

**ТЕХНОЛОШКО-МЕТАЛУРШКИ
ФАКУЛТЕТ**

35/203
(Број захтева)
21.06.2019.
(датум)

**Образац 2
УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
ВЕЋЕ НАУЧНИХ ОБЛАСТИ ТЕХНИЧКИХ
НАУКА**

(назив већа научне области коме се захтев упућује)

Београд, Студентски трг бр. 1

ЗАХТЕВ

за давање сагласности на реферат о урађеној докторској дисертацији

Молимо да, сходно члану 47. ст. 5. тачка 4. Статута Универзитета у Београду (“Гласник Универзитета у Београду” број 162/11, пречишћен текст, 167/12, 172/13 и 178/14), дате сагласност на реферат о урађеној докторској дисертацији кандидата:

АНЕ (Драгослав) МИЛИВОЈЕВИЋ, мастер инжењера технологије

КАНДИДАТ: **Ана Миливојевић** пријавила је докторску дисертацију под називом:

„Ензимска синтеза естара флавоноида и контролисано отпуштање из козметичких формулација“

Из научне области: **ТЕХНОЛОШКО ИНЖЕЊЕРСТВО**

Универзитет је дана **30.10.2017.** године, својим актом **61206-4337/2-17**, дао сагласност на предлог теме докторске дисертације која је гласила:

„Ензимска синтеза естара флавоноида и контролисано отпуштање из козметичких формулација“

Комисија за оцену и одбрану докторске дисертације кандидата **Ане Миливојевић** образована је на седници Наставно-научног већа одржаној **07.03.2019.** године Одлуком Факултета под бр. **35/75.** у саставу:

Име и презиме	Звање	Научна област
1. Др Дејан Безбрадица	Редовни професор	Биохемијско инжењерство и биотехнологија
2. Др Рада Пјановић	Ванредни професор	Хемијско инжењерство
3. Др Зорица Кнежевић-Југовић	Редовни професор	Биохемијско инжењерство и биотехнологија
4. Др Марија Ћоровић	Научни сарадник	Биохемијско инжењерство и биотехнологија
5. Др Мирјана Антов	Редовни професор	Биохемијско инжењерство

Студен је уписан на докторске студије шк. 2013/2014. године.

Наставно-научно веће Факултета прихватило је реферат Комисије за оцену и одбрану докторске дисертације на седници одржаној дана **30.05.2019.** године.

ДЕКАН ФАКУЛТЕТА

Проф. др Петар Ускоковић

На основу чл. 40. став 3. Закона о високом образовању, чл. 112. став 3. Статута Универзитета у Београду, чл. 88. став 3. Статута ТМФ-а и чл. 39. Правилника о докторским студијама ТМФ, на седници Наставно-научног већа Технолошко-металуршког факултета од 30.05.2019. године, донета је

О Д Л У К А

о прихватању Реферата о оцени докторске дисертације

Прихвата се Реферат Комисије у саставу: др Дејан Безбрадица, редовни професор Универзитета у Београду, Технолошко-металуршки факултет, др Рада Пјановић, ванредни професор Универзитета у Београду, Технолошко-металуршки факултет, др Зорица Кнежевић-Југовић, редовни професор Универзитета у Београду, Технолошко-металуршки факултет, др Марија Ћоровић, научни сарадник Универзитета у Београду, Технолошко-металуршки факултет, др Мирјана Антов, редовни професор Универзитета у Новом Саду, Технолошки факултет, о прегледу и оцени урађене докторске дисертације под називом: **„Ензимска синтеза естара флавоноида и контролисано отпуштање из козметичких формулација“** коју је поднела **АНА МИЛИВОЈЕВИЋ** (рођене Милисављевић) мастер инжењер технологије и упућује се на сагласност Већу научних области техничких наука Универзитета у Београду.

Веће научних области техничких наука Универзитета у Београду дало је сагласност на предлог теме докторске дисертације Ане Миливојевић, под називом **„Ензимска синтеза естара флавоноида и контролисано отпуштање из козметичких формулација“** Одлуком број: 61206-4337/2-17 од 30.10.2017. године.

Верификација научних доприноса:

Категорија M21:

1. **Milivojević, A.**, Ćorović, M., Simović, M., Banjanac, K., Blagojević, S., Pjanović, R., Bezbradica, D.: Novel Approach for Flavonoid Esters Production: Statistically Optimized Enzymatic Synthesis Using Natural Oils and Application in Cosmetics, - *Industrial & Engineering Chemistry Research* vol. 58, no. 9, pp. 3640-3649, 2019 (**IF=3,141**) (ISSN 0888-5885).
2. **Milivojević, A.**, Ćorović, M., Carević, M., Banjanac, K., Vujisić, Lj., Veličković, D., Bezbradica, D.: Highly efficient enzymatic acetylation of flavonoids: Development of solvent-free process and kinetic evaluation, - *Biochemical Engineering Journal*, vol. 128, no. 1, pp. 106-115, 2017 (**IF=2,892**) (ISSN 1369-703X).
3. **Milislavić, 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 & Engineering Chemistry Research*, vol. 53, no. 43, pp. 16644–16651, 2014 (**IF=2,587**) (ISSN 0888-5885).

Докторска дисертација и реферат о оцени докторске дисертације достављају се на увид јавности, а по истеку рока од 30 дана, на сагласност Већу научних области техничких наука Универзитета у Београду.

Одлуку доставити: Већу научних области техничких наука Универзитета, ментору, Служби за наставно-студентске послове, Библиотеци и Архиви факултета.

Д Е К А Н

Проф. др Петар Ускоковић

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ

Предмет: Реферат о урађеној докторској дисертацији кандидата **Ане Миливојевић (рођене Милисављевић)**, мастер инж. технологије.

Одлуком бр. 35/75 од 07.03.2019. године, именовани смо за чланове Комисије за преглед, оцену и одбрану докторске дисертације кандидата Ане Миливојевић под насловом

Ензимска синтеза естара флавоноида и контролисано отпуштање из козметичких формулација

После прегледа достављене Дисертације и других пратећих материјала и разговора са Кандидатом, Комисија је сачинила следећи

РЕФЕРАТ

1. УВОД

1.1. Хронологија одобравања и израде дисертације

01.10.2013. - Кандидат Ана Миливојевић, мастер. инж. технологије уписала је докторске академске студије на Катедри за биохемијско инжењерство и биотехнологију.

01.06.2017. - Кандидат Ана Миливојевић, мастер инж. технологије предложила је тему докторске дисертације под називом: „Ензимска синтеза естара флавоноида и контролисано отпуштање из козметичких формулација“, а Наставно-научно веће Технолошко-металуршког факултета у Београду усвојило је Комисију за оцену научне заснованости предложене теме.

21.09.2017. - На седници Наставно-научног већа Технолошко-металуршког факултета, на основу поднетог Реферата Комисије, донета је Одлука о прихватању предлога теме докторске дисертације Ана Миливојевић, мастер инж. технологије под називом „Ензимска синтеза естара флавоноида и контролисано отпуштање из козметичких формулација“, а за менторе ове докторске дисертације именовани су др Дејан Безбрадица, редовни професор ТМФ-а и др Рада Пјановић, ванредни професор ТМФ-а.

30.10.2017. - На седници Већа научних области техничких наука Универзитета у Београду дата је сагласност на предлог теме докторске дисертације Ана Миливојевић, мастер инж. технологије под називом „Ензимска синтеза естара флавоноида и контролисано отпуштање из козметичких формулација“.

07.03.2019. - На седници Наставно-научног већа Технолошко-металуршког факултета донета је Одлука о именовању Комисије за оцену и одбрану докторске дисертације Ана Миливојевић, мастер инж. технологије под називом „Ензимска синтеза естара флавоноида и контролисано отпуштање из козметичких формулација“.

1.2. Научна област дисертације

Истраживања у оквиру ове дисертације припадају научној области Технолошко инжењерство (ужа научна област Биохемијско инжењерство и биотехнологија) за коју је матична установа Технолошко-металуршки факултет Универзитета у Београду. За менторе су изабрани др Дејан Безбрадица, редовни професор ТМФ-а и др Рада Пјановић, ванредни професор ТМФ-а, који су на основу објављених публикација и искустава компетентни да руководе израдом ове докторске дисертације.

1.3. Биографски подаци о кандидату

Ана Миливојевић (рођ. Милисављевић), мастер инжењер технологије, рођена је 16. априла 1989. године у Краљеву. Основну школу и гимназију завршила је у Краљеву. Основне академске студије на Технолошко-металуршком факултету (смер Биохемијско инжењерство и биотехнологија) Универзитета у Београду уписала је 2008. године. Дипломирала је на истом факултету 2012. године са оценом 10 (десет) и просечном оценом у току студија 9,85. Током студија постизала је одличне резултате због којих је награђивана наградом „Панта С. Тутунџић“ за постигнут изузетан успех. У периоду од 6. августа до 30. септембра 2012. године похађала је IAESTE праксу на Данском Техничком Универзитету, Национални институт хране, Лингби, Копенхаген. Мастер академске студије уписала је 2012. године на Технолошко-металуршком факултету (смер Биохемијско инжењерство и биотехнологија) Универзитета у Београду. Мастер рад је одбранила 2013. године са оценом 10 (десет) и просечном оценом током мастер студија, 10,00. Докторске академске студије, на Катедри за биохемијско инжењерство и биотехнологију Технолошко-металуршког факултета Универзитета у Београду, уписала је 2013. године. У периоду од априла 2014. до фебруара 2018. године била је стипендиста Министарства просвете, науке и технолошког развоја на пројекту "Развој нових инкапсулационих и ензимских технологија за производњу биокатализатора и биолошки активних компонената хране у циљу повећања њене конкурентности, квалитета и безбедности" ев. бр. ИИИИ 46010. У јулу 2015. године изабрана је у звање истраживач-сарадник, а поново изабрана у јулу 2018. године. Од фебруара 2018. године запослена је на Иновационом центру Технолошко-металуршког факултета у звању истраживач-сарадник на пројекту „Примена биотехнолошких метода у одрживом искоришћењу нус-производа агроиндустрије“ (ев. бр. ТР 31035). Од септембра 2017. године ангажована је у настави на студијском програму Биохемијско инжењерство и биотехнологија на лабораторијским вежбама из предмета Биотехнолошки практикум 1. Коаутор је 12 (дванаест) радова у међународним часописима (један М21а, седам М21, два М22, и два М24), 2 (два) рада у часописима националног значаја и 8 (осам) саопштења на домаћим и међународним скуповима (пет М33 и три М34).

Положила је све испите предвиђене планом и програм докторских студија Технолошко-металуршког факултета са просечном оценом 10,00, укључујући и завршни испит.

2. ОПИС ДИСЕРТАЦИЈЕ

2.1. Садржај дисертације

Докторска дисертација Ане Миливојевић написана је на 268 страна, са укупно 6 поглавља и Прилогом 1, 105 слика (94 у тексту и 11 у Прилогу 1), 38 табела и 232 литературних навода. Докторска дисертација састоји се из следећих поглавља: Увод, Теоријски део, Експериментални део, Резултати и дискусија, Закључак и Литература, уз изводе на српском и енглеском језику. На крају дисертације дата је биографија кандидата, као и потписане изјаве о ауторству, истовестности електронске и штампане верзије докторског рада и о коришћењу.

2.2. Кратак приказ појединачних поглавља

У **Уводу** дисертације описана су физиолошка својства флавоноида и указано је на неопходност структурне модификације ових молекула у циљу проширења поља примене у храни и козметици. Дат је осврт на могућност ензимске синтезе липофилних деривата флавоноида, применом липаза као биокатализатора, са циљем добијања биоактивних молекула веће стабилности и растворљивости у липофилним срединама. На крају поглавља представљени су циљеви рада и план истраживања.

У **Теоријском делу** дисертације дат је детаљни преглед литературе о хемијској структури, класификацији и биолошким својствима флавоноида. Наведене су основне особине, структура и механизам деловања липаза, са акцентом на липазу типа В из *Candida antarctica* као најчешће коришћеног биокатализатора у реакцији синтезе флавоноид естара карбоксилних киселина. Такође, указано је на предности примене имобилисаних ензима и описане су основне методе имобилизације. На основу доступне научне литературе дат је увид у тренутно стање у области примене липаза у реакцији ациловања флавоноида, наведени су најбитнији резултати досадашњих истраживања која су се бавила овом тематиком, описујући различите приступе синтези естара и анализирајући утицај кључних реакционих фактора на принос производа. Представљен је актуелни и потенцијални комерцијални значај естара флавоноида за примену у прехранбеној, фармацеутској и козметичкој индустрији. С обзиром на примену синтетисаних естара у козметици, у последњем поглављу теоријског дела указано је на трансдермални пренос биоактивних компоненти и улогу коже као основне баријере. На основу доступне литературе описани су потенцијални путеви трансдермалног преноса биоактивних компоненти, као и физичкохемијска својства супстанци која битно одређују сам механизам преноса. Имајући у виду да се за топикалну примену биоактивних једињења активне компоненте обично инкорпорирају у одређене носаче/формулације, у овом делу наведене су и карактеристике различитих типова емулзија као најчешће коришћених козметичких формулација и липозома као система за контролисано отпуштање. На крају теоријског дела дат је преглед научне литературе о математичким моделима који су коришћени за одређивање коефицијената дифузије биоактивних компонената.

Експериментални део се састоји из два поглавља: Материјали и Методе. У првом поглављу наведени су материјали и опрема коришћени у току израде ове дисертације, док су у другом поглављу хронолошки наведене методе и услови коришћени у току експерименталног рада, моделовања и обраде резултата. Прво је описан поступак синтезе естара флавоноида катализоване имобилисаном липазом. Затим је описан поступак квантитативне анализе различитих узорака, процес њиховог пречишћавања и начин извођења спектралних анализа. Након тога описан начин статистичког планирања експеримената применом централног композитног ротатабилног плана и анализе резултата методом одзивних површина. Даље су приказане методе примењиване за имобилизацију липазе на различите носаче, као и начини карактеризације добијених имобилисаних препарата путем одређивања њихове хидролитичке активности и увтрђивања садржаја протеина у смеси након имобилизације. Такође, представљен је поступак одређивања антиоксидативног дејства естара флоридзина и различитих карбоксилних киселина. У оквиру овог дела описане су методе припреме липозома и различитих козметичких формулација са инкорпорираним естрима флавоноида. Такође, детаљно је описан поступак извођења дифузионих експеримената којима је праћен трансдермални пренос естара флавоноида. На крају овог поглавља описане су методе карактеризација припремљених козметичких формулација: одређивање стабилности, испитивање ефекта хидратације, иритабилности и дерматолошке компатибилности.

Поглавље **Резултати и дискусија** обухвата приказ резултата добијених у експерименталном раду при изради ове дисертације, њихову анализу и дискусију која укључује поређење добијених резултата са резултатима научних радова који се баве сличном тематиком. Ово

поглавље састоји се из пет целина: Ензимска синтеза естара флавоноида са масним киселинама као ацил-донорима, Примена алтернативних ацил-донора у реакцији синтезе естара флавоноида, Имобилизације липазе типа В из *S. antarctica*, Инкорпорирање естара флавоноида у козметичке формулације и праћење њихове дифузије и Карактеризација козметичких формулација са инкорпорираним естрима флавоноида.

У **првом поглављу** испитана је ензимска естерификација три структурно различита флавоноида (флоридзина, нарингина и ескулина) коришћењем олеинске киселине као ацил-донора и липазе из *S. antarctica* као биокатализатора. Синтеза флоридзин-олеата је оптимизована применом статистичких метода планирања и методе одзивних површина, а структура синтетисаног производа пречишћеног семипрепаративном течноом хроматографијом високих перформанси је доказана NMR спектроскопском анализом. Такође, испитан је утицај дужине ланца (C_2 - C_{18}) и степена незасићености карбоксилне киселине на принос производа, као и на антиоксидативну активност естара. Након тога оптимизована је естерификација друга два флавоноида, нарингина и ескулина, испитивањем утицаја концентрације ацил-акцептора и молског односа супстрата као два фактора која су показала највећи утицај на принос синтетисаног производа. У **другом поглављу** примена различитих алтернативних ацил-донора у реакцији естерификације флавоноида је испитана. Тако су за синтезу флавоноид-ацетата, поред сирћетне киселине испитани још и анхидрид сирћетне киселине и триацетин, док су за синтезу естара виших масних киселина испитана различита природна, биљна уља као што су кокосово, ланено и сунцокретово уље. Реакција ацетиловања флоридзина применом триацетина као ацетил-донора у систему без растварача је оптимизована. Коришћењем COPASI програма испитана је кинетика реакције ацетиловања флавоноида, постављен је кинетички модел реакције на основу којег су одређене све кинетичке константе. Са друге стране, реакција трансестерификације три флавоноида применом биљних уља је испитана и извршена је анализа добијених производа применом течне хроматографије високих перформанси спрегнуте са масеном спектрометријом (HPLC-MS). Кључни реакциони параметри реакције трансестерификације ескулина са ланеним уљем су оптимизовани, а добијени оптимални услови су примењени и у реакцији трансестерификације коришћењем преостала два уља. У **трећем поглављу** фокус је био на развијању ефикасних и јефтиних имобилисаних препарата, који би касније били успешно примењени у реакцији синтезе естара флавоноида. Испитан је велики број различитих типова LifeTech™ носача за имобилизацију, при чему је испробано неколико метода за имобилизацију ензима. Имобилизација ензима на три одабрана носача је оптимизована и имобилисани препарати су окарактерисани са аспекта своје хидролитичке активности, тестирани у реакцији естерификације флавоноида и одређена је њихова оперативна стабилност током 15 циклуса реакције. Поред тога, испитана је и естерификациона активност одабраних, најактивнијих препарата имобилисане CAL В на различите модификоване и немодификоване носаче, чији је поступак имобилизације претходно оптимизован на Катедри за биохемијско инжењерство и биотехнологију. У **четвртном поглављу** анализирана је могућност инкорпорирања естара флавоноида у велики број различитих козметичких формулација (емулзије уље у води, емулзије гел у уљу, гел-емулзије, емулзије уље у води са структуром течних кристала, липозоме инкорпориране у гелу) и праћена је кинетике отпуштања естара. Коришћењем стандардне Францове ћелије, у прелиминарним експериментима праћена је кинетика отпуштања естара флавоноида кроз целулозноацетатну мембрану како из концентроване смеше естара тако и из различитих козметичких формулација. Након тога, испитана је дифузија одабраних естара из најпогоднијих козметичких формулација у систему са синтетском мембраном (Strat-M®) која представља модел систем за трансдермални пренос масе. Добијени експериментални подаци су фитовани у MatLab програму при чему су одређени ефективни коефицијенти дифузије појединачних естара флавоноида. **Последње (пето) поглавље** обухвата карактеризацију различитих козметичких формулација са естрима флавоноида као активним компонентама. Испитана је стабилност припремљених емулзија, њихов утицај на хидратацију коже, а и процењен је и

степен иритабилности и дерматолошка компатибилност након топикалне примене. Као систем за поређење коришћене су емулзије са изопропил-миристатом и каприлно-капринским триглицеридима, као стандардним, најчешће коришћеним емолиентима.

У поглављу **Закључак** јасно и прегледно су изнети закључци изведени на основу резултата представљених у претходним поглављима који су у сагласности са постављеним циљевима рада.

На крају дисертације дат је списак коришћене литературе.

3. ОЦЕНА ДИСЕРТАЦИЈЕ

3.1. Савременост и оригиналност

Флавоноиди, секундарни метаболити виших биљака, су велика група полифенолних једињења који поседују низ значајних физиолошких ефеката, као што су антибактеријско, антивирусно, антиинфламаторно, антиалергијско дејство, затим инхибирају пероксидацију липида, агрегацију тромбоцита, као и активност неких ензимских система. С обзиром на широки спектар биолошких функција ових једињења и њихов повољни утицај на здравље људи, све више расте интересовање за ову групу једињења као потенцијално функционалних молекула за развој оптималних биоактивних деривата. Ипак, 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 примењује дериватизација ових једињења 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 у литератури је описана реакција ациловања као веома значајан поступак за структурну и функционалну модификацију флавоноида. Међутим, утицај кључних експерименталних фактора (концентрације ензима, температуре, концентрације флавоноида, молског односа супстрата и времена трајања реакције) на принос производа и међусобне интеракције ових фактора, нису детаљно испитани. Прегледом научне периодике установљено је да се већина испитаних реакција естерификације флавоноида изводи применом чистих масних киселина или њихових винил-естара као ацил-донора, док алтернативни, јефтинији супстрати нису испитани. Већина досадашњих истраживања била је фокусирана на синтезу естара флавоноида помоћу постојећих комерцијалних ензимских препарата, најчешће Novozym[®] 435. Ипак за ширу комерцијалну употребу естара флавоноида неопходно је и да се смање трошкови постојећих процеса применом ефикаснијих метода и носача за имобилизацију ензима, па је велики број савремених истраживања усмерен на развој нових имобилизованих биокатализатора.

Када је реч о примени естара флавоноида као биоактивних компоненти различитих козметичких производа, неколико поступака је патентирано. Међутим, подаци о испитивању трансдермалног преноса ових једињења, као и подаци о њиховом дерматолошком утицају након топикалне примене нису детаљно испитани.

На основу свега наведеног, у циљу унапређења синтезе естара флавоноида и повећања економске одрживости производног поступка на почетку рада је изведена детаљна оптимизација процеса синтезе. Статистичко планирање експеримената и анализа резултата применом методе одзивних површина даје увид у појединачни и интерактивни ефекат варијаних параметара, што ће омогућити добијање максималних приноса производа уз што мањи утрошак ензима. Наредни циљ истраживања ове дисертације је проналажење алтернативних, јефтинијих ацил-донора који обезбеђују већу економичност производног поступка и/или повећану ефикасност. С тим у вези, изабрано је неколико ацил-донора са циљем да се обухвати што већи број масних киселина, последишно и финалних производа. Па тако, за синтезу флавоноид-ацетата, као алтернативни супстрати су испитани анхидрид

сирћетне киселине и триацетин, док су за синтезу естара виших масних киселина као ацил-донори испитана различита биљна уља, као што су кокосово, ланено и сунцокретово уље. Након тога је истраживање усмерено на развој нових имобилисаних биокатализатора погодних за ефикасну и економичну производњу флавоноид естара карбоксилних киселина. Имобилисани препарати највећег потенцијала су испитани у реакцији естерификације и одређена је њихова оперативна стабилност током извођења консекутивних реакција.

У циљу испитивања да ли и у којој мери, након топикалне примене, естри флавоноида могу продрићи у дубље слојеве коже, испитана је дифузија естара флавоноида из различитих козметичких формулација кроз синтетску Strat-M[®] мембрану која је по структури слична структури људске коже и користи се за симулацију трансдермалног преноса. Треба нагласити да ће након уклањања растварача и биокатализатора, целокупне реакционе смеше које садрже смеше естара, непрореаговало уље, као и моно- и диглицериде бити коришћене за припрему различитих емулзија. Овакав поступак додатно доприноси економичности самог производног процеса. У последњој фази истраживања фокус је био на испитивању могућности комерцијалне примене различитих козметичких формулација чије активне компоненте представљају естри флавоноида добијени у реакцији са одабраним биљним уљима. С тим у вези, процењена је стабилност припремљених емулзија и испитан њихов утицај на кожу након топикалне примене, ефекат хидратације и степен иритабилности.

3.2. Осврт на референтну и коришћену литературу

У оквиру ове докторске дисертације цитирана су 232 литературна навода који су омогућили да се представи стање у испитиваној научној области, али и да се сагледа актуелност проблематике. Савремена истраживања публикована у реномираним научним часописима су приказана, анализирана и дискутована и изведени су закључци који су дали добар увид у поступак ензимске естерификације флавоноида и примену синтетисаних естара у козметичким препаратима. Овако направљен преглед и анализа актуелне научне периодике послужио је као основ за истраживања која су спроведена у овој докторској дисертацији. Преглед литературе која је коришћена у току истраживања, образложење предложене теме дисертације и објављени радови кандидата наведени у пријави, указују на одлично познавање области истраживања и актуелног стања истраживања у овој конкретној области.

3.3. Опис и адекватност примењених научних метода

Сви резултати приказани у овој докторској дисертацији су доказани применом одговарајућих експерименталних техника и савремених аналитичких инструменталних метода према оригиналним или модификованим методама из литературе, као и адекватном анализом и обрадом података.

Синтеза естара флавоноида извођена је у шаржном систему, у термостату са орбиталним мешањем, под дефинисаним реакционим условима. Узорци су анализирани и пречишћавани применом савремених RP-HPLC анализа под оптимизованим условима елуције, док је доказивање производа вршено одређивањем NMR спектра. У току рада, у циљу оптимизације најважнијих процесних параметара, два пута је коришћена метода статистичког планирања експеримената, која се заснива на истовременој промени већег броја параметара, али у складу са претходно одабраним експерименталним планом што омогућава поузданију оптимизацију процесних параметара у ширем интервалу уз значајно смањење броја експеримената. Поред тога, статистички метод омогућава добијање одговарајућих математичких модела на основу којих може да се предвиди понашање система у зависности од процесних параметара и омогући поуздана контрола и регулација процеса. Вишепараметарска анализа добијених резултата извршена је коришћењем статистичког и математичког програмског пакета MATLAB 7.0. За испитивање антиоксидативног дејства флоридзин-естара коришћена је спектрофотометријска метода заснована на способности

једињења да редукује стабилни љубичасто обојени 2,2-дифенил-1-пикрилхидразил-радикал (DPPH) прихватањем једног електрона. COPASI софтвер (верзија 4.16) коришћен је за испитивање кинетике реакције ацетиловања флавоноида триацетином у систему без растварача. Кинетички параметри за претпостављени модел су одређени применом нелинеарне регресионе анализе коришћењем генетичког логаритма у оквиру пакета COPASI софтвера. За валидацију експерименталних података, временска симулација модела је спроведена применом детерминистичког LSODA програма у оквиру COPASI пакета. Реверзно-фазна течна хроматографија високих перформанси спрегнута са масеном спектрометријом (HPLC-MS) коришћена је у циљу идентификације производа реакције трансестерификације.

За имобилизацију липазе на различите носаче примењене су методе описане у литератури, као и оригиналне процедуре оптимизоване у оквиру експерименталног рада. За анализу узорака примењивана је стандардна метода одређивања хидролитичке активности у реакцији разградње *p*-нитрофенилбутирата, а концентрација протеина мерена је методом по Бредфорду (Bradford). Оперативна стабилност имобилисаних биокатализатора одређивана је применом у консекутивним реакционим циклусима под дефинисаним условима.

Припрема различитих козметичких формулација изведена је коришћењем метода прилагођених типу емулзије и природи емулгатора. Дифузиони експерименти извођени су применом стандардне Францове ћелије, а анализа узорака вршена је применом HPLC уређаја. За одређивање коефицијената дифузије, експериментални резултати су фитовани коришћењем различитих кинетичких модела у MATLAB 7.0 програму.

Испитивање стабилности емулзија, ефекта хидратације, иритабилности и дерматолошке компатибилности извођено је применом стандардних метода описаних у литератури и коришћењем уређаја Zetasizer Nano ZS, Aquaflux Biox System Ltd и Kjeldahl Analyzer.

3.4. Применљивост остварених резултата

На основу прегледа литературних података и експерименталних резултата приказаних у оквиру ове дисертације, остварен је значајан допринос у развоју економичног поступка синтезе естара представника различитих класа флавоноида, као и допринос проширењу поља примене синтетисаних естара у различитим козметичким препаратима. Примена статистичког планирања експеримената и анализе резултата методом одзивних површина омогућила је сагледавање интерактивних дејстава између кључних параметара процеса. Оптимизацијом реакционих услова, биоактивни липофилни деривати флавоноида су синтетисани у високом приносу коришћењем како чистих масних киселина, тако и различитих алтернативних, јефтинијих супстрата као ацил-донора. Триацетин се показао као одговарајући супстрат за одигравање реакције ацетиловања у еколошки прихватљивом систему без растварача. Опсежна кинетичка студија реакције ацетиловања је резултирала моделима који дају увид у механизам одигравања реакције што је јако битно за увећање размера и контролу биокаталитичких процеса. Са друге стране, различита биљна уља, као што су кокосово, ланено и сунцокретоно уље, су се показала као веома добра, јефтинија алтернатива чистим масним киселинама у реакцији естерификације флавоноида. Развијен је нови приступ примене природних биоизвора у реакцији трансестерификације структурно различитих молекула флавоноида, при чему настаје широк спектар производа, чије је поље примене проширено како у прехранбеној, тако и у козметичкој индустрији. Корак ка повећању економичности процеса начињен је развојем метода имобилизације при чему су добијени препарати повећаног афинитета према реакцији естерификације, а који при томе показују изузетну оперативну стабилност у поменутој реакцији. Завршна фаза дисертације има највећи апликативни значај, с обзиром да је развијен приступ примене смеше естара флавоноида у различитим козметичким препаратима, испитана је кинетика трансдермалног преноса и одређени су коефицијенти дифузије појединачних естара. Поред тога, показано је да се смеше естара инкорпориране у форми гел-емулзија могу успешно применити у

козметичким препаратима, имајући у виду одличан ефекат хидратације, неиритирајући карактер и свеукупну дерматолошку компатибилност примењених козметичких формулација.

3.5. Оцена достигнутих способности кандидата за самостални научни рад

Кандидат Ана Миливојевић, мастер инжењер технологије, током израде своје докторске дисертације испољила је изузетну стручност у реализацији експеримената и коришћењу различитих експерименталних техника и инструменталних метода, а при анализи резултата је показала самосталност, систематичност и креативност. Кандидат има изузетну склоност ка експерименталном раду и инжењерски приступ у развоју и реализацији нових производа. На основу досадашњег залагања и постигнутих резултата Комисија је мишљења да кандидат поседује све квалитете неопходне за самостални научно-истраживачки рад.

4. ОСТВАРЕНИ НАУЧНИ ДОПРИНОС

4.1. Приказ остварених научних доприноса

- Естерификација флоридзина коришћењем олеинске киселине као ацил-донора и Novozym[®] 435 као биокатализатора је оптимизована применом статистичких метода планирања и уочено је да се оптимизацијом заснованом на специфичном приносу производа даје много бољи увид у продуктивност самог ензимског процеса. У овој докторској дисертацији остварен је принос од 5,45 mmol/g_{ензима}, што је јако добар резултат у поређењу са литературним подацима. Поред тога, иако је познато да су за употребу липаза у реакцијама естерификације пожељнији хидрофобнији растварачи, истраживање је показало да је ацетонитрил најпогоднији реакциони медијум за реакцију синтезе естара флоридзина, док је производ реакције детектован у траговима у изооктану и додекану.
- Испитан је утицај дужине ланца (C₂-C₁₈) као и степена незасићености карбоксилне киселине на синтезу естара флоридзина, показано је да су све испитане киселине добри супстрати за реакцију синтезе (степен конверзије преко 70 %), али да CAL В показује највећи афинитет ка масним киселинама са више од 6 C атома.
- Установљено је да оптималне вредности реакционих параметара ензимске синтезе естара различитих флавоноида јако зависе од врсте примењеног ацил-акцептора и да концентрација флавоноида и молски однос супстрата имају највише утицаја на синтезу липофилних деривата.
- Реакција синтезе флоридзин-ацетата се успешно може извести у систему без растварача, у којем триацетин има улогу и ацил-донора и растварача, при чему настају два производа реакције флоридзин-6"-О-ацетат и флоридзин-3",6"-О-диацетат. Дефинисан је кинетички модел реакције ацетиловања и установљено је да се процес може описати двостепеном моносупстратном реакцијом у којој су оба ступња реакције адекватно описана реверзибилном Михаелис-Ментеновом кинетиком. Претпостављени модел је показао добро слагање не само у почетним временима, већ и током дужег реакционог периода.
- Биљна уља (кокосово, ланено и сунцокретово уље) успешно су примењена у реакцији естерификације три структурно различита флавоноида, флоридзина, нарингина и ескулина (степен конверзије > 65 %). Применом ових алтернативних ацил-донора омогућена је синтеза смеше естара флавоноида различитих масних киселина у једном кораку реакције при значајном смањењу укупних трошкова самог поступка. Синтеза естара ескулина у реакцији са ланеним уљем је оптимизована применом статистичких метода планирања и добијени оптимални услови су успешно примењени и у реакцији синтезе естара ескулина коришћењем друга два уља.

- Коришћена уља су честе компоненте различитих козметичких производа, а производи њихове делимичне разградње (моноглицериди и диглицериди) поседују веома корисна емулгујућа својства. Због тога, након уклањања растварача и биокатализатора, смеше естара су директно коришћене за припрему различитих формулација, чиме је развијен нови, економичнији приступ припреме различитих врста козметичких препарата са емолијентима на бази природних уља.
- Имобилизација липазе продуцента *C. antarctica* успешно је изведена на више носача различитих карактеристика (порозност, хидрофобност, присуство функционалних група) посредством различитих механизма везивања (адсорпцијом или ковалентном имобилизацијом). Процес имобилизације липазе на три одабрана носача са аминоксис (ECR 8409F), октадецил (ECR 8806M) и епокси (ECR 8285F) функционалним групама је оптимизован, а CAL В имобилисана на носач са октадецил и носач са епокси функционалним групама је показала веома добру естерификациону активност и одличну оперативну стабилност током 15 циклуса реакција синтезе естара три различита флавоноида.
- Смеша моно- и диацетата флоридзина добијених у реакцији са триацетином успешно је инкорпорирана у различите козметичке формулације и липозоме као системе за контролисано отпуштање и након *in vitro* анализе трансдермалног преноса применом strat-M мембране показано је да формулације у којима је вода континуална фаза представљају погодније носаче ових естара и омогућавају бржи трансдермални пренос.
- Када је реч о трансдермалном преносу естара нарингина и флоридзина добијених у реакцији са кокосовим и ланеним уљем из гел-емулзија, у свим експериментима установљено да до преноса компоненте долази са закашњењем (*lag* фаза) и да пренос компоненте зависи како од саме дифузије тако и од релаксације полимера ($0,5 < n < 1$). Ефективни коефицијенти дифузије естара опадају са повећањем броја C атома и са смањењем броја двоструких веза у маснокиселинском ланцу. Показано је да естри флоридзина добијени у реакцији и са кокосовим и са ланеним уљем брже дифундују из испитаних гел-емулзија кроз мембрану која представља модел систем трансдермалног преноса у односу на одговарајуће естре нарингина.
- Поређењем дифузионих карактеристика естара флоридзина добијених отпуштањем из различитих формулација кроз strat-M мембрану установљено је да естри најбрже дифундују из гел-емулзије, емулзије уље у води и на крају из емулзије гел у уљу, чиме је још једном потврђено да су за пренос естара флавоноида погодније формулације у којима је вода континуална фаза.
- Козметичке формулације припремљене са естрима флавоноида добијеним у реакцији са биљним уљима су показале веома добру стабилност током 60 дана складиштења. Поред тога, припремљене смеше естара се након уклањања биокатализатора и растварача, могу успешно применити на кожи у форми гел-емулзија, с обзиром да је показан одличан ефекат хидратације, неиритирајући карактер и свеукупна дерматолошка компатибилност примењених козметичких формулација.

4.2. Критичка анализа резултата истраживања

Разматрањем доступне научне литературе из области примене липаза у процесу добијања флавоноид-естара карбоксилних киселина и анализом резултата остварених у оквиру ове докторске дисертације, уочава се да је примењена методологија омогућила оптимизацију кључних параметара процеса и примену некомерцијалних имобилисаних ензима чиме је ефикасност и економичност поступка вишеструко повећана. Поред тога, у овој дисертацији представљена је могућност коришћења алтернативних, јефтинијих ацил-донора, као што су триацетин за синтезу флавоноид-ацетата и различитих биљних уља за синтезу естара виших масних киселина. Применом триацетина као ацил-донора и растварача омогућила је развој еколошки прихватљивог поступка естерификације флавоноида у системима без органског

растварача. Опсежна кинетичка студија која је дала увид у механизам одигравања реакције ацетиловања је од несумњивог научног значаја за даљи развој биопроцеса. Поред тога, нарочито значајан корак ка одрживости процеса и практичној примени поступка начињен је коришћењем лако доступних биљних уља као ацил-донора, с обзиром да је развијен нови приступ примене природних биоизвора у реакцији трансестерификације структурно различитих молекула флавоноида. На овај начин настаје широк спектар производа, чије је поље примене проширено како у прехранбеној, тако и у козметичкој индустрији, а осим тога, овакав поступак доводи до смањења укупних трошкова, што је веома важно за даљи развој самог процеса. Од нарочитог је значаја што је потврђена примена овако синтетисаних естара флавоноида у различитим козметичким формулацијама. Такође, одређивање кинетике трансдермалног преноса појединачних естара даје значајан научни допринос за даљу примену ових биоактивних компоненти у козметичкој индустрији, а посебно имајући у виду и чињеницу да је у овој докторској дисертацији потврђена свеукупна дерматолошка компатибилност примењених козметичких формулација са инкорпорираним естрима флавоноида.

4.3. Верификација научних доприноса

Кандидат Ана Миливојевић је резултате истраживања добијене у оквиру израде своје докторске дисертације потврдила објављивањем радова у часописима међународног значаја и саопштењима на међународним и националним скуповима. Резултати истраживања проистекли из ове дисертације објављени су до сада у оквиру три рада у научним часописима међународног значаја (три M21) и два саопштења на међународним и националним скуповима (један M33 и један M34). Кандидат се током израде дисертације бавио истраживачким радом у оквиру уже научне области биохемијског инжењерства и биотехнологије у оквиру којих је коаутор још девет радова у часописима међународног значаја и осам саопштења на скуповима међународног или националног значаја.

Научни радови који су део дисертације:

Категорија M21:

1. **Milivojević, A., Ćorović, M., Simović, M., Banjanac, K., Blagojević, S., Pjanović, R., Bezbradica, D.:** Novel Approach for Flavonoid Esters Production: Statistically Optimized Enzymatic Synthesis Using Natural Oils and Application in Cosmetics, - *Industrial & Engineering Chemistry Research* vol. 58, no. 9, pp. 3640-3649, 2019 (**IF=3,141**) (ISSN 0888-5885).
2. **Milivojević, A., Ćorović, M., Carević, M., Banjanac, K., Vujisić, Lj., Veličković, D., Bezbradica, D.:** Highly efficient enzymatic acetylation of flavonoids: Development of solvent-free process and kinetic evaluation, - *Biochemical Engineering Journal*, vol. 128, no. 1, pp. 106-115, 2017 (**IF=2,892**) (ISSN 1369-703X).
3. **Milislavljević, 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 & Engineering Chemistry Research*, vol. 53, no. 43, pp. 16644–16651, 2014 (**IF=2,587**) (ISSN 0888-5885).

Категорија M33:

4. **Milivojević, A., Ćorović, M., Carević, M., Banjanac, K., Bezbradica, D.:** Effect of different reaction parameters on lipase-catalyzed esterification of naringin and esculin - *XII Conference of Chemists, Technologists and Ecologists of Republic of Srpska*, 2018, Teslić, pp. 312 - 318 (ISBN 978-99938-54-74-6).

Категорија M34:

5. **Milislavljević, A., Stojanović, M., Dinić, I., Carević, M., Mihailović, M., Milosavić, N., Bezbradica, D.:** Lipase-catalyzed synthesis of phloridzin esters, *8th International Conference of the Chemical Societies of the South-East European Countries*, 2013, Beograd, F P21.

5. ЗАКЉУЧАК И ПРЕДЛОГ

На основу претходно изнетих разматрања резултата докторске дисертације Ане Миливојевић, мастер инж. технологије под називом „Ензимска синтеза естара флавоноида и контролисано отпуштање из козметичких формулација” сматрамо да су испуњени сви циљеви и задаци рада на овој тези и да она својим садржајем и квалитетом значајно доприноси области Технолошко инжењерство. Оригиналност докторске дисертације потврђена је објављеним радовима у часописима међународног значаја и публиковањем резултата на међународним и националним конференцијама, као и провером оригиналности применом програма iThenticate. Такође, комисија је мишљења да је кандидат испољио изузетну научно-истраживачку способност у свим фазама израде ове докторске дисертације. Комисија предлаже Наставно-научном већу Технолошко-металуршког факултета да се докторска дисертација под називом „Ензимска синтеза естара флавоноида и контролисано отпуштање из козметичких формулација” кандидата Ане Миливојевић прихвати, изложи на увид јавности и упуту на коначно усвајање Већу научних области техничких наука Универзитета у Београду. Такође, да се након завршетка ове процедуре, кандидат позове на усмену одбрану докторске дисертације пред Комисијом у истом саставу.

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ

Др Дејан Безбрадица, редовни 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