

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ

Предмет: Реферат о урађеној докторској дисертацији кандидата Соње Јаковетић Танасковић, дипл. инж. технологије.

Одлуком бр.35/278, од 26.05.2016. именовани смо за чланове Комисије за преглед, оцену и одбрану докторске дисертације кандидата Соње Јаковетић Танасковић под насловом

Ензимска производња естара фенолних киселина

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

26.09.2013. - Кандидат Соња Јаковетић Танасковић, дипл. инж. технологије предложила је тему докторске дисертације под називом: „Ензимска производња естара фенолних киселина“, а Наставно-научно веће Технолошко-металуршког факултета Универзитета у Београду усвојило Комисију за оцену научне заснованости предложене теме.

21.11.2013. - На седници Наставно-научног већа Технолошко-металуршког факултета Универзитета у Београду, на основу поднетог Реферата Комисије, донета је Одлука о прихватању предлога теме докторске дисертације Соње Јаковетић Танасковић, дипл. инж. технологије, под називом „Ензимска производња естара фенолних киселина“, а за ментора ове докторске дисертације именована је др Зорица Кнежевић-Југовић, редовни професор ТМФ-а.

16.12.2013. - На седници Већа научних области техничких наука Универзитета у Београду дата је сагласност на предлог теме докторске дисертације Соње Јаковетић Танасковић, дипл. инж. технологије, под називом „Ензимска производња естара фенолних киселина“.

26.05.2016. - На седници Наставно-научног већа Технолошко-металуршког факултета донета је одлука о именовању Комисије за оцену и одбрану докторске дисертације Соње Јаковетић Танасковић, дипл. инж. технологије, под називом „Ензимска производња естара фенолних киселина“.

Кандидат Соња Јаковетић Танасковић, дипл. инж. технологије уписала је докторске студије на Катедри за Биохемијско инжењерство и биотехнологију (ментор др Зорица Кнежевић-Југовић, ред. проф) 2009/2010. године. Наставно-научно веће одржано 05.06.2015. године

донело је одлуку о продужењу рока за завршетак докторских студија докторанда Соње Јаковетић Танасковић за још два семестра школске 2015/2016. године.

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 ментора је изабрана др Зорица Кнежевић-Југовић, редовни професор ТМФ-а, која је на основу објављених публикација и искуства компетентна да руководи израдом ове докторске дисертације.

1.3. Биографски подаци о кандидату

Соња Јаковетић Танасковић рођена је 11.12.1984. године у Краљеву, где је завршила основну школу "Димитрије Туцовић" и гимназију "Мирко Луковић" и за успехе током школовања награђена је Вуковом дипломом. Студије на Технолошко-металуршком факултету Универзитета у Београду уписала је школске 2003/2004. Током студирања три пута је награђена дипломом Панта С. Тутунцић за изузетан успех на студијама у редовном року. Дипломирала је на ТМФ-у на Катедри за Биохемијско инжењерство и биотехнологију 30.12.2008. са оценом 10 на дипломском раду и просечном оценом 9,72 у току студија. Добитник је и признања Српског хемијског друштва за укупан Изузетан успех у току студирања. Докторске студије на Катедри за Биохемијско инжењерство и биотехнологију под менторством др Зорице Кнежевић-Југовић, ред. проф, уписала је 2009. године. Положила је све испите предвиђене планом и програмом докторских студија са просечном оценом 10,0. Наставно-научно веће одржано 05.06.2014. године донело је одлуку о давању сагласности за продужење рока за завршетак докторских студија докторанда Соње Јаковетић Танасковић за још два семестра.

Од фебруара 2011. године Соња Јаковетић Танасковић је као истраживач-приправник запослена 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. ИИИ 46010, који финансира Министарство науке, просвете и технолошког развоја Републике Србије. Звање истраживача сарадника стиче у јануару 2013. године. Од јула 2013. године до јула 2015. године била је ангажована на заједничком научно-истраживачком пројекту између Републике Србије и Народне Републике Кине, под називом „Примена пољопривредног отпада за производњу ензима“. Од септембра 2013. године ангажована је у настави на студијском програму Биохемијско инжењерство и биотехнологија на лабораторијским вежбама из предмета: Биотехнолошки практикум 1 и Ензимско инжењерство. Од јуна 2014. до јуна 2015. године била је ангажована на иновационом пројекту „Производња нових дијететских формулација на бази природних протеина са антиоксидативним и антитуморским дејством“.

Коаутор је 11 (једанаест) радова у међународним часописима (пет М21, један М22, четири М23 и један М24) и 19 (деветнаест) саопштења на домаћим и међународним скуповима од којих су једанаест штампани у целини (четири М33, седам М64, седам М63, и један М64).

2. ОПИС ДИСЕРТАЦИЈЕ

2.1. Садржај дисертације

Докторска дисертација Соње Јаковетић Танасковић написана је на 185 страна, са укупно 6 поглавља, 101 сликом, 17 табела и 232 литературна 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.

2.2. Кратак приказ појединачних поглавља

У Уводу дисертације дата су основна разматрања о значају фенолних киселина и њихових естара посматрана кроз њихова физиолошка својства и потенцијалну употребу, са освртом на потребу за њиховом липофилизацијом да би им се побољшала физичко-хемијска својстава и/или функционалност. Наиме, мала растворљивост циметне, ферулне, кафене и других фенолних киселина у неполарним срединама ограничава њихову ширу примену у фармацеутској, козметичкој и прехранбеној индустрији. Један од начина да се повећа растворљивост фенолне киселине у неполарним срединама је естерификација киселине алифатичним алкохолима. Познато је да липофилност значајно утиче на биолошку активност супстанци, њихову ресорпцију, расподелу у системима, метаболизам и елиминацију и да се молекули веће липофилности боље ресорбују, и имају већи степен расподеле у односу на мање липофилне молекуле. Акцент је стављен на предности примене ових једињења у односу на комерцијалне синтетске антиоксидансе. Посебна пажња посвећена је предностима ензимске синтезе липофилних фенолних естара, првенствено са еколошког аспекта у односу на стандардне хемијске поступке. На крају поглавља представљени су циљеви рада и план истраживања.

У Теоријском делу описан је значај антиоксиданаса и њихова улога у заштити организма од оксидативног стреса, односно превенцији различитих обољења. Потом је извршена подела антиоксиданаса и истакнут је значај уноса егзогених антиоксиданаса путем исхране и суплемената. У наставку је извршена класификација фенолних једињења, групе егзогених антиоксиданаса, која је заступљена у људској исхрани. Посебан осврт је направљен на својства фенолних киселина и механизме њиховог деловања при инактивирању слободних радикала. Истакнут је значај превођења ових једињења у липофилну форму естерификацијом и могућност еколошки прихватљиве и економичне производње естара фенолних киселина применом имобилисаних липаза. Представљене су важне карактеристике липаза, укључујући њихову структуру, механизам деловања, специфичност и класификацију. Детаљно су окарактерисане две липазе које се највише користе као биокатализатори у синтези фенолних естара. Направљен је детаљан преглед литературе која даје увид у тренутно стање у области ензимске синтезе фенолних естара, заједно са анализом значајних параметара који утичу на ефикасност ензимске синтезе ових једињења, укључујући избор биокатализатора, избор ацил донора и ацил акцептора, молског односа супстрата, температуре, садржаја воде и реакционог медијума. Такође, приказане су до сада примењене конфигурације проточних реактора у синтези фенолних естара. Изложена је и теоријска основа кинетике бисупстратних ензимских реакција са релевантним примерима кинетичких студија спроведених у синтези фенолних естара у литератури. На крају су наведене методе имобилизације које су успешно имплементирани у добијању биокатализатора ефикасних у синтези фенолних естара, а истакнуте су и предности неорганских материјала као носача за имобилизацију, нарочито алумосиликата.

Експериментални део се састоји од два поглавља: Материјали и Методе. У првом поглављу наведени су материјали и опрема коришћени у току израде ове дисертације, док су у другом поглављу наведене методе и услови коришћени у експерименталном раду, према редоследу експерименталног истраживачког рада. Прво су описани услови и методе за ензимску синтезу различитих фенолних естара. Приказан је и начин селекције одговарајућег биокатализатора, а затим је испитан утицај различитих ацил донора на принос реакције естерификације. Описане су процедуре коришћене за испитивање утицаја ацил акцептора, реакционог медијума, молског односа супстрата, температуре реакције, концентрације ензима на принос реакције естерификације. У наставку су описане методе за одређивање антиоксидативне и антикоагулационе активности естара фенолних киселина. Потом, описан је процес оптимизације извођења реакције синтезе естара фенолних киселина у биореактору са флуидизованим слојем. Представљене су и хроматографске методе коришћене за одређивање приноса фенолних естара. Даље је описана метода примењена за имобилизацију

ензима, као и начин одређивања хидролитичке активности добијених имобилизата, као и метода коришћена за одређивање садржаја протеина у узорцима пре и после имобилизације. Приказани су и поступци коришћени у припреми носача за имобилизацију, као и методе коришћене за детаљну карактеризацију носача и имобилизата.

Поглавље Резултати и дискусија обухвата приказ резултата добијених у експерименталном раду у овој дисертацији, њихову анализу и дискусију која укључује поређење са релевантним радовима из литературе. Резултати и дискусија се састоје из следећих поглавља: Утицај врсте биокатализатора и природе ацил донора на принос реакције естерификације, Оптимизација ензимске синтезе естара циметне киселине, Синтеза етил-цинамата у реактору са флуидизованим слојем: кинетичка студија и пренос масе, Оптимизација ензимске синтезе естара ферулне киселине, Иmobилизација липазе Б из *Candida antarctica* и примена добијених имобилизата у синтези естара фенолних киселина.

У првом поглављу испитана је могућност ензимске синтезе естара фенолних киселина коришћењем два комерцијална препарата имобилисане липазе, и то липазе из *C. antarctica*, Novozyme 435, и липазе из *Rhizomucor miehei*, Lprozime RM IM. Поред поменутих комерцијалних препарата испитана је и естерификациона активност неколико липаза произведених на Катедри за биохемијско инжењерство и биотехнологију Технолошко металуршког факултета Универзитета у Београду и то липазе из *Pseudomonas aeruginosa san-ai*, *Pseudomonas putida* B21, *Rhizopus oryzae* i *Aspergillus niger*. Испитан је и утицај структуре ацил донора на активност примењених липаза. Наиме, структура фенолне киселине, тј. природа супституената на ароматичном језгру утиче на специфичност ензима, па је ради одабира адекватног ензимског препарата за синтезу липофилних антиоксиданаса било неопходно испитати утицај различитих ацил донора на испитиване ензиме.

У другом поглављу извршена је оптимизација ензимске синтезе естара циметне киселине са аспекта приноса производа, али и његових биолошких својстава. У почетним активностима испитано је каталитичко дејство комерцијалне липазе из *C. antarctica*, Novozyme 435, при чему су као ацил акцептори коришћени различити алифатични и ароматични алкохоли. Како садржај воде у систему значајно утиче на положај равнотеже ензимске реакције и активност ензима, реакције естерификације су се изводиле без и у присуству одређене количине молекулских сита дефинисаних перформанси (порозности, адсорпционог капацитета). Након тога одређена је антиоксидативна активност свих синтетисаних естара помоћу неколико метода, на основу чега су одабрани најпогоднији ацил акцептори који су се користили у даљој оптимизацији реакције естерификације. Утврђено је да врста алкохола, односно дужина алкил групе супституента који се уводи у бензолово језгро циметне или ферулне киселине, има значајан утицај на брзину ензимске реакције, али и на антиоксидативну активност добијених естара. Даље је извршен избор реакционог медијума за синтезу естара циметне киселине користећи више растварача широког опсега поларности ($\log P$ вредности). Утицај кључних процесних параметара и интервал њиховог утицаја испитан је класичном методом варирања једног по једног фактора да би на одабраном модел естру (олеил-цинамат) и у одабраним интервалима вредности параметара била извршена оптимизација процеса применом статистичког планирања експеримената. Испитан је утицај кључних реакционих параметара и то: температуре, количине ензима, концентрације лимитирајућег супстрата, молског односа супстрата и реакционог времена, као и интензитета мешања на три одабрана одзива: степен конверзије, принос производа и специфичне естерификационе активности. На основу резултата статистички планираних експеримената установљена је природа и интензитет интеракција међу испитиваним параметрима и утврђени су њихови оптимуми са аспекта све три одзивне величине. У даљем раду испитана је могућност синтезе олеил-цинамата реакцијом трансестерификације етил-цинамата и олеил алкохола.

У трећем поглављу изведена је оптимизација синтезе етил-цинамата катализована комерцијалном имобилисаном липазом у биореактору са флуидизованим слојем и шаржном

биореактору. С тим у вези испитан је утицај протока реакционе смеше, односно времена задржавања на степен конверзије циметне киселине. Пронађена је и оптимална количина биокатализатора за извођење ове реакцију у оба биореакторска система да би се извршило поређење ефикасности примењених биореакторских конфигурација при одабраним условима. У том циљу испитана је и почетна кинетика ензимске реакције у оба система и добијени резултати су моделовани различитим кинетичким моделима бисупстратних реакција. Најбоља слагања кинетичких резултата са експерименталним подацима добијена су применом пинг-понг би би кинетичког модела. На основу вредности добијених кинетичких константи утврђено је да је максимална брзина реакције више од шест пута већа у реактору са флуидизованим слојем и да у шаржном биореактору постоји инхибиција етанолом, док у биореактору са флуидизованим слојем ова инхибиција није уочена. Поредећи генерално кинетичке податке добијене при оптималним условима у лабораторијском експерименталном систему у реактору са флуидизованим слојем и шаржном реактору на модел систему синтезе етил-цинамата, може се закључити да су значајно веће брзине реакције естерификације као и константе специфичности за оба супстрата постигнуте у реактору са флуидизованим слојем. Под одабраним оперативним условима у оба биореакторска система изведени су апроксимативни прорачуни коефицијената преноса масе, како би се елиминисала могућност постојања дифузионих лимитација (спољашњих и унутрашњих), односно како би се доказало да је синтеза етил-цинамата у оба биореакторска система кинетички контролисана.

У четвртом поглављу изведена је оптимизација синтезе естара ферулне киселине. Како се структура ове киселине значајно разликује од циметне киселине, поново је испитан утицај ацил акцептора на степен конверзије. Добијеним естрима је одређена антиоксидативна активност, на основу чега је одабран естар чија је ензимска синтеза даље оптимизирана. У наставку је примењено статистичко планирање експеримената и методологија одзивних површина, како би се нашли оптимални услови синтезе модел естра, етил-ферулата, посматрани кроз три одзива: степена конверзије, принос производа и специфичну естерификациону активност.

Како су под оптималним условима добијени естри циметне и ферулне киселине у високом приносу у реакцији естерификације са липазом из *S. antartica*, настављен је истраживачки рад у правцу развоја новог имобилисаног препарата овог ензима који би био ефикасан у реакцијама синтезе естара фенолних киселина. У петом поглављу испитана је могућност имобилизације нативне липазе Б на термички третиран каолин, метакаолин. Пре самог процеса имобилизације извршена је припрема носача за имобилизацију, као и његова детаљна карактеризација при чему се показало да је дошло до фазне трансформације каолина у метакаолин. Након тога, извршена је оптимизација процеса имобилизације липазе на метакаолин и разјашњени су механизми адсорпције овог протеина на метакаолин. Имобилизан ензим добијеном при оптималним условима имобилизације испитан је у реакцији синтезе различитих фенолних естара, при чему је утврђено да ли је дошло до промене специфичности према различитим ацил донорима овог ензима приликом имобилизације на метакаолин у односу на комерцијални Novozyme 435.

У поглављу Закључци 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

Интерес за развојем ензимских процеса синтезе природних антиоксиданаса произашао је из све веће свести потрошача о нежељеним ефектима вештачких додатака храни, као и све строжих законских мера које регулишу њихову примену. Наиме, додатком антиоксиданаса храни и козметичким препаратима повећава се рок трајања ових производа, јер се спречава аутокаталитичка оксидација моно- и полинезасићених масних киселина које улазе у њихов састав. У ове сврхе су се до сада углавном користили хемијским путем синтетисани антиоксиданси (бутилхидроксианизол, бутилхидрокситолуен, и *терц*-бутилхидрохинон), међутим, импликације да као производи њихове разградње настају токсичне и канцерогене материје, довеле су до потребе за проналаском адекватне замене у виду природних липофилних антиоксиданаса. Као могућа алтернатива синтетским антиоксидансима намећу се фенолна једињења која се сматрају одговорним за антиоксидативно деловање биљних екстраката. У последњих неколико година ова једињења заокупљују пажњу научне јавности, како због низа физиолошких дејстава (антимикробна, антиканцерогена, антиинфламаторна, антикоагулациона), тако и због позитивног утицаја на квалитет производа, попут боје и ароме. Међутим, и поред низа предности фенолних једињења у поређењу са синтетичким антиоксидансима, хидрофилна природа их чини непогодним за коришћење у уљаним формулацијама и емулзијама, ограничавајући тако њихову употребу у козметичким и прехранбеним производима. С друге стране, липофилни естри фенолних киселина задовољавају све предуслове за коришћење у таквим производима. Наиме, увођењем алифатичног бочног низа естерификацијом фенолних киселина повећава се њихова растворљивост у неполарним срединама, а самим тим и могућност њихове примене у индустрији хране, козметичкој, као и фармацеутској индустрији. Производња естара на индустријском нивоу ослања се на хемијску синтезу, која се заснива на примени киселих катализатора. У мањој мери естри се производе ензимском синтезом и екстракцијом из биљака. Синтеза естара хемијском методом има неколико значајних недостатака: неселективност реакције која доводи до стварања великог броја нежељених производа, токсичност неких споредних производа за животну средину, примена концентрованих киселина што компликује руковање реактантима и доводи до повећаних трошкова за опрему због корозивног дејства.

Захваљујући великој специфичности и активности ензима под благим процесним условима, применом ензимских процеса могу се превазићи недостаци хемијски катализоване синтезе естара. Естри добијени на овај начин сврставају се у природне производе, а сам поступак синтезе спада у "зелене" поступке. С друге стране, недовољна примена ензимских поступака у индустрији последица је комплексности ензимске синтезе естара која зависи од великог броја реакционих услова, што отежава оптимизовање реакције, а поред тога и цена самог ензимског препарата је велика препрека за освајање овог процеса на комерцијалном нивоу. Да би ензимска синтеза естара постала конкурентна класичним хемијским поступцима производ треба да буде синтетисан у великом приносу уз што мањи утрошак скувих комерцијалних ензимских препарата под оптималним реакционим условима. Императив развоја ензимске синтезе естара фенолних киселина налази се у проналажењу јефтинијих имобилисаних биокатализатора и развоју континуланих процеса чиме би се повећала ефикасност искоришћења имобилисаних биокатализатора.

У овој докторској дисертацији развијено је неколико ефикасних ензимских процеса за синтезу естара фенолних киселина (олеил-цинамата, етил-цинамата, етил-ферулата), који се заснивају на примени комерцијалне имобилисане липазе из *C. antartica*, Novozyme 435, као и липазе имобилисане на метакаолину по оригиналном поступку. Синтеза естара фенолних киселина катализована комерцијалном липазом свакако није нов проблем и у току последњих неколико деценија објављен је велики број научних радова и патената на ову тему, од којих су неки и комерцијализовани у постројењима малих капацитета. Међутим, неки од најактуелнијих проблема у овој области као и иначе у ензимској катализи у микроводеним системима, су мали приноси производа због положаја равнотеже реакције као и мале оперативне стабилности ензима у индустријским условима. Поред тога, проблем

представља инхибиција ензима у присуству вишка киселине или алкохола, што је нарочито изражено у случају примене поларних супстрата, на пример, етанола при синтези етил-цинамата или етил-ферулата. У овој докторској дисертацији је први пут изведена кинетичка студија ензимске синтезе етил-цинамата у различитим биореакторским системима што доприноси разумевању механизма и кинетике реакције естерификације са имобилисаном липазом, нарочито врстама и ефектима инхибиције, као и оптимизацији конфигурације и одговарајућег режима рада биореактора. Показано је да механизам и јачина инхибиције зависе, не само од својстава ензима и супстрата, него да значајну улогу, у том смислу, имају својства носача као и конфигурација и режим рада реактора.

У почетним истраживањима извршен је избор одговарајућег биокатализатора с којим су добијени високи приноси синтетисаних естара, као и утврђивање афинитета примењених биокатализатора према супстратима различите структуре. У наставку је принос реакције естерификације циметне киселине повећан детаљном оптимизацијом кључних реакционих параметара. Испитана је и могућност синтезе етил-цинамата у континуалном систему и то биореактору са флуидизованим слојем, и направљено је поређење овог биореактора са шаржним биореактором. Изабрано је одговарајуће реакторско решење за извођење реакције са имобилисаним ензимом и развијен је теоријски кинетички модел на основу кога се може предвидети понашање имобилисаног система и ефекти инхибиције у дужем временском периоду. Оптимизован је и процес синтезе естара ферулне киселине која је значајно бољи антиоксиданс од циметне киселине, а која представља лошији супстрат за липазу.

Последња фаза истраживања била је усмерена на проналажење новог биокатализатора чијом би се применом смањили трошкови ензимске синтезе фенолних естара. С тим у вези оптимизована је имобилизација нативне липазе Б на јефтин и веома распрострањен носач, метакаолин. Оптимизација поступка имобилизације укључила је оптимизацију рН, јонске јачине, концентрације ензима и времена контакта ензима и носача. Показало се да је липаза Б имобилисана на каолину у 10 mM ацетатном пуферу рН5, ефикасан ензимски препарат за синтезу естара фенолних киселина. Највећи степен конверзије, од готово 100%, остварен је са пара-хидроксифенилпропионском киселином и то при количини биокатализатора од 8 mg/cm³. Резултати истраживања омогућили су увиде у механизме везивања липазе за метакаолин под различитим имобилизационим условима на основу чега су дискутоване промене у специфичности ензима након имобилизације у овим сложеним хетерогеним системима.

3.2. Осврт на референтну и коришћену литературу

Током израде докторске дисертације кандидат је извршио детаљан преглед научне и стручне литературе из релевантних научних области везаних за проблематику докторске дисертације. Цитирана су 232 литературна навода која су омогућила да се јасно представи стање у испитиваној научној области, као и да се сагледа актуелност проблематике. Већину прегледане литературе чине радови публиковани у врхунским међународним часописима од стране еминентних стручњака у испитаној научној области. На основу овог пресека стања у литератури изложене су основне смернице за истраживања која су извршена у овој докторској дисертацији. Из образложења предложене теме докторске дисертације и објављених радова у пријави, коју је кандидат поднео, као и из пописа литературе која је коришћена у истраживању, уочава се адекватно познавање предметне области истраживања, као и познавање актуелног стања истраживања у овој области у свету.

3.3. Опис и адекватност примењених научних метода

У пријави докторске дисертације су постављени задаци који су остварени коришћењем одговарајућих експерименталних техника и савремених аналитичких инструменталних

метода према оригиналним или модификованим методама из литературе, као и адекватном анализом и обрадом података.

Ензимска синтеза естара фенолних киселина изведена је у шаржном систему, у термостату са орбиталним мешањем, под тачно дефинисаним реакционим условима. Принос реакције естерификације, односно трансестерификације одређен је коришћењем реверзно-фазне течне хроматографије високих перформанси (RP-HPLC) као и стандардних волуметријских метода. За оптимизацију синтезе естара циметне и ферулне киселине коришћена је метода планираних експеримената која се заснива на истовременој промени већег броја параметара, али у складу са претходно одабраним експерименталним планом што омогућује поузданију оптимизацију процесних параметара у ширем интервалу уз значајно смањење броја експеримената и потрошње скувих хемикалија. Поред тога, статистички метод омогућује 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. Експериментални систем коришћен за производњу етил-цинамата у биореактору са флуидизованим слојем састојао се од биореактора опремљеног дупликатором (стаклена колона димензија 10 mm×136 mm са спољашњим воденим омотачем), апаратуре за загревање и пропуштање воде кроз дупликатор, ерленмајера са магнетом и реакционом смешом која је постављена на магнетну мешалицу са термостатом и перисталтичке пумпе. Стаклена колона се пунила са одговарајућом количином имобилисане липазе из *S. antartica* тако да однос ензим/супстрат буде исти као у шаржном систему, док се реактор напајао са 50 cm³ реакционе смеше узлазним током који је био омогућен перисталтичком пумпом. Кинетичка анализа у оба биореакторска система изведена је варирањем концентрације супстрата у широком опсегу ради утврђивања евентуалног инхибиторног дејства супстрата.

За испитивање антиоксидативних својстава синтетисаних естара коришћена је спектрофотометријска метода заснована на способности антиоксиданса да редукује стабилни органски љубичасто обојени 2,2-дифенил-1-пикрилхидразил-радикал (DPPH). Резултати добијени DPPH методом проверени су електрохемијски, методом цикличне волтаметрије. Експерименти су изведени у електрохемијској ћелији на собној температури, при чему је као радна електрода коришћена стаклена угљенична електрода, као контра електрода коришћена је електрода од платине, док је као референтна коришћена засићена каломел електрода. Одређивање антикоагулационе активности синтетисаних естара изведено је помоћу рекалцификационе технике коришћењем ЕЛИСА читача. Карактеризација носача за имобилизацију изведена је коришћењем савремених инструменталних метода и то Фуријеове трансформацијске инфрацрвене спекроскопије (FT-IR), за одређивање структурних карактеристика носача коришћена је рентгенска дифракциона анализа, за одређивање морфолошких карактеристика носача коришћена је скенирајућа електронска микроскопија (SEM), док је одређивање просечне величине честица изведено применом технике динамичког расипања светлости на зетасајзеру. На истом уређају одређена је и изоелектрична тачка носача. Стандардна активност имобилисане липазе одређивана је спектрофотометријском методом при чему се користио п-нитрофенилбутират као супстрат, док је садржај протеина одређиван стандардном спектрофотометријском методом по Бредфорду.

3.4. Применљивост остварених резултата

На основу прегледа до сада објављених експерименталних података и резултата приказаних у оквиру ове докторске дисертације, остварен је значајан допринос у имплементацији ензима у синтези липофилних естара фенолних киселина. Синтеза ових липофилних физиолошки активних једињења изведена је у високом приносу у биореакторским системима различите конфигурације, коришћењем како комерцијалних, тако и нове имобилисане липазе. Дефинисани су оптимални процесни параметри за синтезу различитих естара, а утврђено је и интерактивно дејство испитиваних процесних параметара коришћењем савремених

статистичких метода. Изведен је кинетички модел синтезе физиолошки активног етилцинамата, чиме је дат увид у механизам одигравања реакције синтезе фенолних естара. Направљен је и значајан корак ка повећању економичности процеса развојем методе имобилизације којом је добијен препарат сличних перформанси, али вишеструко ниже цене од комерцијалног. Јединствене особине комерцијалних имобилисаних липаза попут Novozyme 435, које се производе од стране великих компанија које уједно имају и развијене технологије примене тих липаза, су под високим степеном патентне заштите од конкуренције. На основу неких доступних података у литератури, може се закључити да је у оквиру ове тезе развијен имобилисани систем са липазом из *S. antarctica* на метаколину који има истог реда величине или чак већу ефикасност у реакцији синтезе неколико естара фенолних киселина од комерцијалних имобилисаних система.

3.5. Оцена достигнутих способности кандидата за самостални научни рад

Кандидат Соња Јаковетић Танасковић, дипломирани инжењер технологије, је током израде докторске дисертације испољила изузетну стручност у припреми и реализацији експеримената и коришћењу различитих техника и метода, а при анализи резултата је показала самосталност, систематичност и креативност. 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

Научним доприносом резултата ове докторске дисертације може се сматрати следеће:

- Показано је да је комерцијални имобилисани препарат липазе Б из *S. antarctica* супериоран биокатализатор у односу на комерцијалну имобилисану липазу из *R. miehei* у свим изведеним синтезама естара. Приказано је да обе испитане липазе највећи афинитет показују према фенолним киселинама које имају засићен бочни низ, *para*-хидроксифенилпропионској и дихидрокафеној киселини. Такође, показало се да липаза Б из *S. antarctica* показује већи афинитет према несупституисаној циметној киселини, него према њеним супституисаним дериватима, *para*-кумаринској, *para*-метоксициметној, ферулној и кафеној киселини. Уочено је да је ова инхибиција липазе последица комбинације електронског и стерног ефекта, при чему је показано да је улога електронског ефекта доминантна.
- Приликом испитивања афинитета липазе према различитим ацил акцепторима показало се да када је циметна киселина ацил дозор, број С атома алифатичног алкохола нема значајан утицај на остварен степен конверзије циметне киселине, док је синтеза естара циметне киселине и ароматичних алкохола у потпуности изостала. Показано је да је антиоксидативна активност добијених естара циметне киселине већа од антиоксидативне активности саме киселине, што је последица замене Н атома карбоксилне групе алкил групом која индуктивно донира електроне бензеновом прстену чинећи га реактивнијим.
- Показано је да је Novozyme 435 активан уз минималне количине воде па је повећање приноса и економичности поступка омогућено применом молекулских сита за уклањање вишка воде из реакционог система. Као оптимални реакциони медијум показао се неполарни изооктан, иако је растворљивост фенолних супстрата у овом реакционом медијуму незнатна, чиме је потврђен позитиван ефекат неполарних растварача на активност ензима. Испитивање

молског односа етанола и циметне киселине, показало је да одређени вишак етанола погодује синтези етил-цинамата, јер раствара циметну киселину и повећава њену концентрацију у микрооколини ензима, док превелика количина етанола доводи до инхибиције ензима, јер одвлачи воду са површине ензима а која је есенцијална за његову каталитичку активност.

- Оптимизација најзначајнијих реакционих параметара (температуре, количине ензима, концентрације лимитирајућег супстрата, реакционог времена и молског односа супстрата) применом статистичког планирања експеримената и анализа резултата методом одзивних површина са аспекта три одабрана одзива (степен конверзије, принос естра и специфичне естерификационе активности) омогућила је повећање ефикасности процеса и дала увид у интензитет и природу интеракција међу испитиваним факторима. Поред степена конверзије, уобичајене одзивне величине у већини научних радова везаних за ову тематику, анализирана је и специфична ензимска активност, одзивна величина која даје увид у економичност процеса, јер укључује и количину ензима као и реакционе време, па је оптимизацијом овог одзива значајно повећана ефикасност процеса.

- Развијен је и оптимизован реакторски систем са флуидизованим слојем који је успешно имплементиран у синтези етил-цинамата коришћеној као модел реакцији синтезе естара фенолних киселина. Извођењем реакције у семиконтинуалном режиму значајно је повећана ефикасност производње етил-цинамата, па је тако након 23 h специфични принос производа у реактору са флуидизованим слојем био готово 2,5 пута већи у односу на шаржни реактор. Како би се омогућило повећање размера процеса, поред развоја ефикасног реакторског система одређени су и одговарајући кинетички модели синтезе етил-цинамата у оба биореакторска система. Показало се да се реакција синтезе етил-цинамата одвија према пинг-понг би механизму, али у шаржном реактору постоји инхибиције ензима алкохолном у вишку. На основу вредности ове константе може се закључити да степен инхибиције није значајан.

- Хидродинамички прорачун је показао да је под одабраним оперативним условима могуће спречити утицај унутрашњег и спољашњег отпора преносу масе на реакциони ток, односно потврђено је да је реакција кинетички контролисана, те да је добијени кинетички модел валидан.

- Показано је да липаза Б показује већу селективност према алифатичним алкохолима када се као ацил донор користи ферулна киселина, што је последица облика активног центра овог ензима. Као најбољи ацил акцептор показао се најкраћи ацил акцептор, етанол. Такође, естри ферулне киселине показују нешто нижу антиоксидативну активност од саме киселине, што је последица смањења реактивности хидроксилне групе на бензеновом прстену због електрон-донорског ефекта алкил групе у бочном низу. За разлику од циметне киселине код које се инхибиција DPPH радикала одвија по НАТ механизму, у случају ферулне киселине се одвија према механизму трансфера електрона. Оптимизацијом кључних фактора естерификације, значајно је унапређена реакције синтезе етил-ферулата, при чему је добијен принос од готово 100%.

- Даље повећање економичности поступка синтезе фенолних естара омогућено је развојем сопственог имобилисаног препарата липазе Б. Као носач за имобилизацију коришћен је метакаолин, јефтин и веома доступан материјал. У релевантној литератури нема података о имобилизацији овог ензима на метакаолин, па резултати добијени у овој дисертацији представљају оригиналан допринос у овој научној области. Показано је да је се имобилизацијом липазе Б на метакаолин не утиче на њену специфичност према фенолним киселинама. Показано је да се адсорпција липазе Б на метакаолин одвија према Ленгмировом

моделу и да електростатичке интеракције највише доприносе, али не и једино, везивању липазе за дати неоргански носач.

4.2. Критичка анализа резултата истраживања

Прегледом доступне литературе из ове области истраживања, која разматра ензимску синтезу естара фенолних киселина, као и разматрањем резултата добијених у овој докторској дисертацији, уочава се да резултати из ове докторске дисертације значајно допуњују постојеће резултате из поменуте области. Наиме, оптимизацијом кључних реакционих фактора и успешном имплементацијом сопственог биокатализатора, значајно је повећана ефикасност и економичност синтезе естара фенолних киселина. Развојем ефикасне конфигурације реактора са флуидизованим слојем, као и постављањем одговарајућег кинетичког модела постављени су основи за увећање размера процеса синтезе естара фенолних киселина. Посебан значај има развој сопственог биокатализатора имобилизацијом на јефтин и доступан материјал.

4.3. Верификација научних доприноса

Кандидат Соња Јаковетић Танасковић 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 два рада у научним часописима међународног значаја (један M21 и један M23) и пет саопштења на међународним и националним скуповима (два M33, један M34 и два рада категорије M63). 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 четрнаест саопштења на скуповима међународног или националног значаја.

Категорија M21:

1. **Jakovetić, S.**, Luković, N., Bošković-Vragolović, N., Bezbradica, D., Picazo-Espinosa, R., Knežević-Jugović, Z.: Comparative study of batch and fluidized bed bioreactors for lipase-catalyzed ethyl cinnamate synthesis, *-Industrial and Engineering Chemistry Research*, vol. 52, no. 47, pp. 16689–16697, 2013 (**IF=2,587**) (ISSN 0888-5885).

Категорија M23:

1. **Jakovetić, S.**, Jugović, B., Gvozdenović, M., Bezbradica, D., Antov, M., Mijin, D., Knežević-Jugović, Z.: Synthesis of aliphatic esters of cinnamic acid as potential lipophilic antioxidants catalyzed by lipase B from *Candida antarctica*, *-Applied Biochemistry and Biotechnology*, vol. 170, no. 7, pp. 1560-1573, 2013 (**IF=1,943**) (ISSN: 0273-2289).

Категорија M33:

1. **Jakovetić, S.**, Knežević-Jugović, Z., Jugović, B., Gvozdenović, M., Bezbradica, D.: Synthesis of ethyl cinnamate catalyzed by lipase B from *Candida antarctica*, *-6th Central European Congress on Food – CEFood 2012*, Novi Sad, Srbija, 2012., pp. 1110-1114.
2. Knežević-Jugović, Z., **Jakovetić, S.**, Jugović, B., Gvozdenović, M., Grbavčić, S., Bezbradica, D., Antov, M.: Enzymatic synthesis of aliphatic esters of phenolic acids and evaluation of their antioxidant properties, *-39th conference of Slovak Society of Chemical Engineering*, High Tatras, Slovakia, 2012., pp. 1426–1432.

Kategorija M34:

1. **Jakovetić, S.**, Luković, N., Grbavčić, S., Jovanović, J., Stefanović, A., Carević, M., Knežević-Jugović, Z.: The kinetic study of oleylcinnamate synthesis, *-8th International Conference of the Chemical Societies of the South-East European Countries*, Beograd, Srbija, 2013., F P14.

Kategorija M63:

1. **Jakovetić, S.**, Carević, M., Grbavčić, S., Stojanović, M., Luković, N., Žuža, M., Mihailović, M.: Esterification of phenolic acids catalyzed by lipase B from *Candida antarctica*, *-Prva konferencija mladih hemičara Srbije*, Beograd, Srbija, 2012., pp. 54-57.
2. **Jakovetić, S.**, Picazo-Espinosa, R., Manzanera, M., Stojanović, Ž., Prodanović, R., Miladinović, R., Knežević-Jugović, Z.: Immobilization of *Candida antarctica* lipase B on supports with epoxy groups via covalent attachment, *-50. savetovanje SHD*, Beograd, Srbija, 2012., pp. 203-207.

Ostali naučni radovi kandidata:

Kategorija M21:

1. Milašinović, N., **Jakovetić, S.**, Knežević-Jugović, Z., Milosavljević, N., Lučić, M., Filipović, J., Kalagasidis Krušić, M.: Catalyzed ester synthesis using *Candida rugosa* lipase entrapped by poly(N-isopropylacrylamide-co-itaconic acid) hydrogel, *-The Scientific World Journal*, Article ID 142123, 2014 (**IF =1,730**) (ISSN 1537-744X).
2. **Jakovetić, S.**, Luković, N., Jugović, B., Gvozdenović M., Grbavčić, S., Jovanović, J., Knežević-Jugović, Z.: Production of Antioxidant Egg White Hydrolysates in a Continuous Stirred Tank Enzyme Reactor Coupled with Membrane Separation Unit, *-Food and Bioprocess Technology*, vol. 8, no. 2, pp. 287-300, 2015 (**IF=3,126**) (ISSN 1935-5130).
3. Knežević-Jugović, Z., Žuža, M., Džunuzović, E., **Jakovetić, S.**, Stefanović, A., Jeremić, K., Jovanović, S.: An approach for the improved immobilization of penicillin G acylase onto macroporous poly(glycidylmethacrylate-co-ethylenglycoldimethacrylate) as a potential industrial biocatalyst, *-Biotechnology Progress*, vol. 32, no. 1, pp. 43-53, 2016 (**IF= 2,149**) (ISSN: 8756-7938).
4. Šekuljica, N., Prlainović, N., **Jakovetić, S.**, Grbavčić, S., Ognjanović, N., Knežević-Jugović, Z., Mijin, D.: Removal of anthraquinone dye by cross-linked enzyme aggregates from fresh horseradish extract, *-Clean - Soil, Air, Water*, DOI: 10.1002/clen.201500766, 2016 (**IF=1,945**) (ISSN: 1863-0650).

Kategorija M22:

1. Bezbradica, D., Jugović, B., Gvozdenović, M., **Jakovetić, S.**, Knežević-Jugović, Z.: Electrochemically synthesized polyaniline as support for lipase immobilization, *-Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, vol. 70, no. 1-2, pp. 55-60, 2011 (**IF=2,823**) (ISSN 1381-1177).

Kategorija M23:

1. **Jakovetić, S.**, Knežević-Jugović, Z., Grbavčić, S., Bezbradica, D., Avramović, N., Karadžić I.: Rhamnolipid and lipase production by *Pseudomonas aeruginosa* san-ai: the process

comparison analysis by statistical approach, *-Hemijska industrija*, vol. 67, no. 4, pp. 677-685, 2013 (IF=0,562) (ISSN 0367-598X).

2. Moftah, O., Grbavčić, S., Moftah, W., Luković, N., Prodanović, O., **Jakovetić, S.**, Knežević-Jugović, Z.: Lipase production by *Yarrowia lipolytica* using olive oil processing wastes as substrates, *-Journal of the Serbian Chemical Society*, vol. 78, no. 6, pp. 781-794, 2013 (IF=0,912) (ISSN 0352-5139).
3. Jovanović, J., Stefanović, A., Žuža, M., **Jakovetić, S.**, Šekuljica, N., Bugarski, B., Knežević-Jugović, Z.: Improvement of antioxidant properties of egg white protein enzymatic hydrolysates by membrane ultrafiltration, *-Hemijska industrija*, DOI:10.2298/HEMIND150506047J, 2016 (IF=0,364) (eISSN 2217-7426).

Kategorija M24:

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

Kategorija M33:

1. Knežević-Jugović, Z., Jugović, B., **Jakovetić, S.**, Bezbradica, D., Antov, M., Moftah, O., Gvozdrenović, M.: Design of a polyaniline based biosensor electrode for glucose: A comparative study of two immobilized systems, *-38th conference of Slovak Society of Chemical Engineering*, High Tatras, Slovakia, 2011., pp. 1519–1525.
2. Knežević-Jugović, Z., Stefanović, A., Jovanović, J., Žuža, M., Grbavčić, S., **Jakovetić, S.**, Dojčinović, M., Luković, N.: Ultrasound-induced changes in functional properties of egg white proteins and in their susceptibility to enzymatic hydrolysis, *-41st International Conference of Slovak Society of Chemical Engineering*, High Tatras, Slovakia, 2014., pp. 126-135.

Kategorija M34:

1. **Jakovetić, S.**, Luković, N., Grbavčić, S., Jugović, B., Gvozdrenović, M., Grgur, B., Knežević-Jugović, Z.: Enzymatic hydrolysis of egg-white proteins in a membrane reactor, *-8th International Conference of the Chemical Societies of the South-East European Countries*, Beograd, Srbija, 2013.
2. Carević, M., Vukašinović-Sekulić, M., Stojanović, M., Mihailović, M., **Jakovetić, S.**, Grbavčić, S., Bezbradica, D.: Production and characterization of extracellular α -galactosidase from *Aspergillus oryzae* DSM 1862, *-8th International Conference of the Chemical Societies of the South-East European Countries*, Beograd, Srbija, 2013., F P14.
3. Stefanović, A., Jovanović, J., Gluvić, A., **Jakovetić, S.**, Luković, N., Žuža, M., Knežević-Jugović, Z.: Kinetic model of the hydrolysis of egg white proteins by Alcalase, *-8th International Conference of the Chemical Societies of the South-East European Countries*, Beograd, Srbija, 2013.
4. Luković, N., **Jakovetić, S.**, Grbavčić, S., Jovanović, J., Stefanović, A., Šekuljica, N., Knežević-Jugović, Z.: Production of antioxidative egg-white hydrolysates in a circle batch membrane reactor, *-7th Central European Congress Food- CEFood, Food Chain Intergadion*, Ohrid, Macedonia, 2014., pp. 220-220.

5. Jovanović, J., Stefanović, A., **Jakovetić, S.**, Luković, N., Šekuljica, N., Žuža, M., Knežević-Jugović, Z.: Antioxidant activity and functional properties of peptides derived from egg white proteins by two-step enzymatic hydrolysis, -*Food Quality & Safety, Health & Nutrition 1st Conference*, Skopje, Macedonia, 2014., pp. 76-76.
6. Knežević-Jugović, Z., Jovanović, J., Stefanović, A., **Jakovetić, S.**, Grbavčić, S., Elmalimadi, M., Bugarski, B.: Hydrolysis of egg white and wheat proteins with protease from *Bacillus licheniformis*: fractionation and identification of bioactive peptides, -*42nd International Conference of Slovak Society of Chemical Engineering*, High Tatras, Slovakia, 2015., pp. 753-753.

Kategorija M63:

1. **Jakovetić, S.**, Bezbradica, D., Avramović, N., Milosavić, N., Grbavčić, S., Karadžić, I., Knežević-Jugović, Z.: Kinetika produkcije ramnolipida iz *P. aeruginosa* san-ai, -*Biotehnologija za održivi razvoj*, Beograd, Srbija, 2010., pp. 53-57.
2. Stojanović, M., Carević, M., **Jakovetić, S.**, Dimitrijević, A., Trbojević, J., Mihailović, M., Veličković, D.: Enzymatic synthesis of L-ascorbyl linoleate, - *Prva konferencija mladih hemičara Srbije*, Beograd, Srbija, 2012., pp. 64-67.
3. Mihailović, M., Banjanac, K., Stojanović, M., Prlainović, N., **Jakovetić, S.**, Carević, M.: Stabilizacija imobilisane lipaze iz *Candida rugosa* tretmanom imobilizata aminokiselinama, - *Prva konferencija mladih hemičara Srbije*, Beograd, Srbija, 2012., pp. 82-85.
4. Jovanović, J., Stefanović, A., Žuža, M., Šekuljica, N., **Jakovetić, S.**, Luković, N., Knežević-Jugović, Z.: Empirijski kinetički model hidrolize proteina belanceta pretretiranih ultrazvučnim talasima visoke frekvencije, -*XIX Savetovanje o biotehnologiji*, Čačak, Srbija, 2014., pp. 281-285.
5. Žuža, M., Gluvić, A., **Jakovetić, S.**, Luković, N., Stefanović, A., Jovanović, J., Knežević-Jugović, Z.: Antioksidativna aktivnost hidrolizata belanceta i njegovih frakcija dobijenih membranskom ultrafiltracijom, -*XIX Savetovanje o biotehnologiji*, Čačak, Srbija, 2014., pp. 275-279.

Kategorija M64:

1. Carević, M., Stojanović, M., Jakovetić, S., Mihailović, M., Dimitrijević, A., Trbojević, J., Veličković, D.: Proizvodnja sirovog ćelijskog ekstrakta β -galaktozidaze pomoću bakterija mlečne kiseline, *Prva konferencija mladih hemičara Srbije*, Beograd, Srbija, 2012., pp. 74-74.

5. ЗАКЉУЧАК И ПРЕДЛОГ

На основу претходно изнетих разматрања резултата докторске дисертације Соње Јаковетић Танасковић, дипл. инж. под називом „Ензимска производња естара фенолних киселина” сматрамо да су испуњени сви циљеви и задаци рада на овој тези и да она својим садржајем и квалитетом значајно доприноси области Технолошко инжењерство, што је и потврђено објављивањем радова у међународним часописима, као и публикавањем резултата на конференцијама од међународног и националног значаја. Такође, комисија је мишљења да је кандидат испољио изузетну научноистраживачку способност у свим фазама израде ове

докторске дисертације. Комисија предлаже Наставно-научном већу ТМФ-а да се докторска дисертација под називом „Ензимска производња естара фенолних киселина” кандидата Соње Јаковетић Танасковић прихвати, изложи на увид јавности и упути 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

.....
Проф. др Зорица Кнежевић-Југовић, редовни професор
Универзитет у Београду, Технолошко-металуршки факултет

.....
Проф. др Дејан Безбрадица, ванредни професор
Универзитет у Београду, Технолошко-металуршки факултет

.....
Проф. др Невенка Бошковић-Враголовић, ванредни професор
Универзитет у Београду, Технолошко-металуршки факултет

.....
Проф. др Мирјана Антов, редовни професор
Универзитет у Новом Саду, Технолошки факултет