

## НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ

**Предмет:** Реферат о урађеној докторској дисертацији кандидата **Марије Ћоровић (рођене Стојановић)**, дипл. инж. технологије.

Одлуком 35/126 бр. од 5.06.2015. године, именовани смо за чланове Комисије за преглед, оцену и одбрану докторске дисертације кандидата Марије М. Ћоровић под насловом

**Синтеза липосолубилних аскорбил-естара карбоксилних киселина катализована имобилисаним липазама**

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 Марија М. Ћоровић, дипл. инж. технологије предложила је тему докторске дисертације под називом: „Синтеза липосолубилних аскорбил-естара карбоксилних киселина катализована имобилисаним липазама“ а Наставно-научно веће Технолошко-металуршког факултета у Београду усвојило Комисију за оцену научне заснованости предложене теме.

**21.11.2013.** - На седници Наставно-научног већа Технолошко-металуршког факултета, на основу поднетог извештаја Комисије, донета је Одлука о прихватању предлога теме докторске дисертације Марије М. Ћоровић, дипл. инж. технологије, под називом „Синтеза липосолубилних аскорбил-естара карбоксилних киселина катализована имобилисаним липазама“ и за ментора ове докторске дисертације именован је др Дејан Безбрадица, доцент ТМФ-а.

**16.12.2013.** - На седници Већа научних области техничких наука Универзитета у Београду дата је сагласност на предлог теме докторске дисертације Марије М. Ћоровић, дипл. инж. технологије, под називом „Синтеза липосолубилних аскорбил-естара карбоксилних киселина катализована имобилисаним липазама“.

**4.06.2015.** - На седници Наставно-научног већа Технолошко-металуршког факултета донета је Одлука о именовању Комисије за оцену и одбрану докторске дисертације Марије М. Ћоровић, дипл. инж. технологије, под називом „Синтеза липосолубилних аскорбил-естара карбоксилних киселина катализована имобилисаним липазама“.

Кандидат је уписао докторске студије Технолошко-металуршког факултета на Катедри за биохемијско инжењерство и биотехнологију (ментор др Дејан Безбрадица, ванредни професор ТМФ-а) 13.10.2010. године.

### 1.2. Научна област дисертације

Истраживања изведена у оквиру ове докторске 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 изабран др Дејан Безбрадица, ванредни професор ТМФ-а који је на основу публикација у релевантним научним часописима и истраживачког искуства у овој области компетентан да руководи израдом ове докторске дисертације.

### 1.3. Биографски подаци о кандидату

Марија Ћоровић (рођена Стојановић) рођена је у Крушевцу где је завршила основну школу Доситеј Обрадовић и Крушевачку гимназију. Студије на Технолошко-металуршком факултету Универзитета у Београду уписала је школске 2004/2005. године. У току студија, два пута јој је додељена награда „Панта С. Тутунџић“ за постигнут изузетан успех. У периоду од 1. јула до 31. августа 2008. године похађала је IAESTE праксу у Фрајбергу у Немачкој. Примила је признање Српског хемијског друштва за укупан изузетан успех у току студирања. Дипломирала је на ТМФ-у, на Катедри за биохемијско инжењерство и биотехнологију 24.09.2010. са оценом на дипломском раду 10 и просечном оценом студирања 9,69. По завршетку редовних студија, 13.10.2010. године је уписала докторске студије Технолошко-металуршког факултета Универзитета у Београду на Катедри за биохемијско инжењерство и биотехнологију (ментор др Дејан Безбрадица).

Од 1.02.2011. године запослена је као истраживач приправник на Технолошко-металуршком факултету на пројекту Министарства за просвету, науку и технолошки развој Републике Србије бр. ИИИ 46010 под називом "Развој нових инкапсулационих и ензимских технологија за производњу биокатализатора и биолошки активних компонената хране у циљу повећања њене конкурентности, квалитета и безбедности". У звање истраживач сарадник изабрана је 26.02.2013. године. Коаутор је 9 радова у међународним часописима (пет М21, један М22 и три М23) и дванаест саопштења на домаћим и међународним скуповима (један М33, шест М34, четири М63 и један М64).

Положила је све испите предвиђене планом и програм последипломских студија Технолошко-металуршког факултета са просечном оценом 9,82, укључујући и завршни испит.

## **2. ОПИС ДИСЕРТАЦИЈЕ**

### 2.1. Садржај дисертације

Докторска дисертација Марије Ћоровић написана је на 205 страна, са укупно 6 поглавља, 92 слике, 22 табеле и 264 литературна навода. Докторска дисертација садржи следећа поглавља: Увод, Теоријски део, Материјале и методе, Резултате и дискусију, Закључак и Литературу, уз изводе на српском и енглеском језику.

### 2.2. Кратак приказ појединачних поглавља

У **Уводу** дисертације је приказан значај употребе адитива са антиоксидативним дејством у липофилним прозводима у циљу продужавања њиховог рока употребе. Указано је на неопходност замене синтетских адитива природним једњењима или њиховим дериватима.

Дат је осврт на могућност превођења витамина Ц као најраспрострањенијег природног антиоксиданса у липофилну форму естерификацијом и могућност еколошки прихватљиве и економичне производње његових естара применом ензима липаза. Такође је набројано у које се још сврхе аскорбил-естри карбоксилних киселина могу користити. На крају поглавља су представљени циљеви рада са планом истраживања.

У **Теоријском делу** дисертације је дат преглед актуелних хемијских метода добијања аскорбил-естара масних киселина и указано је на разлике у специфичности и региоселективности хемијских катализатора и биокатализатора које представљају предност ензимске синтезе над класичним хемијским поступцима. Направљен је детаљан преглед литературе која даје увид у тренутно стање у области примене липаза у процесу добијања аскорбил-естара. Приказане су карактеристике, механизам деловања и методе примењиване за имобилизацију липаза од значаја за биокаталитичку производњу аскорбил-естара карбоксилних-киселина и детаљно је анализиран утицај кључних реакционих фактора. Такође је представљен актуелни и потенцијални комерцијални значај аскорбил-естара карбоксилних киселина за примену у прехранбеној, фармацеутској и козметичкој индустрији заснован на њиховим јединственим карактеристикама као амфифилних молекула са снажним антиоксидативним дејством. Наведени су најбитнији резултати досадашњих истраживања која су се бавила овом тематиком, а указано је и на друга могућа поља примене као што је медицинско. Описана је теоријска основа кинетике ензимских бисупстратних реакција, а наведени су и анализирани и релевантни примери кинетичких студија из научне литературе. На крају поглавља су дата основна разматрања различитих реакторских конфигурација погодних за производњу аскорбил-естара катализовану имобилисаним липазама, са освртом на хидродинамику у овим ситемима.

Поглавље **Материјали и методе** подељено је у две целине. У првој целини су наведени сви материјали који су коришћени у току израде ове дисертације и њихови произвођачи. Друга целина обухвата навођење и опис метода које су примењиване у току експерименталног рада, моделовања и обраде резултата. Прво је описан поступак синтезе аскорбил-естара катализоване имобилисаним липазама у шаржном систему. Затим је описана процедура одређивања садржаја воде у реакционом медијуму. Након тога је изложен начин планирања и извођења кинетичке студије. Затим је описан поступак квантитативне анализе различитих узорака, процес њиховог пречишћавања и начин извођења спектралних анализа. Приказан је начин одређивања оперативне стабилности биокатализатора. Даље је представљен поступак одређивања антиоксидативног дејства аскорбил-естара карбоксилних киселина. Затим је описан начин статистичког планирања експеримената применом централног композитног ротатабилног плана и анализе резултата методом одзивних површина. Након тога 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 смеши након имобилизације. На крају је приказан начин рада у семиконтинуалном систему у биореактору са флуидизованим слојем имобилисаног ензима и рецикулацијом супстрата. Представљени су примењени услови рада и конфигурација реакторског система.

У поглављу **Резултати и дискусија** обухваћен је приказ резултата остварених у току експерименталног рада у оквиру ове дисертације, њихова анализа и дискусија која укључује поређење добијених резултата са резултатима литературних радова сличне тематике. Ово поглавље се састоји из седам целина: Прелиминарни експерименти, Избор органског растварача и донора ацил-остатка за ензимску синтезу L-аскорбил-естара, Оптимизација реакционих услова за синтезу аскорбил-олеата, Испитивање кинетике биосинтезе L-аскорбил-олеата, Имобилизација липазе типа Б из *C. antarctica*, Синтеза L-аскорбил-олеата катализована липазом типа Б из квасца *C. antarctica* имобилисаном на Purolite® MN102 у шаржном биореактору и биореактору са флуидизованим слојем и Ензимска синтеза

аскорбил-естара применом полинезасићених масних киселина и масти и уља као ацил-донора.

У **првом поглављу** приказани су прелиминарни експерименти чији циљеви су били одабир микробне липазе која ће бити коришћена у даљем експерименталном раду и развој HPLC методе за квантификацију естара и семипрепаративно одвајање. У овим експериментима изведена је синтеза аскорбил-олеата, структура производа пречишћеног семипрепаративном течном хроматографијом високих перформанси је доказана НМР спектроскопском анализом. У **другом поглављу** је анализиран афинитет имобилисане липазе према различитим донорима ацил-остатка и утицај дужине и степена незасићености бочног низа на антиоксидативну активност синтетисаних естара, на основу чега је изабран најпогоднији ацил-донор за даљи рад. Такође је испитано више растварача широког опсега поларности за употребу као потенцијалних реакционих медијума. **Треће поглавље** је фокусирано на оптимизацију кључних реакционих параметара (температуре, концентрације ензима, почетног садржаја воде, концентрације лимитирајућег супстрата и молског односа супстрата) класичном методом варирања једног по једног фактора и применом статистичког планирања експеримената. На основу резултата статистички планираних експеримената установљена је природа и интензитет интеракција међу испитиваним параметарима и утврђени су њихови оптимуми са аспекта три одабрана одзива (моларне конверзије, концентрације производа и специфичног приноса естра по граму ензима). Такође је испитан утицај времена додавања молекулских сита у реакциону смешу у циљу уклањања вишка воде, затим оперативна стабилност имобилисане липазе при употреби у консекутивним реакционим циклусима и могућност реактивације делимично инактивiranог биокатализатора. У **четвртом поглављу** је прво извршена оптимизација реакционих параметара са аспекта постизања максималних почетних брзина реакције. Након тога је, на основу кинетичке студије, добијен модел који описује утицај концентрације супстрата на почетну брзину реакције. Затим је укључивањем утицаја повратне реакције хидролизе изведен интегрални модел који описује читав реакциони ток. **Пето поглавље** је обухватило тестирање различитих типова носача и метода за имобилизацију липазе Б из *C. antarctica*. Сви имобилисани ензими су окарактерисани са аспекта своје хидролитичке активности, а одабрани препарати су тестирани у реакцији синтезе аскорбил-олеата у циљу одабира најпогоднијег и најефикаснијег за даљу примену. Услови доијања одабраног препарата, липазе Б из *C. antarctica* имобилисане на хидрофобни макропорозни носач на бази стирен-дивинилбензена са терцијарним амино-групама - Purolite<sup>®</sup> MN102, су након тога детаљно оптимизовани, а тестирана је и његова оперативна стабилност. Такође су утврђени трошкови његове производње и упоређени са ценом комерцијалног препарата. У **шестом поглављу** је потврђена апликативна вредност добијеног имобилисаног препарата у реакторским системима различитих конфигурација (шаржном и семиконтинуалном). Оптимизовани су оперативни услови у биоректору са флуидизованим слојем имобилисаног ензима и утврђене оптималне вредности најзначајнијих реакционих параметара у оба система. Испитана је кинетика естерификације у оба система и упоређена са реакцијом катализованом комерцијалним ензимом. Под одабраним радним условима у два реакторска система је испитана и хидродинамика, и то анализом ефекта дифузионих лимитација (спољашњих и унутрашњих) на реакциони процес и испитивањем утицаја тангенцијалних напона на инактивацију имобилисане липазе. Два система су упоређена и са аспекта оперативне стабилности биокатализатора. Последње, **седмо поглавље** се бави испитивањем могућности замене масних киселина као донора ацил-остатка мастима и уљима као природним, јефтиним и доступним сировинама. Тестирана су четири различита ацил-донора: сунцокретово уље, свињска маст, ланено уље и кокосово уље. Одабран је погодан растварач и реакциона температура, а затим је извршена карактеризација добијених производа.

### 3. ОЦЕНА ДИСЕРТАЦИЈЕ

#### 3.1. Савременост и оригиналност

Липофилни прехранбени, фармацеутски и козметички производи имају кратак рок употребе с обзиром на изражену склоност моно- и полинезасићених масних киселина које улазе у њихов састав ка аутооксидацији. Овај пробелем се углавном превазилази коришћењем адитива са антиоксидативним дејством. Антиоксиданси могу бити једињења различите хемијске структуре и њихово дејство може бити засновано на различитим механизмима, али сви они морају задовољити неколико основних предуслова за примену у прехранбеним, фармацеутским и козметичким производима - да не мењају боју, мирис и укус производа у који се додају, да су липосолубилни, нетоксични и стабилни током дужег временског периода и на повишеним температурама. У ове сврхе се углавном примењују хемијским путем синтетисани антиоксиданси (бутилхидроксианизол, бутилхидрокситолуен, пропилгалат и терц-бутил-хидрохинон), али ова једињења се под физиолошким условима разлажу до токсичних супстанци од којих су неке потенцијално канцерогене. Поред тога, они се добијају коришћењем растварача и катализатора који нису биокompatibilни, а реакције нису региоселективне и остварују се ниски приноси што отежава изоловање и пречишћавање производа. На основу свега наведеног, оправданост њихове употребе ставља се под знак питања и намеће се потреба за проналажењем нових ефикасних липофилних антиоксиданаса који задовољавају све услове за безбедну употребу. L-аскорбинска киселина је један од најраспрострањенијих природних антиоксиданаса, а њена употреба за презервирање хране, пића, козметичких и фармацеутских производа је веома честа. Међутим, изразито је хидрофилног карактера па је њена ефикасност у липофилним производима веома мала. Са друге стране, њени деривати, аскорбил-естри масних киселина, задовољавају све предуслове за коришћење у таквим производима. Поред тога аскорбил-естри масних киселина су амфифилни молекули, па могу бити употребљавани као биосурфактанти у детерџентима, прехранбеним, козметичким или текстилним производима. Такође, за поједине L-аскорбил-естре је доказано да услед великог афинитета према липофилним конститuentима ћелијских мембрана могу бити примењени за транспорт и циљано деловање лека, затим у лечењу болести изазваних оксидативним стресом, па чак и канцера. Хемијским путем добијени аскорбил-палмитат и -стеарат се данас примењују као адитиви у липофилним производима, али они нису у потпуности растворни у мастима и уљима, па се моно- и полинезасићени ацил-донори дугог ланца или засићени ацил-донори средње дужине ланца сматрају погоднијим. Уз то, методе за добијање ових естара на индустријском нивоу се заснивају на неселективној реакцији катализованом концентрованом сумпорном киселином, а сам поступак рада је компликован и трошкови опреме високи. Имајући ово у виду, постоји потреба за развојем нових економичних “зелених” технологија применом ензима као катализатора ових реакција. На овај начин се под благим условима у региоселективној реакцији могу добити производи високог квалитета по ниским ценама. Досадашња истраживања у овој области указују на могућност постизања високих приноса аскорбил-естара у реакцијама катализованим комерцијалним препаратима који садрже имобилисане ензиме, нарочито када се као ацил-донори користе чисте масне киселине, метил- или винил-естри масних киселина. Да би ове технологије постале конкурентне класичним хемијским поступцима морају бити синтетисане високе концентрације производа уз што мањи утрошак скувих комерцијалних ензимских препарата под оптималним реакционим условима, док развој нових, јефтинијих имобилисаних биокатализатора и коришћење јефтиних сировина као ацил-донора треба додатно да повећа економичност процеса.

На основу свега наведеног као циљ ове докторске дисертације постављено је остваривање доприноса развоју конкурентног поступка за ензимску синтезу L-аскорбил-естара карбоксилних киселина. На почетку рада ће бити одабран најпогоднији реакциони медијум и донор ацил-остатка, а затим ће најзначајнији реакциони фактори бити детаљно

оптимизовани. Статистичко планирање експеримената и анализа резултата применом методе одзивних површина омогућиће увид у појединачни и интерактивни ефекат варираних параметара, што ће омогућити добијање максималних приноса производа уз што мањи утрошак ензима. Дефинисање кинетичког модела који адекватно описује реакциони ток је предуслов за пројектовање биореактора, увећање размера и контролу процеса, па ће даљи рад бити усмерен у том правцу.

Након тога ће истраживање бити усмерено на развој нових имобилисаних биокатализатора погодних за ефикасну и економичну производњу аскорбил-естара карбоксилних киселина. Имобилисани препарат највећег потенцијала ће затим бити тестиран у два реакторска система – шаржном биореактору са мешањем и биореактору са флуидизованим слојем имобилисане липазе и рецикулацијом супстрата. Поређење две реакторске конфигурације ће бити вршено испитивањем стабилности имобилисаног ензима, кинетике реакције и анализом хидродинамике у тестираним системима.

Последња фаза истраживања ће бити усмерена на испитивање могућности коришћења јефтинјих, природних донора ацил-остатка, масти и уља, у циљу додатног смањења цене ензимског процеса и добијања производа различитих карактеристика и са бројним додатним пољима потенцијалне примене.

### 3.2. Осврт на референтну и коришћену литературу

У оквиру ове докторске дисертације цитирана су 264 литературна навода који су омогућили да се представи стање у испитиваној научној области, као и да се сагледа актуелност проблематике. Савремена истраживања публикована у цитираним научним радовима су приказана, анализирана и дискутована и изведени су закључци који су дали добар увид у могућност примене липаза у производњи липофилних естара витамина Ц. Овако направљен преглед и анализа актуелне литературне периодике послужио је као основ за истраживања која су спроведена у овој докторској дисертацији. Преглед литературе која је употребљавана у току истраживања, образложење предложене теме дисертације и објављени радови кандидата наведени у пријави, указују на адекватно 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 одбарадом података.

Биосинтеза аскорбил-естара карбоксилних киселина је извођена у шаржном систему, у термостату са орбиталним мешањем, под дефинисаним реакционим условима. Садржај воде у реакционим смешама одређиван је применом волуметријске методе по Карлу и Фишеру. Узорци су анализирани и пречишћавани применом савремених RP-HPLC анализа под оптимизованим условима елуције, док је доказивање производа вршено одређивањем НМР спектра. Кинетичка анализа заснивала се на експерименталном плану састављеном из 64 експеримента у којима су концентрације два супстрата вариране у широком опсегу ради утврђивања евентуалног инхибиторног дејства супстрата. Оперативна стабилност биокатализатора одређивана је применом у консекутивним реакционим циклусима под дефинисаним условима. За испитивање антиоксидативног дејства аскорбил-естара коришћена је спектрофотометријска метода заснована на способности антиоксиданса да редукује стабилни љубичасто обојени 2,2-дифенил-1-пикрилхидразил-радикал (DPPH) прихватањем једног електрона. Редуковани DPPH је жуто обојен, па се праћењем промене апсорбанце испитиваног у односу на контролни узорак на 517 nm утврђује његов капацитет за везивање DPPH-радикала.

Приликом испитивања утицаја и оптимизације реакционих фактора коришћена је метода централног композитног ротатабилног планирања експеримената и метода одзивних површина. Примењени план се састојао од 32 експерименталне тачке (16 факторијалних, 10 аксијалних и 6 централних), а испитивани фактори су варирани у следећим опсезима: почетна концентрација воде (0,018-0,218 % $(v/v)$ ), температура (40-60 °C), почетна концентрација ензима (0,2-1% $(w/v)$ ), почетни моларни однос киселине и алкохола (1:3-1:15) и концентрација аскорбинске киселине (0,02-0,22 M). Добијени резултати су моделовани полиномом другог степена који је укључивао чланове који описију линеарне, квадратне и интерактивне ефекте параметара. Адекватност модела је тестирана дисперзионом анализом, а вредности коефицијената и њихова статистичка сигнификантност су одређени методом најмањих квадрата коришћењем програма MATLAB 7.0. Применом Студентовог теста је утврђена сигнификантност чланова ( $p \leq 0,05$ ) који су укључени у финални модел.

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 пара-нитрофенилбутирата и мерење концентрације протеина методом по Бредфорду (Bradford).

За семиконтинуалну производњу аскорбил-олеата установљена је адекватна конфигурација реакторског система са флуидизованим слојем имобилисаног ензима који се састојао из биореактора опремљеног дупликатором, 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.

#### 3.4. Применљивост остварених резултата

На основу прегледа литертурних података и експерименталних резултата приказаних у оквиру ове дисертације, остварен је значајан допринос примени имобилисаних ензима у синтези аскорбил-естара карбоксилних киселина. Ови липофилни антиоксиданси су оптимизацијом реакционих услова синтетисани у високом приносу, у реакторским системима различите конфигурације, коришћењем како комерцијалних, тако и нових имобилисаних липаза. Примена статистичког планирања експеримената и анализе резултата методом одзивних површина омогућила је сагледавање интерактивних дејстава између кључних параметара процеса. Опсежна кинетичка студија је резултирала моделима који дају увид у механизам одигравања реакције катализоване ензимом имобилисаним на различитим носачима примењеним у различитим реакционим системима. Корак ка повећању економичности процеса начињен је развојем методе имобилизације којом је добијен препарат сличних перформанси, али вишеструко ниже цене од комерцијалног. Завршна фаза истраживања има највећи апликативни значај, пошто је установљено да се коришћењем природних супстрата (масти и уља) као донора ацил-остатака значајно умањују трошкови производње, а смеша производа која је на овај начин добијена поседује побољшане карактеристике у односу на појединачне естре.

#### 3.5. Оцена достигнутих способности кандидата за самостални научни рад

Кандидат Марија Ђоровић, дипломирани инжењер технологије је током израде докторске дисертације испољила изузетну самосталност у планирању и реализацији експеримената применом различитих лабораторијских техника и научних метода и склоност ка експерименталном раду. При анализи и моделовању добијених резултата показала је систематичност и креативност. Приликом развоја постојећих и осмишљавања нових експерименталних поступака, испољила је склоност ка инжењерском начину размишљања. На основу досадашњег ангажовања и остварених резултата, Комисија сматра 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 тезе може се сматрати следеће:

- Показано је да липаза из *C. antarctica* поседује висок афинитет према засићеним киселинама краћег ланца и незасићеним масним киселинама дугог ланца у реакцији естерификације са аскорбинском киселином велики. Утврђено је и да управо ови естри поседују капацитет за везивање слободних радикала исти или већи од витамина Ц што доказује да се ензимском синтезом естара витамина Ц може повећати његова липосолубилност без нарушавања физиолошке активности. Утврђено је да се са порастом броја двоструких веза у ацил-остатку појачава антиоксидативно дејство синтетисаних естара, што је и од великог апликативног значаја пошто су управо незасићене масне киселине подложније аутооксидативним процесима.
- Оптимизација најзначајнијих реакционих параметара (температуре, концентрације ензима, почетног садржаја воде, концентрације лимитирајућег супстрата и молског односа супстрата) применом статистичког планирања експеримената и анализом резултата методом одзивних површина са аспекта три одабрана одзива (степен конверзије, концентрација естра и специфичан принос производа) омогућила је повећање ефикасности процеса и дала увид у интензитет и природу интеракција међу испитиваним факторима. У релевантној научној периодици постоји свега неколико радова посвећених оптимизацији ензимске синтезе естара витамина Ц, али су као одзивне величине праћени искључиво степен конверзије и концентрација производа. У овом раду први пут је анализиран специфични принос производа као одзивна величина која укључује и примењену концентрацију ензима, па је тиме и мера економичности процеса чија неадекватност представља највећу препреку развоју индустријских ензимских поступака синтезе естара витамина Ц. Под оптималним условима (60 °C, 0,018 % (v/v) воде, 0,2 % (w/v) ензима, 0,135 М витамина Ц и молски однос 1:8) је остварен максимални специфични принос од 16,7 mmol аскорбил-олеата по граму имобилисаног ензима, што је представљало напредак у односу на досадашња објављена истраживања. Даље повећање приноса и економичности поступка омогућено је применом молекулских сита за уклањање вишка воде из реакционог система, употребом имобилисаног ензима у узастопним реакционим циклусима, као и реактивацијом делимично инактивираних липаза фосфатним пуфером.
- Утврђен је кинетички модел који адекватно описује реакцију естерификације витамина Ц олеинском киселином катализовану комерцијалним имобилисаним ензимским препаратом Novozym® 435 са укљученим ефектом повратне реакције хидролизе. Усвојен је пинг-понг би-би механизам са инхибицијом аскорбинском-киселином. Развој адекватног модела који описује комплетан ток реакције представља значајан допринос у пројектовању ензимских реактора за синтезу естара витамина Ц и представља оригиналан научни допринос ове дисертације јер су досадашњи кинетички модели били ограничени на иницијалну фазу ензимске реакције.
- Имобилизацијом липазе Б продуцента *C. antarctica* на више носача различитих карактеристика (порозност, хидрофобност, присуство функционалних група) посредством различитих механизма везивања (адсорпцијом или ковалентном имобилизацијом), показано је да су за примену у катализовању синтезе аскорбил-олеата најпогоднији хидрофобни носачи. Највећу ефикасност је показала липаза имобилисана на макропорозни хидрофобни носач са терцијарним амино-групама на бази кополимера стирена и дивинилбензена (Purolite® MN102). Овај препарат поседује сличну хидролитичку (888,4 p-NPBU g<sup>-1</sup>) и естерификациону активност као Novozym®



435, а трошкови његовог добијања су неколико пута нижи од цене комерцијалног препарата.

- Кинетичка студија је показала да се реакција синтезе аскорбил-олеата катализована липазом Б из *C. antarctica* имобилисаном на Purolite® MN102 одвија према пинг-понг би-би моделу са инхибицијом олеинском киселином. На основу вредности константи модела је доказано да се афинитет липазе имобилисане не хидрофобан носач према хидрофобном супстрату повећава, док се према хидрофилном смањује.
- Липаза Б из *C. antarctica* имобилисана на Purolite® MN102 је, поред шаржног, успешно имплементирана и у биореактору са флуидизованим слојем ензима и рецикулацијом супстрата при чему је остварено повећање почетних брзина реакције од око 40 % у односу на шаржни систем. Хидродинамички прорачун је показао да је под одабраним оперативним условима могуће спречити утицај унутрашњег и спољашњег отпора преносу масе на реакциони ток и инактивацију ензима услед деловања смицајних напона. Оперативна стабилност липазе била је већа у шаржном систему.
- Применом јефтених природних сировина, уља и масти, као донора ацил-остатака постигнуте су концентрације производа до 112 mM (степен конверзије 83 %). На овај начин је знатно умањена укупна цена коштања производње, а за добијену смешу аскорбил-естара, је установљено да имају антиоксидативну активност већу од смеше појединачних естара што представља додатну погодност за примену ових смеша као производа.

#### 4.2. Критичка анализа резултата истраживања

Разматрањем доступне научне литературе из области примене липаза у процесу добијања аскорбил-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. Опсежна кинетичка студија која је дала увид у механизам одигравања реакције и анализа различитих реакторских система са аспекта хидродинамике, активности и стабилности биокатализатора представљају резултате од несумњивог научног и апликативног значаја. Наиме, анализа кинетике и хидродинамике у шаржном и семиконтинуалном систему са флуидизованим слојем представљају основ за потенцијално пројектовање реактора, увећање размера процеса и аутоматизацију поступка. Нарочито значајан корак ка одрживости процеса и практичној примени поступка начињен је применом природних сировина у добијању високо-вредних производа чији је потенцијал примене у прехранбеној, козметичкој и фармацеутској индустрији велики.

#### 4.3. Верификација научних доприноса

Кандидат Марија Ћоровић је резултате истраживања остварене у оквиру израде ове докторске дисертације потврдила објављивањем радова у часописима међународног значаја и саопштавањем радова на међународним и националним скуповима. Резултати истраживања који су део дисертације објављени су до сада у оквиру четири рада у међународним часописима и четири саопштења на скуповима међународног или националног значаја. Кандидат се током израде дисертације бавио истраживачким радом у оквиру уже научне области биохемијског инжењерства и биотехнологије у оквиру којих је коаутор још пет радова у часописима међународног значаја и осам саопштења на скуповима међународног или националног значаја.

### Научни радови који су део дисертације:

#### Категорија M21:

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

#### Категорија M22:

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

#### Категорија M23:

3. **Stojanović, M.**, Carević, M., Mihailović, M., Knežević-Jugović, Z., Petrović, S., Bezbradica, D.: Enzimaska sinteza i primena askorbil-estara masnih kiselina, - *Hemijska Industrija*, vol. 67, pp. 239-247, 2013 (IF(2013)=0,562) (ISSN 2217-7426).
4. **Stojanović, M.**, Carević, M., Mihailović, M., Veličković, D., Dimitrijević, A., Milosavić, N., Bezbradica, D.: Influence of fatty acid on lipase-catalyzed synthesis of ascorbyl esters and their free radical scavenging capacity, - *Biotechnology and Applied Biochemistry*, doi:10.1002/bab.1296 (IF(2014)=1,362) (ISSN 0885-4513).

#### Категорија M33:

5. **Stojanović, M.**, Veličković, D., Dimitrijević, A., Milosavić, N., Knežević-Jugović, Z., Bezbradica, D.: Study of lipase-catalyzed synthesis of ascorbyl oleate using response surface methodology, - *Proceedings of 6th Central European Congress on Food – CEFood*, pp. 807-813, 2012, Novi Sad (ISBN: 978-86-7994-027-8).

#### Категорија M34:

6. **Stojanović, M.**, Veličković, D., Dimitrijević, A., Milosavić, N., Knežević-Jugović, Z., Bezbradica, D.: The optimization of enzymatic synthesis of ascorbyl oleate in organic solvents, - *1st FCUB ERA Workshop Food Safety and Health Effects of Food*, 2011, Beograd, P.1.

#### Категорија M63:

7. **Stojanović, M.**, Veličković, D., Dimitrijević, A., Milosavić, N., Knežević-Jugović, Z., Bezbradica, D.: Sinteza askorbil-oleata katalizovana imobilisanom lipazom iz *C. antarctica*, - *Biotehnologija za održivi razvoj*, pp. 21-24, 2010, Beograd (ISBN: 978-86-7401-269-7).
8. **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*, pp. 64-67, 19-20. oktobar 2012, Beograd, CD Knjiga radova (ISBN: 978-86-7132-051-1).

### Остали научни радови кандидата:

#### Категорија M21:

9. Mihailović, M., **Stojanović, M.**, Banjanac, K., Carević, M., Prlainović, N., Milosavić, N., Bezbradica, D.: Immobilization of lipase on epoxy-activated Purolite® A109 and its post-immobilization stabilization, - *Process Biochemistry*, vol. 49, pp. 637-646, 2014 (IF(2013)=2,524) (ISSN 1359-5113).
10. Milisavljević, A., **Stojanović, M.**, Carević, M., Mihailović, M., Veličković, D., Milosavić, N., Bezbradica, D.: Lipase-Catalyzed Esterification of Phloridzin: Acyl Donor Effect on

Enzymatic Affinity and Antioxidant Properties of Esters, - *Industrial and Engineering Chemistry Research*, vol. 53, pp. 16644–16651, 2014 (IF(2014)=2,587) (ISSN 0888-5885).

11. Banjanac, K., Mihailović, M., Prlainović, N., **Stojanović, M.**, Carević, M., Marinković, A., Bezbradica, D.: Cyanuric chloride functionalized silica nanoparticles for covalent immobilization of lipase, - *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, doi: 10.1002/jctb.4595 (IF(2013)=2,494) (ISSN 0268-2575).
12. Carević, M., Veličković, D., **Stojanović, M.**, Milosavić, N., Rogniaux, H., Ropartz, D., Bezbradica, D.: Insight in the regioselective enzymatic transgalactosylation of salicin catalyzed by  $\beta$ -galactosidase from *Aspergillus oryzae*, - *Process Biochemistry*, doi:10.1016/j.procbio.2015.01.028 (IF(2013)=2,524) (ISSN 1359-5113).

#### Kategorija M23:

13. Carević, M., Vukašinović-Sekulić, M., Grbavčić, S., **Stojanović, M.**, Mihailović, M., Dimitrijević, A., Bezbradica, D.: Optimization of  $\beta$ -galactosidase production from lactic acid bacteria, - *Hemijska Industrija*, doi: 10.2298/HEMIND140303044C (IF(2013)=0,562) (ISSN 2217-7426).

#### Kategorija M34:

14. Carević, M., **Stojanović, M.**, Mihailović, M., Stefanović, A., Grbavčić, S., Knežević-Jugović, Z., Bezbradica, D.: The immobilization of  $\beta$ -galactosidase on chemically modified immobilization supports, - *2nd FCUB Workshop Food Technology and Biotechnology*, 2011, Beograd, P-26.
15. Milisavljević, A., **Stojanović, M.**, Dinić, I., Carević, M., Mihailović, M., Milosavić, N., Bezbradica, D.: Lipase-catalyzed synthesis of phloridzin esters, *8<sup>th</sup> International Conference of the Chemical Societies of the South-East European Countries*, 2013, Beograd, F P21.
16. Prlainović, N., **Stojanović, M.**, Carević, M., Mihailović, M., Banjanac, K., Marinković, A., Bezbradica, D.: Two-step modification of silica nanoparticles for covalent lipase immobilization, - *8<sup>th</sup> International Conference of the Chemical Societies of the South-East European Countries*, 2013, Beograd, BS-NS P001.
17. Mihailović, M., Carević, M., **Stojanović, M.**, Prlainović, N., Banjanac, K., Bezbradica, D.: Chemical modification of Purolite A109 for application in lipase immobilization, - *8<sup>th</sup> International Conference of the Chemical Societies of the South-East European Countries*, 2013, Beograd, F P34.
18. Carević, M., Vukašinović-Sekulić, M., **Stojanović, M.**, Mihailović, M., Jakovetić, S., Grbavčić, S., Bezbradica, D.: Production and characterization of extracellular  $\alpha$ -galactosidase from *Aspergillus oryzae* DSM 1862, - *8<sup>th</sup> International Conference of the Chemical Societies of the South-East European Countries*, 2013, Beograd, F P14.

#### Kategorija M63:

19. 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*, pp. 54-57, 19-20. oktobar 2012, Beograd, CD Knjiga radova (ISBN: 978-86-7132-051-1).
20. 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*, pp. 82-85, 19-20. oktobar 2012, Beograd, CD Knjiga radova (ISBN: 978-86-7132-051-1).

#### Kategorija M64:

21. Carević, M., **Stojanović, M.**, Jakovetić, S., Mihailović, M., Dimitrijević, A., Trbojević, J., Veličković, D.: Proizvodnja sirovog ćelijskog ekstrakta  $\beta$ -galaktozidaze pomoću bakterija

## 5. ЗАКЉУЧАК И ПРЕДЛОГ

На основу претходно изнетих разматрања резултата докторске дисертације Марије Ћоровић, дипл. инж. под називом „Синтеза липосолубилних аскорбил-естара карбоксилних киселина катализована имобилисаним липазама” 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 научно-истраживачку способност у свим фазама израде ове докторске дисертације.

Комисија предлаже Наставно-научном већу Технолошко-металуршког факултета да се докторска дисертација под називом „Синтеза липосолубилних аскорбил-естара карбоксилних киселина катализована имобилисаним липазама ” кандидата Марије Ћоровић 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 Дејан Безбрадица, ванредни професор  
Универзитет у Београду, Технолошко-металуршки факултет

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

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

.....  
др Александар Маринковић, доцент  
Универзитет у Београду, Технолошко-металуршки факултет