

UNIVERZITET U BEOGRADU
TEHNOLOŠKO-METALURŠKI FAKULTET

Anja I. Petrov Ivanković

**ENZIMSKI POTPOMOĞNUTA PROIZVODNJA
PREBIOTIKA ZA TOPIKALNU PRIMENU I
ODREĐIVANJE NJIHOVIH STRUKTURNIH I
FUNKCIONALNIH SVOJSTAVA**

doktorska disertacija

Beograd, 2025

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF TECHNOLOGY AND METALLURGY

Anja I. Petrov Ivanković

**ENZYME-ASSISTED PRODUCTION OF
PREBIOTICS FOR TOPICAL APPLICATION
AND DETERMINATION OF THEIR
STRUCTURAL AND FUNCTIONAL
PROPERTIES**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2025

MENTORI:

Dr Dejan Bezbradica, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet

Dr Marija Čorović, viši naučni saradnik
Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet

ČLANOVI KOMISIJE:

Dr Rada Pjanović, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet

Dr Mirjana Rajilić-Stojanović, vanredni profesor
Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet

Dr Dijana Krstić Milošević, naučni savetnik
Univerzitet u Beogradu, Institut za biološka istraživanja
„Siniša Stanković“ – Institut od nacionalnog značaja za
Republiku Srbiju

DATUM ODBRANE: _____

Zahvalnica

Ova doktorska disertacija je najvećim delom urađena na Katedri za Biohemijsko inženjerstvo i biotehnologiju Tehnološko-metalurškog fakulteta, Univerziteta u Beogradu. Deo mikrobioloških eksperimenata urađen je na Departmanu za dermatologiju, Univerzitetskog medicinskog centra Radbod (Radboud University) u Nijmegenu (Holandija), a deo analiza na Institutu za nauku o hrani (Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación, CIAL) u Madridu (Španija). Istraživanja koja su obuhvaćena ovom doktorskom disertacijom finansirana su od strane Ministarstva nauke, tehnološkog razvoja i inovacija Republike Srbije (br. 451-03-136/2025-03/200287), Projekta fonda za nauku Republike Srbije (program Ideje, „Prebiotics for functional food and bioactive cosmetics – PrIntPrEnzy“, br. 7750109) i Programa Evropske unije Horizont Evropa 2021-2027 – Okvirni program za istraživanje i inovacije („Twinning for intensified enzymatic processes for production of prebiotic containing functional food and bioactive cosmetics – TwinPrebioEnz“, br. 101060130).

Posebnu zahvalnost dugujem svom mentoru, prof. dr Dejanu Bezbradici, na ukazanoj prilici da se bavim istraživačkom temom koja je bila istovremeno izazovna i izuzetno inspirativna, te je predstavljala istinsko zadovoljstvo u svakom koraku istraživačkog procesa. Takođe, zahvaljujem se na pruženom znanju i stručnim savetima koji su imali značajnu ulogu u razvoju temeljnih ideja ove doktorske disertacije.

Iskreno zahvaljujem svojoj mentorki, dr Mariji Ćorović, na pažljivom usmeravanju eksperimentalnog dela istraživanja, koje je u velikoj meri doprinelo oblikovanju i ukupnom kvalitetu ove doktorske disertacije. Veliko hvala na vrednim savetima koji su doprineli razvoju mog istraživačkog puta.

Zahvaljujem se prof. dr Radi Pjanović, van. prof. dr Mirjani Rajilić-Stojanović i dr Dijani Krstić Milošević na korisnim komentarima i savetima koji su poboljšali kvalitet ove doktorske disertacije.

Od srca zahvaljujem kolegincama iz tima dr Katarini Banjanac, Ani Vukoičić, dr Ani Milivojević i dr Milici Simović, kao i svim ostalim kolegincama i kolegama, profesorima i tehničarima sa Katedre za biohemijsko inženjerstvo i biotehnologiju na nesebičnoj pomoći, razumevanju i prijateljskoj atmosferi koja je činila svakodnevni rad prijatnijim i ispunjenijim. Posebnu zahvalnost dugujem dragoj koleginki Milici Veljković na bezrezervnoj pomoći u laboratoriji, ali i na iskrenom prijateljstvu, i nebrojenim šoljicama kafe koje su bile dragocen predah i podstrek u najzahtevnijim trenucima istraživanja.

Najveću zahvalnost dugujem prijateljima i svojoj porodici, pre svega mojoj mami Vesni koja me je od malih nogu uvela u svet „hemičarenja“ i koja je svojom ljubavlju, neiscrpnim strpljenjem i podrškom bila moj najveći oslonac tokom svih ovih godina. Neizmerno hvala i mojoj sestri Ivani što je uvek bila tu za mene kao najbolji prijatelj, pružajući mi nepokolebljivu podršku kroz sve izazove koje je ovaj put, ali i život, nosio sa sobom. Na kraju, neizmerno hvala mom suprugu Milanu, mojoj sigurnoj luci, na strpljenju, razumevanju, ohrabrenju i vedrom osmehu koji su bili izvor moje snage da istrajem, čak i kada je bilo najteže. Hvala što ste uvek verovali u mene!

Anja

Enzimski potpomognuta proizvodnja prebiotika za topikalnu primenu i određivanje njihovih strukturnih i funkcionalnih svojstava

Sažetak

U okviru ove doktorske disertacije izvršena je konvencionalna i enzimski potpomognuta ekstrakcija fitohemikalija iz različitog bobičastog voća i tropova bobičastog voća primenom zelenih rastvarača u cilju dobijanja ekstrakata sa dermalnim prebiotskim potencijalom. Optimizacijom uslova enzimski potpomognute ekstrakcije dobijeni su vodeni ekstrakti koji su pored bogatog polifenolnog sastava i izražene antioksidativne aktivnosti, imali i bolju prebiotsku aktivnost u odnosu na ekstrakte dobijene konvencionalnom metodom ekstrakcije. Kao najbolji izdvojili su se ekstrakti crne ribizle i tropa maline, koji su pokazali visok stepen stimulacije koagulaza negativne bakterije *Staphylococcus epidermidis*, stalnog člana mikrobiote kože, uz istovremenu inhibiciju patogenih bakterija *Staphylococcus aureus* i *Cutibacterium acnes*. Korišćenjem *in vitro stratum corneum* modela kože i uzorka mikrobiote kože sa atopijskim dermatitisom, pokazano je da isti ekstrakti stimulišu rast koagulaza negativnih bakterija, čime je potvrđena njihova sposobnost modulacije sastava mikrobiote kože u korist željenih bakterija. Ekstrakti crne ribizle i tropa maline dobijeni enzimski potpomognutom ekstrakcijom i eutektskim smešama na bazi betaina i propilen glikola ili glicerola, imali su izraženiju prebiotsku aktivnost, usled združenog delovanja sastojaka samih smeša i fitohemikalija prisutnih u ekstraktima. Eksperimenti transdermalne difuzije polifenola ekstrakta crne ribizle iz kozmetičkih formulacija, pokazali su da je hidrogel najpogodnija formulacija za topikalnu isporuku polifenola, jer ostaju na površini kože gde mogu ispoljiti svoju aktivnost. Na kraju, frakcije bogate pektinima dobijene iz tropa crne ribizle zaostalog nakon ekstrakcije fitohemikalija, pokazale su dobra tehno-funkcionalna svojstva za primenu u kozmetičkim proizvodima, kao i prebiotski potencijal.

Ključne reči: *topikalni prebiotici, mikrobiota kože, bobičasto voće, fitohemikalije, antioksidativna aktivnost, enzimski potpomognuta ekstrakcija, zeleni rastvarači, (trans)dermalna difuzija, kozmetičke formulacije, frakcije bogate pektinom*

Naučna oblast: Tehnološko inženjerstvo

Uža naučna oblast: Biohemijsko inženjerstvo i biotehnologija

Enzyme-assisted production of prebiotics for topical application and determination of their structural and functional properties

Abstract

Within this doctoral dissertation, the conventional and enzyme-assisted extraction of phytochemicals from different berries and berry pomaces using green solvents was performed to obtain extracts with skin prebiotic potential. Aqueous extracts obtained under the optimized condition of enzyme-assisted extraction had higher polyphenol concentration and stronger antioxidant activity, as well as better prebiotic activity compared to extracts obtained by the conventional extraction method. Blackcurrant and raspberry pomace extracts stood out as the best, showing a high degree of stimulation of the coagulase-negative bacteria *Staphylococcus epidermidis*, a resident member of the skin microbiota, with simultaneous inhibition of the pathogenic bacteria *Staphylococcus aureus* and *Cutibacterium acnes*. Using an *in vitro stratum corneum* skin model and a microbiota sample of skin with atopic dermatitis, it was shown that the same extracts stimulate the growth of coagulase-negative bacteria, thus confirming their ability to modulate the composition of the skin microbiota in favor of the beneficial bacteria. Blackcurrant and raspberry pomace extracts obtained by enzyme-assisted extraction and eutectic mixtures based on betaine and propylene glycol or glycerol had a more pronounced prebiotic activity, due to the joint action of the ingredients of the mixture and phytochemicals present in the extracts. Experiments of transdermal diffusion of polyphenols of blackcurrant extract from cosmetic formulations showed that hydrogel is the most suitable formulation for topical delivery of polyphenols because they remain on the surface of the skin where they can exert their activity. Finally, the fractions rich in pectin obtained from blackcurrant pomace remaining after extraction of phytochemicals, showed good techno-functional properties for application in cosmetic products, as well as skin prebiotic potential.

Key words: topical prebiotics, skin microbiota, phytochemicals, berries, antioxidant activity, enzyme-assisted extraction, green solvents, (trans)dermal diffusion, cosmetic formulations, pectin-rich fractions

Scientific field: Technological engineering

Scientific subfield: Biochemical engineering and biotechnology

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DEO.....	4
2.1. Koža.....	4
2.1.1. Struktura kože.....	4
2.1.1.1. Epidermis.....	5
2.1.1.2. Dermis.....	6
2.1.1.3. Hipodermis.....	7
2.1.1.4. Kožni adneksi.....	7
2.1.2. Urođeni i stečeni imunološki sistem kože.....	8
2.1.3. Prenos (bioaktivnih) jedinjenja kroz kožu.....	9
2.1.3.1. Putevi prenosa.....	9
2.1.3.2. Uticaj različitih faktora na prenos (bioaktivnih) jedinjenja u/kroz kožu.....	10
2.1.3.2.1. Stanje kože.....	10
2.1.3.2.2. Fizičko-hemijske karakteristike aktivnih jedinjenja.....	10
2.1.3.2.3. Karakteristike topikalnih formulacija.....	11
2.2. Mikrobiota kože.....	12
2.2.1. Podela mikrobiote kože.....	13
2.2.1.1. Rezidentna i tranzitna mikrobiota kože.....	13
2.2.1.2. Podela mikrobiote na osnovu dela tela koji kolonizuju njeni predstavnici.....	14
2.2.1.2.1. Članovi mikrobiote koji naseljavaju vlažne delove kože.....	15
2.2.1.2.2. Članovi mikrobiote koji naseljavaju masne delove kože.....	16
2.2.1.2.3. Članovi mikrobiote koji naseljavaju suve delove kože.....	16
2.2.2. Najznačajniji članovi mikrobiote kože.....	17
2.2.2.1. <i>Staphylococcus epidermidis</i>	17
2.2.2.2. <i>Staphylococcus aureus</i>	18
2.2.2.3. <i>Cutibacterium acnes</i>	18
2.3. Disbalans mikrobiote kože.....	19
2.3.1. Atopijski dermatitis.....	19
2.3.1.1. Interakcije između bakterija <i>S. epidermidis</i> i <i>S. aureus</i> kod atopijskog dermatitisa.....	20
2.3.2. <i>Acne vulgaris</i>	21
2.3.2.1. Interakcije između bakterije <i>S. epidermidis</i> i <i>C. acnes</i> kod akni.....	22
2.4. Modulacija mikrobiote kože kao princip lečenja kožnih oboljenja.....	23
2.4.1. Probiotici u kozmetici.....	23
2.4.2. Prebiotici u kozmetici.....	24

2.4.2.1. Prebiotski efekat oligosaharida na dermalnu mikrobiotu	25
2.4.2.2. Prebiotski efekat polifenola na dermalnu mikrobiotu	27
2.5. Polifenoli	28
2.5.1. Strukturna podela polifenola.....	29
2.5.1.1. Flavonoidi	29
2.5.1.1.1. Antocijanini	30
2.5.1.2. Fenolne kiseline	31
2.5.1.3. Tanini.....	31
2.5.1.4. Stilbeni i lignani.....	31
2.5.2. Antioksidativna aktivnost polifenola	31
2.5.2.1. Autooksidacija lipida u koži.....	32
2.5.2.2. Mehanizam antioksidativnog delovanja polifenola	33
2.5.2.3. Uticaj strukture polifenola na njihovu antioksidativnu aktivnost	34
2.6. Ekstrakcija polifenola iz biljnog materijala.....	36
2.6.1. Uticaj rastvarača na efikasnost ekstrakcije	36
2.6.1.1. Duboke eutektičke smeše.....	37
2.6.2. Uticaj ostalih fizičko-hemijskih parametara na efikasnost ekstrakcije	38
2.6.3. Vrste ekstrakcije za izolaciju polifenola iz biljnog materijala	39
2.7. Enzimski potpomognuta ekstrakcija polifenola iz biljnog materijala.....	39
2.7.1. Sastav biljnog ćelijskog zida.....	40
2.7.1.1. Celuloza	40
2.7.1.2. Hemiceluloza.....	41
2.7.1.3. Pektin.....	42
2.7.2. Enzimi koji učestvuju u razgradnji biljnog ćelijskog zida.....	43
2.7.3. Uticaj različitih parametara na efikasnost enzimski potpomognute ekstrakcije	44
2.8. Ciljevi istraživanja.....	47
3. Eksperimentalni deo	48
3.1. Materijali i metode	48
3.1.1. Materijali	48
3.1.2. Uređaji.....	50
3.2. Metode	51
3.2.1. Ekstrakcija fitohemikalija iz bobičastog voća i tropova primenom maceracije.....	51
3.2.2. Optimizacija enzimski potpomognute ekstrakcije fitohemikalija iz bobičastog voća i tropa.....	51
3.2.3. Ekstrakcija polifenola iz bobičastog voća i tropa primenom dubokih eutektičkih smeša	51
3.2.4. Određivanje karakteristika ekstrakata	52
3.2.4.1. Određivanje sadržaja ukupnih polifenola	52

3.2.4.2. Određivanje sadržaja ukupnih flavonoida	52
3.2.4.3. Određivanje sadržaja ukupnih antocijanina	52
3.2.4.4. Određivanje sadržaja ukupnih flavanola	53
3.2.4.5. Određivanje sadržaja ukupnih fenolnih kiselina.....	53
3.2.4.6. Određivanje sadržaja ukupnih hidrolizabilnih tanina.....	54
3.2.4.7. Određivanje sadržaja ukupnih kondenzovanih tanina.....	54
3.2.4.8. Određivanje sadržaja ukupnih redukujućih šećera.....	54
3.2.4.9. HPLC analiza antocijanina.....	55
3.2.5. Određivanje antioksidativnih karakteristika ekstrakata.....	55
3.2.5.1. FRAP metoda	55
3.2.5.2. CUPRAC metoda.....	55
3.2.5.3. DPPH metoda.....	56
3.2.5.4. ABTS metoda	56
3.2.5.5. Relativni antioksidativni kapacitet.....	56
3.2.6. Određivanje prebiotske aktivnosti ekstrakata i potvrđenih prebiotika.....	57
3.2.6.1. Priprema hranljivih podloga.....	57
3.2.6.2. Priprema bakterijskih inokuluma.....	57
3.2.6.3. Određivanje uticaja galakto-oligosaharida na bakterijski rast.....	57
3.2.6.3.1. HPLC analiza galakto-oligosaharida	58
3.2.6.4. Određivanje uticaja ekstrakata na bakterijski rast	58
3.2.6.5. Određivanje uticaja ekstrakata na mešanu bakterijsku kulturu	59
3.2.6.6. Određivanje uticaja ekstrakata na bakterijski rast na <i>in vitro stratum corneum</i> modelu.....	59
3.2.6.7. Uticaj ekstrakata na mikrobiotu kože	60
3.2.6.8. Kvantifikacija prebiotskog efekta	60
3.2.7. Praćenje difuzije galakto-oligosaharida i antocijanina iz kozmetičkih formulacija	61
3.2.7.1. Priprema kozmetičkih formulacija i njihova karakterizacija	61
3.2.7.1.1. Priprema hidrogela	61
3.2.7.1.2. Priprema krem gela tipa ulje u vodi (u/v)	61
3.2.7.1.3. Priprema emulzije gela tipa ulje u vodi (u/v)	62
3.2.7.1.4. TEWL test	62
3.2.7.1.5. Zein test.....	62
3.2.7.1.6. RBC test	63
3.2.7.2. Praćenje difuzije	63
3.2.7.3. Izračunavanje koeficijenata difuzije.....	63
3.2.8. Izolacija i karakterizacija pektinskih frakcija iz crne ribizle	65
3.2.8.1. Izolacija frakcija pektina iz crne ribizle.....	65

3.2.8.2. Karakterizacija pektinskih frakcija	65
3.2.8.2.1. Analiza strukturnih karakteristika pektinskih frakcija	65
3.2.8.2.1.1. Određivanje monosaharidnog sastava.....	65
3.2.8.2.1.1.1. Određivanje strukturnih karakteristika pektina	66
3.2.8.2.1.2. Određivanje raspodele molekulskih masa	66
3.2.8.2.1.3. FTIR analiza	67
3.2.8.2.2. Određivanje tehno-funkcionalnih svojstava	67
3.2.8.2.2.1. Određivanje kapaciteta zadržavanja vode	67
3.2.8.2.2.2. Određivanje kapaciteta zadržavanja ulja.....	67
3.2.8.2.2.3. Određivanje emulgujućih svojstava pektina	67
3.2.9. Statistička analiza	68
4. REZULTATI I DISKUSIJA.....	69
4.1. Uticaj GOS na mikrobiotu kože.....	69
4.2. Hemijska i biološka karakterizacija ekstrakata iz bobičastog voća.....	71
4.2.1. Određivanje sastava i antioksidativne aktivnosti ekstrakata.....	71
4.2.1.1. Koncentracija različitih klasa polifenolnih jedinjenja i redukujućih šećera	71
4.2.1.2. Antioksidativna aktivnost	73
4.2.1.3. Korelacije između antioksidativne aktivnosti i polifenolnog sastava	74
4.2.2. Identifikacija ekstrakata bobičastog voća sa prebiotskim efektom na mikrobiotu kože	76
4.2.2.1. Ispitivanje uticaja vodenih ekstrakata na rast bakterija <i>S. epidermidis</i> i <i>S. aureus</i>	76
4.2.2.2. Ispitivanje uticaja etanolnih ekstrakata na rast bakterija <i>S. epidermidis</i> i <i>S. aureus</i>	80
4.2.2.3. Ispitivanje uticaja odabranih ekstrakata na ko-kulturu bakterija <i>S. epidermidis</i> i <i>S. aureus</i>	83
4.3. Hemijska i biološka karakterizacija ekstrakata bobičastog voća	85
4.3.1. Određivanje sastava i antioksidativne aktivnosti ekstrakata.....	85
4.3.1.1. Koncentracija različitih klasa polifenolnih jedinjenja i redukujućih šećera	85
4.3.1.2. Antioksidativna aktivnost	86
4.3.1.3. Korelacije između antioksidativne aktivnosti i polifenolnog sastava ekstrakata tropova	87
4.3.2. Identifikovanje ekstrakta sa prebiotskim efektom na mikrobiotu kože	88
4.3.2.1. Ispitivanje uticaja ekstrakata na rast bakterija <i>S. epidermidis</i> i <i>S. aureus</i>	88
4.3.2.2. Ispitivanje uticaja odabranih ekstrakata na ko-kulturu bakterija <i>S. epidermidis</i> i <i>S. aureus</i>	90
4.4. Optimizacija enzimski potpomognute ekstrakcije fitohemikalija iz odabranog voća i tropova	92
4.4.1. Analiza monosaharidnog sastava polisaharida u supstratima	92
4.4.2. Optimizacija enzimski potpomognute ekstrakcije fitohemikalija iz crne ribizle	93
4.4.2.1. Izbor enzimskih preparata.....	93
4.4.2.2. Odnos rastvarača i supstrata.....	95
4.4.2.3. Koncentracija enzimskih preparata.....	96

4.4.2.4. Kombinovani efekat izabranih enzimskih preparata	97
4.4.2.5. Karakterizacija ekstrakta	98
4.4.2.5.1. Sadržaj različitih klasa polifenolnih jedinjenja i redukujućih šećera	98
4.4.2.5.2. Monosaharidni sastav	98
4.4.2.5.3. HPLC-UV analiza	99
4.4.2.5.4. Antioksidativna aktivnost.....	100
4.4.3. Optimizacija enzimski potpomognute ekstrakcije fitohemikalija iz jagode	100
4.4.3.1. Izbor enzimskih preparata.....	100
4.4.3.2. Odnos supstrata i rastvarača.....	101
4.4.3.3. Koncentracija enzimskih preparata	102
4.4.3.4. Kombinovani efekat izabranih enzimskih preparata	103
4.4.3.5. Karakterizacija ekstrakta	104
4.4.3.5.1. Sadržaj različitih klasa polifenolnih jedinjenja i redukujućih šećera	104
4.4.3.5.2. Antioksidativna aktivnost.....	105
4.4.4. Optimizacija enzimski potpomognute ekstrakcije fitohemikalija iz tropova bobičastog voća	105
4.4.4.1. Izbor enzimskih preparata.....	105
4.4.4.2. Odnos supstrata i rastvarača.....	107
4.4.4.3. Koncentracija enzimskih preparata	108
4.4.4.4. Kombinovani efekat izabranih enzimskih preparata	110
4.4.4.5. Karakterizacija ekstrakta	111
4.4.4.5.1. Sadržaj različitih klasa polifenolnih jedinjenja i redukujućih šećera	111
4.4.4.5.2. Antioksidativna aktivnost.....	112
4.4.4.5.3. Korelacije između antioksidativne aktivnosti i polifenolnog sastava.....	113
4.5. Ispitivanje prebiotskog potencijala ekstrakata dobijenih enzimski potpomognutom ekstrakcijom	114
4.5.1. Ispitivanje uticaja ekstrakata na rast bakterija <i>S. epidermidis</i> i <i>S. aureus</i>	114
4.5.2. Ispitivanje uticaja ekstrakata na ko-kulturu bakterija <i>S. epidermidis</i> i <i>S. aureus</i>	118
4.5.3. Ispitivanje uticaja izabranih ekstrakata na <i>stratum corneum</i> modelu	119
4.5.4. Ispitivanje uticaja izabranih ekstrakata na rast različitih sojeva bakterija kože	121
4.5.5. Ispitivanje uticaja izabranih ekstrakata na rast ko-kulture <i>S. epidermidis</i> i kliničkog izolata bakterije <i>S. aureus</i> na <i>stratum corneum</i> modelu	123
4.5.6. Ispitivanje uticaja izabranih ekstrakata na mikrobiom kože	124
4.5.6.1. Uticaj na mikrobiom zdrave kože	124
4.5.6.2. Uticaj na mikrobiom kože sa atopijskim dermatitisom	125
4.6. Ispitivanje difuzionih karakteristika odabranih dermalnih prebiotika	127
4.6.1. Difuzija galakto-oligosaharida iz različitih kozmetičkih formulacija.....	127
4.6.1.1. Difuzija kroz celulozno - acetatnu membranu.....	127

4.6.1.2. Transdermalna difuzija galakto-oligosaharida iz različitih kozmetičkih formulacija	129
4.6.1.3. Ispitivanje uticaja kozmetičkih formulacija sa galakto-oligosaharidima na rast bakterija	130
4.6.2. Difuzija polifenola ekstrakta crne ribizle iz različitih kozmetičkih formulacija	130
4.6.2.1. Difuzija kroz celulozno - acetatnu membranu.....	130
4.6.2.2. Transdermalna difuzija antocijanina iz različitih kozmetičkih formulacija	134
4.6.2.3. Ispitivanje uticaja kozmetičkih formulacija na rast bakterija.....	134
4.6.2.4. Određivanje efekta hidratacije, dermatološke kompatibilnosti i iritabilnosti formulacija.....	135
4.7. Ekstrakcija fitohemikalija odabranog bobičastog voća i tropa primenom eutektičkih smeša	137
4.7.1. Ekstrakcija fitohemikalija crne ribizle i tropa maline primenom eutektičkih smeša	137
4.7.1.1. Karakterizacija ekstrakata	137
4.7.1.2. Antioksidativna aktivnost	139
4.7.2. Enzimski potpomognuta ekstrakcija fitohemikalija iz crne ribizle i tropa maline primenom eutektičkih smeša	140
4.7.2.1. Karakterizacija ekstrakata	140
4.7.2.2. Antioksidativna aktivnost	141
4.7.2.3. Ispitivanje prebiotskog potencijala ekstrakata.....	142
4.8. Izolacija pektina iz bobičastog voća/crne ribizle	145
4.8.1. Fizičko-hemijske karakteristike izolovanih frakcija pektina	145
4.8.2. Monosaharidni sastav frakcija pektina.....	146
4.8.3. Raspodela molekulskih masa	147
4.8.4. FTIR analiza.....	147
4.8.5. Tehno-funkcionalne karakteristike pektinskih frakcija	148
4.8.6. Prebiotski potencijal dobijenih frakcija pektina	149
5. ZAKLJUČAK.....	151
6. LITERATURA.....	154

1. UVOD

Ljudska koža predstavlja prvu zaštitu organizma od fizičkih i hemijskih uticaja okoline. Istovremeno, predstavlja stanište velikom broju mikroorganizama koji obuhvataju bakterije, kvasce, viruse, kao i sitnih organizama poput grinja, koji se zajedničkim imenom nazivaju mikrobiotom kože [1]. Dermalnu mikrobiotu čini grupa mikroba stalno prisutnih na površini kože koja ne šteti domaćinu, kao i grupa mikroba koja se kratkotrajno zadržava i može ispoljiti svoj patogeni potencijal. Zahvaljujući efikasnom radu imunološkog sistema, između domaćina i njegove mikrobiote izgrađen je simbiotski odnos. Ovaj kompleksan odnos održava ravnotežu mikrobiološkog okruženja, što je ključno za očuvanje zdravlja kože. Ipak, koža je svakodnevno izložena različitim endogenim i egzogenim uticajima koji mogu izazvati prekomeran rast patogenih mikroorganizama, i posledično dovesti do disbalansa u sastavu dermalne mikrobiote. Neadekvatan odgovor organizma na ovo stanje otvara mogućnost nastanka zapaljenskih stanja kože poput atopijskog dermatitisa, akni, psorijaze, alergija i autoimunih bolesti [2,3].

Dosadašnja terapija za lečenje kožnih oboljenja nastalih kao posledica prekomernog bakterijskog rasta se prvenstveno bazira na upotrebi antibakterijskih preparata koji neselektivno inhibiraju bakterijski rast i smanjuju mikrobiološku raznolikost mikrobiote kože [4,5]. Stoga, kao nov i perspektivan pristup suzbijanju kožnih oboljenja javlja se ideja o topikalnoj primeni kozmetičkih formulacija sa prebioticima u cilju ponovnog uspostavljanja balansa dermalne mikrobiote. Prema definiciji, prebiotici u kozmetici podrazumevaju aktivne sastojke koje mikroorganizmi selektivno koriste obezbeđujući blagotvorne efekte na zdravlje kože [6]. Njihov mehanizam delovanja uključuje inhibiciju patogenih bakterija uz istovremeno očuvanje i/ili stimulaciju korisnih bakterija. Pored regulacije mikrobne disbioze, dermalni prebiotici mogu jačati imunološki sistem kože, stimulisati reparacione procese u oštećenoj koži, povećati njenu hidrataciju i otpornost na različite faktore stresa, sprečiti prevremeno starenje, transepidermalni gubitak vode i dr. [4,7].

Koncept dermalnih prebiotika je još uvek nova tema u svetu nauke, ali saznanja o njima se svakodnevno proširuju. Dosadašnja istraživanja ukazuju na primenu različitih vrsta oligosaharida poput galakto-oligosaharida, frukto-oligosaharida, gluko-oligosaharida, ksilo-oligosaharida i dr., koji imaju učinkovito dejstvo za uspostavljanje narušene ravnoteže između komensalnih bakterija poput koagulaza negativnih stafilokoka (*Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus capitis* i dr.) i patogenih bakterija (*Cutibacterium acnes*, *Staphylococcus aureus* i dr.). Međutim, sve se više nameće upotreba nove vrste prebiotika – polifenola, prvenstveno poznatim po svojim izraženim antioksidativnim svojstvima [4,5,7].

Polifenoli, sekundarni metaboliti viših biljaka, se mogu naći u različitom voću i povrću, pri čemu se bobičasto voće ističe kao jedan od najbogatijih izvora fitohemikalija [8]. Industrijska prerada voća stvara velike količine kašastih ostataka – tropova, koji se generalno smatraju otpadom iako sadrže velike količine neekstrahovanih polifenola, pa poslednjih godina dobijaju sve veću pažnju zbog svog neiskorišćenog potencijala [9]. Izolacija polifenola iz biljnog materijala se tradicionalno vrši ekstrakcijom pomoću različitih organskih rastvarača. Međutim, za upotrebu u kozmetičke svrhe neophodna je primena zelenih rastvarača poput etanola, vode ili pak eutektskih smeša prirodnog porekla, kako bi se izbegle negativne posledice koje sa sobom nose organski rastvarači. Tradicionalne metode ekstrakcije se lako izvode, ali njima se dobijaju niski prinosi jedinjenja kovalentno vezanih za ćelijski zid biljaka. Kako bi se ovi problemi prevazišli, razvijene su inovativne metode ekstrakcije, poput ekstrakcije potpomognute enzimima, sa ciljem povećanja efikasnosti izolacije fitohemikalija iz različitih delova biljaka [10,11].

Ćelijski zid biljaka izgrađen je od polisaharida celuloze, hemiceluloze, pektina i lignina, koji biljci pružaju potporu i zaštitu od spoljašnjih stresnih uticaja. Ekstrakcija potpomognuta enzimima zasniva se na upotrebi enzima (poput celulaza, hemicelulaza i pektinaza) koji hidrolizuju ove strukturne komponente što dovodi do razaranja ćelijskog zida i lakše difuzije slobodnih, ali i kovalentno vezanih molekula. Ključna prednost ove metode ekstrakcije je to što se izvodi u blagim reakcionim uslovima,

čime se smanjuje mogućnost oštećenja osetljivih komponenti, kao i to što se dobijaju veći prinosi željenih jedinjenja zahvaljujući visokoj specifičnosti enzima. Svakako, za dodatno povećanje efikasnosti enzimski potpomognute ekstrakcije neophodno je sprovesti optimizaciju mnogobrojnih parametara od kojih ovaj proces zavisi i to za svaki biljni materijal, kako bi se dobili ekstrakti bogati fitohemikalijama [12,13]. Upotreba ovako dobijenih ekstrakata kao dermalnih prebiotika, a istovremeno i kao antioksidanata koji štite kožu od ultravioletnog zračenja i prevremenog starenja, zahteva njihovu inkorporaciju u različite kozmetičke formulacije koje bi omogućile kontrolisanu isporuku polifenola u površinske ili dublje slojeve kože [8,14].

Cilj ove doktorske disertacije je razvoj efikasnih enzimskih postupaka proizvodnje dermalnih prebiotika za topikalnu primenu. Početna faza istraživanja je posvećena ispitivanju mogućnosti upotrebe galakto-oligosaharida, ekstrakata bobičastog voća i ekstrakata tropa bobičastog voća, bogatih polifenolima za regulaciju mikrobiološkog disbalansa. Ekstrakcija polifenola iz bobičastog voća (divlja i pitoma borovnica, crna ribizla, crvena ribizla, malina, jagoda, pasji trn i aronija) i tropova bobičastog voća (crna ribizla, malina, jagoda i aronija) je izvršena maceracijom korišćenjem vode i etanola kao rastvarača. Karakterizacija dobijenih ekstrakata koja se odnosi na ukupni sadržaj polifenola i različitih klasa polifenola, redukujućih šećera, kao i određivanje antioksidativne aktivnosti, izvršene su primenom odgovarajućih spektrofotometrijskih metoda. Prebiotska aktivnost u ovim preliminarnim eksperimentima je određena analizom uticaja na rast koagulaza negativne bakterije *S. epidermidis*, predstavnika komensalne dermalne mikrobiote, i koagulaza pozitivne bakterije sa patogenim potencijalom – *S. aureus*. U slučaju rasta čiste kulture, procena prebiotske aktivnosti je izvršena merenjem promene optičke gustine tokom vremena, dok je rast ovih bakterija u ko-kulturi određen indirektnom metodom brojanja kolonija na manitol slanom agaru. Odabir potencijalnih prebiotika je izvršen na osnovu procene sposobnosti dobijenih ekstrakata da stimulišu rast *S. epidermidis* uz istovremenu inhibiciju rasta *S. aureus*.

U drugoj fazi istraživanja, nakon izbora ekstrakata sa prebiotskim potencijalom, eksperimenti su bili usmereni ka optimizaciji enzimski potpomognute ekstrakcije. Ispitan je uticaj ključnih eksperimentalnih faktora (izbor enzima, odnos supstrata i rastvarača, koncentracija enzima i vreme trajanje enzimske hidrolize) na ekstrakciju polifenola. Odabranim supstratima određen je monosaharidni sastav polisaharida primenom gasne hromatografije sa plamenojonizujućim detektorom (GC-FID). Za razgradnju ćelijskog zida korišćeni su enzimski preparati Pectinex® Ultra SP-L i Rohapect® MC sa izraženom pektinolitičkom aktivnošću, i Viscozyme® L i Cellic® CTec3 HS koji imaju izraženu celulolitičku i hemicelulolitičku aktivnost. Karakterizacija ekstrakata izvršena je primenom spektrofotometrijskih metoda, a odabrani ekstrakti su analizirani primenom reverzno-fazne tečne hromatografije visokih performansi (RP-HPLC) sa UV detekcijom. Prebiotska aktivnost ovako dobijenih ekstrakata je ispitana praćenjem rasta ranije pomenutih bakterija i to u mono- i ko-kulture pomenutih bakterija, pri čemu su se kao najefikasniji istakli ekstrakt crne ribizle i ekstrakt tropa maline.

Kako bi se detaljnije analizirao prebiotski potencijal ekstrakta crne ribizle i ekstrakta tropa maline, ispitan je njihov uticaj na rast većeg broj sojeva bakterije *S. epidermidis* i drugih koagulaza negativnih stafilokoka – *S. capitis* i *S. hominis*, kao i na kliničke izolate bakterija *C. acnes* i *S. aureus*, merenjem promene optičke gustine. Takođe, u ovom delu istraživanja efekat izabranih ekstrakata na određene sojeve bakterija *S. epidermidis*, *S. aureus* i *C. acnes* je ispitan primenom *in vitro* modela površinskog sloja kože (*stratum corneum* model). Ovaj model približnije opisuje uslove koji vladaju na koži, s obzirom na to da se sastoji samo od agara i kalusa peta, kao jedinog izvora nutrijenata za mikroorganizme, što ujedno pruža bolju procenu delotvornosti ekstrakata kao prebiotika. Konačno, potvrda prebiotske aktivnosti ovih ekstrakata izvršena je na uzorku mikrobiote kože zdravih volontera, kao i na uzorku iste mikrobiote kože sa dodatkom kliničkog izolata *S. aureus* u cilju imitacije mikrobiote koja se može naći na koži pacijenata sa atopijskim dermatitisom.

U trećoj fazi istraživanja, ekstrakt koji je pokazao najbolji prebiotski potencijal i antioksidativnu aktivnost (ekstrakt crne ribizle), kao i galakto-oligosaharidi, inkorporirani su u različite kozmetičke formulacije (hidrogel, krem gel emulzija tipa ulje u vodi i klasična emulzija tipa ulje u vodi) kako bi se odredile njihove difuzione karakteristike. Prvi deo ovih eksperimenata izveden je korišćenjem Francove difuzione ćelije i celulozno-acetatne membrane koja se obično primenjuje za preliminarno opisivanje kinetike oslobađanja aktivnih sastojaka iz kozmetičkih formulacija. Drugi deo difuzionih eksperimenata je sproveden sa sintetskom Strat[®] M membranom koja strukturno imitira slojeve kože, kako bi se procenilo da li aktivni sastojci (galakto-oligosaharidi ili antocijanini ekstrakta crne ribizle) putem transdermalnog prenosa mogu preći u dublje slojeve kože ili ostaju u površinskim slojevima.

U narednoj fazi istraživanja, ispitna je mogućnost ekstrakcije polifenola iz crne ribizle i tropa maline primenom dubokih eutektičkih smeša kao zelenih rastvarača. Duboke eutektičke smeše su pripremljene korišćenjem sastojaka koji su odobreni za upotrebu u kozmetici. Stoga, u svim smešama je kao akceptor vodoničnih veza korišćen betain, dok su donori vodoničnih veza bili glicerol, glukoza, urea, sorbitol i propilen glikol. Efikasnost ovih smeša kao rastvarača za ekstrakciju polifenola ispitana je u postupku maceracije, a nakon odabira najpogodnijih smeša, ekstrakcija je izvedena uz pomoć enzimskih preparata pod prethodno definisanim optimalnim uslovima. Prebiotska aktivnost odabranih ekstrakata usmerena ka bakterijama *S. epidermidis* i *S. aureus*, procenjena je korišćenjem *stratum corneum* modela.

Poslednji korak istraživanja ove doktorske disertacije je bio iskorišćenje tropa crne ribizle, zaostalog nakon ekstrakcije fitohemikalija, u cilju dobijanja frakcija bogatih pektinskim polisaharidima za potencijalnu kozmetičku primenu. Karakterizacija pektinskih frakcija izvršena je primenom je GC-FID analiza, zatim primenom hromatografije visokih performansi sa izdvajanjem po veličini (HPSEC) i infracrvene spektroskopije sa Furijeovom transformacijom (FTIR). Pored analize njihovog sastava, ispitana su i tehno-funkcionalna svojstva dobijenih frakcija i dermalni prebiotski potencijal.

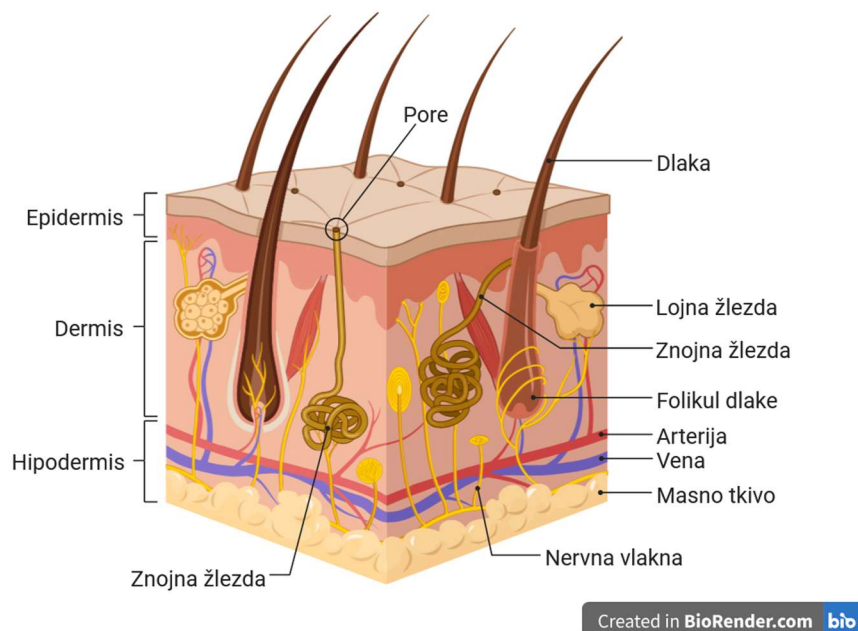
2. TEORIJSKI DEO

2.1. Koža

Koža je najveći organ ljudskog organizma, na šta ukazuje činjenica da čini 15-20 % celokupne mase čoveka [15]. Kao spoljašnji omotač, oblaže površinu tela i omogućava interakciju između domaćina i okoline. Predstavlja dinamičan organ koji se stalno menja i učestvuje u brojnim procesima od vitalnog značaja za ljudsko zdravlje [16]. Prvenstveno štiti unutrašnja tkiva i organe od oštećenja i povreda, ali i reaguje na nadražaje iz spoljašnje sredine. Zahvaljujući senzornim receptorima za dodir, pritisak, bol i temperaturu, šalje informaciju centralnom nervnom sistemu o promenama u neposrednom okruženju [17]. Kao fizička barijera, predstavlja prvu liniju odbrane organizma od fizičkih, mehaničkih i hemijskih agenasa, ultraljubičastog zračenja i patogenih mikroorganizama. S jedne strane sprečava penetraciju stranih materija i mikroorganizama iz spoljašnjeg okruženja u organizam, a sa druge strane prekomerni gubitak vode i drugih neophodnih supstanci iz tela. Takođe, koža učestvuje u regulaciji telesne temperature putem znojenja čime se održava ravnoteža u sadržaju vode i elektrolita [15,18]. Koža je bitna za očuvanje zdravlja domaćina, jer pored toga što pruža pasivnu fizičku odbranu protiv patogena, sadrži i elemente urođenog i adaptivnog imunološkog sistema koji joj omogućavaju aktivnu borbu protiv infekcija. Još jedna bitna funkcija kože je to što učestvuje u sintezi nekoliko hormona, kao i vitamina D, neophodnog za pravilan rast, razvoj i funkcionisanje organizma [15,19].

2.1.1. Struktura kože

Za kožu se može reći da predstavlja jedan od najkompleksnijih organa u ljudskom organizmu, s obzirom na to da je izgrađena od najmanje pet različitih vrsta ćelija organizovanih u tri osnovna sloja koji se međusobno razlikuju po građi, funkciji i poreklu. Pored epidermisa, dermisa i hipodermisa na ili unutar kože se nalaze kožni adneksi koji dodatno doprinose efikasnom funkcionisanju kože i njenog imunološkog sistema [15,17,18]. Na slici 2.1 prikazana je slojevita građa kože sa adneksima.

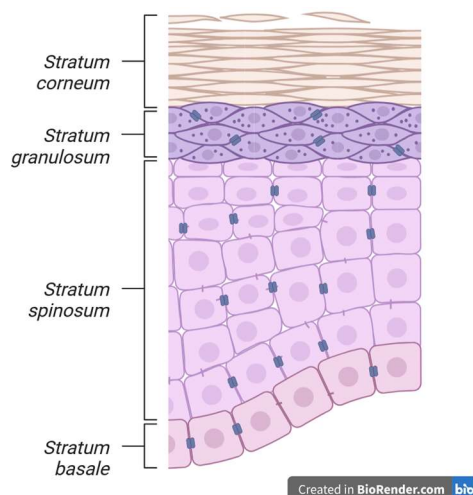


Slika 2.1. Struktura kože (napravljeno pomoću Biorendera)

2.1.1.1. Epidermis

Epidermis (slika 2.2) je spoljašnji i najtanji sloj kože, debljine od 0,05–1 mm. Debljina se znatno razlikuje u zavisnosti od dela tela i izloženosti mehaničkom opterećenju, pa je na primer, najdeblja na stopalima i rukama (~0,8 mm), a najtanja na kopcima (~0,06 mm) [17]. Epidermis ne sadrži krvne sudove [20]. U epidermisu se raspoznaju četiri epitelna podsloja: *stratum corneum*, *stratum granulosum*, *stratum spinosum* i *stratum basale* [15,20], pri čemu se na zadebljanim delovima kože može uočiti još jedan podsloj – *stratum lucidum*. Epidermis je potpuno odvojen od dermisa bazalnom membranom, koja se nalazi odmah ispod sloja *stratum basale* i naleže na ćelije dermisa [21].

Epidermis je u najvećem delu izgrađen od epitelnih ćelija - keratinocita, koji se neprestano stvaraju u bazalnom podloju. Keratinociti nakon proliferacije i diferencijacije, migriraju ka površini i u zavisnosti od stepena diferencijacije formiraju ostale podslojeve. Ćelijski ciklus keratinocita od nastanka u podsloju *stratum basale* pa do dolaska do površine kože traje oko 30 dana, pri čemu se proces ubrzava kod određenih zapaljenskih stanja poput psorijaze [22]. U epidermisu su pored epitelnih, prisutne i druge vrste ćelija: melanociti, Langerhansove ćelije i Merkelove ćelije. Dok keratinociti omogućavaju epidermisu da izvršava svoju barijernu funkciju i zadržava vodu, melanociti, Langerhansove i Merkelove ćelije odgovorne su za pigmentaciju kože, imunološku zaštitu i senzorne (dodirne) funkcije, redom [15].



Slika 2.2. Šematski prikaz slojeva kože (napravljeno pomoću Biorendera)

Stratum basale se sastoji od jednog sloja bazalnih ćelija poznatih kao bazalni keratinociti, koji su kubičnog oblika i relativno velikog jezgra [15]. Vezani su za bazalnu membranu preko hemidezmozoma (multiproteinskih kompleksa), dok su sa okolnim ćelijama vezani dezmozomima [21]. Ovaj sloj se naziva i matičnim slojem, zato što bazalni keratinociti neprestano prolaze kroz proces mitoze, čime se obezbeđuje zamena ćelija u višim slojevima. Bazalni keratinociti migriraju ka višim podslojevima, morfološki se menjaju, postaju pljosnatiji i zrnastije strukture, usled smanjenog sadržaja fosfolipida [17,20]. U ovom podsloju su prisutni i melanociti, dendritičke ćelije u kojima se stvara pigment melanin i pakuje u melanozome odgovorne za pigmentaciju kože. Melanozomi se dalje distribuiraju u keratinocite podsloja *stratum spinosum* gde okružuju njihova jezgra i štite ih od ultraljubičastih zraka. Kako se broj melanocita ne razlikuje previše između tipova kože, količina proizvedenog melanina prvenstveno zavisi od izloženosti suncu i genetike. Takođe, prisutne su i Merkelove ćelije za koje se smatra se da imaju ulogu senzornih receptora za dodir [15-17].

Stratum spinosum, poznat kao i suprabazalni sloj, sastoji se od osam do deset slojeva keratinocita poligonalnog oblika koje su povezane dezmozomima. Keratinociti prisutni u ovom sloju razlikuju se od

bazalnih po morfologiji s obzirom na to da sadrže keratinske filamente veće molekulske mase. Takođe, prvi put se u ovom sloju javljaju i lipidno obogaćene lamelarne granule poznate kao keratinozomi, što ukazuje na to da su se ćelije ovog podsloja pored sinteze proteina, specijalizovale i za sintezu lipida [20,21]. Glavna karakteristika ovog podsloja je to što doprinosi čvrstoći i fleksibilnosti kože [15,17]. Takođe, u njemu su prisutne i dendritične Langerhansove ćelije koje su efikasne u prepoznavanju i hvatanju antigena, zbog čega imaju ključnu ulogu u adaptivnom imunološkom odgovoru kože [23].

Stratum granulosum ili zrnasti sloj se nalazi neposredno iznad podsloja *stratum spinosum* i izgrađen je od tri do pet slojeva keratinocita. Ćelije su spljoštenije, sa zadebljanom membranom i zrnastog izgleda usled prisustva lamelarnih i keratohijalnih granula [15,17]. Keratohijalne granule se sastoje od profilagrina, lorikrina, proteina bogatim cisteinom i keratina, koje progresivno postaju veće u višim slojevima, ukazujući na izraženu sintezu keratina u poređenju sa prethodnim podslojevima. Filagrin, dobijen iz prekursora profilagrina, omogućava agregaciju keratinskih filamenata, njihovo unakrsno povezivanje i konačno – formiranje snopova. Sa druge strane, lamelarne granule koje sadrže lipidne komponente na svojoj površini služe za održavanje ćelijske kohezije [21]. U ovom podsloju započinje proces keratinizacije, proces degradacije ćelijskih komponenata, koji pored toga što dovodi do znatne promene u morfološkom obliku keratinocita, smanjuje njihovu metaboličku aktivnost [15,17].

Barijerna zona proteže se kroz nekoliko slojeva ćelija, a najizraženija je između živog epidermisa i podsloja *stratum corneum*. *Stratum corneum* ili rožnati sloj čini kompaktna masa od oko dvadesetak slojeva ćelija bez jedra i ćelijskih organela. Keratinociti u rožnatom sloju su krajnje diferencirani i metabolički neaktivni, a poznati su i kao korneociti [15]. Nevijabilni korneociti neprekidno se odbacuju sa tela u sitnim ljuspicama putem procesa koji se naziva deskvamacija ili ekfolijacija kože. Istovremeno, brzina proliferacije bazalnih korneocita podudara se sa stopom deskvamacije, te debljina ovog sloja ostaje približno ista, a barijerna funkcija kože ni u jednom trenutku nije narušena [15,17].

Rožnati sloj sagrađen je prema modelu „cigli i maltera“, pri čemu „cigle“ čine hidrofilni korneociti bogati proteinima (keratin i filagrin [20]), a „malter“ hidrofobni matriks bogat lipidima [24]. Sastav lipida u ovim međućelijskim prostorima se menja, idući od granularnog ka rožnatom sloju. Dok u međućelijskom prostoru vijabilnog epidermisa dominiraju fosfolipidi, dotle u rožnatom sloju prevladavaju holesterol, ceramidi i slobodne masne kiseline, dok se u manjoj meri mogu detektovati i trigliceridi, glikosfingolipidi i holesterolsulfat [21,24,25].

Hidrofobni i hidrofilni deo imaju različite funkcije, ali komplementarne, koje zajedno doprinose barijernoj aktivnosti epidermisa. Lipidni ekstracelularni matriks, odgovoran je za regulaciju propustljivosti, deskvamaciju, anti-peptidnu (antimikrobnu) aktivnost, izbacivanje toksina i selektivnu apsorpciju supstanci [26]. Nedostatak bilo koje od tri najzastupljenije vrste lipida dovodi do povećanog transepidermalnog gubitka vode, samim tim i do smanjenja barijerne funkcije kože [21]. Sa druge strane, korneociti pružaju mehaničku potporu, hidrataciju, zaštitu od UV zračenja i pokreću imunološki odgovor [26]. Rožnati sloj je visoko keratinizovan i dehidratisan u odnosu na druge slojeve kože, ali zahvaljujući keratinu, ima sposobnost zadržavanja vlage, što doprinosi njegovoj mekoći i fleksibilnosti [25]. Sadržaj vode je promenljiv i zavisi kako od vlažnosti okoline, tako i od lokacije na telu [17]. Povišena temperatura okoline slabi normalnu hidrataciju rožnatog sloja kože čime se potencijalno može narušiti zaštitna funkcija kože [21].

2.1.1.2. Dermis

Dermis čini najveći deo kože i obično je deset do dvadeset puta deblji od epidermisa. Predstavlja vezivno tkivo sa malim udelom ćelija, od kojih su najzastupljeniji fibroblasti. Dermalni fibroblasti sintetišu kolagen i elastin, glavne komponente ekstracelularnog matriksa [15]. Kolagen je fibrilarni protein izgrađen od tri velika polipeptidna lanca međusobno povezanih vodoničnim vezama i formiraju mrežu, dodatno stabilizovanu Van der Valsovim silama [25]. Izgrađena mreža čvrstih, kolagenskih

vlakana ima ulogu potpornog materijala u vezivnom tkivu dermisa, povećava zateznu čvrstoću kože i vezuje velike količine vode, čime raste tonus i svežina kože. Za razliku od kolagena, koji čini 70% dermalnog tkiva, nivo elastina je oko 1% i starenjem se smanjuje [15]. Vlakna elastina su po prirodi proteini, a njihovo prisustvo u dermisu pruža koži elastičnost. Uvek se nalaze uz kruta kolagenska vlakna kako bi se ograničilo prekomerno rastezanje tkiva [25].

U sastav matriksa, pored vode, kolagena i elastina ulaze i želatinozne supstance: proteoglikani (poput hijaluronske kiseline), glukozaminoglikani i glikoproteini (poput fibronektina, fibulina i integrina) [16,27]. Njihova uloga ogleda se u zaštiti i lubrikaciji dermalnih vlakana i ćelija, zadržavanju vode čime se povećava hidratacija kože, olakšavanju međućelijskog transporta i regulisanju viskoznosti samog tkiva [16]. Unutar dermisa nalaze se i vaskularni i limfni sistem, nervni završeci i kožni adneksi. Vaskularni sistem odgovoran je za regulaciju temperature kože, snabdevanje epidermisa hranjivim materijama i kiseonikom, kao i uklanjanje toksina i otpadnih proizvoda koji bi u slučaju akumulacije mogli dovesti do odumiranja samih ćelija [17,20]. U njemu je smeštena i većina ćelija imunološkog sistema kože poput dendritskih ćelija, makrofaga, mastocita, eozonofila, neutrofila, (B i T) limfocita, koja igra važnu ulogu u prevenciji infekcija i regeneraciji oštećenog tkiva [16].

2.1.1.3. Hipodermis

Hipodermis, *subcutis* ili potkožno tkivo nalazi se ispod dermisa i predstavlja najdublji sloj kože, pričvršćuje dermis za mišiće ili kosti [16]. Pretežno se sastoji od masnog tkiva, odnosno masnih ćelija (adipocita) povezanih vezivnim tkivom [15,17]. Čak 80% masti organizma je smešteno u hipodermisu, dok ostatak masti okružuje unutrašnje organe [27]. Raspodela i broj masnih ćelija se razlikuje na različitim delovima tela i zavisi od pola, hormonskog uticaja, starosti i stepena uhranjenosti osobe [20]. Mast se skladišti u obliku velikih lipidnih kapljica unutar zrelih adipocita i služi kao rezerva energije za organizam, obezbeđujući izolaciju od hladnoće ili toplote i ima važnu ulogu u održavanju temperature tela (termogenezi). Zbog svoje strukture, hipodermis ima ulogu „zaštitnog jastuka” koji apsorbuje spoljašnje sile poput mehaničkog udara čime štiti kožu od oštećenja [15-17]. Kao i dermis, ovaj sloj je dobro snabdeven krvlju. Takođe, deluje kao endokrini organ koji luči širok spektar hormona koji učestvuju u regulaciji unosa hrane, homeostazi glukoze, stimulaciji angiogeneze i rastu kose [16].

2.1.1.4. Kožni adneksi

Kroz slojevitou strukturu kože prolaze kožni adneksi (dodaci) koji su smešteni u dermisu, a protežu se do površine kože. S obzirom na to da su u direktnom kontaktu sa spoljašnjim okruženjem, predstavljaju potencijalno mesto prolaska supstance u dublje slojeve kože. Obuhvataju egzokrine žlezde (znojne i lojne), folikule dlake i nokte [17,27].

Dlake su specijalizovane rožnate materije koje rastu iz folikula smeštenih u dermisu i prodiru kroz epidermis do površine kože. Odgovorne su za regulaciju telesne temperature, zaštitu kože i olakšavaju isparavanje znoja. Uz folikul dlake, smeštene su lojne (sebacealne) žlezde i zajedno obrazuju sebacealnu jedinicu. Lojne žlezde luče sebum formirajući masnu prevlaku za kosu i kožu. Sebum je viskozna tečnost bogata lipidima, koja štiti kožu od isušivanja i čini je glatkom i mekom. Ove žlezde su najbrojnije na vlasištu, bradi, čelu, obrazima i leđima [26,28].

U ljudskom organizmu se nalazi od dva do četiri miliona znojnih žlezda rasprostranjenih na skoro celoj površini tela, pri čemu su najbrojnije na dlanovima, stopalima, čelu i gornjim udovima [26]. Postoje dve vrste znojnih žlezdi: ekrine i apokrine. Ekrine žlezde pomažu u regulaciji telesne temperature lučeći znoj kao odgovor na povišene spoljašnje temperature, fizičku aktivnost ili emocionalni stres. Suprotno njima, apokrine žlezde se nalaze samo u predelima poput aksila, perigenitalnog i perianalnog područja, a njihov sekret se izlučuje u folikule dlake, odakle se zatim prenosi na površinu kože [28]. Bakterije

prisutne u navedenim regijama, mogu da metabolišu apokrini znoj, stvarajući masne kiseline kratkog lanca koje daju muškarcima i ženama karakterističan, često neprijatan miris [15].

Nokti, rožnate tvorevine, štite vrhove prstiju na rukama i nogama od mehaničkog oštećenja [27].

2.1.2. Urođeni i stečeni imunološki sistem kože

Pored toga što je fizička barijera, koža ima imunološku odbrambenu funkciju. Imunološki odgovor kože je od vitalnog značaja prilikom povrede ili infekcije kože, a takođe reguliše sastav bakterija koji je kolonizuje [29]. Imunološka reakcija predstavlja odgovor organizma na strane organske materije koje su unete parenteralnim putem. Ovaj odgovor se manifestuje kroz neutralizaciju, razgradnju i izlučivanje stranih materija, bilo samostalno ili u kombinaciji sa proizvodima imunoloških ćelija i tkiva. Sve strane organske materije i mikroorganizmi koji izazivaju ovu reakciju nazivaju se antigenima [30].

Urođeni imunitet je prisutan od rođenja i predstavlja odgovor organizma na neki antigen sa kojim nikada pre nije bio u dodiru. Mehanizam delovanja podrazumeva brzu detekciju mikroorganizama, fagocitozu i antimikrobnu aktivnost. Urođeni imunitet uključuje fizičke barijere (epitel kože i sluzokože), rastvorljive komponente (sistem komplementa, antimikrobni peptidi, hemokini i citokini) i ćelije (monociti, dendritičke ćelije, prirodne ćelije ubice i polimorfonuklearni leukociti (neutrofilii)) [26].

Antimikrobni peptidi su mali, amfilinili molekuli, obično sa pozitivnim naelektrisanjem, koji poseduju snažne antimikrobne osobine. Efikasni su protiv širokog spektra mikroorganizama, uključujući Gram pozitivne i Gram negativne bakterije, gljivice i određene viruse [31]. Smatra se da njihova aktivnost potiče iz sposobnosti da se preko svoje hidrofobne površine vežu za membranu mikroorganizma, formirajući pore koje dovode do liziranja ćelije i njene smrti. Najvažniji humani antimikrobni peptidi uključuju β -defensine (hBD-1, hBD-2, hBD-3, hBD-4) i katelicidin (LL-37) koji se proizvode u vijabilnim keratinocitima i dermicidin koji se izlučuje putem ljudskog znoja [4,26,32]. Na njihovu antimikrobnu aktivnost ne utiče niska pH vrednost ljudskog znoja, kao ni visoka koncentracija soli. Pored antimikrobnih peptida, sebum sadrži antimikrobne lipide poput laurinske i sapienske kiseline, koje takođe imaju važnu ulogu u kontroli rasta patogenih organizama [33].

Patogeni mikroorganizmi na svom ćelijskom zidu poseduju molekulске obrasce (eng. *Pathogen-Associated Molecular Patterns*, PAMP) koji se ponašaju kao ligandi za aktivaciju receptora za prepoznavanje obrazaca (eng. *Pattern Recognition Receptors*, PRR) prisutnih na ćelijama imunološkog sistema. Među PRR receptorima, najviše su proučavani tzv. TLR receptori (eng. *Toll-like Receptors*, TLR) [32]. Vezivanje patogenih molekulskih obrazaca za odgovarajuće receptore pokreće urođeni imunološki odgovor, što rezultira izlučivanjem antimikrobnih peptida, citokina ili hemokina koji mogu brzo inaktivirati i uništiti raznovrstan spektar patogenih mikroorganizama. Takođe, i neki članovi dermalne mikrobiote mogu ograničiti rast patogenih bakterija i time dodatno doprinose pravilnom funkcionisanju imunološkog sistema domaćina [3,29]. Štaviše, komensalne bakterije proizvode antimikrobne peptide koji sinergetskim delovanjem sa humanim antimikrobnim peptidima mogu da inhibiraju patogene [33].

Stečeni ili adaptivni imunološki sistem kože se stiče tokom života domaćina i nastaje kao rezultat izlaganja organizma različitim patogenima. Njegov odgovor je sporiji i zahteva proizvodnju specifičnih T limfocita koji služe za prepoznavanje antigena i B ćelija čija uloga podrazumeva proizvodnju specifičnih antitela koja se vezuju za strani mikroorganizam. Prednost ovog sistema je to što poboljšava svoje delovanje pri ponovnom izlaganju antigena i sposobnost prepoznavanja specifičnog proteina umesto jednostavnog obrasca prepoznavanja. Imunološki odgovor ovog sistema se može izgraditi protiv gotovo bilo kojeg strukturnog proteina, što sa sobom nosi visok rizik od pojave autoimunosti [34,35].

2.1.3. Prenos (bioaktivnih) jedinjenja kroz kožu

Koža je organ koji je svakodnevno izložen supstancama iz spoljnog okruženja, kao što su hranljive materije, gasovi i toksini. Pored toga, kozmetička i farmaceutska industrija nude širok spektar proizvoda sa aktivnim sastojcima koji se nanose na kožu kako bi poboljšali njen izgled ili lečili različite bolesti. Bioaktivna jedinjenja su inkorporirana u različite kozmetičke formulacije, a da bi ostvarila svoje terapeutsko dejstvo, moraju proći kroz slojevitou strukturu kože, dospeti do ciljanog područja u dovoljnoj koncentraciji i ostati prisutna dovoljno dugo da ispolje svoju aktivnost [25].

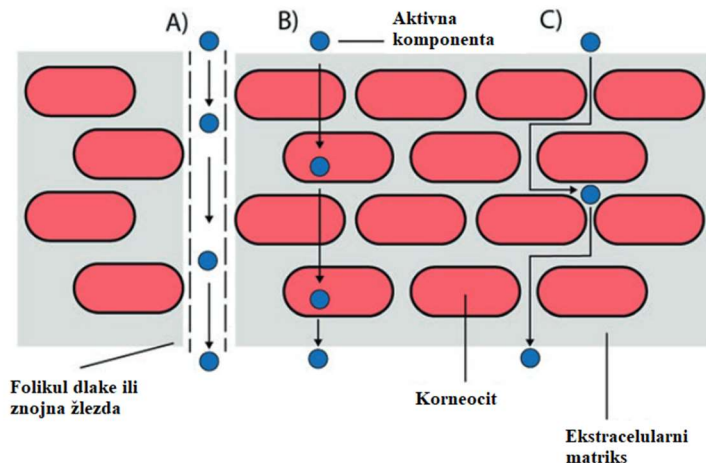
U dermatološkoj praksi, topikalna primena lekovitih preparata može biti u cilju transdermalne ili dermalne isporuke aktivnih supstanci. Transdermalni prenos podrazumeva difuziju komponente kroz slojeve kože i ulazak u sistemska cirkulaciju radi terapeuskog efekta. S druge strane, dermalna (lokalna) isporuka se odnosi na distribuciju komponente unutar slojeva kože uz minimalnu sistemska apsorpciju [36]. Ovakav vid isporuke je važan u lečenju dermatoloških stanja (npr. rak kože, psorijaza, ekcem i druge infekcije izazvane patogenim mikroorganizmima) gde je sedište oboljenja smešteno u samoj koži [37].

2.1.3.1. Putevi prenosa

Da bi aktivna supstanca došla do ciljanog sloja u koži ili sistemska cirkulacije, potrebno je da savlada barijernu funkciju rožnatog sloja, sloja koji pruža najveći otpor difuziji. Penetracija pasivnom difuzijom je moguća samo kod malih molekula čija molekulska masa nije veća od 500 Da, uz uslov da imaju adekvatnu lipofilnost [37].

Aktivna komponenta može difundovati kroz kožu na tri moguća načina (slika 2.3) [38]:

1. Transepidermalno (transcelularno i intercelularno)
2. Transfolikularno
3. Transglandularno



Slika 2.3. Šematski prikaz puteva prenosa komponente kroz rožnati sloj kože: A - transglandularni/transfolikularni prenos; B - Transcelularni prenos; C - Intercelularni prenos. (preuzeto i prilagođeno prema referenci [38])

Transepidermalni put podrazumeva prolazak kroz epidermis, što se može izvesti transcelularno (kroz korneocite) ili intercelularno (kroz lipidni ekstracelularni matriks). Ako bi se struktura rožnatog sloja poistovetila sa „ciglom i malterom“, najkraći put prenosa bio bi kroz slojeve korneocita i okolnog međucelijskog lipidnog matriksa, dok je put kroz ekstracelularni matriks znatno duži. Koji će put biti iskorišćen zavisi pre svega od strukture aktivne supstance. Pa tako, transcelularno prodiru uglavnom

hidrosolubilne/hidrofilne (polarne) supstance, dok liposolubilne/hidrofobne (nepolarne) supstance prolaze kroz lipidni sloj [25,37]. Kasnije je utvrđeno da je intercelularni prenos najzastupljeniji put prenosa većine aktivnih supstanci kroz ljudski rožnati sloj. Ovo je objašnjeno time da penetracija transcelularnim putem zahteva prolazak supstance kroz relativno hidrofilne korneocite, lipidnu ovojnicu koja ih okružuje i međućelijski matriks, što je do 50 puta veća dužina puta u poređenju sa ukupnom debljinom rožnatog sloja [39]. Međutim, ukoliko se uzme u obzir složena struktura rožnatog sloja odnosno činjenica da su korneociti međusobno povezani korneodezmozomima javlja se još jedan mogući put difuzije molekula kroz ovaj sloj. Ovaj put obuhvata prenos kroz korneocite preko korneodezmozoma i pogodan je za hidrofilne molekule. Pretpostavlja se da urea na taj način prodire u dublje slojeve epidermisa [20].

Transfolikularna penetracija, kroz koren dlake se dugo smatrala osnovnom, ali je kasnije dokazano da aktivne supstance prodiru i transglandularno, kroz izvodne kanale znojnih žlezdi [25]. Prednost ovih puteva prenosa je to što zaobilaze penetraciju kroz zahtevni rožnati sloj. Ali kako zauzimaju malu površinu apsorpcije, svega 0,1 % površine kože, prenos ovim načinom je limitiran, skoro zanemarljiv u odnosu na prenos kroz epidermis [20]. Znojne žlezde mogu posredno uticati na transepidermalni prenos tako što luče znoj koji smanjuje kiselost kože i hidratiše rožnati sloj, što u određenoj meri povećava permeaciju hidrofilnih aktivnih komponenti [25].

2.1.3.2. Uticaj različitih faktora na prenos (bioaktivnih) jedinjenja u/kroz kožu

Sposobnost penetracije aktivnih jedinjenja kroz kožu zavisi od nekoliko faktora poput stanja same kože, fizičko-hemijskih svojstava jedinjenja, kao i od sastava kozmetičkih formulacija u koje su ove komponente inkorporirane.

2.1.3.2.1. Stanje kože

Zdravstveno stanje kože, starost, debljina, pol, mogućnost metabolisanja jedinjenja, broj folikula vlasi i pora izvodnih kanala žlezdi, područje tela, eventualne povrede i promene na koži, stepen hidratacije, temperatura, pH vrednost i dr. predstavljaju parametre koji u velikoj meri utiču na permeabilnost rožnatog sloja, a samim tim i kože [20]. Razlike u sastavu rožnatog sloja dovode do nelinearnog pH gradijenta između podslojeva što može ograničiti difuziju naelektrisanih molekula [36]. Povećanjem temperature kože usled povećanog ultravioletnog zračenja, groznice ili proširenja krvnih sudova ili broja kapilara, propustljivost kože se značajno povećava i ubrzava se prenos aktivne komponente [38]. Starost, tip kože i polni hormoni utiču na propustljivost kože zbog promene u hemijskom sastavu rožnatog sloja. Stoga, u zavisnosti od regiona tela, transepidermalna i transfolikularna difuzija može biti favorizovana ili poremećena [36].

2.1.3.2.2. Fizičko-hemijske karakteristike aktivnih jedinjenja

Nekoliko fizičko-hemijskih parametara reguliše difuziju aktivne komponente kroz kožu i umnogome utiču na njenu bioraspodivost. Poznato je da se pasivna difuzija odvija prelaskom molekula iz oblasti veće, ka oblasti niže koncentracije. Stoga, bitno je da koncentracija topikalno nanese aktivne komponente bude odgovarajuća, jer veći koncentracioni gradijent dovodi do boljeg prenosa kroz slojeve kože [38]. Oblik i veličina molekula u velikoj meri određuje efikasnost njihove transdermalne difuzije. Apsorpcija aktivne komponente je obrnuto proporcionalna molekulskoj masi, te manji molekuli (molarne mase manje od 500 Da), obezbeđuju dobar kontakt sa rožnatim slojem i lakši prodor kroz epitelnu barijeru [40].

Vrsta funkcionalnih grupa prisutnih na aktivnom jedinjenju utiče na rastvorljivost samih jedinjenja i određuje način prenosa kroz kožu. Pa tako, postojanje funkcionalnih grupa poput hidroksilne, karboksilne i amidne grupe čine molekule polarnijim što povećava njihovu rastvorljivost u vodi, ali istovremeno otežava njihov prolazak kroz lipofilni rožnati sloj [36,41]. Stoga, u poslednje vreme, jedan od pristupa za rešavanje ovog problema podrazumeva modifikaciju hidrofilnih molekula dodavanjem alkil bočnih lanaca koji povećavaju lipofilnost molekula i olakšava njihovu difuziju kroz kožu [42]. Iz ovoga sledi da je rastvorljivost aktivnog jedinjenja jako bitna karakteristika koja u velikoj meri utiče na tok transdermalne difuzije, a određena je koeficijentom raspodele (P).

Koeficijent raspodele (P) daje informaciju o stepenu hidrofilnosti i lipofilnosti supstance i predstavlja odnos koncentracija aktivnog jedinjenja između dve nemešljive faze (npr. oktanol i voda) i najčešće se prikazuje kao logaritamska vrednost ($\log P$). Više vrednosti ovog koeficijenta ukazuju na to da je aktivno jedinjenje lipofilno i da ima veću tendenciju rastvaranja u lipidima ili nepolarnim rastvaračima kao što je oktanol. Sa druge strane, niže vrednosti ukazuju na hidrofilni karakter aktivnog jedinjenja i veću tendenciju rastvaranja u vodi [38]. S obzirom na to da je rožnati sloj sastavljen od nepolarnih lipida i neutralnih proteina, aktivna jedinjenja bi trebalo da poseduju odgovarajuću rastvorljivost u vodi i ulju kako bi efikasno prošli kroz slojeve kože. Poželjna vrednost koeficijenta raspodele ($\log P$) aktivnog jedinjenja za transdermalnu difuziju bi trebalo da bude u opsegu 1,0-3,0 [43]. Veoma lipofilni molekuli bi imali visoku rastvorljivost u lipidima, ali to bi značilo da se neće lako odvojiti od rožnatog sloja i preći u vijabilni deo epidermisa koji sadrži više vode, čime se ograničava brzina njihove transdermalne difuzije.

Kada je reč o neto naelektrisanju, većina aktivnih supstanci su slabe kiseline ili baze, i pH sredine utiče na disocijaciju ovih molekula menjajući njihovu hidrofilnost/lipofilnost što na kraju određuje tok kretanja molekula kroz slojeve kože. Rastvorljivost i difuzione karakteristike aktivnog jedinjenja u velikoj meri zavise od toga da li se nalaze u jonizovanom obliku ili ne. Molekuli u nejonizovanom obliku obično imaju lipofilan karakter i mogu lakše difundovati do vijabilnog epidermisa, za razliku od jonizovanog oblika molekula koji ima visoku rastvorljivost u vodi i visoku električnu otpornost i ne može lako da prođe kroz kožu. Udeo nejonizovanog oblika molekula zavisi od konstante disocijacije (pK_a) i pH vrednosti okoline [44]. Pa tako, postojanje pH gradijenta u koži dovodi do toga da npr. kiselina sa konstantom disocijacije (pK_a) 4,4, lako prolazi intercelularnim putem kroz rožnati sloj, čija je pH vrednost između 4,5 i 5,5, jer je molekul u nejonizovanom obliku i lipofilan. Međutim, kada bi stigla do zrnastog sloja kože, pH vrednosti između 6,8 i 7,0, molekul soli bi bio u jonizovanom obliku, veće polarnosti i samim tim i veće rastvorljivosti u vodi, što direktno limitira dalju difuziju [36,45].

2.1.3.2.3. Karakteristike topikalnih formulacija

Topikalne formulacije predstavljaju sisteme za dermalnu/transdermalnu isporuku bioaktivnih komponenata koje treba da obezbede lakši prodor aktivne komponente kroz kožu i njeno delovanje na ciljanom području u određenom vremenskom periodu. Nakon topikalnog nanošenja formulacije sa inkorporiranim aktivnom komponentom, svi sastojci, u manjem ili većem obimu, zajedno migriraju kroz slojeve kože. Tada može doći do uspostavljanja interakcija između aktivne komponente, sastojaka primenjene formulacije i sastojaka kože (sebuma i znoja), koje menjaju tok i brzinu difuzije željenih komponenata. Stoga, kako bi se neželjene interakcije minimizirale i difuzija bioaktivnih jedinjenja optimizovala, neophodno je poznavati fizičko-hemijske karakteristike kozmetičke formulacije [20,36].

Topikalne formulacije se mogu klasifikovati prema viskoznosti na tečne i polutečne; prema broju faza na one koje mogu imati jednu ili više; i prema mestu delovanja aktivne komponente na dermalne i transdermalne. Formulacije koje se najčešće primenjuju obuhvataju emulzije i gelove [46].

Formulacije sa većom viskoznošću usporavaju difuziju aktivnih komponenata iz same formulacije, čime se odlaže kontakt sa kožom, a samim tim i dalja apsorpcija. Takođe, veoma lipofilne

formulacije se mogu takmičiti sa lipidnim slojem iz rožnatog sloja, otežavajući prenos aktivne komponente zbog nepovoljnog koeficijenta raspodele, dok formulacije sa okluzivnim sastojcima mogu umereno povećati njenu apsorpciju. Prisustvo rastvarača, surfaktanta, pojačivača apsorpcije ili drugih aditiva u formulaciji može izazvati promene ili oštećenje rožnatog sloja putem različitih mehanizama što rezultira značajnim povećanjem apsorpcije svih komponenata iz formulacije [20,36].

U zavisnosti od konzistencije, emulzije se mogu javiti kao tečne formulacije (losioni) ili polutečne formulacije (kreme). Kao heterogeni sistemi, sastoje se od najmanje dve nemešljive faze pri čemu su kapi jedne faze (dispergovana faza) dispergovane unutar druge (kontinualne) faze. Tako mogu nastati emulzije tipa ulje u vodi (u/v) i tip voda u ulju (v/u). U prvom slučaju, ulje je dispergovano u vodi kao kontinualnoj fazi, dok je u drugom slučaju voda dispergovana, a ulje kontinualna faza. Kako bi se olakšala emulzifikacija, neophodno je prisustvo i treće komponente – emulgatora, koji ima funkciju da smanji površinski napon između dve faze i time osigura fizičku stabilnost emulzija. Tip emulzije isključivo zavisi od prirode emulgatora, jer faza u kojoj se emulgator bolje rastvara predstavlja kontinualnu fazu [47]. Emulzije se široko primenjuju s obzirom na to da se lako razmazuju po koži uz istovremeno snabdevanje kože lipofilnim i hidrofilnim sastojcima. Međutim, za razliku od u/v emulzija koje imaju prijatan osećaj na koži, v/u emulzije mogu ostaviti nepoželjan, mastan film na površini kože [20].

Gelovi ili hidrogelovi su polučvrste formulacije koji se sastoje od vode i odgovarajućeg polimera koji deluju kao agens za geliranje. Lako se razmazuju, hidriraju kožu i pružaju efekat hlađenja nakon nanošenja [46]. Karakteriše ih postojanje mreže hidrofilnih polimernih lanaca koji usled bubrenja mogu da zadrže velike količine vode, a da se pritom ne rastvore. Polimerni lanci su unutar trodimenzionalne mreže međusobno povezani kovalentnim, vodoničnim ili Van der Valsovim silama [48]. U zavisnosti od prirode polimera zavise i karakteristike samog hidrogela. Pa tako, prednost hidrogelova dobijenih pomoću prirodnih polimera je to što su biokompatibilni i biorazgradivi, ali imaju loše mehaničke karakteristike. Za razliku od njih, hidrogelovi pripremljeni pomoću sintetičkih polimera imaju bolje definisanu strukturu, što ih čini hemijski i mehanički stabilnijim [49]. Takođe, variranjem hemijskog sastava i metoda pripreme mogu se kontrolisati njihova svojstva poput poroznosti, sposobnosti bubrenja, biokompatibilnosti, biorazgradivosti i mehaničke čvrstoće [50].

2.2. Mikrobiota kože

Koža je značajna za opšte zdravlje ljudi, jer kao fizička i imunološka barijera štiti domaćina od stranih organizama i spoljašnjih uticaja [51]. Istovremeno, predstavlja stanište različitim mikroorganizmima kao što su bakterije, kvasci, virusi, bakteriofagi, arheje i grinje [35,52]. Podaci pokazuju da se na svakom kvadratnom centimetru ljudske kože nalazi preko milion mikroorganizama koji zajedno čine mikrobiotu kože [2,53].

Po definiciji mikrobiota kože predstavlja kompleksnu, simbiotičku zajednicu svih mikroorganizama koji žive na koži u homeostazi sa domaćinom [29]. Njena glavna uloga je sprečavanje kolonizacije domaćina patogenim vrstama i očuvanje imunološkog sistema. Ukoliko se poremeti ravnoteža između mikroba prisutnih u koži zdrave osobe (takozvanih komensala) i patogena, može doći do infekcije ili drugih poremećaja na koži [3,29]. U literaturi se mikrobiota često naziva i mikrobiomom, ali kako mikrobiota predstavlja skup mikroba, a mikrobiom skup gena mikroorganizama, ova dva termina se ne mogu poistovetiti. Na osnovu toga se može reći da ukupni genom koji mikrobiota kože sadrži naziva se mikrobiom kože [1,2].

Dermalna mikrobiota čoveka se tokom života menja i postaje složenija u odnosu na mikrobiotu novorođenčadi. Koža fetusa je sterilna, a kolonizacija započinje neposredno nakon rođenja, pri čemu način porođaja ima ključnu ulogu u inicijalnoj kolonizaciji. Prirodnim porođajem se uspostavlja mikrobiota koja odgovara vaginalnoj mikrobioti majke, dok se kod carskog reza razvija mikrobiota koja

je prisutna na koži stomaka [2,51]. Ovu ranu zajednicu mikroorganizama karakteriše mala raznolikost vrsta [51]. Prvi kontakt novorođenčeta i mikroorganizama značajno utiče na razvoj imuniteta kože koji se prvenstveno fokusira na razvijanje tolerancije prema bakterijama koje su deo normalne mikrobiote kože. Kako ljudi sazrevaju, od novorođenčadi do odrasle dobi, na koži se javljaju fiziološke promene koje dovode do značajnih modifikacija dermalne mikrobiote. Na primer, tokom adolescencije, dominiraju lipofilne bakterije, što je povezano sa polnim sazrevanjem i pojačanom aktivnošću lojnih žlezda stimulisanih hormonima [54,55]. Mikrobiota kože odraslih osoba je relativno stabilna i raznovrsna, a promene u sastavu mikroorganizama se poklapaju sa fiziološkim promenama na koži. Pored toga, okolina i uslovi koji u njoj vladaju, mogu značajno uticati na povećanje broja i raznovrsnosti zajednice mikroorganizama [51,54].

S obzirom na to da je koža dinamičan organ, njene osobine su promenljive i zavise kako od karakteristika i načina života pojedinca, tako i od životne sredine. Kakva će biti njena struktura pitanje je genetike, starosti, ishrane, nege i lične higijene, ali i geografskog područja stanovanja i klime (izloženosti sunčevoj svetlosti, temperature, vlažnosti, zagađenja vazduha i dr.) [35]. Uzajamno delovanje endogenih i egzogenih faktora na koži formira mikrookruženja koja se razlikuju u temperaturi, pH vrednosti, vlažnosti i sadržaju sebuma. Ova mikrookruženja direktno definišu uslove rasta mikroorganizama, a samim tim i sastav mikrobiote kože [3].

2.2.1. Podela mikrobiote kože

U literaturi se javljaju dve podele mikrobiote kože. Na osnovu vremena zadržavanja mikroorganizama na koži razlikuju se stalna (rezidentna) i prolazna (tranzitna) mikrobiota. Druga podela dermalne mikrobiote, lokacijska, izvršena je na osnovu ekoloških uslova koji vladaju u mikrookruženjima i to na mikroorganizme koji žive u suvoj, vlažnoj ili masnoj sredini [2].

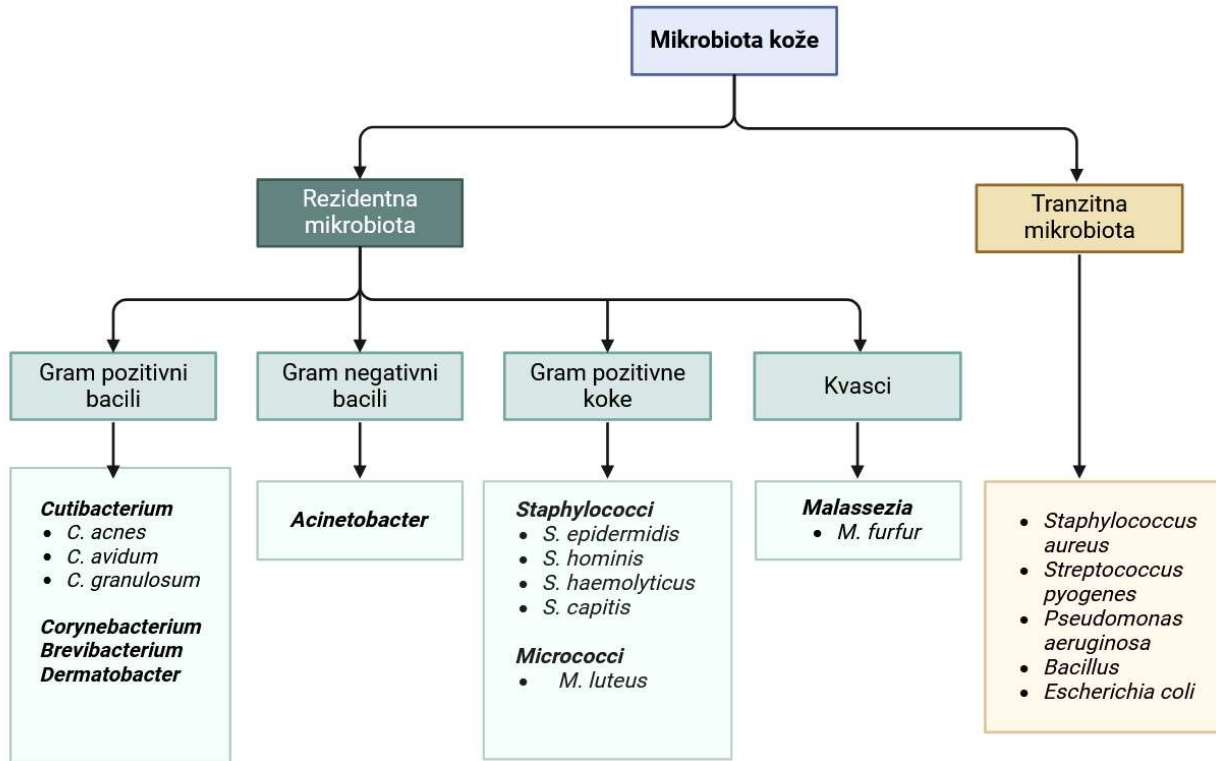
2.2.1.1. Rezidentna i tranzitna mikrobiota kože

Rezidentnu ili normalnu mikrobiotu kože čini vijabilna, simbiotska i reproduktivna populacija mikroorganizama koja trajno naseljava kožu [2,4]. Tačnije, rezidentni mikroorganizmi se nastanjuju u žlezdama i različitim slojevima kože, a zatim migriraju ka površini zajedno sa keratinocitima [56]. Smatraju se komensalima, jer su uglavnom nepatogeni i bezopasni, a mogu imati i korisne efekte na zdravlje domaćina [2,57]. Neki od njih luče antimikrobne metabolite čime sprečavaju kolonizaciju kože patogenim (i drugim prolaznim bakterijama) i tako učestvuju u prevenciji nastanka oboljenja. Mogu uticati na imunološki sistem, usmeravajući ga da napada mikroorganizme koji izazivaju kožne bolesti čime smanjuju težinu upalnih procesa i pomažu u ozdravljenju. S druge strane, u slučaju traume ili oslabljenog imunološkog sistema domaćina, stalna mikrobiota može ispoljiti svoj patogeni potencijal [58].

Iako se na koži nalazi čak 18 različitih razdela, u rezidentnoj mikrobioti dominiraju bakterije 4 razdela: *Actinobacteria* (rodovi: *Corynebacterium*, *Cutibacterium*, *Micrococcus*, *Brevibacterium*, *Dermatobacter*, *Actinomyces*) sa prosečnom zastupljenošću od 51,8 %; *Firmicutes* (rodovi: koagulaza negativni *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Finegoldia*) sa 24,4 %; *Proteobacteria* (rodovi: *Acinetobacter*, *Methylobacterium*, *Paracoccus*, *Haematobacter*) sa 16,5 %; i *Bacteroidetes* (rodovi: *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Chryseobacterium*) sa 6,3 % [7,53,54].

Tranzitni ili prolazni mikroorganizmi potiču iz okoline, nalaze se na površini kože i nikada je ne nastanjuju trajno. Zadržavaju se svega nekoliko sati ili dana pre nego što nestanu i mogu se trajno ukloniti primenom deterdženata i dezinfekcionih sredstava [53,59]. Definisani su kao kontaminanti sa malim ili nikakvim kapacitetom za održivi rast i reprodukciju na koži, zbog inhibirajuće aktivnosti stalne mikrobiote [4]. Iako se ne zadržavaju dugo na koži, prilikom povrede ili povećanog stresa organizma

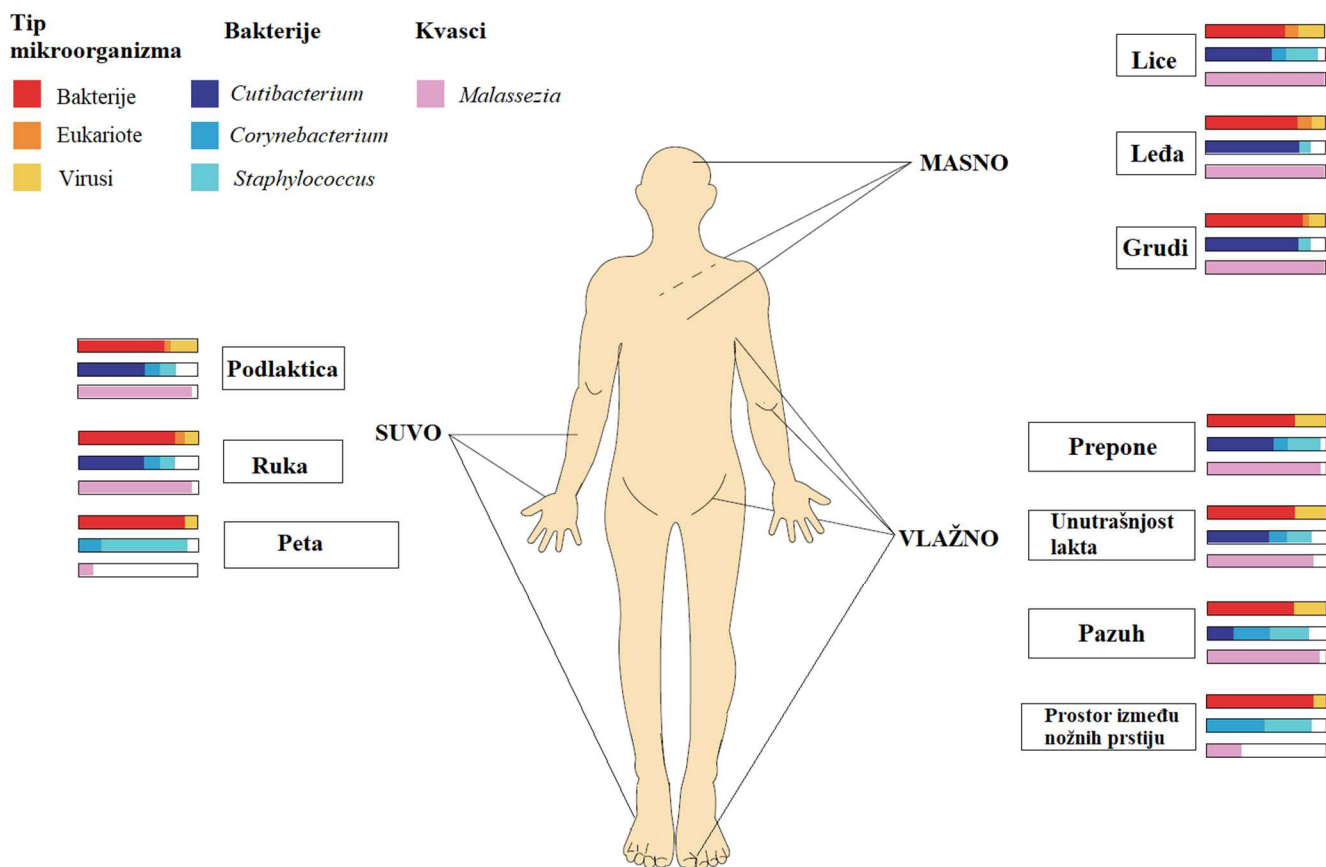
mogu izazvati infekcije što ih čini oportunističkim patogenima [59]. Najčešći predstavnik tranzitne mikrobne zajednice je koagulaza pozitivna bakterija *Staphylococcus aureus*, kao i bakterije *Streptococcus pyogenes*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* i neke vrste roda *Bacillus*, kao i neke vrste kvasca *Candida* [4,7,56]. Na slici 2.4 prikazani su najučestaliji predstavnici rezidentne i tranzitne mikrobiote kože.



Slika 2.4. Rezidentna i tranzitna mikrobiote kože: Najznačajniji rodovi i vrste.

2.2.1.2. Podela mikrobiote na osnovu dela tela koji kolonizuju njeni predstavnici

Ljudska mikrobiota kože je individualna karakteristika pojedinca i predstavlja složenu zajednicu mikroorganizama. Pod konstantnim je delovanjem fizičkih, hemijskih i bioloških faktora okoline kojima se na mnogobrojne načine prilagođava kako bi opstala. Veliki uticaj na njen sastav ima gustina folikula dlaka i aktivnost i broj žlezda. Stoga, sastav mikrobiote varira među različitim staništima na koži u zavisnosti od uslova koji vladaju u njima. U literaturi se javljaju tri tipa mikrookruženja na koži koja naseljavaju članovi mikrobiote: vlažno, masno i suvo [2,3,60]. Na slici 2.5 je prikazan raspored pomenutih mikrookruženja sa najučestalijim vrstama mikroorganizmima.



Slika 2.5. Šematski prikaz mikrookruženja na koži i najdominantnijih mikroorganizama koji ih nastanjuju (preuzeto i prilagođeno prema referenci [60]).

2.2.1.2.1. Članovi mikrobiote koji naseljavaju vlažne delove kože

Vlažna područja na koži se nalaze na pregibima na tela (poput unutrašnjih strana laktova i kolena, pazuha, prepona, nožnih prstiju i okoline pupka), gde delimična okluzija povećava sadržaj vlage [3,29,35]. Ove regije pored veće vlažnosti, imaju i višu temperaturu što dodatno pospešuje mikrobni rast [29].

Znojne žlezde (apokrine i ekrine) su obilnije na pregibima tela, dlanovima, stopalima i oko pupka, i kroz sekreciju znoja regulišu sadržaj vode i drugih supstanci, čime utiču na rast mikroba [2,3]. Ekrini znoj je providna tečnost, bez mirisa, koju čini voda sa rastvorenim neorganskim jonima (Na^+ , Cl^- , Ca^{2+} , K^+ , HCO_3^-), laktatima, ureom, aminokiselinama i malom količinom proteina [18]. Ovakav sastav znoja smanjuje pH vrednost kože čime se ograničava broj mikroorganizama koji na njoj može da se umnožava i preživi. Takođe, ekrine žlezde konstantno oslobađaju antimikrobne peptide kao što su katecidin, β -defensini, dermcidin [26,35]. Ostala organska jedinjenja koja su prisutna u znoju uključuju histamin, prostaglandine i supstance nalik vitaminu K, ali i tragove glukoze i oralno uzimanih lekova [26]. Za razliku od ekrinog, apokrini znoj je mlečna, viskozna, masna, bezmirisna tečnost koja se pretežno sastoji od proteina, lipida i steroida [15,61].

Istraživanja ukazuju da mikrobiota vlažnih područja veće varijabilnosti. Najzastupljenije su bakterije roda *Corynebacterium* (28 %) i *Staphylococcus* (21 %) [52]. Stafilokoke (*S. epidermidis*, *S. aureus*, *S. hominis*) su halotolerantne vrste koje su se adaptirale da podnesu visoke koncentracije soli poreklom iz ekrinog znoja. Takođe, ove bakterije su u stanju da koriste ureu iz znoja kao izvor azota [51]. Podaci pokazuju da tranzitni *S. aureus* može proizvesti molekule koji potpomažu adheziju drugih bakterija za kožu i proteaze pomoću kojih oslobađaju hranljive materije iz rožnatog sloja. Korinebakterije

su auksotrofni mikroorganizmi i ne mogu sami da proizvode lipide neophodne za svoj rast i opstanak. One su se prilagodile da prežive na vlažnim mestima tako što razgrađuju lipide iz sebuma i rožnatog sloja do kornemikolske kiseline koju koriste za oblaganje svoje ćelijske membrane [3,35].

U jednoj studiji je utvrđeno da se ispod pazuha može detektovati i do 10^6 vijabilnih ćelija po cm^2 kože, od kojih su pored pomenuta dva roda, prisutne i bakterije roda *Cutibacterium*, a kod muškaraca i bakterije roda *Anaerococcus*. Takođe je primećeno da se pored *S. epidermidis*, u većem broju pojavljuje i vrsta *S. hominis*. Mikrobiota pazuha je posebno zanimljiva za kozmetičke proizvode, jer je odgovorna za formiranje neprijatnog mirisa znoja i smatra se da stafilokoke i korinebakterije imaju ključnu ulogu u ovom procesu [4].

2.2.1.2.2. Članovi mikrobiote koji naseljavaju masne delove kože

Masna koža nastaje usled povećane aktivnosti lojnih žlezda, koja je najveća tokom puberteta. One proizvode masnu supstancu - sebum, koja obezbeđuje hidrofobnu prevlaku koja štiti i podmazuje površinu kože [29]. Analizom sebuma utvrđeno je da se sastoji od triglicerida, skvalena, voska, holesterola i estara holesterola [28]. Slobodne masne kiseline su prisutne u znatnoj količini na površini kože, iako ih nema u samom sebumu, i smatra se da nastaju lipolitičkom aktivnošću enzima u izvodima kanala lojnih žlezda i na površini kože. Pokazalo se da sebum ima blago antibakterijsko delovanje, usled prisustva katelicidina, β -defensina, antimikrobnih histona i imunoglobulina A koji omogućavaju zaštitu od bakterijskih i gljivičnih infekcija kože [18,28,35].

Područja sa većom gustinom lojnih žlezda (čelo, grudi, leđa, nos, predeo iza ušiju, vlasište) podstiču kolonizaciju lipofilnih mikroorganizama. Istraživanja pokazuju da sastav mikrobiote masne kože ima najmanju raznolikost i da nije sklon varijacijama tokom vremena [28,51]. Dominiraju bakterije roda *Cutibacterium* (46 %) i *Staphylococcus* (16 %), a nešto manje predstavnici kvasca *Malassezia* [52]. Na primer, istraživanja su pokazala da se na cm^2 kože čela nalazi do 10^6 bakterija, gde dominiraju bakterije *C. acnes* i *S. epidermidis*, ali se mogu detektovati i bakterijske vrste rodova *Acinetobacter*, *Corynebacterium*, *Stenotrophomonas*, *Bacillus* i *Pseudomonas* [2].

Lojne žlezde obezbeđuju anaerobnu sredinu i optimalno okruženje za rast fakultativnih anaeroba poput *Cutibacterium acnes*, stalnog člana dermalne mikrobiote [29]. S obzirom na ograničene resurse u lipofilnoj sredini, *C. acnes* proizvodi proteaze za oslobađanje aminokiselina iz proteina kože, a lipaze za razgradnju lipida prisutnih u sebumu. Slobodne masne kiseline koje nastaju hidrolizom lipida pospešuju adheziju bakterija čime pomažu pri kolonizaciji masnih delova kože [3,29,35,51]. Takođe, oslobođene masne kiseline održavaju kiselu sredinu kože (pH ~5) i inhibiraju rast patogenih bakterija kao što su *S. aureus*, *Streptococcus pyogenes* i *Corynebacterium bovis*. Smanjenjem rasta ovih neželjenih bakterija, potpomaže se rast rezidentnih koagulaza negativnih stafilokoka i korinebakterija [29,52].

2.2.1.2.3. Članovi mikrobiote koji naseljavaju suve delove kože

Suvi delovi kože (ruke, šaka, podlaktica, noge, lakat, koleno) podležu isušivanju i velikim fluktacijama spoljašnje temperature [60]. U ovim regijama primećena je velika varijabilnost mikrobne populacije tokom vremena i može se naći veliki broj predstavnika razdela *Proteobacteria* (41 %), *Actinobacteria* (28 %) i *Bacteroidetes* (14 %) [52].

Istraživanja su pokazala da se na kvadratnom centimetru kože ruke nalazi oko 10^5 bakterija, i da je usled veće izloženosti okolini, udeo tranzitnih bakterija znatno veći u poređenju sa njihovim udelom u vlažnim i masnim delovima kože. Kao najdominantnije su se izdvojile bakterije roda *Cutibacterium* i *Staphylococcus*, a zatim i bakterija roda *Streptococcus*, *Corynebacterium*, *Lactobacillus* i *Burkholderia*. Sa druge strane, u mikrobioti podlaktice su najprisutnije bakterije roda *Cutibacterium*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Corynebacterium*, a nešto manje roda *Acinetobacter* i *Fingoldia* [4].

2.2.2. Najznačajniji članovi mikrobiote kože

Kožu kolonizuje raznolika zajednica mikroorganizama, čiji sastav oblikuju mnogobrojni faktori. Među najzastupljenijim rodovima bakterija izdvajaju se *Cutibacterium* i *Staphylococcus*, koji se nalaze na skoro svim delovima ekosistema kože. Poznato je da su bakterijske vrste *C. acnes* i *S. epidermidis* povezane sa specifičnim zdravstvenim stanjima i da se selektivno smatraju važnim čuvarima zdravlja kože. Sa druge strane, *S. aureus* je najčešće izolovani patogen odgovoran za mnogobrojne bolesti kože.

2.2.2.1. *Staphylococcus epidermidis*

Staphylococcus epidermidis je Gram pozitivna, nepokretna, nesporogena koka koja kolonizuje kožu i sluzokožu organa ljudi i drugih sisara [62]. Predstavlja 90 % mikroorganizama koji opstaju u aerobnim uslovima na površini ljudskog tela. Formira male kolonije bele ili žućkaste boje, prečnika 1-2 mm koje obrazuju nepravilne skupine nalik na grozd. Od drugih stafilokoka se razlikuje po tome što ne poseduje enzim koagulazu, osetljiva je na deferoksamin i ne može da sintetiše trehalozu iz kiselina [62,63].

Bakteriocini su antimikrobni peptidi čija je inhibitorna aktivnost pretežno usmerena prema bakterijskim vrstama koje su usko povezane sa bakterijama koje ih sintetišu, pri čemu na njih ne deluju jer su razvile sopstveni imunitet [64,65]. *S. epidermidis* proizvodi bakteriocine kojima se direktno ograničava kolonizacija patogena što pozitivno utiče na ljudsku kožu. Najčešće sintetiše lantibiotike (peptide koji sadrže karakteristične aminokiseline lantionin ili metilantionin): epidermin, Pep 5, epilancin K7 i epicidin 280. Lantibiotici mogu da inhibiraju metilicilin-rezistentni *S. aureus* i druge patogene stafilokoke, najčešće uzročnike infekcija kože. Zbog sposobnosti da eliminišu patogene mikroorganizme, javlja se sve veći interes za njihovom primenom u lečenju pacijenata. Prednost njihove upotrebe je što ciljano deluju u poređenju sa antibioticima i što stalna mikrobiota domaćina ne bi bila ugrožena [64].

S. epidermidis proizvodi i PSM- γ i PSM- δ , module rastvorljive u fenolu (eng. *Phenol-soluble modulins*, PSM), amfifilne peptide sa površinski aktivnim svojstvima. Ovi peptidi u saradnji sa humanim antimikrobnim peptidima (AMP) selektivno smanjuju preživljavanje vrsta *Streptococcus pyogenes* i *Staphylococcus aureus* što je bitno za očuvanje zdravlja domaćina. S obzirom na strukturne sličnosti između PSM i humanih AMP, njihovo delovanje protiv ciljanih vrsta je isto i podrazumeva razaranje ćelijske membrane bakterija [64]. Pokazalo se da određeni sojevi *S. epidermidis* imaju dodatnu ulogu u borbi protiv patogena moduliranjem urođenog imunološkog odgovora domaćina [57,63]. Peptidne komponente bakterije *S. epidermidis* putem TLR-2 receptora mogu aktivirati keratinocite da sintetišu humane AMP2. Na taj način *S. epidermidis* pojačava imunološki odgovor domaćina i olakšava borbu protiv potencijalnih infekcija [63]. Podaci pokazuju da *S. epidermidis* sintetiše i lipotejhojnu kiselinu koja može suzbiti upalne procese na koži tokom zarastanja rana [29,66]. Pored toga, najnovija studija pokazuje da ova bakterija ima gen za proizvodnju enzima sfingomijelinaze, koji razgradnjom sfingomijelina povećava nivo ceramida i pomaže u sprečavanju dehidratacije kože, ukazujući na bitnu ulogu *S. epidermidis* u očuvanju barijerne funkcije kože [63,66].

Iako je deo komensalne mikrobiote, *S. epidermidis* može delovati kao oportunistički patogen. Može doprineti razvoju bolničkih infekcija, jer formira biofilm na površini medicinskih uređaja (poput intravenskih katetera i implantata). Ove infekcije obično počinju kolonizacijom bakterija prisutnih na koži pacijenata ili zdravstvenog osoblja tokom umetanja uređaja u organizam. Kada dođe do krvotoka imunokompromitovanih ili ozbiljno bolesnih pacijenata, *S. epidermidis* može izazvati sepsu, endokarditis ili druga ozbiljna oboljenja. Zbog formiranja biofilmova na ugrađenim uređajima, otežano je lečenje pacijenata antibioticima i često zahteva uklanjanje i zamenu medicinskih uređaja [64,66,67].

2.2.2.2. *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus je Gram pozitivna koka sa ćelijama prečnika od 1-3 mm, koje obrazuju grozdove. Fakultativni je anaerob i formira kolonije žute ili bele boje, čija boja potiče od karotenoida. Otporna je na visoke koncentracije soli. Ono po čemu se razlikuje od bakterije *S. epidermidis* je to što proizvodi enzim koagulazu, najpoznatiji faktor virulencije koji dovodi do zgrušavanja krvi [68].

Oportunistički patogen *S. aureus* često kolonizuje ljudsku kožu, a kada jednom prevaziđe kožnu barijeru može prouzrokovati razna sistemska, akutna i hronična oboljenja. Najčešći klinički entiteti izazvani ovom bakterijom podrazumevaju infekciju kože i mekog tkiva, i to od infekcije epidermisa (impetigo), preko dermisa (folikulitis, furunkuli i karbunkuli) do potkožnog tkiva (nekrotizirajući fasciitis-gangrena, celulitis i dr.) [69]. Ono što je čini patogenim bakterijom je to što sekretuje različite toksine koji utiču na imunološki odgovor organizma. Izlučeni toksini se vezuju za membranu ćelija imunološkog sistema (leukocita) i stvaraju pore koje dovode do smrti ćelija. Faktori virulencije mogu biti i egzoenzimi nukleaze i proteaze koje inaktiviraju i razaraju različite imunološke odbrambene komponente poput antimikrobnih peptida [70]. Takođe, *S. aureus* ima sposobnost sticanja rezistencije na više klasa antibiotika (npr. penicilin, meticilin, vankomicin, ampicilin, tetraciklin) što predstavlja veliki problem i izazov za lečenja bolesnika [68].

Iako se obično klasifikuje kao tranzitni patogen, podaci sugerišu da je oko 20 % ljudske populacije stalno kolonizovano ovom bakterijom. Potrebno je naglasiti da kolonizacija ne predstavlja ujedno i infekciju, jer zdrave osobe retko razvijaju invazivne infekcije uzrokovane ovom bakterijom. Štaviše, neki sojevi mogu da proizvode bakteriocine koji inhibiraju rast drugih *S. aureus* sojeva. Međutim, literaturni podaci o ovoj bakteriji kao članu normalne mikrobiote su ograničeni, s obzirom na to da učestvuje u nastanku mnogih kožnih oboljenja, pa su istraživanja uglavnom usmerena ka sprečavanju patogene aktivnosti [63].

2.2.2.3. *Cutibacterium acnes*

Cutibacterium acnes (prethodni naziv *Propionibacterium acnes*) je Gram pozitivna, anaerobna, nesporogena, pleomorfna bakterija koja je deo normalne mikrobiote kože i sluzokože. Kolonije na krvnom agaru su prečnika od 1 do 2 mm, obično okrugle i neprozirne. Fermentacijom glicerola do propionske kiseline održava nisku pH vrednost kiselog omotača kože i ograničava patogeni rast. Proizvodi i bakteriocine protiv drugih patogenih vrsta roda *Cutibacterium*, nekih Gram negativnih bakterija i kvasaca [71]. Iako se smatra komensalom, u određenim uslovima može ispoljiti svoj patogeni potencijal i prouzrokovati kožna oboljenja poput akni, folikulitisa, pustuloze i dr. Takođe, može izazvati i sistemske infekcije prilikom ugradnje implantata, usled formiranja biofilma na njihovoj površini što ograničava pristup antibioticima i samo lečenje [63].

Kao saprofitni mikroorganizam, *C. acnes* dobija hranljive materije za rast lipolitičkom razgradnjom triglicerida iz sebuma. Pored lipaza i proteaza, izlučuje dodatne enzime koji se smatraju faktorima virulencije, jer olakšavaju kolonizaciju bakterija u folikulama. Jedan od tih enzima je hijaluronat liaza koja razgrađuje polisaharid hijaluronan (hijaluronska kiselina), sastavni deo ekstracelularnog matriksa vezivnog tkiva kože. Sa druge strane, endoglikoceramidaza i sijalidaza katalizuju hidrolizu glikosfingolipida odnosno sijaloglikoproteina, što posledično dovodi i do razgradnje i oštećenja kožnog tkiva [63,64].

C. acnes sintetiše i porfirine, proinflamatorne metabolite koji imaju ulogu u dermalnim oboljenjima. Istraživanja ukazuju da sojevi koji uzrokuju akne proizvode visoke nivoe ovih molekula, dok su sojevi sa niskom produkcijom porfirina, prisutni na zdravoj koži [54,72].

2.3. Disbalans mikrobiote kože

U normalnim uslovima, koža i njena mikrobiota zajedno deluju kako bi zaštitile organizam od potencijalne invazije patogenih mikroorganizama [73]. Između domaćina, rezidentne i tranzitne mikrobiote postoji izbalansirana interakcija koja omogućava imunološkom sistemu kože da razlikuje komensalne od štetnih mikroorganizama [2,57]. Poremećaj homeostatskih odnosa između domaćina i njegove mikrobiote može nastati zbog promene u sastavu dermalne mikrobiote (disbioza) i/ili izmenjenog imunološkog odgovora organizma na mikrobiotu. Pretpostavlja se da je prekomeran rast pojedinih vrsta mikroorganizama u odnosu na druge glavni uzrok upalnih procesa na koži kao što su atopijski dermatitis, acne vulgaris, psorijaza, seboreja i dr. [73]. Ipak, još uvek nije potpuno jasno da li je disbalans mikrobiote uzrok ili posledica kožnih oboljenja, iako bi razumevanje te veze moglo pomoći u odabiru adekvatne terapije [74].

2.3.1. Atopijski dermatitis

Atopijski dermatitis ili ekcem je hronično kožno oboljenje. Obično traje do druge godine života, ali nije retkost da se razvije i kod odraslih osoba [55]. Simptomi podrazumevaju pojavu intenzivnog svraba, crvenila i suvih površina (lezija) koje mogu zahvatiti celo telo (slika 2.6). Nekoliko različitih, ali međusobno povezanih faktora može dovesti do nastanka ovog oboljenja i to su: oslabljena barijerna funkcija kože, poremećaj imunološkog sistema i disbioza dermalne mikrobiote [3,67,75].

Disbioza mikrobiote povezana je sa povećanom kolonizacijom patogenih bakterija i smanjenjem broja komensala. Iako uloga disbioze u patogenezi atopijskog dermatitisa nije u potpunosti razjašnjena, pacijenti sa ovim oboljenjem obično imaju smanjen diverzitet dermalne mikrobiote. Mnoge studije su potvrdile da je obilniji rast *S. aureus* primećen na upaljenim područjima kože u odnosu na nezahvaćene delove. Ozbiljnost atopijskog dermatitisa povezana je sa biofilmom koji ova bakterija formira, jer utiče na izbegavanje imunološkog odgovora domaćina što dovodi do recidiva i težeg lečenja [67,75,76].

Istraživanje sastava mikrobiote u lezijama pacijenata pokazalo je da su najprisutnije bakterije *S. aureus* i *S. epidermidis*, pri čemu *S. epidermidis* dominira kod pacijenata sa umerenom kliničkom slikom, dok je *S. aureus* prisutniji kod pacijenata sa težim oblikom atopijskog dermatitisa [71,73]. Nakon adekvatne terapije, zapažen je porast drugih bakterijskih rodova poput *Corynebacterium*, *Cutibacterium*, *Streptococcus*. Ovi nalazi sugerišu da lečenje povećava diverzitet dermalne mikrobiote i poboljšava kliničku sliku. Drugi potencijalni zaključak na koji ukazuje ova studija jeste da povećan broj bakterije *S. epidermidis* u lezijama predstavlja mikrobn odgovor na prekomerni rast *S. aureus*, i to zbog sposobnosti da je selektivno inhibira [73].



Slika 2.6. Ruka pacijenta sa atopijskim dermatitisom [77]

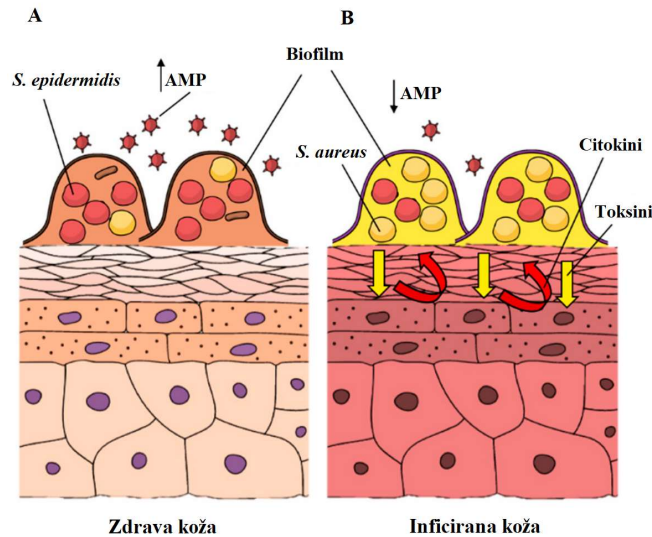
2.3.1.1. Interakcije između bakterija *S. epidermidis* i *S. aureus* kod atopijskog dermatitisa

Pojava atopijskog dermatitisa je genetski predisponirana. Oštećenje integriteta kože kod pacijenata sa atopijskim dermatitisom povezano je sa mutacijama na genu koji kodira filagrin, strukturni protein rožnatog sloja kože. U homeostazi zdrave kože, proteolizom filagrina oslobađaju se pirolidin karboksilna i urokanska kiselina koje kontrolišu hidrataciju površinskog sloja kože. Stoga, promenjena funkcija gena dovodi do smanjenja ovih prirodnih hidratantnih molekula što za posledicu ima povećanje pH vrednosti okoline i deformaciju korneocita. Usled prekomernog transepidermalnog gubitka vode koža postaje suva i izloženija alergenima (odgovornim za upalu i svrab) i mikroorganizmima iz spoljašnje sredine. Interesantno, *S. aureus* se jače vezuje za morfološki promenjene korneocite, a smanjena kiselost površinskog sloja kože olakšava dalju kolonizaciju i rast [56,75,76,78]. Proteaze i toksini ove bakterije dodatno oštećuju kožu i modifikuju imunološki odgovor domaćina. Iako još uvek nije utvrđeno da li bakterija *S. aureus* doprinosi nastanku atopijskog dermatitisa ili se prekomerno umnožava kao posledica oboljenja, brojna istraživanja je povezuju sa upalnim reakcijama na koži [35,75].

S. aureus može da formira biofilm koji podstiče proizvodnju proinflamatornih citokina i indukuje zapaljensku reakciju [73]. Obrazovani biofilm olakšava razmnožavanje *S. aureus*, jer sprečava fagocitne imunološke ćelije (makrofage) da prodru i ispolje svoju antimikrobnu aktivnost. Sa druge strane, biofilm može stimulisati regrutovanje polarizovanih makrofaga (makrofagi sa smanjenom antimikrobnom aktivnošću) na mesto upale, ometajući tako antiinflamatorni odgovor imunološkog sistema domaćina [79]. *S. aureus* može da prodre iz epidermisa u dermis, što izaziva ekspresiju inflamatornih citokina i narušava imunološku homeostazu kože [3,79]. Pored toga, *S. aureus* proizvodi toksine koji su citotoksični za širok spektar ćelija, uključujući keratinocite. Toksini mogu uticati na imunološke ćelije da luče proinflamatorne molekule, što predstavlja još jedan mogući način pokretanja zapaljenske reakcije [35,78].

Da bi čovek očuvao svoje zdravlje važno je da imunološki odgovor bude prilagođen nivou pretnje određenog patogena. Ako je imunološki odgovor suviše slab, organizam neće uspeti da se odbrani od infekcija, a ukoliko je prejak, može doći do prekomernog oštećenja tkiva. Stoga, jedna od značajnih uloga komensala poput koagulaza negativnih stafilokoka je regulacija ravnotežne proizvodnje pro- i antiinflamatornih citokina [79].

Konkretno, delovanje komensalne bakterije *S. epidermidis* se ogleda u kompeticiji za hranljivim materijama i mestu za adheziju, čime značajno ograničava potencijal rasta *S. aureus* na koži. Drugi mehanizam podrazumeva sintezu serinske proteaze koja sprečava formiranje biofilma bakterije *S. aureus*. Ovaj enzim hidrolizuje proteine koji izgrađuju biofilm, kao i epitelne proteinske ligande, odgovorne za adheziju *S. aureus* [65,79]. Treći mehanizam delovanja se odnosi na sintezu bakteriocina koji ne samo da liziraju ćelije *S. aureus*, već interaguju sa ljudskim antimikrobnim peptidima i dodatno pojačavaju mikrobicidnu aktivnost imunološkog sistema domaćina. Istraživanja su pokazala da *S. epidermidis* aktivira TLR2 receptore na keratinocitima čime se pojačava ekspresiju humanih defensina (hBD2 i hBD3) i poboljšava otpornost domaćina na infekcije izazvane bakterijom *S. aureus*. Takođe, ukazano je da humani defensin 2 u kombinaciji sa serinskom proteazom efikasnije degradira biofilm bakterije *S. aureus*, nego kada deluje sam [65,79]. Na slici 2.7 šematski je prikazano delovanje bakterija *S. aureus* i *S. epidermidis* na zdravoj i inficiranoj koži.



Slika 2.7. Šematski prikaz promena mikrobiote kože i proizvodnje biofilma kod atopijskog dermatitisa. (A) Kompetitivni odnos bakterija *S. epidermidis* i *S. aureus* na zdravoj koži. (B) Atopijski dermatitis - Prekomerna ekspresija inflamatornih citokina i toksina pospešuje stvaranje biofilma bakterije *S. aureus* na štetu drugih komensala (preuzeto i prilagođeno prema referenci [79]).

2.3.2. *Acne vulgaris*

Acne vulgaris ili akne je jedno od najčešćih hroničnih oboljenja kože koje se javlja kod 80 % stanovništva obično u ranoj adolescenciji. Kliničke karakteristike akni uključuju seboreju, stvaranje komedona, papula, pustula, nodula i cisti usled upale sebacealnih jedinica, prikazanih na slici 2.8. Primarno zahvata delove tela sa masnom kožom poput lica, vrata, grudi, ramena i leđa. Postoje četiri faktora koja doprinose razvoju akni: proinflamatorni medijatori koji se oslobađaju u koži, prekomerna proizvodnja sebuma, blokiranje otvora folikula usled hiperkeratoze (zadebljanje površinskog dela kože) i povećana proliferacija komensalne bakterije *Cutibacterium acnes*. Pored *C. acnes*, u aknama je primećen i povećan broj *S. epidermidis* i bakterija roda *Corynebacterium* [80,81].

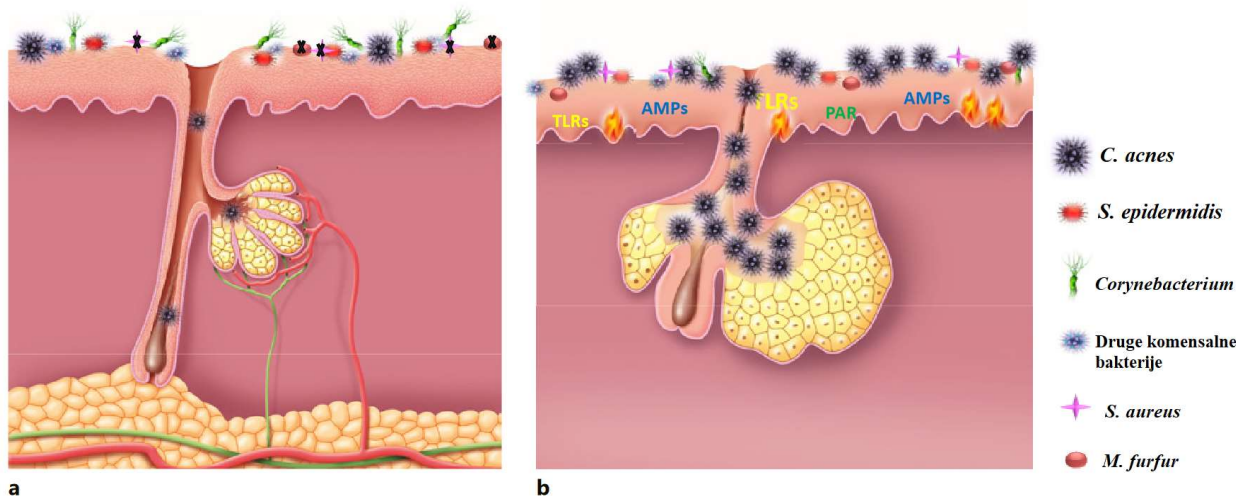


Slika 2.8. Simptomi kožnog oboljenja acne vulgaris (preuzeto i prilagođeno prema referenci [82])

2.3.2.1. Interakcije između bakterije *S. epidermidis* i *C. acnes* kod akni

Koža sklona aknama povezana je sa disbalansom bakterija *C. acnes* i *S. epidermidis*, pri čemu su one prisutne u lezijama. Trenutna istraživanja smatraju *C. acnes* odgovornom za pojavu akni, dok za *S. epidermidis* nema dokaza da igra aktivnu ulogu u njihovom nastanku. Njihova zajednička karakteristika je upotreba glicerola kao izvor ugljenika za sintezu različitih masnih kiselina kratkog lanca, koje dalje koriste kao antimikrobna sredstva za međusobno nadmetanje [57].

Patogeneza akni uključuje kolonizaciju sebacealne jedinice bakterijom *C. acnes*, što pokreće upalnu reakciju i napredovanje oboljenja od neinflamatornog komedona do inflamatornih lezija [83]. Postoji nekoliko modela koji objašnjavaju ulogu *C. acnes* u razvoju akni. Smatra se da kiseline koje ova bakterija sintetizira (prvenstveno propionska kiselina), mogu da oštete okolno tkivo, što izaziva brzu reakciju imunološkog sistema, a time i upalu [80]. Ove kiseline takođe deluju kao faktori hemotaksije za neutrofile, fagocitne ćelije imunološkog sistema koje predstavljaju prvi odgovor organizma na infekciju. Tokom svog delovanja, neutrofili oslobađaju lizosomalne enzime, koji mogu dovesti do oštećenja epitela folikula i upale. Dodatno, vezivanje *C. acnes* izaziva prekomernu proizvodnju TLR2 receptora u keratinocitima, komponente urođenog imunološkog sistema koje učestvuju u odbrani od napada invazivnih mikroba [80,83]. *C. acnes* izaziva imunološki odgovor aktivacijom TLR2 receptora. Vezivanjem za receptore, pokreću se procesi koji dovode do ekspresije gena za proizvodnju proinflamatornih citokina. Pored stimulisanja upalnih procesa aktivacijom TLR receptora, istraživanja sugerišu da postoji još jedan put koji uključuje aktivaciju proteaza-aktivirajućeg receptora 2 (PAR2) na keratinocitima. U ovom slučaju, *C. acnes* oslobađa egzogene proteaze koje aktiviraju ove receptore čime se podstiče proizvodnja proinflamatornih citokina i matriksne metaloproteinaze-9 koja je zadužena za degradaciju ćelijskog matriksa [72,80,83]. Na slici 2.9 šematski je prikazano delovanje rezidentnih i patogenih članova mikrobiote na zdravoj koži i koži sa aknama.



Slika 2.9. Šematski prikaz zdrave kože i kože sa aknama. a) Zdrava koža, tada *S. epidermidis* kontroliše proliferaciju *C. acnes* b) Formiranje komedona nakon prekomerne kolonizacije *C. acnes* koja vodi do disbioze i formiranja akni; AMP-antimikrobni peptidi, TLR – „Toll-like“ receptori, PAR- proteaza-aktivirajući receptor (preuzeto i prilagođeno prema referenci [57])

Sa druge strane, različita *in vivo* ispitivanja antagonizma, ukazuju da *S. epidermidis* može kontrolisati proliferaciju *C. acnes* oslobađanjem sukcininske kiseline. Ova kiselina ne samo da pokazuje direktno antibakterijsko dejstvo, već i inhibira aktivaciju TLR receptora na površini ćelija, čime se

sprečava proizvodnja proinflammatory citokina i umanjuje intenzitet upalne reakcije. U jednoj studiji je na miševima ispitivana topikalna primena i intralezijsko injektiranje sukcininske kiseline kao terapija za akne. To je bio prvi put da je dokazano da bakterijski članovi mikrobiote kože, kroz fermentaciju glicerola i proizvodnju sukcininske kiseline, mogu značajno ograničiti prekomerni rast *C. acnes*. Takođe, lipotejhojna kiselina iz bakterije *S. epidermidis* može da inhibira TLR receptore, ali i da indukuje regrutovanje mastocita u zaraženim područjima kože i stimuliše aktivnost T limfocita [57].

2.4. Modulacija mikrobiote kože kao princip lečenja kožnih oboljenja

Tradicionalni način lečenja kožnih oboljenja se još uvek široko primenjuje pri čemu efikasnost terapija zavisi od težine bolesti, kao i od zdravstvenog stanja pacijenata. Pa tako, osnovna terapija za lokalno lečenje atopijskog dermatitisa podrazumeva upotrebu emolijenata koji nadoknađuju nedostatak vode u koži i time poboljšavaju njenu barijernu funkciju ili upotrebu immunosupresivnih preparata [3,67]. Sa druge strane terapija za lečenje akni se oslanja na primenu lokalnih preparata na bazi benzoil peroksida ili retinoida koji smanjuju simptome upaljenih folikularnih keratinocita i olakšavaju lečenje [63]. Međutim, teža klinička slika oba oboljenja iziskuje primenu topikalnih antibiotika. Iako imaju antibakterijsko i protivupalno dejstvo, antibiotici nisu najbolji izbor lečenja s obzirom na to da rezistentnost na antibiotike postaje sve veća briga u kliničkoj praksi. Još jedan nedostatak antibiotika je to što imaju širok spektar delovanja koji se odražava na mikrobn diverzitet normalne mikrobiote kože. Stoga, da bi se sprečilo smanjenje raznolikosti vrsta, naučna istraživanja su sve više usmerena ka razvoju novih terapija koje bi svojim selektivnim delovanjem ograničile rast patogenih vrsta uz očuvanje komensalnih članova dermalne mikrobiote. Može se reći da se glavni ciljevi istraživanja u ovoj oblasti kozmetike odnose na održavanje, zaštitu i obnovu raznolikosti i ravnoteže dermalne mikrobiote, kao i prevenciju njenog disbalansa. Kozmetički proizvodi koji bi mogli da zadovolje postavljene ciljeve obuhvataju primenu probiotika i prebiotika [4,7,71].

2.4.1. Probiotici u kozmetici

Koncept probiotika se prvenstveno vezuje za crevnu mikrobiotu i smatra se da ga je uveo ruski naučnik Ilija Mečnikov još 1907. godine sa idejom da konzumacija korisnih mikroba može imati pozitivne efekte na ljudski organizam, posebno za lečenje bolesti probavnog trakta. Termin probiotik dolazi iz grčkih reči „*pro bios*“ što u prevodu znači „za život“, nasuprot terminu antibiotik koji u prevodu sa grčkog jezika znači „protiv života“ [84]. Definicija pojma probiotika je evoluirala uporedo sa naučnim saznanjima iz ove oblasti. Po trenutnoj i opšteprihvaćenoj definiciji probiotici predstavljaju žive mikroorganizme koji primenjeni u adekvatnim količinama doprinose zdravlju domaćina [85].

Kada je reč o probioticima u kozmetici, prema poslednjem izveštaju međunarodne organizacije koja se bavi regulativama u kozmetici – ICCR (eng. *International cooperation on cosmetics regulation*) iz 2022. godine, dermalni probiotici su opisani kao „aktivni ili neaktivni mikroorganizmi dodati u adekvatnim količinama u kozmetički proizvod postižu željenu kozmetičku korist na mestu primene, bilo direktnim delovanjem ili posrednim uticajem na mikrobiotu domaćina“. Pod aktivnim se podrazumevaju mikroorganizmi koji rastu, povećavajući svoj broj i/ili biomasu, dok neaktivni mikroorganizmi ne rastu, ali imaju metaboličku aktivnost [86].

Da bi se neki mikroorganizam mogao izabrati kao dermalni probiotik, trebalo bi da zadovolji jedan ili više karakterističnih kriterijuma kao što je: sposobnost konkurentnog isključivanja patogenih vrsta sa površine kože na koju se nanose; mogućnost adhezije za tkivo; osetljivost na antibiotike; antimikrobna aktivnost; tolerancija na visoke koncentracije kiseline i kiseonika [87]. Među probioticima u kozmetici dominiraju bakterije mlečne kiseline porodice *Lactobacillaceae*, ali se kao potencijalni probiotik i stalni član zdrave mikrobiote kože javlja upravo bakterija *S. epidermidis* [86]. Stoga, u tabeli

2.1 dat je literaturni pregled studija u kojima je prikazana probiotska aktivnost topikalno primenjene bakterije *S. epidermidis*.

Tabela 2.1. Probiotska aktivnost bakterije *S. epidermidis* u *in vivo* studijama

Formulacija	Broj bakterija	Mesto nanošenja	Efekat	Ref.
Gel sa <i>S. epidermidis</i>	$7 \cdot 10^8$ CFU/g	Lice zdravih pacijenata	- Povećan sadržaj lipida - Smanjen transepidermalni gubitak vode - Konstantno nizak pH kože - Povećan specifični rast bakterije <i>S. epidermidis</i>	[88]
Losion sa bakterijama <i>S. epidermidis</i> i <i>S. hominis</i>	$1 \cdot 10^7$ CFU/g, odnosno $1 \cdot 10^5$ CFU/cm ²	Unutrašnjost lakta AD pacijenata	Smanjenje broja bakterije <i>S. aureus</i>	[89]
Suspenzija bakterije <i>S. epidermidis</i>	$4 \cdot 10^7$ - $2 \cdot 10^8$ CFU/cm ²	Leđa miša sa indukovanim AD	- Smanjen transepidermalni gubitak vode - Povećan sadržaj ceramida u rožnatom sloju kože	[90]
Flaster sa inkapsuliranom bakterijom <i>S. epidermidis</i>	$1 \cdot 10^5$ CFU	Uši miša sa indukovanim aknama	Smanjenje broja bakterije <i>C. acnes</i>	[91]
Emulzija sa bakterijom <i>S. epidermidis</i>	$1 \cdot 10^7$ CFU/mL	Uši miša sa indukovanim AD	- Redukovan proces keratinizacije - Smanjeno oštećenje kože - Smanjene inflamatorne reakcije	[92]

*AD - atopijski dermatitis, CFU – eng. *Colony forming units*

Iako postoje studije o učinkovitom dejstvu potvrđenih probiotskih ili komensalnih kultura u kozmetičke svrhe, njihova komercijalna primena je ograničena. Prvenstveno, veliki je izazov očuvanje vijabilnosti kulture i njihove sposobnosti da kolonizuju kožu uporedo sa već prisutnim mikroorganizmima [7]. Posebno za upotrebu u kozmetici, primena živih bakterija je ograničena strogim zakonskim regulativama i zahteva ogromne napore za uvođenje modifikovanih postupaka proizvodnje, skladištenja i isporuke proizvoda. Zbog toga se u skorije vreme sve češće koriste inaktivirani mikrobn preparati poput supernatanata, ekstrakta ili ćelijskih lizat, koji su poznati kao postbiotici [93]. Međutim, kao bolja opcija ističe se primena prebiotika, aktivnih sastojaka koji nemaju mikrobn poreklo [4,5,7].

2.4.2. Prebiotici u kozmetici

Ideja o prebioticima proizašla je iz naučnih saznanja o probioticima i prvi put je definisana 1995. godine, a od tada su definicije nekoliko puta menjane kako bi se prilagodile naučnim i tehnološkim dostignućima. Pionirski koncept prebiotika ih opisuje kao „nesvarljive sastojke hrane koji blagotvorno utiču na domaćina selektivnom stimulacijom rasta i/ili aktivnosti jedne ili ograničenog broja (rezidentnih) bakterija u kolonu, čime se poboljšava zdravstveno stanje domaćina“ [94]. Iz navedene definicije može se zaključiti da prebiotici služe kao hranljivi sastojci korisnim članovima gastrointestinalne mikrobiote, koji pored rezidentnih uključuju i unesene probiotske mikroorganizme. Najnovija definicija, koju je 2017. godine predložilo Međunarodno naučno udruženje za probiotike i prebiotike (eng. *International Scientific Association of Probiotics and Prebiotics*, ISAPP), definiše

prebiotike kao „supstrate koji rezidentni mikroorganizmi selektivno koriste, pružajući zdravstvenu korist“ [6]. Prema ovoj definiciji, supstrat se koristi isključivo za metabolizam mikroba, čime se antimikrobna sredstva isključuju iz kategorije prebiotika. Takođe, supstrati koji utiču na sastav mikrobiote putem neselektivnih mehanizama (poput antibiotika, minerala, vitamina i bakteriofaga) se ne mogu smatrati prebioticima, jer ih mikroorganizmi ne koriste kao nutrijente za metabolizam. Dodatna prednost ove definicije je što nije ograničena na gastrointestinalnu mikrobiotu, već se može primeniti i na druge mikrobiote u organizmu [6,94].

Interesovanje za primenom prebiotika u kozmetici javlja se zbog mogućnosti uticaja na sastav i/ili funkciju mikrobiote kože na način koji omogućava ciljanu inhibiciju štetnih mikroorganizama i istovremeno očuvanje i/ili stimulaciju korisnih bakterija, za razliku od antibiotika koji imaju širi spektar delovanja [4]. Smatra se da prebiotici nakon inkorporiranja u odgovarajuće kozmetičke formulacije i nanošenja na kožu mogu selektivno stimulisati aktivnost i rast normalne mikrobiote [7]. Drugim rečima, ukoliko su pravilno izabrani, prebiotici će biti korišćeni kao nutrijenti za rast komensalnih vrsta i time poboljšati zdravlje kože, dok ih patogeni mikroorganizmi neće koristiti [95]. U skladu sa ovim, međunarodna organizacija ICCR je dermalne prebiotike opisala kao nevijabilne sastojke dodate u kozmetički proizvod sa ciljem da ih mikrobiota na mestu primene aktivno koristi kao hranljive supstance, kako bi se postigla kozmetička korist [86,96].

Prebiotici se prvenstveno odnose na ugljene hidrate poput frukto-oligosaharida, galakto-oligosaharida i inulina i dr., koji se klasifikuju kao potvrđeni prebiotici za gastrointestinalni trakt. Međutim, istraživanja u ovoj oblasti brzo napreduju, te se javljaju i novi kandidati za prebiotike koji uključuju druge ugljene hidrate i polifenole, za koje još uvek nema dovoljno dokaza o njihovom delovanju na ljudsko zdravlje, pa se u literaturi često sreću pod nazivom „potencijalni prebiotici“. Izvori ovih prebiotika su alge, voćni sokovi, voće i voćni trop i različito bilje [97,98]. Iako su znanja o njima još uvek ograničena, novija istraživanja ukazuju na njihov obećavajući potencijal.

Kada je reč o dermalnim prebioticima, važno je napomenuti da je sama ideja o prebioticima u kozmetici još uvek u ranoj fazi razvoja, i da je neophodno sprovesti mnogobrojna *in vitro* i *in vivo* ispitivanja kako bi se sa sigurnošću moglo tvrditi da neka supstanca ima potvrđeno korisno dejstvo i na mikrobiotu kože.

2.4.2.1. Prebiotski efekat oligosaharida na dermalnu mikrobiotu

Kao najviše izučavani prebiotici izdvajaju se galakto-oligosaharidi (GOS) i frukto-oligosaharidi (FOS) [98]. GOS su nesvarljivi ugljeni hidrati koji se sastoje od dve do osam šećernih jedinica, pri čemu je jedna od tih jedinica terminalna glukoza za koju su vezane galaktoze ili disaharidi koji se sastoje od dve galaktoze. Važna karakteristika ovih oligosaharida je njihova hibridna struktura, koja proističe iz različitih glikozidnih veza formiranih između šećernih jedinica. Prirodno su prisutni u niskim koncentracijama u mleku, ali se za komercijalne svrhe proizvode iz laktoze pomoću enzima [98-100]. Osim što povoljno utiču na crevnu mikrobiotu i imunitet, istraživanja ukazuju da oralna upotreba GOS može smanjiti razvoj ili težinu atopijskog dermatitisa kod dece, ali i redukovati bore i transepidermalni gubitak vode kod odraslih osoba [6,101]. Fizičko-hemijske karakteristike ovih oligosaharida kao što su stabilnost pri visokim temperaturama i niskim pH vrednostima sredine, visoka rastvorljivost u vodi i sposobnost zadržavanja vlage, čine ih pogodnim za primenu u prehrambenoj i kozmetičkoj industriji [102]. Sa druge strane, FOS predstavljaju smešu oligosaharida čija se struktura sastoji od terminalnog molekula glukoze za koji su vezane fruktozne jedinice glikozidnom vezom. Imaju maksimalno deset fruktoznih jedinica, za razliku od inulina koji ima viši stepen polimerizacije. Prisutni su u višim biljkama poput banane, pšenice, špargli i artičoke, a mogu se proizvesti i enzimskim putem iz saharoze ili inulina [103].

Cilj upotrebe prebiotika u kozmetici je održavanje dermalne mikrobiote zdravom ili poboljšanje njenog sastava smanjenjem patogenog rasta, uz očuvanje ili stimulaciju rasta komensalnih članova. Iako se na tržištu mogu naći kozmetički proizvodi sa prebioticima, ne postoje detaljne informacije o njihovom uticaju na mikrobiotu ili potencijalnom lečenju kožnih oboljenja. Stoga, u tabeli 2.2 prikazane su dosadašnje studije različitih topikalnih prebiotika i njihov uticaj na izgled kože i/ili bakterijski rast.

Tabela 2.2. Uticaj topikalnih prebiotika na kožu i njenu mikrobiotu

Formulacija	Vrsta studije	Konc.	Opis studije	Rezultati	Referenca
Vodeni rastvor GOS	<i>In vitro</i>	1-5 %	Ispitivanje uticaja GOS na rast bakterija kože. Početni broj svake bakterije u hranljivoj podlozi je bio $1,5 \cdot 10^8$ CFU/mL.	- Sa porastom koncentracije GOS, raste i stepen inhibicije biofilma bakterije <i>S. aureus</i> - Slaba inhibicija ili bez uticaja na biofilm bakterije <i>S. epidermidis</i>	[104]
Serum sa GOS	<i>In vivo</i>	7 %	Klinička studija sa zdravim pacijentima koji su serum nanosili na lice tokom 8 nedelja.	- Smanjen transepidermalni gubitak vode - Povećan diverzitet mikrobiote: <i>Proteobacteria</i> ↓, <i>Firmicutes</i> ↑ - Smanjen broj bakterije <i>S. aureus</i> - Izražena stimulacija rasta <i>S. epidermidis</i> pri 0,5-5 % FOS; pri višim konc. manje izražena stimulacija	[101]
Vodeni rastvor FOS	<i>In vitro</i>	0,5-15 %	Ispitivanje uticaja FOS na rast bakterija kože. Početni broj svake bakterije u hranljivoj podlozi je bio $1 \cdot 10^6$ CFU/mL.	- Izražena inhibicija <i>C. acnes</i> i <i>S. aureus</i> - Svi testirani oligosaharidi su stimulisali rast <i>S. epidermidis</i> pri čemu se kao najefikasniji izdvojio FOS.	[105]
FOS, GOS, Inulin i IMO	<i>In vitro</i>	2 %	Ispitivanje uticaja različitih oligosaharida na rast dermalnih bakterijskih izolata. Početni broj svake bakterije je bio $1 \cdot 10^7$ CFU/mL.	- Fementaciona tečnost FOS-a zaostala nakon rasta <i>S. epidermidis</i> , uspešno je inhibirala formiranje biofilma bakterije <i>S. aureus</i> .	[106]
Vodeni rastvor gluko-oligosaharida	<i>In vitro</i>	1 % i 5 %	Ispitivanje mogućnosti adhezije bakterija izolovanih iz lezija AD pacijenata nakon tretiranja prebioticima. Početni broj svake bakterije je bio $2,1 \cdot 10^7$ - $8,4 \cdot 10^7$ CFU/mL.	- Drastično smanjena sposobnost adhezije <i>S. aureus</i> za ćelije nakon tretmana. - Tretman nije uticao na adheziju <i>S. epidermidis</i>	[107]
Rastvor inulina	<i>In vitro</i>	5 %	Ispitivanje dodatka inulina u hranljivu podlogu na rast bakterija dermalne mikrobiote. Početni broj bakterije bio je $OD_{610} = 0,1$.	- Selektivna inhibicija nepoželjnih bakterija poput <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> i <i>C. striatum</i> i stimulacija rasta <i>S. epidermidis</i>	[108]
Sprej sa glukomananima biljke konjak	<i>In vivo</i>	5 %	Klinička studija sa pacijentima sa aknama koji su nanosili sprej na lice tokom 6 nedelja.	- Klinička slika svih pacijenata se poboljšala nakon tretmana.	[109]

FOS – frukto-oligosaharidi, GOS - Galakto-oligosaharidi, IMO – izomalto-oligosaharidi

2.4.2.2. Prebiotski efekat polifenola na dermalnu mikrobiotu

Polifenoli predstavljaju raznovrsnu grupu fitohemikalija koje nastaju kao proizvodi sekundarnog metabolizma viših biljaka. Često se primenjuju u hrani, kozmetičkim i farmaceutskim proizvodima zbog svoje biokompatibilnosti i snažnog antioksidativnog dejstva. Glavni izvori polifenola su bobičasto voće, povrće, lekovito bilja, biljna ulja i kora drveta poput bora, hrasta i cimeta [8].

Kozmetički i dermatološki značaj polifenolnih jedinjenja pretežno je zasnovan na njihovom antioksidativnom dejstvu. Primena antioksidanata u kozmetici smanjuje oštećenja kože koja su nastala kao posledica oksidativnog stresa što predstavlja efikasnu alternativu u terapiji i prevenciji prevremenog starenja. Dodatno, nakon inkorporacije u kozmetičke formulacije sprečavaju oksidaciju lipofilnih komponenti i propadanje aktivnih sastojaka, čime se produžava rok trajanja proizvoda [110]. Mogu inhibirati aktivnost elastaze i hijaluronidaze, enzima koji katalizuju razgradnju hijaluronske kiseline prisutne u vanćelijskom matriksu kože i aktivnost enzima kolagenaze odgovornog za razgradnju kolagena. Na taj način dodatno utiču na očuvanje zdravog i mladalačkog izgleda kože. Polifenoli apsorbuju ultraljubičasto zračenje, te se mogu koristiti u kozmetičkim preparatima za zaštitu od sunca, sprečavajući prodiranje sunčevog zračenja u dublje slojeve kože [110,111].

Poslednjih godina, u kozmetici i dermatologiji se sve više razmišlja o primeni polifenola iz biljnih ekstrakata kao potencijalnih prebiotika za poboljšanje sastava mikrobiote kože, lečenje kožnih bolesti i poboljšanja izgleda kože. U tabeli 2.3 dat je literaturni pregled biljnih ekstrakata sa prebiotskim potencijalom za primenu u kozmetičke svrhe.

Tabela 2.3. Pregled studija prebiotskog delovanja ekstrakata bogatih polifenolima na dermalnu mikrobiotu

Naziv biljke	Vrsta studije	Konc.	Opis studije	Rezultati	Ref.
Vodeni ekstrakt crne ribizle (<i>Ribes nigrum</i>), bora (<i>Pinus sylvestris</i>) i ginseng (<i>Panax ginseng</i>)	<i>In vitro</i> i <i>in vivo</i>	0,1-5 %	Ispitivanje uticaja ekstrakta na članove mikrobiote kože. Početni broj bakterija pri ispitivanju pojedinačnih ekstrakata bio je OD ₆₂₀ = 0,05. Klinička studija je obuhvatala zdrave osobe koje su nanosile formulaciju sa smešom ekstrakata tokom 3 nedelje.	- <i>In vitro</i> studija: Pojedinačni ekstrakti pri konc. 1%, inhibiraju rast <i>C. acnes</i> , a stimulišu rast <i>S. epidermidis</i> i <i>S. warneri</i> . - <i>In vivo</i> studija: Smeša svih ekstrakata u optimalnim konc. 1% redukuje rast <i>C. acnes</i> , a stimuliše rast koagulaza negativnih stafilokoka. - Smeša ekstrakata, ali i pojedinačni ekstrakti pokazali su potencijal za lečenje akni. Kozmetički proizvod je komercijalno dostupan.	[112]
Vodeni ekstrakt bobica (<i>Rubus articus</i>) (<i>Rubus nepalensis</i>)	<i>In vitro</i> i <i>in vivo</i>	0,002-0,1 %	Ispitivan uticaj ekstrakta na rast bakterija (CFU) kože i ekspresiju gena na HaCaT modelu*. Klinička studija je obuhvatala zdrave osobe koje su kremu sa ekstraktom nanosile na lice tokom 28 dana.	- <i>In vitro</i> studija: Pri konc. ekstrakta 0,1% rast <i>S. epidermidis</i> na ćelijama kože je povećan, dok je rast <i>S. aureus</i> inhibiran. Povećana ekspresija gena TLR2 koji učestvuje u odbrambenom mehanizmu kože. - <i>In vivo</i> studija: Krema sa 0,002 % ekstrakta je povećala hidrataciju kože. Promena u sastavu mikrobiote: <i>Staphylococcus</i> ↑, <i>Cutibacterium</i> ↓	[113]
Vodeni ekstrakt bobica (<i>Rubus articus</i>)	<i>In vitro</i> i <i>in vivo</i>	-	Ispitivanje uticaja ekstrakata na rast bakterija kože praćenjem optičke gustine. Klinička studija je obuhvatala	- <i>In vitro</i> studija: Ekstrakt je stimulusao rast <i>S. epidermidis</i> , a inhibirao rast <i>S. aureus</i> tokom 24 h gajenja. - <i>In vivo</i> studija: Puder sa inkorporiranim ekstraktom je smanjio	[114]

(<i>Rubus nepalensis</i>)			pacijentkinje sa veoma suvom kožom koje su nanosile puder (šminku) na lice tokom 28 dana.	transepidermalni gubitak vode, a samim tim doveo do veće hidratacije kože. Povećan je mikrobnii diverzitet u korist korisnih bakterija kože.	
Vodeni ekstrakt biljke <i>Chamaenerion fleischeri</i>	<i>In vivo</i>	0,1-3 %	Klinička studija sa zdravim osobama koje su nanosile formulaciju na lice tokom 4 nedelje.	- Formulacija sa inkorporiranim ekstraktom pri konc. 3% je promovisala rast komensalnih bakterija <i>S. epidermidis</i> , <i>S. hominis</i> , a smanjila rast patogenih bakterija.	[115]
Vodeni ekstrakt bobica <i>Sapindus trifoliatus</i>	<i>In vivo</i>	1 %	<i>In vivo</i> studija je obuhvatala dobrovoljce koji su prali lice sapunom sa i bez ekstrakta. Nakon uzimanja brisa, određen je bakterijski broj (CFU).	- Ekstrakt je povećao udeo <i>S. epidermidis</i> na koži, a drastično smanjio udeo nepoželjnih bakterija <i>S. aureus</i> i <i>C. acnes</i> . - Studija ukazuje na potencijal korišćenja ovog ekstrakta kao pomoć u terapiji lečenja atopijskog dermatitisa ili akni.	[116]
Vodeni ekstrakt kore pomorandže (<i>Punica granatum</i> L)	<i>In vitro</i>	0,4-0,8 %	Ispitivanje uticaja ekstrakta na kliničke izolate kože. Početni broj bakterija bio je $1 \cdot 10^5$ CFU/mL.	Optimalne konc. ekstrakta su stimulisale rast kliničkih izolata <i>S. epidermidis</i> , a inhibirale izolate <i>S. aureus</i> . Pri višim konc. su obe bakterije bile inhibirane.	[117]
Ekstrakt divlje brusnice (<i>Vaccinium vitis-idaea</i>) i moroške (<i>Rubus chamaemorus</i>)	<i>In vitro</i>	0,2-1,5 %	Ispitivanje uticaja ekstrakata na rast bakterija kože. Početni broj svake bakterije bio je $1,67 \cdot 10^7$ CFU/mL.	- Ekstrakt divlje brusnice sadrži više 23-30 mg GAE/g polifenola i pri konc. od 0,2% ima prebiotski efekat na <i>S. epidermidis</i> , a inhibirajući na <i>S. aureus</i> i <i>C. acnes</i> . - Ekstrakt moroške ima 2-2,5 mg GAE/g polifenola i pri konc. 1,5% je pokazao isti efekat. - Oba ekstrakta pri odgovarajućim koncentracijama polifenola pokazuju potencijal za lečenje akni ili AD.	[118]

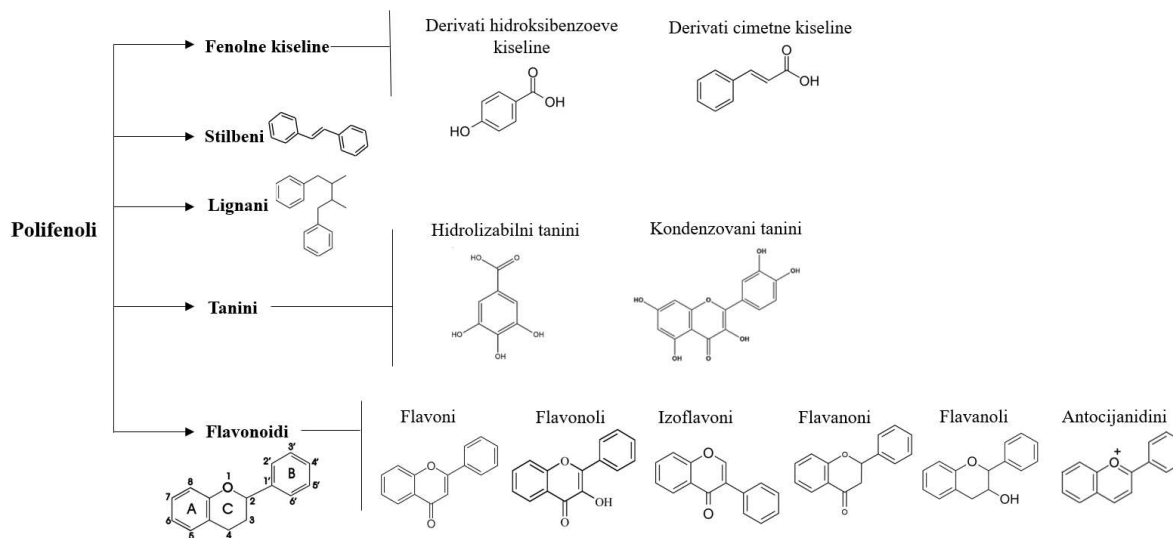
* HaCaT – ćelijska linija umravljenih ljudskih keratinocita, GAE- ekvivalenti galne kiseline

2.5. Polifenoli

Polifenoli predstavljaju grupu jedinjenja koja sadrže dve ili više hidroksilnih grupa (-OH) direktno vezanih za aromatični prsten. Fenolna hidroksilna grupa je pod stalnim uticajem aromatičnog prstena i lako može osloboditi vodonikov jon što ovoj grupi jedinjenja daje karakter slabih kiselina. Nalaze se u višim biljkama i mogu se javiti u slobodnim i vezanim oblicima (rastvorljivim i nerastvorljivim), u zavisnosti od toga da li su kovalentno vezani za druge molekule ili ne [119]. Slobodni polifenoli nisu povezani ni fizičkim ni hemijskim vezama sa drugim molekulima i rastvorljivi su u rastvaraču. Takođe, i polifenoli koji formiraju (glikozidne, estarske ili etarske) veze sa šećerima ili drugim jedinjenjima poput masnih kiselina ili glukuronske kiseline se mogu izolovati rastvaračem. Polifenoli se najčešće javljaju u vidu glikozida, čiji je aglikon vezan za jednu ili više šećernih jedinica putem ugljenik-ugljenik veze (C-glikozidi) ili hidroksilnih grupa (O-glikozidi). Na kraju, polifenoli koji su kovalentno vezani sa strukturnim elementima ćelijskog zida (poput pektina, celuloze, hemiceluloze, lignina, arabinoksilana i proteina), prisutni su u većim količinama u biljnom materijalu u poređenju sa rastvorljivim polifenolima i ne mogu se ekstrahovati rastvaračem, bez prethodnog delovanja kisele, alkalne ili enzimske hidrolize [120,121].

2.5.1. Strukturna podela polifenola

Na osnovu svoje strukture, polifenoli se mogu klasifikovati u dve grupe koje obuhvataju flavonoide i jedinjenja koja nisu flavonoidi odnosno fenolne kiseline, stilbene, lignane i tanine [119]. Na slici 2.10 dat je pregled podele polifenolnih jedinjenja i njihovih strukturnih formula.



Slika 2.10. Podela polifenolnih jedinjenja i prikaz osnovnih strukturnih formula

2.5.1.1. Flavonoidi

Do sada je identifikovano preko 10.000 vrsta flavonoida iz različitih biljnih izvora. Pored toga što su odgovorni za boju, ukus i miris biljaka, flavonoidi učestvuju u regulaciji ćelijskog rasta, zaštiti od ultraljubičastog zračenja i drugih spoljašnjih faktora. Sastoje se od dva aromatična prstena (A i B) međusobno povezanih preko tri ugljenikova atoma iz piranskog (C) i njihova opšta strukturna formula je C₆-C₃-C₆. Flavonoidi se u prirodi nalaze u obliku glikozida, za koje je vezana glukoza ili ramnoza, ali ponekad i ksiloza, glukuronska kiselina i galaktoza [122-125]. U okviru flavonoida razlikuje se šest podgrupa koje se prvenstveno razlikuju prema oksidacionom stanju centralnog piranskog prstena koje uključuju flavone, flavonole, izoflavone, flavanone, flavanole i antocijanine [123].

Flavoni su karakteristični po tome što na C-4 atomu piranskog imaju keto grupu (C=O) i dvostruku vezu između C-2 i C-3 atoma. Najpoznatiji flavoni su apigenin i luteolin. Najčešće se javljaju u obliku 7-O-glikozida i mogu se naći u lekovitom bilju poput kamilice, u kajsijama, kupusu, jabuci, mangu, celeru, peršunu i dr. [124].

Flavonoli se razlikuju od flavona, po hidroksilnoj grupi koju imaju na C-3 atomu piranskog prstena, pa se često sreću pod nazivom i 3-hidroksid flavoni. Raznolikost unutar ove podgrupe, potiče od različite pozicije fenolnih hidroksilnih grupa i kao najpoznatiji se izdvajaju kvercetin, kaemferol, miricetin, rutin i galangin. Zajedno sa flavonima, odgovorni su za belo i svetlo-žutu boju cveta, a mogu se naći u luku, jabuci, bobičastom voću, brokoliju, zelenoj salati, čajevima i crvenom vinu [122,124,125].

Izoflavoni ili kako se često mogu naći u literaturi – izoflavonoidi, imaju drugi fenolni prsten na poziciji C-3 piranskog prstena što predstavlja njihovu jedinu hemijsku razliku od ostalih grupa flavonoida. Karakteristični su metaboliti leguminoznih biljaka i klasifikuju se u tri grupe: genisteini, daidzeini i gliciteini. Izoflavoni predstavljaju fitoestrogene koji su slični ljudskom hormonu 17- β -estradiolu [122,125].

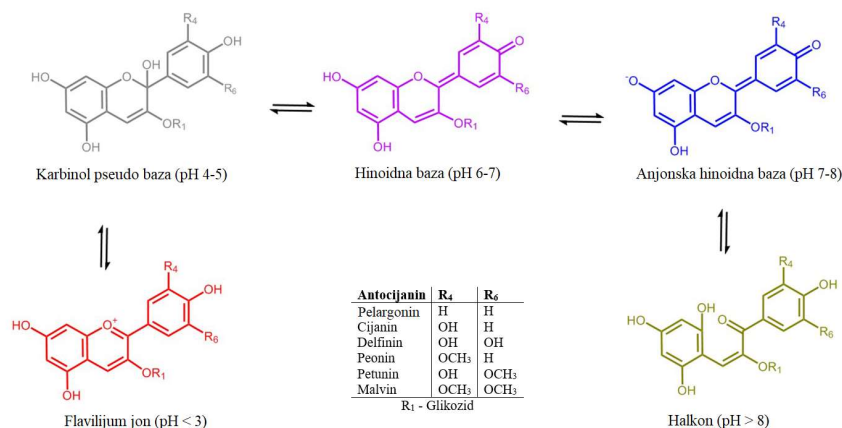
Flavanoni ili dihidro flavoni imaju zasićen piranski prsten. Zasićena dvostruka veza između C-2 i C-3 piranskog prstena predstavlja jedinu strukturnu razliku između flavanona i drugih flavonoida. U većim količinama se nalaze u citrusnom voću kao što je pomorandža, limun, mandarina, grejpfrut i limeta. Predstavnici ove grupe flavonoida su naringenin, hesperidin, hesperetin, pinocembrin, likviritin i erifoktiol. Većina prirodnih flavanona je povezana sa šećerom i gradi 7-*O*-glikozide [122,125].

Flavanoli koji se nazivaju i katehini ili flavan-3-oli, karakteriše hidroksilna grupa na C-3 atomu i odsustvo dvostruke veze u piranskom prstenu. U flavanole spadaju katehin, galokatehin i epikatehin, koji se u većim količinama mogu naći u jabuci, banani, kruškama, malinama i borovnicama [124,125].

2.5.1.1.1. Antocijanini

Antocijanini (ime izvedeno iz grčkih reči „*anthos*“ – cvet i „*kyáneos*“ – plavo), predstavljaju grupu rastvorljivih pigmenata koji daju plavu, ljubičastu, crvenu i narandžastu boju cvetu ili plodu, u zavisnosti od pH vrednosti okruženja [125,126]. Osnovna struktura antocijanina su antocijanidini (aglikoni) koji se sastoje od dva aromatična prstena (A i B) povezana heterocikličnim prstenom (C) koji sadrži kiseonik. Šećerne jedinice koje se najčešće vezuju za aglikone su glukoza, galaktoza, arabinoza i ramnoza [127]. Među najpoznatijim antocijaninima izdvajaju se cijanin (aglikon: cijanidin), delfinin (aglikon: delfinidin), malvin (aglikon: malvidin), pelargonin (aglikon: pelargonidin), peonin (aglikon: peonidin) i petunin (aglikon: petunidin). Najbogatiji izvor antocijanina je bobičasto voće poput borovnice, brusnice, crne ribizle, jagode, maline, crnog duda i grožđa [125,126].

Izolovani antocijanini su veoma nestabilni i podložni degradaciji. Njihova stabilnost zavisi od kiselosti sredine, jer različita koncentracija protona dovodi do strukturnih promena ovih molekula i pojave karakterističnih obojenja [126]. Pa tako, pri pH < 3 antocijanini se nalaze u obliku flavilijum katjona i imaju crveno obojenje i ponašaju se kao slabe kiseline. Sa porastom pH vrednosti, dolazi do deprotonizacije antocijanina što za uzvrat pomera apsorpcione maksimume ka višim talasnim dužinama [128]. Stoga, pri pH 4-5, prelaze u karbinol pseudo baze, bez obojenja, dok sa daljim porastom pH na 6-7 prelaze u hinoidne baze i ljubičaste su. Pri pH 7-8, nalaze se u obliku anjonskih hinoidnih baza i odgovorni su za plavo obojenje. Kada je pH > 8, antocijanini prelaze u halkone sa otvorenim heterocikličnim prstenom, koji su blede žute boje. Pri višim pH vrednostima antocijanini se razgrađuju što smanjuje njihovu koncentraciju u rastvoru. Interesantno, glikozidi sa jednom šećernom jedinicom, a posebno sa dve, su stabilniji u neutralnim pH uslovima od odgovarajućih aglikona, jer molekuli šećera sprečavaju degradaciju nestabilnih intermedijera u fenolne kiseline i aldehide [126,129]. Na slici 2.11 prikazana je ravnoteža pomenutih oblika antocijanina pri različitim pH vrednostima sredine.



Slika 2.11. Ravnotežni oblici antocijanina pri različitim vrednostima pH sredine (preuzeto i prilagođeno prema referenci [129]).

2.5.1.2. Fenolne kiseline

Većina fenolnih kiselina se u biljkama javlja u obliku estara ili glikozida strukturnih biljnih komponenata (celuloza, proteini, lignin), flavonoida ili drugih prirodnih proizvoda. Sastoje se od fenolnog prstena i najmanje jedne karboksilne grupe (COOH). Fenolne kiseline se međusobno razlikuju po broju i položaju hidroksilnih grupa na aromatičnom prstenu. U zavisnosti od dužine bočnog lanca vezanog za fenolni prsten, mogu se podeliti na derivate hidroksibenzoeve (C_6-C_1) i cimetine (C_6-C_3) kiseline. U derivate hidroksibenzoeve kiseline spadaju galna, *p*-hidroksibenzoeva, vanilinska i siringinska kiselina, dok derivati cimetine kiseline uključuju kofeinsku, ferulinsku, sinapinsku, hlorogenu i *p*-kumarinsku kiselinu [124,127]. Fenolne kiseline se u visokim koncentracijama mogu naći u bobičastom voću (ili drugom crvenom voću), kafi, čajevima, kakao prahu i različitom povrću o [124,127,130].

2.5.1.3. Tanini

Tanini čine grupu biljnih jedinjenja koja mogu da vežu i precipituju proteine, i odgovorni su za opor ukus biljaka ili njihovih proizvoda. Predstavljaju polimere polifenola i obično se klasifikuju u dve grupe: kondenzovani i hidrolizabilni tanini [119,127]. Mogu se naći u različitim žitaricama, mahunarkama, bobičastom voću, grožđu, kruškama, vinu, čajevima i dr.

Kondenzovani tanini, poznati i kao proantocijanidini, predstavljaju oligomere i polimere flavan-3-ola, koji nastaju pod dejstvom kiselina ili enzima. Strukturna raznolikost ovih jedinjenja proizilazi iz karakteristika monomernih jedinica, tipa veza, stepena polimerizacije, kao i mogućnosti esterifikacije sa galnom kiselinom [119,127]. Hidrolizom proantocijanidina pri povišenoj temperaturi i u kiseloj sredini dolazi do njihovog razlaganja, pri čemu nastaju antocijanidini. Nasuprot njima, hidrolizabilni tanini se pretežno sastoje od centralne šećerne jedinice (najčešće glukoze) koja je estarskim vezama povezana sa ostacima galne kiseline i njenih derivata. Na osnovu građe, dele se na galotanine i elagotanine. Galotanini se sastoje od centralne šećerne jedinice supstituisane ostacima galne kiseline, dok elagotanini predstavljaju veće i strukturno kompleksnije molekule, građene od jedinica pentagaloil glukoze međusobno povezanih kovalentnim (C–C) vezama. Hidrolizom hidrolizabilnih tanina pod dejstvom kiselina, baza ili enzima, galotanini se razlažu na glukozu i galnu kiselinu, dok se iz elagotanina dodatno oslobađa i elaginska kiselina [130,131].

2.5.1.4. Stilbeni i lignani

U strukturu stilbena ulaze dva benzenova prstena povezana dvostrukom vezom ($C_6-C_2-C_6$), zbog koje postoje kao izomeri. Obično se javljaju u obliku glikozida. Postoje u biljkama poput grožđa, pasulja, bobičastom voću, dudu, šljivama i dr. Reprezentativan predstavnik stilbena je resveratrol, koji se u velikim količinama nalazi u vinu [119,132].

Lignani su klasa polifenolnih jedinjenja koja nastaju reakcijom polimerizacije fenil propanoida (C_6-C_3 monomera) koji pokazuju veliku strukturnu raznolikost i široko su rasprostranjeni u korenu, stabljici, listovima i semenu biljaka. Nalaze se u biljkama bogatim vlaknima, kao što je brokoli, šargarepa, mahunarke, žitarice, bobičasto voće, ali i u nasicima poput kafe, vina i čajeva [130,132].

2.5.2. Antioksidativna aktivnost polifenola

Pored ultravioletnog zračenja, oksidativni stres je glavni uzročnik prevremenog starenja ili raznih kožnih oboljenja, koji nastaje usled viška reaktivnih vrsta poznatih kao slobodni radikali. Slobodni radikali sadrže neparan elektron zbog kog su izuzetno nestabilni i skloni interakcijama sa drugim molekulima [133]. Radikali sa izraženom reaktivnošću su molekuli koji sadrže atom kiseonika i među

najpoznatijim su hidroksil (HO[•]), superdioksid anjon radikal (O^{2-•}), peroksilni (O₂[•]), hipohlorit radikal (ClO[•]) i azot dioksid (NO[•]) radikali. Iako se ne smatra klasičnim radikalom, vodonik peroksid (H₂O₂) je takođe sposoban da započne lančane reakcije u organizmu [134].

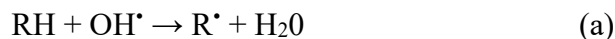
Slobodni radikali se prirodno formiraju tokom oksidativnih reakcija koje su deo svakodnevnog metabolizma i u normalnim uslovima antioksidativni sistem kože može efikasno da se izbori sa njima [8]. Endogeni antioksidativni sistem kože se prvenstveno odnosi na enzime superdioksid dismutazu, katalazu, glutation reduktazu i glutation peroksidazu koji predstavljaju prvu liniju odbrane od štetnih radikala. Drugu liniju odbrane čine jedinjenja poput L-askorbinske kiseline u hidrofилnom delu kože, α-tokoferola u ćelijskim membranama, ubihinola u mitohondrijama, glutationa i lipoinske kiseline [8,110]. Međutim, u slučaju povećanog endogenog stresa organizma, povreda ili napada patogena, koncentracija slobodnih radikala naglo raste, i organizam nije sposoban da se sam izbori sa njima. Zbog toga je korisna primena antioksidanata koji su sposobni da neutrališu reaktivne vrste i spreče nastanak oksidativnog stresa [134].

Kao snažni antioksidanti se upravo izdvajaju polifenoli, koji zadržavaju svoju stabilnost u prisustvu radikala, sprečavajući formiranje novih reaktivnih vrsta. Drugim rečima, oni prekidaju lančanu reakciju i sprečavaju dalja oštećenja kože, što ih čini vrednim sastojcima za primenu u kozmetici [8,133].

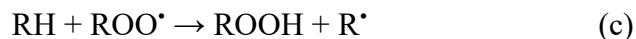
2.5.2.1. Autooksidacija lipida u koži

U koži se nalazi veliki udeo lipida koji uključuju ceramide, holesterol i masne kiseline, od velike važnosti za održavanje odbrambene funkcije kože, ali i njene hidratacije i elastičnosti. Oksidativno oštećenje lipida može biti izazvano raznim fizičko-hemijskim procesima, kao što je izlaganje toploti, ultravioletnom zračenju ili visoko reaktivnim vrstama – slobodnim radikalima [135] i ovaj proces je posredovan redoks aktivnim metalima poput gvožđa i bakra [136]. Proces oksidacije lipida obuhvata skup lančanih reakcija koje se mogu podeliti u 3 faze a to su: inicijacija, propagacija i terminacija.

Inicijacija je prvi korak u oksidaciji lipida koji započinje napadom slobodnih radikala (npr. OH[•]) na fosfolipide ili nezasićene masne kiseline (RH) koje ulaze u sastav membrana ćelijskih i subćelijskih komponenti [137]. U ovom koraku dolazi do formiranja lipidnog radikala (R[•]) koji dalje reaguje sa molekulom kiseonika što dovodi do stvaranja peroksilnog radikala (ROO[•]) [137].



Drugi korak oksidacije lipida – propagacija, se odnosi na lančanu reakciju između peroksilnih radikala koji su sposobni da uklone atom vodonika iz drugih nezasićenih kiselina i stvaranja lipidnog hidroperoksida (ROOH) i novog radikala koji pokreće lančanu reakciju. U ovom koraku se generiše veliki broj novih slobodnih radikala koji mogu da započnu reakciju sa stabilnim molekulima nezasićenih masnih kiselina što rezultira većom razgradnjom lipida [137,138].



Poslednji korak – terminacija uključuje degradaciju radikala ili reakciju između dva slobodna radikala koji formiraju stabilan, nereaktivan proizvod. Kao krajnji produkti oksidacije lipida nastaju različite vrste aldehida, ketona, alkana i drugih proizvoda razgradnje karboksilnih kiselina, kao i drugih reaktivnih proizvoda polimerizacije [137].

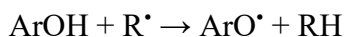


Sprečavanje ili usporavanje lipidne autooksidacije moguće je primenom antioksidanata koji su sposobni da neutrališu formiranje početnog alkil radikala (R^{\bullet}), koji bi doveo do ciklusa propagacije. Antioksidanti predstavljaju heterogenu grupu jedinjenja – od malih molekula do složenih enzimskih sistema, pri čemu se u skorije vreme sve veća pažnja posvećuje antioksidativnom delovanju polifenolnih jedinjenja [138]. Polifenoli mogu sprečiti inicijaciju autooksidacije lipida kroz nekoliko mehanizama koji su detaljnije opisani u nastavku.

2.5.2.2. Mehanizam antioksidativnog delovanja polifenola

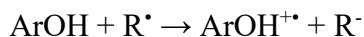
Kao tipični antioksidanti, polifenoli reaguju sa slobodnim radikalima preko tri glavna mehanizma:

1) Mehanizam prenosa atoma vodonika uključuje direktnu reakciju između polifenola (ArOH) i slobodnog radikala (R^{\bullet}), što se može opisati kao:



Tokom homolitičkog raskidanja O-H veze u hidroksilnoj grupi, polifenol donira atom vodonika, pri čemu se formira stabilan RH molekul i oksidovani oblik slobodnog radikala polifenola (ArO^{\bullet}). Nastali slobodni radikal polifenola ima aromatični prsten sa jednim delokalizovanim elektronom, što predstavlja energetski stabilniju strukturu od inicijalnog slobodnog radikala [139]. Kao takvi, nisu sposobni da pokrenu nastanak novih radikala i propagiraju lančane reakcije, već mogu da prihvate elektrone drugih radikala i formiraju stabilne neradikalske proizvode [140].

2) Mehanizam prenosa pojedinačnog elektrona se takođe odnosi na direktnu reakciju između polifenola i slobodnog radikala i može se predstaviti na sledeći način:



Kada polifenol donira elektron slobodnom radikal, nastaje energetski stabilan anjon (R^{-}) sa parnim brojem elektrona i manje reaktivan katjon radikal polifenola ($\text{ArOH}^{\bullet+}$). Najbitniji parametar za procenu antioksidativne aktivnosti u ovom mehanizmu je energija jonizacije, jer što je ona niža, lakše je oslobađanje elektrona, a posledično i neutralizacija slobodnih radikala [139].

3) Sposobnost helacije jona prelaznih metala podrazumeva da polifenoli formiraju stabilne komplekse sa jonima metala čime ih sprečavaju da učestvuju u reakcijama koje generišu slobodne radikale. Štaviše, neki metali (joni bakra, mangana, kobalta i gvožđa) u nižem oksidacionom stanju mogu da reaguju sa vodonik peroksidom u takozvanoj Fentonovoj reakciji i da nagrade visoko reaktivne hidroksil radikale (HO^{\bullet}). Polifenoli, stvaranjem kompleksa sa metalima, indirektno učestvuju u sprečavanju nastanka oksidativnog stresa i sprečavanju oštećenja biomolekula [139].

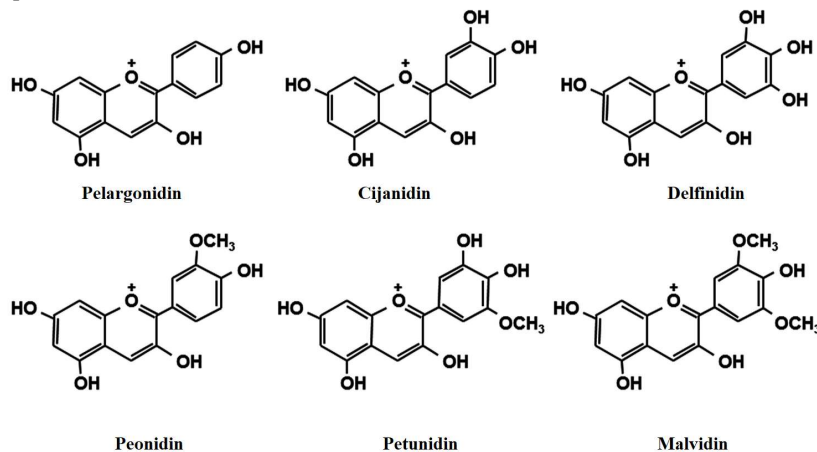
2.5.2.3. Uticaj strukture polifenola na njihovu antioksidativnu aktivnost

Struktura polifenola je bitan faktor koji utiče na njihovu antioksidativnu aktivnost. Ova velika grupa prirodnih jedinjenja razlikuje se međusobno po vrsti prstenova koji ih izgrađuju, tipu i poziciji supstituenata, što direktno određuje njihovu sposobnost da deluju kao antioksidanti. Poznato je da fenolna hidroksilna grupa ima ključnu ulogu u neutralizaciji slobodnih radikala, pri čemu broj i pozicija hidroksilnih i drugih grupa, može značajno uticati na izraženost antioksidativne aktivnosti. Može se reći da glavne strukturne karakteristike koje doprinose antioksidativnoj aktivnosti podrazumevaju:

- prisustvo više hidroksilnih grupa vezanih za aromatično jezgro, pri čemu je *orto* položaj ovih grupa najpovoljniji;
- prisustvo karbonilne funkcionalne grupe (C=O) ili dvostruke veze između atoma (C₂-C₃) ugljenika;
- planarna struktura polifenola, koja omogućava konjugaciju, i delokalizaciju elektrona i rezonantne efekte [132,139].

Sa druge strane, prisustvo glikozidnih ili metoksilnih (OCH₃) grupa ima negativan efekat [132]. U nastavku su nabrojane najvažnije strukturne karakteristike svake (pod)grupe polifenola odgovorne za njihovu antioksidativnu aktivnost.

Antocijanini (slika 2.12) su se pokazali kao jedinjenja sa izraženom sposobnošću da neutrališu superdioksid radikale i antioksidativni kapacitet njihovih aglikona opada u sledećem nizu: delfinidin > petunidin > malvidin > cijanidin > peonidin > pelargonidin, pri čemu glikolizacija aglikona može uticati na ovaj redosled. Pored toga što glikozidi imaju smanjene antioksidativne sposobnosti, broj i tip vezane šećerne jedinice ih mogu dodatno izmeniti. Na primer, antioksidativna aktivnost malvidin galaktozida je izraženija u odnosu na antioksidativnu aktivnost malvidin glukozida. Isto tako, glukozidi cijanidina i malvidina sa dve šećerne jedinice su pokazali manju efikasnost od njihovih odgovarajućih monoglukozida [132].



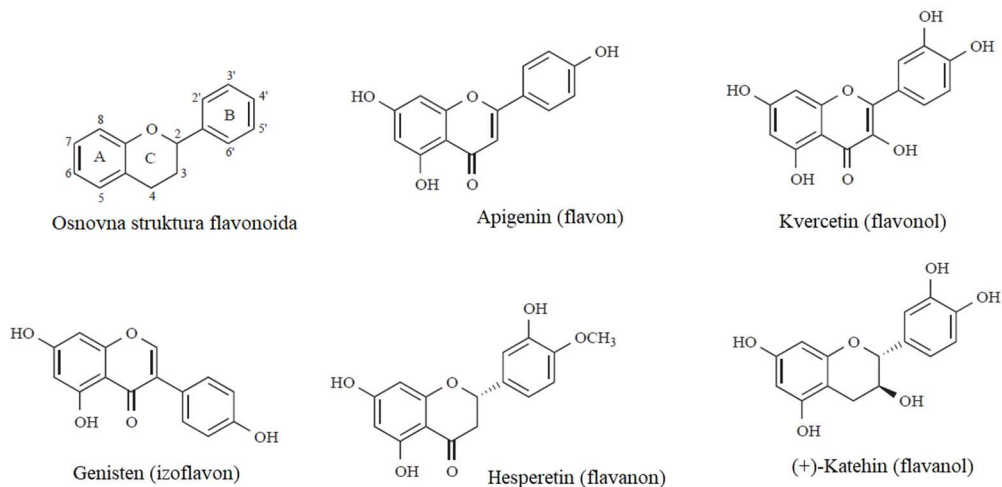
Slika 2.12. Strukture antocijanidina. (preuzeto i prilagođeno prema referenci [141])

Kod flavanola, kateholna grupa na B aromatičnom prstenu i hidroksilna grupa na zasićenom (C) prstenu mogu delovati kao efikasni donori elektrona što poboljšava njihovu antioksidativnu sposobnost. Dodatno, pokazalo se da flavanoli koji sadrže ostatke galne kiseline u svojoj strukturi, imaju bolju aktivnost od onih koji ne sadrže [132,134]. Kod tanina, polimera flavanola, se pokazalo da stepen polimerizacije povećava njihovu sposobnost uklanjanja štetnih radikala [132].

Kada je reč o flavonolima, hidroksilne grupe na B i C prstenu više doprinose antioksidativnoj aktivnosti od onih na A prstenu [132]. Isto tako, helacija flavonola sa prelaznim metalima se vrši

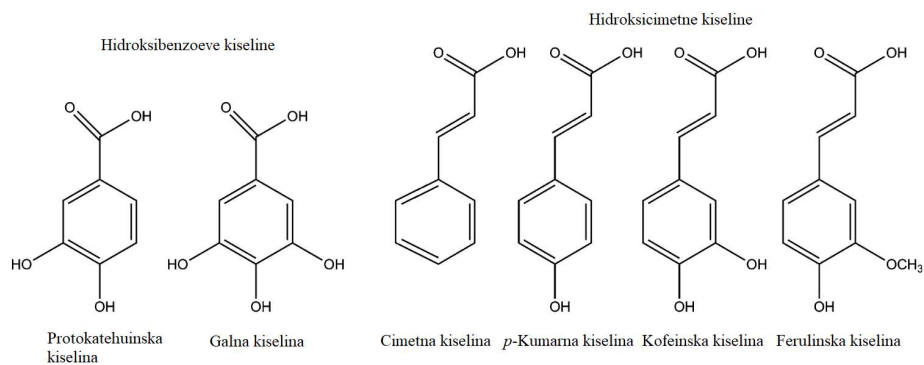
prvenstveno preko OH grupe na C-3 i karbonilne grupe na C-4 atomu piranskog prstena. Na njihovo formiranje pozitivno utiče i prisustvo dvostruke veze između C-2 i C-3 atoma [134].

Kod flavona i flavanona je kao i kod flavanola, za antioksidativnu aktivnost odgovorna kateholna struktura na B aromatičnom prstenu i tri OH grupe na piranskom prstenu. Sposobnost flavona da heliraju prelazne metale ne proizilazi samo iz prisustva dvostruke veze u piranskom prstenu, već i iz prisustva tri hidrosilne grupe na pozicijama C-5, C-6 i C-7. Sa druge strane, antioksidativna sposobnost izoflavona je u funkciji prisustva OH grupe na C-4 jednog aromatičnog prstena, i dve OH grupe na C-5 i C-6 drugog aromatičnog prstena [134]. Na slici 2.13 prikazani su strukturne formule predstavnika pomenutih grupa flavonoida.



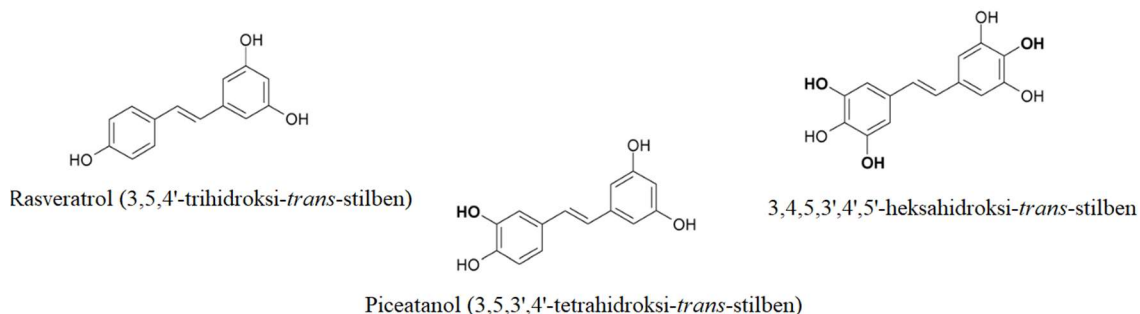
Slika 2.13. Strukturne formule predstavnika flavona, flavonola, izoflavona, flavanona i flavanola. (preuzeto i prilagođeno prema referenci [142])

Fenolne kiseline se razlikuju po prisustvu hidrosilnih i metoksilnih grupa u aromatičnom prstenu, što utiče na njihove različite biološke aktivnosti. Za antioksidativnu sposobnost je odgovoran fenolni prsten koji može da donira atome vodonika. Kiseline koje su se pokazale kao najefikasnije u neutralizaciji slobodnih radikala su galna, siringinska, kofeinska i protokatehuinska kiselina [132]. Takođe, etilenski bočni lanac koji povezuje aromatični prsten sa karboksilnom grupom, povećava njihovu sposobnost da doniraju atome vodonika. Prisustvo supstituenata koji mogu da doniraju atom vodonika, naročito u *orto* i/ili *para* položaju u odnosu na fenolnu hidrosilnu grupu, povećava aktivnost fenolnih kiselina u uklanjanju radikala [140]. Na slici 2.14. prikazani su predstavnici hidrosibenzojevih i hidrosicimetnih kiselina.



Slika 2.14. Predstavnici hidrosibenzojevih i hidrosicimetnih kiselina. (preuzeto i prilagođeno prema referenci [143])

Najizučavaniji predstavnik stilbena je resveratrol (slika 2.15). Antioksidativna aktivnost stilbena zavisi od pozicije hidroksilnih grupa, pri čemu su grupe u *para* položaju aktivnije od onih u *meta* položaju [134]. Esterifikacija može imati uticaj na ovu aktivnost, pa derivati resveratrola, u zavisnosti od položaja i esterifikovane grupe, mogu pokazati i jaču antioksidativnu aktivnost od samog resveratrola [132].



Slika 2.15. Hemijska struktura nekih predstavnika stilbena. (preuzeto i prilagođeno prema referenci [144])

2.6. Ekstrakcija polifenola iz biljnog materijala

Postupak ekstrakcije omogućava izolaciju željenih bioaktivnih komponenata iz sirovih materijala. Kada je reč o polifenolima, kao najčešće primenjena metoda ističe se ekstrakcija rastvaračem, koja podrazumeva njihov prenos iz biljnog materijala u odgovarajući rastvarač, obezbeđujući efikasno izdvajanje i dalju primenu. Odvija se kroz nekoliko koraka [11,145]:

1. Prodiranje rastvarača u biljni materijal;
2. Rastvaranje željenih molekula u rastvaraču;
3. Difuzija rastvorenih molekula iz biljnog materijala;
4. Izdvajanje rastvora sa ekstrahovanim molekulima (ekstrakta)

Na efikasnost ekstrakcije utiče nekoliko parametara, poput tipa rastvarača, temperature, vremena ekstrakcije, veličine čestica materijala, kao i odnosa materijala i rastvarača. Pravilnim izborom pomenutih parametara mogu se postići visoki prinosi željenih komponenata uz minimalne materijalne troškove same ekstrakcije i kasnije obrade ekstrakta, smanjenje otpada i štete životnoj sredini [10].

2.6.1. Uticaj rastvarača na efikasnost ekstrakcije

Efikasnost ekstrakcije polifenolnih jedinjenja iz biljnog materijala u velikoj meri zavisi kako od sposobnosti rastvarača da ih solvatiše, tako i od njihove rastvorljivosti u odabranom rastvaraču. Rastvarači koji formiraju vodonične veze su ključni u ovom procesu, posebno zbog toga što olakšavaju izolaciju polifenolnih jedinjenja vezanih za strukturne komponente biljke. Dakle, neophodno je da stepen difuzije rastvarača unutar biljnog materijala bude visok, kako bi se destabilizovale vodonične veze između polifenola i strukturnih komponenata, a olakšala solvatacija ciljanih jedinjenja. Polarnost rastvarača je takođe bitna, jer određuje selektivnost sistema, odnosno vrste jedinjenja koje će biti prisutne u ekstraktu. S obzirom na to da su polifenoli pretežno polarna i hidrofilna jedinjenja, a prema hemijskom principu „slično se u sličnom rastvara“, polarni rastvarači su najbolji izvor za njihovu izolaciju. Zbog

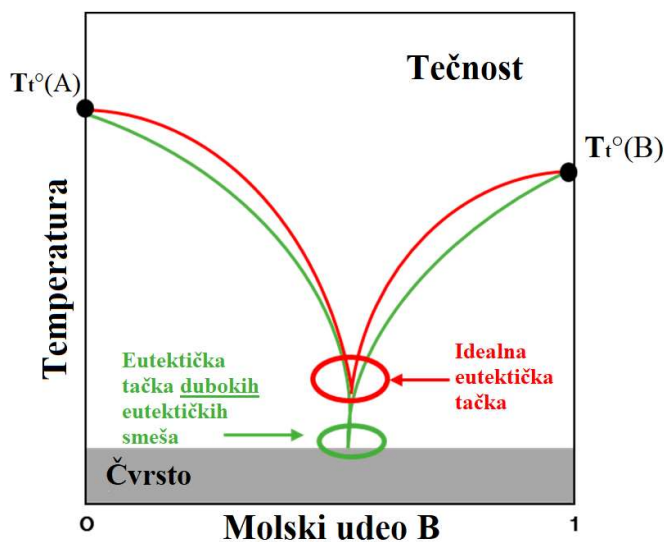
toga se alifatični alkoholi (kao što su metanol i etanol) i polarni organski rastvarači (poput acetona i etil acetata), najčešće koriste u ekstrakciji polifenolnih jedinjenja iz biljaka ili biljnih tropova [11].

Kako je većina organskih rastvarača toksična za ljudsku upotrebu, sve se više pribegava upotrebi zelenih ili GRAS (eng. *Generally Recognized as Safe*) rastvarača, koji su bezbedni za primenu u prehrambenoj, farmaceutskoj ili kozmetičkoj industriji. Univerzalni zeleni rastvarač je voda, koja je lako dostupna, jeftina i ne doprinosi zagađenju životne sredine. Nezapaljiva je tečnost, što smanjuje rizike tokom rukovanja i dodatno opravdava njeno korišćenje. Kao polarni rastvarač, idealna je za izolaciju polifenolnih jedinjenja [146]. Pored vode, etanol se smatra ekološki prihvatljivim rastvaračem, koji pruža visoke prinose ekstrakcije polifenola. Takođe, kombinacija etanola i vode često se koristi kao efikasan rastvarač iz različitih biljnih izvora i njihovih nusproizvoda [11]. Još jedan tip zelenih rastvarača koji se sve više primenjuju kao zamena za organske rastvarače su eutektičke smeše. Ove smeše imaju visoku termalnu stabilnost, slabo isparljive su i moguće im je prilagoditi polarnost, što ih čini adekvatnim rastvaračem za primenu u ekstrakciji fitohemikalija [147,148].

2.6.1.1. Duboke eutektičke smeše

Sam naziv (dubokih) eutektičkih smeša (eng. *Deep eutectic solvents*, DES) potiče od grčke reči *eutēktos* što znači „lako topljivi“, a odnosi se na smanjenje tačke topljenja nakon kombinacije sastojaka koji izgrađuju smešu. Stoga, ove smeše se definišu kao mešavina dve ili više komponenata koja dovodi do značajnog smanjenja tačke topljenja u poređenju sa čistim početnim komponentama [149].

Eutektički sistem se može predstaviti pomoću faznog dijagrama (slika 2.16) kao zavisnost temperature topljenja od sastava komponenata koje ga izgrađuju. Kako se dva jedinjenja (A i B) mešaju, njihove tačke topljenja ($T_f^\circ(A)$ i $T_f^\circ(B)$) opadaju dok se ne dostigne minimalna temperatura poznata kao temperatura idealne eutektičke smeše. Međutim, duboke eutektičke smeše predstavljaju neidealnu eutektičku smešu kod kojih dolazi do naglog snižavanja eutektičke tačke, koja je niža od temperature idealne tečne smeše [149,150].



Slika 2.16. Fazni dijagram idealnih i dubokih eutektičkih smeša. (preuzeto i prilagođeno prema referenci [149])

Na osnovu jedinjenja koja ih izgrađuju, duboke eutektičke smeše se mogu podeliti na [149,151]:

- Tip 1 – izgrađen od kvaternerne amonijum soli i metalne soli (npr. AlCl_3 , AgCl i CuCl_3);
- Tip 2 – izgrađen od kvaternerne amonijum soli i hidratizane metalne soli (npr. $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$);
- Tip 3 – izgrađen od kvaternerne amonijum soli i donora vodoničnih veza;
- Tip 4 – izgrađen od metalne soli i donora vodoničnih veza;
- Tip 5 – relativno nov tip, izgrađen od nejonskih, molekulskih donora i akceptora vodoničnih veza.

Zbog svojih jeftinih početnih komponenata, jednostavne proizvodnje, interakcije sa vodom i visoke biorazgradivosti duboke eutektičke smeše tipa 3 se najviše primenjuju u procesima ekstrakcije. U ovim sistemima jedna od komponenata je uvek donor vodonične veze (eng. *Hydrogen bond donor*, HBD), dok je druga akceptor vodonične veze (eng. *Hydrogen bond acceptor*, HBA). Kvaternerne amonijum soli poput holin hlorida i betaina služe kao HBA, dok se kao HBD najčešće javljaju urea, etil glikol, glicerol, amino kiseline, karboksilne kiseline, šećeri i dr. [147]. Potrebno je naglasiti da ukoliko su izgrađene samo od metabolita živih ćelija onda se nazivaju prirodnim eutektičkim smešama (eng. *Natural deep eutectic solvents*, NADES) [151]. Kada se početne komponente pomešaju u odgovarajućem molarnom odnosu i zagrevaju, zahvaljujući intermolekulskim interakcijama, smeša postaje tečna, čak i nakon hlađenja do sobne temperature. Variranjem prirode HBD i HBA ili njihovog molarnog odnosa moguće je podesiti željena fizičko-hemijska svojstva ovih smeša, čime se povećava njihova mogućnost primene [150,152].

Duboke eutektičke smeše su pogodni rastvarači za ekstrakciju polifenola, jer imaju visok kapacitet solvatacije usled uspostavljanja vodoničnih veza, dipol-dipol interakcija ili Van der Valsovih sila sa ciljanim jedinjenjima, omogućavajući njihovo efikasno izdvajanje iz biljnog materijala [149,153]. Međutim, jedan od glavnih nedostataka DES-a je visoka viskoznost, koja dovodi do niskih prinosa ekstrakcije, usled otežanog prenosa mase. Ovaj problem može se prevazići dodavanjem vode, što ne samo da smanjuje viskoznost, već i povećava polarnost DES-a, što olakšava ekstrakciju polarnih jedinjenja i poboljšava selektivnost ekstrakcije [154].

Pored visoke viskoznosti, najveći izazov u ekstrakciji polifenolnih jedinjenja je njihovo naknadno odvajanje od eutektičkih smeša. Kako bi se izbegla potreba za prečišćavanjem i drugim skupim procesima, koriste se DES koje su bezbedne da se nađu i u finalnim proizvodima. Na primer, za primenu u kozmetici, prema regulativi Evropske unije zabranjena je upotreba soli holina, jer izazivaju iritacije na koži, dok je kao alternativa predložena upotreba betaina. Sa druge strane, kao HBA preporučene su komponente koje imaju potvrđen beneficianalni dermalni efekat poput uree, glukoze, poliola, aminokiselina, α -hidroksilnih kiselina, propilen glikola i dr. [152].

2.6.2. Uticaj ostalih fizičko-hemijskih parametara na efikasnost ekstrakcije

Pored izbora rastvarača, veliki uticaj na prinose ekstrakcije polifenola iz biljnog materijala mogu imati i sledeći parametri [10,11]:

1) Veličina čestica – Generalno, što je manja veličina čestica, veća je dodirna površina, a samim tim i bolja penetracija rastvarača i difuzija aktivnih supstanci iz biljnog materijala. Međutim, previše sitne čestice mogu dovesti do prekomernog upijanja rastvarača i otežati naknadnu filtraciju ili kontinualnu ekstrakciju sa pakovanim slojem čvrste faze.

2) Temperatura – Sa povećanjem temperature smanjuje se viskoznost rastvarača i površinski napon, čime se poboljšava rastvorljivost i difuzija molekula. Međutim, treba imati u vidu da visoke temperature mogu dovesti do isparavanja rastvarača i degradacije termolabilnih komponenata. Stoga, preporučena temperatura ekstrakcije polifenolnih jedinjenja je 20-60 °C [155].

3) Vreme trajanje ekstrakcije – Efikasnost ekstrakcije raste sa povećanjem trajanja ekstrakcije, sve dok se ne postigne ravnoteža između rastvorenih supstanci unutar i izvan čvrstog materijala. Dodatno produženje vremena neće uticati na povećanje prinosa ekstrakcije, ali može dovesti do degradacije labilnijih komponenata ekstrakta. Takođe, produženo izlaganje polifenolnih jedinjenja izvoru svetlosti može dovesti do njihovog oštećenja i smanjene sposobnosti da neutrališu slobodne radikale [156].

4) Odnos čvrstog materijala i rastvarača – Što je veći udeo rastvarača u odnosu na biljni materijal, to je solvatacija materijala bolja, što rezultira višim prinosom ekstrakcije. Međutim, previsok odnos rastvarača i materijala ukazuje na prekomernu potrošnju rastvarača i zahteva povećane kapacitete ekstraktora i dodatno koncentrovanje uzoraka što nije ekonomski opravdano niti ekološki prihvatljivo [156].

5) Hemijski sastav biljnog materijala – Hemijski sastav biljnog materijala varira između različitih sorti jedne biljke, a zavisi i od stepena zrelosti, uslova gajenja, klime, područja, kvaliteta zemljišta i dr. Pored toga, priprema uzorka za ekstrakciju poput načina homogenizacije ili sušenja može promeniti sastav biljnog materijala [157].

2.6.3. Vrste ekstrakcije za izolaciju polifenola iz biljnog materijala

Glavni izazov u procesu ekstrakcije je postizanje maksimalnih prinosa u što kraćem vremenu, minimalni troškovi i ponovljivost procesa. Postoji veliki broj tehnika za ekstrakciju polifenolnih jedinjenja iz biljnog materijala, pri čemu se grubo mogu podeliti u dve grupe: konvencionalne i moderne tehnike ekstrakcije [156].

Konvencionalne tehnike predstavljaju tradicionalni pristup koji se koristi duži niz godina za dobijanje polifenolnih frakcija iz čvrsto-tečnih sistema (biljni materijal-rastvarač) u kojima biljni materijal, nakon maceracije, perkolacije, ekstrakcije sa refluksom ili Soxhletove (Soxhlet) ekstrakcije, oslobađa različita polifenolna jedinjenja u zavisnosti od njihove rastvorljivosti [10]. Široko su prihvaćene, jer se lako izvode i ne zahtevaju skupu opremu. Ipak, kako bi se postigli veći prinosi željenih jedinjenja, često je potrebno ponoviti ekstrakciju više puta uz primenu organskih rastvarača i dužeg trajanja ekstrakcije. Pored toga, upotrebljeni organski rastvarači imaju negativan uticaj na životnu sredinu, a njihova potencijalna reciklaža zahteva dodatne materijalne i energetske troškove [157].

Neki od pomenutih nedostataka konvencionalnih tehnika mogu se eliminisati, ili barem smanjiti zamenom modernim tehnikama kao što su ekstrakcija uz pomoć ultrazvuka, ekstrakcija uz pomoć mikrotalasne energije, ekstrakcija pod pritiskom, ekstrakcija uz pomoć superkritičnih fluida, enzimski potpomognuta ekstrakcija i dr. [157]. Glavna prednost ovih tehnika je to što značajno povećavaju brzinu ekstrakcije uz primenu blagih uslova, zbog čega se smatraju zelenim tehnikama ekstrakcije. Primenom ovih metoda mogu se očekivati viši prinosi polifenola, jer razaranjem ćelijskog zida olakšavaju penetraciju rastvarača, poboljšavajući izolaciju kako slobodnih, tako i vezanih polifenolnih jedinjenja. U ovoj disertaciji je primenjena enzimski potpomognuta ekstrakcija pa će ova zelena ekstrakciona tehnika biti detaljnije opisana u narednom poglavlju [11].

2.7. Enzimski potpomognuta ekstrakcija polifenola iz biljnog materijala

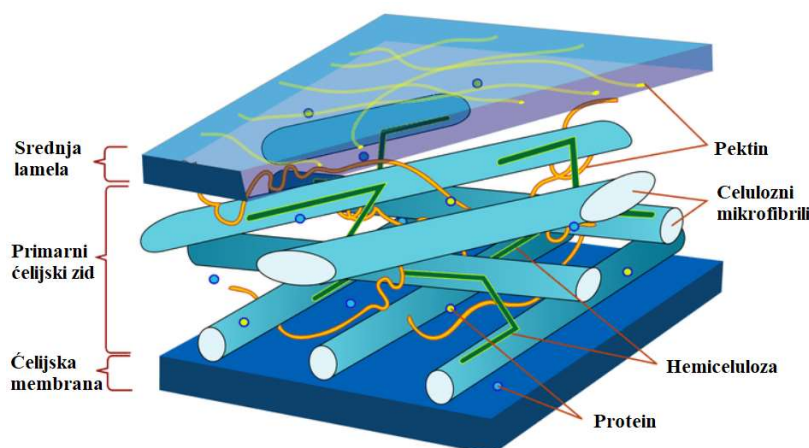
Polifenoli se razlikuju ne samo po strukturi, već i po tome da li se javljaju u rastvornom obliku, kao slobodni ili vezani estarskim, etarskim ili glikozidnim vezama, ili se nalaze u nerastvornom obliku, vezani za strukturne delove biljnog materijala [121]. Međutim, tokom procesa ekstrakcije uglavnom ostaju u čvrstom ostatku, s obzirom na to da njihovu kovalentnu vezu sa makromolekulima nije lako raskinuti samo primenom rastvarača. Najčešće korišćene metode za oslobađanje nerastvorno vezanih polifenola su kisela i alkalna hidroliza, ali nedostatak ovih metoda je to što dovode do degradacije ili strukturnih promena polifenola, a takođe često zahtevaju više operativnih koraka, što proces čini

složenijim. Stoga, kao bolji, efikasniji i ekološki prihvatljiviji metod za ekstrakciju polifenola, a posebno nerastvorno vezanih polifenola, izdvaja se enzimski potpomognuta ekstrakcija [120,121].

Enzimski potpomognuta ekstrakcija se zasniva na hidrolizi ćelijskog zida biljnog materijala pomoću biokatalizatora – enzima – pod optimalnim uslovima, čime se povećava propustljivost materijala, a samim tim olakšava oslobađanje bioaktivnih komponenata. Izbor enzima je ključan faktor koji utiče na efikasnost ekstrakcije, jer u zavisnosti od njegove selektivnosti (i specifičnosti) zavisi koji delovi biljnog materijala će biti razgrađeni. S obzirom na to da se enzimске reakcije izvode u blagim i temperaturno kontrolisanim uslovima, u prisustvu vode kao rastvarača, jedinjenja koja se izoluju nakon enzimski potpomognute ekstrakcije zadržavaju svoja bioaktivna svojstva, a dobijeni ekstrakti su pogodni za ljudsku primenu [12,13].

2.7.1. Sastav biljnog ćelijskog zida

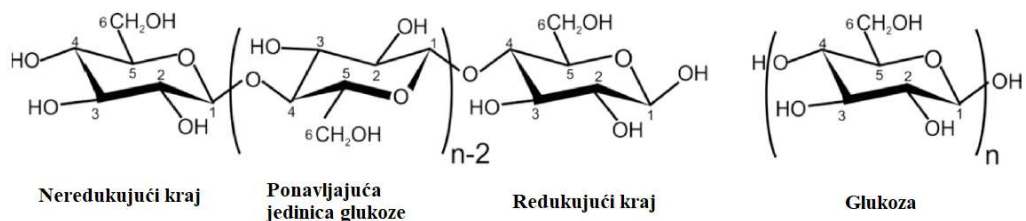
Biljni ćelijski zid se sastoji od dva sloja – primarnog ćelijskog zida i srednje lamele, a kod nekih biljaka se može uočiti i postojanje trećeg sloja – sekundarnog ćelijskog zida. Pretežno su izgrađeni od polisaharida kao što su celuloza, hemiceluloza i pektin, pri čemu se mogu naći i glikoproteini i lignin. Udeo ovih strukturnih komponenata određuje fizičko-hemijska svojstva ćelijskog zida i varira među različitim vrstama biljaka. Razlike u sastavu ćelijskog zida posledica su prilagođavanja biljaka da obavljaju različite funkcije, kao i adaptacije na specifične uslove životne sredine [158-160]. Na slici 2.17 šematski je prikazana struktura ćelijskog zida biljaka.



Slika 2.17. Struktura biljnog ćelijskog zida [161].

2.7.1.1. Celuloza

Celuloza (slika 2.18) je najzastupljenija komponenta primarnog i sekundarnog ćelijskog zida, i predstavlja linearni homopolisaharid koji se sastoji od jedinica glukoze međusobno povezanih β -(1,4) glikozidnim vezama. Svaka D-glukoza je rotirana za 180° u odnosu na susednu jedinicu, formirajući helikoidni lanac dužine od 2000-8000 jedinica glukoze. Helikoidni lanci celuloze su međusobno povezani vodoničnim vezama i Van der Valsovim silama grade kristalnu strukturu poznatu kao mikrofibrili, koji pružaju čvrstinu i mehaničku otpornost biljkama. Celuloza je izuzetno otporna na mnoge rastvarače, uključujući i vodu [159,162,163].

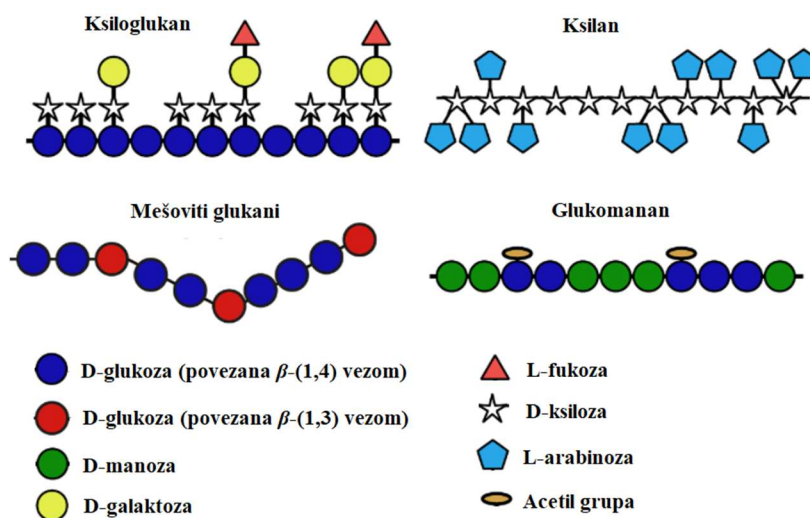


Slika 2.18. Struktura celuloze (preuzeto i prilagođeno prema referenci [162])

2.7.1.2. Hemiceluloza

Hemiceluloza (slika 2.19) je drugi po redu zastupljen polisaharid u ćelijskom zidu i njegova uloga se ogleda u tome što unakrsno povezuje celulozne mikrofibrile, modifikujući njihovu pokretljivost. Kao razgranati heteropolisaharid, sastoji se od različitih piranoznih i furanoznih šećernih jedinica, i prema hemijskoj strukturi mogu se grupisati u četiri klase [159,160,163]:

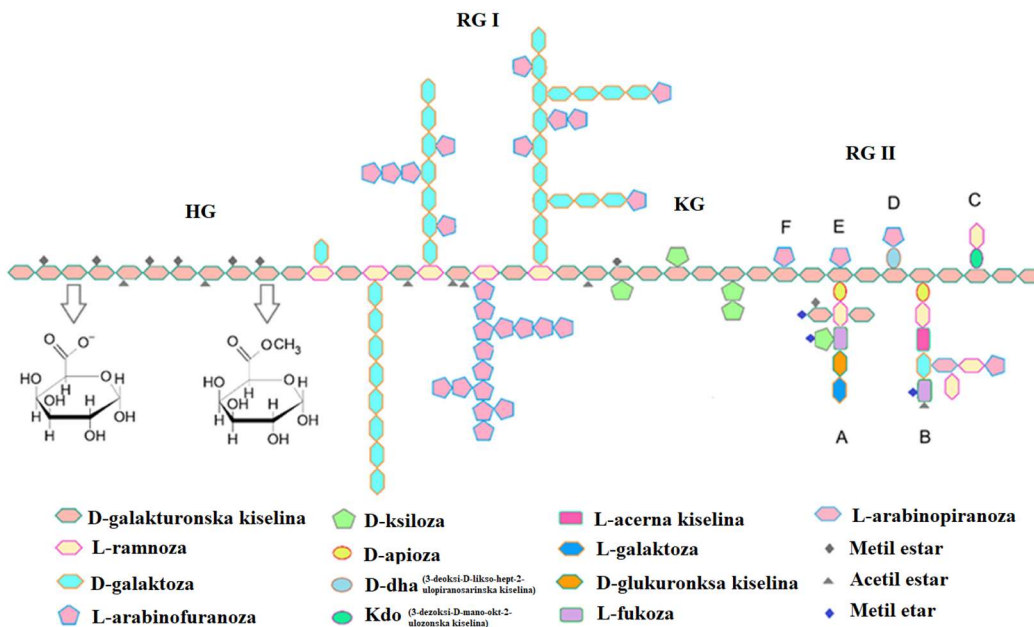
- Ksilani – Sastoje se od osnovnog lanca izgrađenog od jedinica D-ksiloze povezanih β -(1,4) glikozidnim vezama, sa bočnim lancima koji sadrže različite šećere i šećerne kiseline. Bočni lanci uglavnom uključuju arabinozu, glukozu, galaktozu, a u manjoj meri ramnozu, glukuronsku i galakturonsku kiselinu.
- Ksilogukani – Po strukturi su slični celulozi, sastoje se od osnovnog lanca D-glukoze, pri čemu su jedinice glukoze supstituisane jedinicama α -D-ksiloze preko α -(1,6) glikozidne veze, koje se ponavljaju u odgovarajućem obrascu. Jedinice ksiloze mogu dodatno biti supstituisane ostacima galaktoze preko β -(1,2) glikozidne veze i ostacima fukoze preko α -(1,2) veze, formirajući kratke bočne lance vezane za glukanski lanac.
- Glukomanani – Sastoje se od jedinica manoze i glukoze povezanih β -(1,4) glikozidnim vezama.
- Mešoviti β -glukani – Nerazgranati glukani koji su povezani β -(1,3) i β -(1,4) glikozidnim vezama.



Slika 2.19. Šematski prikaz hemiceluloze (preuzeto i prilagođeno prema referenci [164])

2.7.1.3. Pektin

Sam naziv pektina potiče od grčke reči „pêktós” što znači gel, ukazujući na sposobnost ovog polisaharida da formira gel. Strukturu pektina je veoma teško odrediti, jer njegov sastav varira u zavisnosti od biljne sirovine, delova biljke, stepena zrelosti, uslova gajenja i dr [165]. Međutim, može se reći da su pektini heterogeni polisaharidi i da postoje tri tipa: nerazgranati homogalakturnan i razgranati ramnogalakturnan I i ramnogalakturnan II. Druge strukturne klase pektinskih polisaharida uključuju ksilogalakturnane, arabinogalaktane i arabinane [158,166]. Na slici 2.20 prikazane su strukture pektina.



Slika 2.20. Različite strukture pektina. (preuzeto i prilagođeno prema referenci [165])

Homogalakturnan (HG) je oblik pektina koji se najčešće javlja u ćelijskom zidu biljaka i čini oko 60 % prisutnih pektina [159]. Predstavlja linearni homopolimer izgrađen od jedinica D-galakturonske kiseline povezanih α -(1,4) glikozidnim vezama. Karboksilne grupe prisutne na C-6 pozicijama galakturonskih kiselina mogu biti delimično esterifikovane metil grupama, ali i supstituisane acetil grupama na O-2 i/ili O-3 pozicijama, u zavisnosti od izvora. Na osnovu stepena esterifikacije karboksilnih grupa metil grupama, pektini se klasifikuju u visokometilovane pektine (ukoliko je više od 50 % COOH grupa esterifikovano) ili niskometilovane pektine (ukoliko je manje od 50 % COOH grupa esterifikovano) [165,166]. Stepent metoksilacije definiše ukupno naelektrisanje pektina što ima direktan uticaj na mehanizam formiranja gela. Pa tako, niskometilovani pektini mogu da formiraju gel u prisustvu dvovalentnih katjona (poput Ca^{2+}) uspostavljanjem jonskih veza. Sa druge strane, da bi visokometilovani pektini gelirali, potrebno je prisustvo šećera (poput saharoze) i niske pH vrednosti (pH 2,5-3,5) sredine, pri čemu se mehanizam formiranja gela zasniva na uspostavljanju hidrofobnih interakcija i vodoničnih veza [167].

Ksilogalakturnan se sastoji od lanca α -(1,4) D-galakturonske kiseline, koji je u velikoj meri supstituisan D-ksilozom na poziciji O-3 preko β -(1,3) glikozidne veze [168].

Ramnogalakturnan I (RG I) je drugi najzastupljeniji oblik pektina i čini 20-35 % ukupnih pektina. Sadrži glavni linearni lanac izgrađen od ponavljajućih jedinica (α -(1,4)) D-galakturonske kiseline i (α -(1,2)) L-ramnoze, pri čemu su jedinice ramnoze delimično supstituisane (25-85 %) na pozicijama O-4 linearnim ili razgranatim oligo- ili polisaharidima, dok ostaci galakturonskih kiselina

mogu biti acetilovani na O-2 ili O-3 pozicijama. Bočni lanci su uglavnom arabinani, galaktani i arabinogalaktani, pri čemu se u manjem udelu može naći fukoza, glukuronska kiselina i 4-O-metil glukuronska kiselina [158,159,165].

Arabinani su razgranati homopolimeri, čiji je glavni lanac izgrađen iz α -(1,5) jedinica L-arabinoze, a na pozicijama O-2 ili O-3 su vezani istoimeni lanci manjeg stepena polimerizacije. Sa druge strane, galaktani su linearni homopolimerni lanci ostataka D-galaktoze povezanih β -(1,4) glikozidnim vezama. Arabinogalaktani se mogu javiti u dva oblika, poznata kao arabinogalaktani I (AG I) arabinogalaktani II (AG II). Kod AG I, β -(1,4) galaktan je na poziciji O-3 supstituisan L-arabinozom i/ili kratkim lancima α -(1,5) arabinana. Kod AG II za lanac β -(1,3) galaktana vezani su kraći β -(1,6) lanci galaktana koji su dodatno supstituisani kraćim lancima arabinana ili jedinicama L-arabinoze, povezanih preko α -(1,3) i/ili α -(1,6) glikozidnih veza [165,166]. Pored toga, AG II mogu u svojoj strukturi sadržati i do 10 % aminokiselina kao što su prolin, hidroksiprolin, serin, treonin, čime postaju proteoglikani poznati kao arabinogalaktinski proteini [159].

Ramnogalakturonan II (RG II) je najsloženiji tip pektina i čini svega 10 % ukupnih pektina. Predstavlja razgranati polimer, čiju osnovnu strukturu čini homogalakturonan, za koju su vezani bočni lanci različitog stepena polimerizacije. U sastav bočnih lanaca ulazi 12 različitih vrsta šećera povezanih preko 20 različitih tipova glikozidne veze, koji mogu biti dodatno modifikovani (metil esterifikovani, metil eterifikovani ili acetilovani [165,166].

2.7.2. Enzimi koji učestvuju u razgradnji biljnog ćelijskog zida

S obzirom na to da je ćelijski zid u najvećoj meri izgrađen od polisaharida, najčešće primenjivani enzimi za razgradnju ćelijskog zida jesu upravo oni čija je aktivnost usmerena ka hidrolizi ugljenih hidrata. Stoga, u zavisnosti od polisaharida koji hidrolizuju mogu se podeliti na celulaze, hemicelulaze i pektinaze.

Celulaze predstavljaju kompleks enzima koji singerijskim delovanjem razgrađuju celulozu. Ovaj kompleks enzima se sastoji od najmanje tri glavne potklase koje uključuju [160,169,170]:

- Endo-(1,4)- β -D-glukanazu (endoglukanaza, EC 3.2.1.6) koja nasumično hidrolizuje β -(1,4) glikozidne veze unutar molekula oslobađajući duge lance celo-oligosaharida.
- Egzo-(1,4)- β -D-glukanazu (egzoglukanaza, celobiohidrolaza EC 3.2.1.91) koja hidrolizuje β -(1,4) glikozidne veze prisutne na kraju lanca celo-oligosaharida oslobađajući celobiozu i glukozu.
- β -D-glukozidazu (celobiaza, β -D-glukozid-glukohidrolaza, EC 3.2.1.21) koja hidrolizuje terminalne, neredukujuće β -D-glukozne ostatke oslobađajući β -D-glukozu. Ovaj enzim katalizuje konverziju celobioze u glukozu.

U hemicelulaze spada više vrsta enzima čija je aktivnost usmerena ka različitim delovima hemiceluloze i obuhvataju [160,171,172]:

- Endo- β -(1,4)-ksilanazu (endoksilanaza, EC 3.2.1.8) koja nasumično raskida β -(1,4) glikozidne veze unutar molekula ksilana i arabinoksilana oslobađajući oligosaharide.
- 1,4- β -D-ksilan ksilohidrolazu (ksilozidaza, 3.2.1.37) koja raskida β -(1,4) glikozidne veze u ksilo-oligosaharidima, delujući sa neredukujućeg kraja lanca, uz oslobađanje ksiloze.
- Egzo- β -(1,4)-ksilanazu (egzoksilanaza) koja razgrađuje β -(1,4) glikozidne veze u ksilanu, delujući sa redukujućeg kraja lanca, i oslobađa oligomere kratkog lanca ili hidrolizuje ksilo-oligomere kratkog lanca kako bi se oslobodila ksiloza.
- Endo- β -(1,4)-mananazu (E.C.3.2.1.78) koja raskida raskida β -(1,4) glikozidne veze u glukomananima do kratkih manan-oligosaharida.
- β -(1,4)-manozidazu (E.C.3.2.1.25) koja manan-oligosaharide hidrolizuje do manoze.
- α -L-arabinofuranozidazu (E.C.3.2.1.55) koja uklanja bočne supstituentne poput L-arabinoze

- Feruliolnu ksilan esterazu (E.C.3.2.1.73), i *p*-kumaroil esterazu (E.C. 3.1.1.B10) koje hidrolizuju estarske veze između arabinoze i ferulinske kiseline, kao i veze između arabinoze i *p*-kumarne kiseline.
- Acetil ksilan esterazu (E.C.3.2.1.72)
- Endo- α -L-arabinazu (E.C.3.2.1.99).

Pektinaze predstavljaju raznoliku grupu enzima koji učestvuju u hidrolizi pektina i grubo se mogu podeliti na enzime koji učestvuju u depolimerizaciji pektinskih lanaca i na enzime koji katalizuju raskidanje estarskih veza u molekulu pektina. Pa tako, pektinolitički enzimi obuhvataju [160,168,173]:

- Pektin metil esterazu (E.C. 3.1.1.11) koja uklanja metoksil grupu (OCH₃) u HG pri čemu se izdvaja pektinska kiselina i metanol. Ovaj enzim deluje prvenstveno na metoksil grupu koja se nalazi pored neesterifikovane jedinice galakturonske kiseline.
- Pektin acetil esterazu (E.C. 3.1.1.6) koja hidrolizuje acetil estre u HG formirajući pektinsku kiselinu (poligalakturonsku) i etanol.
- Poligalakturonazu (E.C. 3.2.1.15) koja hidrolizuje α -(1,4) glikozidne veze u lancu HG dajući kraće lance α -(1,4) galakturonske kiseline. U zavisnosti od načina na koji deluju postoje endo- i egzopoligalakturonaze.
- Pektin liazu (E.C. 4.2.2.10) koja β -eliminacijom raskida α -(1,4) glikozidne veze u visoko esterifikovanom HG dajući nezasićene 4,5 oligogalakturonate. U zavisnosti od načina na koji deluju postoje endo- i egzopektin liaze.
- Pektat liazu (E.C. 4.2.2.2) koja β -eliminacijom raskida α -(1,4) glikozidne veze u pektinskoj kiselini formirajući nezasićene oligogalakturonate. U zavisnosti od načina na koji deluju postoje endo- i egzopektat.
- Ksilogalakturonazu (EC 3.2.1.-) koja hidrolizuje ksilogalakturonan dajući ksilo-galakturonate.
- Enzime poput arabinaze, RG acetil esteraze, RG hidrolaze, RG liaze koji su uključeni u razgradnji RG.

2.7.3. Uticaj različitih parametara na efikasnost enzimski potpomognute ekstrakcije

Efikasnost enzimski potpomognute ekstrakcije polifenola iz prirodnog izvora je uslovljena mnogobrojnim parametrima, a pravilnim odabirom optimalnih uslova ekstrakcije moguće je postići visoke prinose uz minimalne gubitke. Efikasnost enzimski potpomognute ekstrakcije zavisi prvenstveno od izbora enzima, rastvarača, temperature, trajanja reakcije, dostupnosti supstrata i pH uslova sredine [12,13].

Kao što je već pomenuto, ovaj tip ekstrakcija se najčešće izvodi u vodi, pri čemu je potrebno podešavanje pH vrednost sistema na optimalnu vrednost pri kojoj je aktivnost primenjenih enzima najveća. Ekstremne pH vrednosti mogu dovesti do strukturnih promena u enzimima što drastično smanjuje njihovu aktivnost [13].

Pored kiselosti sredine, temperatura je bitan parametar koji se ne sme zanemariti. Generalno, sa povećanjem temperature povećava se aktivnost enzima, međutim rad na visokim temperaturama može dovesti do promena u trodimenzionalnoj strukturi enzima (denaturacije), zaustavljanja enzimske reakcije i razgradnje termolabilnih jedinjenja. Sa druge strane, niske temperature ne povećavaju aktivnost enzima, pa samim tim i efikasnost ekstrakcije će biti manja.

Vreme ekstrakcije je u neposrednoj vezi sa koncentracijom enzima, jer se vreme ekstrakcije može smanjiti sa povećanjem koncentracije enzima. Povećanje koncentracije enzima ubrzava reakciju, sve dok ne dođe do zasićenja enzima supstratom, kada dalje povećanje koncentracije enzima ne utiče na brzinu reakcije [12,13]. U ovom tipu primene enzima dodatno uslošnjava se činjenica da se dostupna koncentracija supstrata menja tokom procesa jer se paralelno odigrava proces ekstrakcije.

Zbog složenosti i heterogenog sastava ćelijskog zida biljaka za efikasnu razgradnju ćelijskog zida, i ekstrakciju polifenolnih jedinjenja, često se koriste komercijalni enzimski preparati koji predstavljaju smeše različitih vrsta enzima. U tabeli 2.4 dat je literaturni pregled vrsta enzima i enzimskih preparata, kao i optimalnih uslova enzimski potpomognute ekstrakcije polifenolnih jedinjenja iz različitog voća i voćnih tropova.

Tabela 2.4. Primeri enzimski potpomognute ekstrakcije polifenola iz voća i voćnih tropova

Supstrat	Vrsta enzima ili enzimskog preparata	Optimalni uslovi	Rezultat	Ref.
Borovnica (<i>Vaccinium myrtillus</i>)	Kombinacija celulaza i pektinaza	1:10 (g/mL); 37 °C; ukupna konc. enzima 0,3% (v/v), a odnos celulaza i pektinaza 1:2; 4 h enzimska reakcija + 6 h ekstrakcije	Sadržaj antocijanina je povećan za 25 %	[174]
Pomorandžina kora (<i>Citrus sinensis</i>)	Viscozyme® L (smeša β -glukanaze, pektinaze, hemicelulaze, arabinaze i ksilanaze)	1:31 (g/mL); pH 4,8; 60 °C; konc. enzima 0,84 % (v/w); 4,87 h	Sadržaj polifenola u odnosu na kontrolu povećan za 159%	[175]
Trop aronije (lat. <i>Aronia melanocarpa</i>)	Viscozyme® L, CeluStar® XL	1:10 (g/mL); pH 3,5; 40 °C; konc. enzima 6 % (v/w); 7 h	Sadržaj polifenola u odnosu na kontrolu povećan za 29-41 %	[176]
Trop aronije (<i>Aronia melanocarpa</i>)	Rohapect®, Fructozym® BE, Fructozym® Flash-C i Fructozym® Flux	1:50 (g/mL); pH 3; 50 °C, konc. enzima 0,04-0,05 % (v/w); 20 min	Sadržaj antocijanina u odnosu na kontrolu je povećan 1,1-1,4 puta.	[177]
Trop borovnice (<i>Vaccinium myrtillus</i>)	Pectinex® Ultra Color, Panzym® Pro Color, Panzym® BE XXL	1:50 (g/mL); pH 3; 50 °C; konc. enzima 0,1 % (v/v); 2 h	Sadržaj antocijanina u odnosu na kontrolu povećan je 2,1-2,8 puta.	[178]
Trop borovnice (<i>Vaccinium myrtillus</i>)	Viscozyme® L	1:10 (g/mL); pH 4,5; 46 °C; konc. enzima 2 IU/g; 1 h	Sadržaj polifenola u odnosu na kontrolu povećan za 28 %, a sadržaj antocijanina za 11,5 %	[179]
Trop crvenog grožđa (lat. <i>Vitis vinifera</i>)	Celulaze, tanaze	1:10 (g/mL); pH 5; 45 °C, konc. enzima 188 IU/g i 198 IU/g za celulaze i tanaze, redom; 2 h	Sadržaj polifenola u odnosu na kontrolu povećan za 50-55%	[180]
Trop crne ribizle (<i>Ribes nigrum</i>)	Kobinacija pektinaza Grindamyl pectinase i Macer8 FJ	1:4 (g/mL); 50 °C, konc. oba enzima po 1 % (w/w); 2 h	Sadržaj polifenola u odnosu na kontrolu povećan za 23%	[181]
Trop jabuke (<i>Malus domestica</i>)	Pectinex® Ultra SP-L, Celluclast® 1.5 L	1:5 (g/mL); pH 5,5-6; 50-65 °C, konc. enzima 0,45 % (v/w); 24 h	Sadržaj polifenola u odnosu na kontrolu povećan za 10-13%.	[182]

Trop maline (<i>Rubus idaeus</i>)	Alcalase® 2.4 L (alkalna proteaza)	3:100 (g/mL); pH 9; 60 °C, konc. enzima 1,2 IU/100 g; 2 h	Sadržaj polifenola u odnosu na kontrolu povećan za 48%	[183]
Trop maline (<i>Rubus idaeus</i>)	Grindamyl CA 150 (pektinaze), Maxoliva (pektinaze)	1:20 (g/mL); 50 °C, konc. oba enzima po 10% (w/w); 18 h	Sadržaj polifenola u odnosu na kontrolu povećan za 36-39 %	[184]
Trop pasjeg trna (<i>Hippophae rhamnoides</i>)	Viscozyme® L (celulaze), CeluStar® XL (ksilanaze)	1:10 (g/mL); pH 3,5; 40 °C, konc. enzima 6 % (v/w); 7 h	Sadržaj kovalentno vezanih polifenola u odnosu na kontrolu je povećan za 42-50 %.	[185]
Trop trešnje (<i>Prunus avium</i>)	Depol 740L (β -glukanaza), Promod 439L (proteaza), Pectinase 62L (poligalakturonaza i pektin liaza)	0,38:1 (g/mL); pH 10; 70 °C, konc. enzima 0,2-14 % (v/w); 20-40 min	Sadržaj polifenola u odnosu na kontrolu povećan 2,9-4,5 puta.	[186]

2.8. Ciljevi istraživanja

Cilj istraživanja ove doktorske disertacije jeste ispitivanje uticaja komercijalnih prebiotika na dermalnu mikrobiotu, kao i dobijanje ekstrakata/bioaktivnih frakcija iz različitog voća i voćnog tropa primenom zelenih rastvarača i enzimski potpomognute ekstrakcije, koji pored visokog udela polifenolnih jedinjenja i povećane antioksidativne aktivnosti, imaju i prebiotski efekat na mikrobiotu kože.

Stoga, konkretni ciljevi se mogu podeliti u 5 grupa koji obuhvataju:

- Preliminarno ispitivanje uticaja potvrđenih crevnih prebiotika (galakto-oligosaharida) na rast članova mikrobiote kože.
- Ekstrakciju polifenolnih jedinjenja iz različitog bobičastog voća i voćnog tropa primenom konvencionalne metode ekstrakcije, analizu sastava i antioksidativne aktivnosti dobijenih ekstrakata i ispitivanje uticaja na rast mikroorganizma kože kako bi se izabrali ekstrakti koji se mogu koristiti kao potencijalni topikalni prebiotici.
- Enzimski potpomognutu ekstrakciju fitohemikalija iz izabranog bobičastog voća ili tropova u cilju dobijanja ekstrakata sa poboljšanim sastavom i povećanom antioksidativnom aktivnošću, kao i ispitivanje uticaja na aerobne i anaerobne članove mikrobiote kože primenom konvencionalnih metoda gajenja i *in vitro* modela koji imitira površinski sloj kože.
- Inkorporaciju komercijalnih prebiotika i ekstrakta sa najizraženijim prebiotskim efektom u različite kozmetičke formulacije i ispitivanje (trans)dermalne difuzije bioaktivnih jedinjenja u cilju izbora formulacije koja obezbeđuje njihovo kontrolisano otpuštanje do površinskog sloja kože.
- Izolaciju potencijalnih prebiotika na bazi pektina iz taloga odabranog bobičastog voća dobijenog nakon ekstrakcije fitohemikalija, analizu njihovog sastava i tehno-funkcionalnih svojstava za primenu u kozmetičke svrhe, kao i uticaj na rast članova mikrobiote kože.

3. Eksperimentalni deo

3.1. Materijali i metode

3.1.1. Materijali

Hemikalije:

- ABTS, 2,2-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kis.) (Thermo Fisher Scientific, Gel, Belgija)
- Acetonitril HPLC čistoće (Sigma-Aldrich, Šneldorf, Nemačka)
- Aluminiјum hlorid heptahidrat (Centrohem, Stara Pazova, Srbija)
- Amonijum oksalat monohidrat (Centrohem, Stara Pazova, Srbija)
- Bakar hlorid dihidrat (Centrohem, Stara Pazova, Srbija)
- Betain (J&K Scientific GmbH, Pforchajm, Nemačka)
- Cetearil alkohol Lanette® O (BASF, Ludvigshafen, Nemačka)
- Dinatriјum hidrogenfosfat (Centrohem, Stara Pazova, Srbija)
- DNS, 3,5-dinitrosalicilna kiseline (Sigma-Aldrich, Šneldorf, Nemačka)
- DPPH, 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (Thermo Fisher Scientific, Gel, Belgija)
- EDTA (0,5 M rastvor) (Merck, Darmštadt, Nemačka)
- Emulgator Sabowax FL 65 (Sabo, Levate, Italija)
- Etanol 96 % v/v (Zorka Šabac, Šabac, Srbija)
- Folin-Ciocalteu reagens (Carlo Erba, Areze, Italija)
- Galakto-oligosaharidi (GOS), smeša 70 % (w/w) (Davidstow, Kornvol, Velika Britanija)
- Galna kiselina (Merck, Darmštadt, Nemačka)
- Glacijalna sirćetna kiselina (Zorka Pharma, Šabac, Srbija)
- Glicerol (Zorka Pharma, Šabac, Srbija)
- Glukoza (Merck, Darmštadt, Nemačka)
- Gvožđe(II) sulfat heptahidrat (Centrohem, Stara Pazova, Srbija)
- Gvožđe(III) hlorid heksahidrat (Centrohem, Stara Pazova, Srbija)
- Hlorovodonična kiselina (Zorka Šabac, Šabac, Srbija)
- Izopropil miristat (BASF, Ludvigshafen, Nemačka)
- Kalijum dihidrogenfosfat (Centrohem, Stara Pazova, Srbija)
- Kalijum hlorid (Centrohem, Stara Pazova, Srbija)
- Kalijum jodat (Centrohem, Stara Pazova, Srbija)
- Kalijum natriјum tartarat tetrahidrat (Centrohem, Stara Pazova, Srbija)
- Kalijum persulfat (Riedel de Haën, Hanover, Nemačka)
- Kofeinska kiselina (Sigma-Aldrich, Šneldorf, Nemačka)
- Kvercetin (Merck, Darmštadt, Nemačka)
- Limunska kiselina monohidrat (Centrohem, Stara Pazova, Srbija)
- Metanol (Zorka Šabac, Šabac, Srbija)
- Metanol HPLC čistoće (Sigma-Aldrich, Šneldorf, Nemačka)
- Natriјum acetat trihidrat (Centrohem, Stara Pazova, Srbija)
- Natriјum hidroksid (Centrohem, Stara Pazova, Srbija)
- Natriјum hlorid (Centrohem, Stara Pazova, Srbija)
- Natriјum karbonat (Centrohem, Stara Pazova, Srbija)
- Natriјum molibdat dihidrat (Sigma-Aldrich, Šneldorf, Nemačka)
- Natriјum nitrit (Centrohem, Stara Pazova, Srbija)

- *n*-butanol (Centrohem, Stara Pazova, Srbija)
- Neokuproin (Sigma-Aldrich, Šneldorf, Nemačka)
- Polimer Aristoflex[®] AVC (Clariant International Ltd., Bazel, Švajcarska)
- Polimer Heliogel[™] (Lucas Meyer Cosmetics, Pariz, Francuska)
- Propilen glikol, 1,2-propandiol (Riedel de Haën, Hanover, Nemačka)
- Sorbitol (Sigma-Aldrich, Šneldorf, Nemačka)
- TPTZ, 2,4,6-tripiridil-s-tirazin (Thermo Fisher Scientific, Gel, Belgija)
- Trifloro sirćetna kiselina – TFA (Sigma-Aldrich, Šneldorf, Nemačka)
- Tris 1 M pufer pH 8 (Merck, Darmstadt, Nemačka)
- Troloks, 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilroman-2-karboksilna kiselina (Sigma-Aldrich, Šneldorf, Nemačka)
- Tween[®] 20, 10 % (w/v) rastvor (Merck, Darmstadt, Nemačka)
- Urea (Centrohem, Stara Pazova, Srbija)
- Voda HPLC čistoće (Sigma-Aldrich, Šneldorf, Nemačka)

Ekstrakcija polifenola je vršena iz sledećeg bobičastog voća:

- Aronija (lat. *Aronia melanocarpa*) sorte Nero (Plavo d.o.o., Novi Sad, Srbija)
- Borovnica (lat. *Vaccinium myrtillus*) sorte Duke (SB Brava, Čačak, Srbija)
- Crna ribizla (lat. *Ribes nigrum*) sorte Ben Nevis (Drenovac d.o.o., Arilje, Srbija)
- Crvena ribizla (lat. *Ribes rubrum*) (Plavo d.o.o., Novi Sad, Srbija)
- Divlja borovnica (lat. *Vaccinium myrtillus*) (SB Brava, Čačak, Srbija)
- Jagoda (lat. *Fragaria x ananassa*) sorte Jolly (SB Brava, Čačak, Srbija)
- Malina (lat. *Rubus idaeus*) sorte Willamette (SB Brava, Čačak, Srbija)
- Pasji trn (lat. *Hippophae rhamnoides*) (Plavo d.o.o., Novi Sad, Srbija)

Ekstrakcija polifenola je vršena iz tropova dobijenih kao nusproizvodi proizvodnje sokova i to:

- Trop aronije sorte Nero (Floriva, Ivanjica, Srbija)
- Trop crne ribizle sorte Ben Nevis (Floriva, Ivanjica, Srbija)
- Trop jagode sorte Senga Sengana (Floriva, Ivanjica, Srbija)
- Trop maline sorte Fertodi Zamos (Floriva, Ivanjica, Srbija)

Enzimi koji su korišćeni za enzimski potpomognutu ekstrakciju polifenola iz tropova i voća:

- Cellic[®] CTec3 (Novozymes, Bagsvaerd, Danska)
- Pectinex[®] Ultra SP-L (Novozymes, Bagsvaerd, Danska)
- Viscozyme[®] L (Novozymes, Bagsvaerd, Danska)
- Rohapect[®] MC (AB Enzymes, Darmstadt, Nemačka)

Za kultivaciju mikroorganizama korišćene su sledeće podloge:

- BHI bujon (eng. „Brain heart infusion bujon“)(Biolife, Milano, Italija) se priprema rastvaranjem 37 g praškaste podloge u 1 L destilovane vode u čiji sastav ulazi infuzum telećeg mozga (12,5 g) i srca (5 g), pepton (10 g), glukoza (2 g), natrijum hlorid (5 g) i dinatrijum fosfat (2,5 g).
- Kolumbia agar sa 5 % ovčije krvi ili krvni agar (Promedia d.o.o, Kikinda, Srbija). Podloga sadrži pepton (23 g), kukuruzni škrob (1 g), natrijum hlorid (5 g), Nutrient supplement S Medium (50 mL) i agar (15 g) u 1 L destilovane vode.

- Manitol slani agar ili Champan-ova podloga – MSA (Torlak, Beograd, Srbija) se priprema rastvaranjem 111 g praškaste podloge u 1 L destilovane vode u čiji sastav ulazi pepton (10 g), mesni ekstrakt (1 g), manitol (10 g), natrijum hlorid (75 g), agar (15 g) i fenol crveno (0,025 g).
- MH bujon (eng. „Mueller Hinton bujon“) (Torlak, Beograd, Srbija) se priprema rastvaranjem 21 g praškaste podloge u 1 L destilovane vode u čiji sastav ulazi kiseli hidrolizat kazeina (17,5 g), mesni ekstrakt (2 g) i skrob (1,5 g).
- Tripton soja bujon – TSB (Torlak, Beograd, Srbija) se priprema rastvaranjem 30 g praškaste podloge u 1 L destilovane vode u čiji sastav ulazi pepton od kazeina (17 g), soja pepton (3 g), glukoza (2,5 g), natrijum hlorid (5 g) i kalijum hidrogenfosfat (2,5 g). Za bolji rast mikroorganizama dodaje se i 0,6 % (w/v) kvašćevog ekstrakta (Torlak, Beograd, Srbija).

Mikroorganizmi:

- *Corynebacterium aurimucosum*, klinički izolat
- *Cutibacterium acnes* (ATCC 11827, ATCC 6919, klinički izolat: H199-04)
- *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923, ATCC 2913, ATCC 6538, MRSA, klinički izolati: AD 9, AD 11, AD 17, AD 20, AD 23)
- *Staphylococcus capitis*, klinički izolat
- *Staphylococcus epidermidis* (DSM 20044, ATCC 12228, BHF 389, ATCC 14990)
- *Staphylococcus hominis*, klinički izolat

Za pripremu kozmetičkih formulacija korišćeni su sledeći materijali:

- Cetearil alkohol Lanette® O (BASF, Ludvigshafen, Nemačka)
- Emulgator Sabowax FL 65 (Sabo, Levate, Italija)
- Izopropil miristat (BASF, Ludvigshafen, Nemačka)
- Polimer Aristoflex® AVC (Clariant International Ltd., Bazel, Švajcarska)
- Polimer Heliogel™ (Lucas Meyer Cosmetics, Pariz, Francuska)

Ostali materijali i pribor:

- Kutija za anaerobno gajenje bakterija (bioMerieux, Marsi l'Etoal, Francuska)
- Kесе koje obezbeđuju anaerobnu sredinu (Anaerogen, Thermo Scientific, Belgija)
- Francova difuziona celija (PermeGear, Inc., Helertaun, Pensilvanija, SAD)
- Celulozno-acetatna (CA) membrana (Whatman, Dassel, Nemačka)
- Strat® M membrana pora (Merck Millipore, Bilerika, Masačusets, SAD)

3.1.2. Uredaji

- Analitička vaga (Mettler AJ100, Mettler Toledo, Švajcarska)
- Autoklav (Sutjetska, Srbija)
- Centrifuga (Hermle Z206 A, LaborTechnik, Nemačka)
- HPLC (Dionex Ultimate 3000 Thermo Scientific, Thermo Scientific, SAD)
- Kuglični mlin (Retsch MM 400, Retsch GmbH, Han, Nemačka)
- Magnetna mešalica (Heidolph MR 3001, Sigma Aldrich, Nemačka)
- Mešalica sa propelerima (Heidolph RZR 2020, Heidolph Instruments, Nemačka)
- pH metar (inoLab pH 720 WTW, Nemačka)
- Tehnička vaga (MP-3000, Chyo Balance Corporation, Japan)
- Termostat sa orbitalnim mešanjem (KS 4000i control, IKA®, Nemačka)

- Termostat za rast mikroorganizama (Memmert, Nemačka)
- UV/VIS spektrofotometar (Ultrospec 3300 pro Amersham Bioscience, Australija)
- UV/VIS spektrofotometar za mikrotitratske ploče (Epoch, BioTek, SAD)
- Vakuum uparivač (Rotavapor[®], Büchi, Švajcarska)
- Vodeno kupatilo (Waterbath MS3, Memmert, Nemačka)
- Vorteks (IKA[®], Nemačka)

3.2. Metode

3.2.1. Ekstrakcija fitohemikalija iz bobičastog voća i tropova primenom maceracije

Izolacija fitohemikalija iz liofilizovanog bobičastog voća ili voćnih tropova konvencionalnom metodom ekstrakcije odnosno maceracijom izvršena je primenom vode ili 70 % (v/v) etanola kao rastvarača. Supstrat usitnjen do praha je pomešan sa puferom u odnosu 1:10 g/mL. Ekstrakcija je izvedena na 50 °C tokom 2 h uz mešanje na 150 rpm. Nakon toga, uzorci su centrifugirani na 6000 rpm tokom 10 min, a dobijeni supernatanti su čuvani na -20 °C do dalje analize.

3.2.2. Optimizacija enzimski potpomognute ekstrakcije fitohemikalija iz bobičastog voća i tropa

Optimizacija enzimski potpomognute ekstrakcije fitohemikalija iz odabranog liofilizovanog bobičastog voća i voćnih tropova izvršena je primenom četiri komercijalna enzimski preparata: Viscozyme[®] L, Pectinex[®] Ultra SP-L, Rohapect[®] MC i Cellic[®] CTec3 HS. Supstrat je pomešan sa 0,1 M acetatnim puferom (pH 4,5) pri različitim odnosima supstrata i rastvarača (od 1:4 (g/mL) do 1:40 (g/mL)) i različitim koncentracijama enzimskog preparata (od 0,001 mL/g do 0,4 mL/g) koje su definisane za svaki eksperiment pojedinačno, a zatim inkubiran na 50 °C uz mešanje na 150 rpm. Temperatura i pH vrednost su odabrani na osnovu preporuka proizvođača enzimskih preparata. Tokom procesa ekstrakcije, uzimani su alikvoti za određivanje sadržaja ukupnih redukujućih šećera, polifenola i flavonoida, kao i antioksidativne aktivnosti. Nakon hidrolize, koja je trajala od 1 h do 3 h, enzimi su deaktivirani zagrevanjem uzorka na 100 °C tokom 5 minuta u ključalom kupatilu. Kontrolni uzorak je pripremljen na isti način, ali bez dodatka enzimskog preparata. Uzorci su centrifugirani na 6000 rpm tokom 10 min, a dobijeni supernatanti su čuvani na -20 °C do dalje analize.

3.2.3. Ekstrakcija polifenola iz bobičastog voća i tropa primenom dubokih eutektičkih smeša

Duboke eutektičke (DES) smeše su pripremljene mešanjem odgovarajućih odnosa akceptora i donora vodoničnih veza, prema tabeli 3.1. U svim smešama je kao akceptor vodoničnih veza korišćen betain. Smeše su zatim zagrevane na 80 °C na magnetnoj mešalici, sve dok nisu postale potpuno bezbojne i bez kristala, uz mešanje na 600 rpm. Kako bi se u potpunosti odigrala reakcija između komponenti, smeše su ostavljene na 25 °C preko noći uz mešanje pri 600 rpm.

Tabela 3.1. Sastav dubokih eutektičkih smeša

Komponenta 1	Komponenta 2	Komponenta 3	Molarni odnos
Betain	Propilen glikol		1:5
Betain	Glukoza	Voda	1:1:5
Betain	Glicerol		1:2
Betain	Limunska kiselina	Voda	1:1:1
Betain	Sorbitol	Voda	1:1:3
Betain	Urea	Voda	1:1:3

Prilikom ekstrakcije, dobijene DES su razblažene destilovanom vodom tako da je krajnji udeo vode bio 30 % (w/w), a DES-a 70 % (w/w). Razblažene smeše su potom pomešane sa odgovarajućom količinom voća ili voćnog tropa kako bi odnos čvrste i tečne faze bio 1:10 ili 1:40 (g/mL), a ekstrakcija je vršena na 50 °C uz mešanje pri 150 rpm tokom 1 h. Enzimski potpomognuta ekstrakcija se odvijala na isti način, pri čemu je dodat enzimski preparat prema prethodno optimizovanim uslovima. Nakon završene ekstrakcije, uzorci su centrifugirani na 6000 rpm tokom 10 min kako bi se odvojio talog, a dobijeni ekstrakti su čuvani na -20 °C pre dalje analize.

3.2.4. Određivanje karakteristika ekstrakata

3.2.4.1. Određivanje sadržaja ukupnih polifenola

Sadržaj ukupnih polifenola u ekstraktima određen je Folin-Ciocalteu metodom koja se zasniva na redukciji žutog Folin-Ciocalteu reagensa (fosfotungstenat-fosfomolibdat kompleksa) fenolnim jedinjenjima u alkalnoj sredini [187,188]. Tokom ove reakcije formira se plavo obojeni kompleks koji ima maksimalnu apsorpciju na talasnoj dužini od 750 nm. Prema proceduri, ekstrakt zapremine 50 µL se pomeša sa 0,25 mL Folin-Ciocalteu reagensa i 3,7 mL destilovane vode, a zatim snažno promeša tokom 30 s. Nakon toga, dodaje se 1 mL 15 % (w/v) vodenog rastvora natrijum karbonata i ponovo meša 30 s. Inkubacija uzoraka se vrši u mraku tokom 2 h, nakon čega se spektrofotometrijski meri apsorbanca na 750 nm. Slepa proba se priprema na isti način kao uzorci, pri čemu se umesto uzorka koristi odgovarajući rastvarač. Sadržaj polifenola je kvantifikovan pomoću standardne prave za galnu kiselinu (nagib 0,854 mg/mL), koja je pripremljena na isti način kao i uzorci, u opsegu koncentracija od 0,05 – 1,5 mg/mL. Rezultati su izraženi kao miligrami ekvivalenta galne kiseline (eng. *Gallic acid equivalent*, GAE) po gramu suve materije korišćenog voća ili tropa.

3.2.4.2. Određivanje sadržaja ukupnih flavonoida

Sadržaj ukupnih flavonoida u ekstraktima je određen kolorimetrijskom metodom sa aluminijum(III) hloridom koja se zasniva na formiranju kompleksa flavonoida sa Al^{3+} jonom koji daje žuto obojenje [189,190]. Prema proceduri, ekstrakt zapremine 0,75 mL se pomeša sa 1,5 mL metanola i snažno promeša 30 s. Zatim se doda 0,1 mL 10 % (w/v) rastvora $AlCl_3$ u metanolu, 0,1 mL 1 M rastvora natrijum acetata i 2,8 mL destilovane vode i ponovo snažno promeša tokom 30 s. Uzorak se inkubira u mraku tokom 30 min, nakon čega se spektrofotometrijski meri apsorbanca na 415 nm u odnosu na slepu probu koja je pripremana na isti način, ali sa odgovarajućim rastvaračem umesto ekstrakta. Sadržaj flavonoida je kvantifikovan pomoću standardne prave za kvercetin (nagib 0,119 mg/mL), koja je pripremljena na isti način kao i uzorci, u opsegu koncentracija od 0,01 – 0,25 mg/mL. Rezultati su izraženi kao miligrami ekvivalenta kvercetina (eng. *Quercetin equivalent*, QE) po gramu suve materije korišćenog voća ili tropa.

3.2.4.3. Određivanje sadržaja ukupnih antocijanina

Sadržaj ukupnih antocijanina u ekstraktima je određen pH diferencijalnom metodom, koja se zasniva na merenju promene boje antocijanina pri pH vrednostima 1 i 4,5. Antocijanini u veoma kiseloj sredini (pH 1) su uglavnom u obliku flavilijum jona i daju crveno obojenje čija je maksimalna apsorpcija na 520 nm. Na pH 4,5 ovaj katjon prelazi u bezbojnu karbinol pseudo bazu, koja ne apsorbuje na 520 nm. Merenje apsorbanca uzorka na 700 nm pri obe pH vrednosti vrši se kako bi se smanjio uticaj zamućenosti ili apsorpcije drugih jedinjenja, s obzirom na to da antocijanini ne apsorbuju svetlost na ovoj talasnoj dužini. Na taj način, konačan rezultat se odnosi samo na sadržaj antocijanina, bez smetnji drugih

jedinjenja u uzorku. Prema proceduri, 0,5 mL ekstrakta se pomeša sa 1,5 mL 0,025 M puferom kalijum hlorida (pH 1) i 0,5 mL istog ekstrakta se pomeša sa 1,5 mL 0,4 M puferom natrijum acetata (pH 4,5). Obe smeše se snažno mešaju 30 s, a zatim inkubiraju 15 min u mraku. Apsorbanca svake smeše se meri spektrofotometrijski na 520 nm i 700 nm u odnosu na slepu probu, koja je pripremljena na isti način, pri čemu ne sadrži ekstrakt, već odgovarajući rastvarač. Koncentracija antocijanina u uzorcima je izražena kao miligrami ekvivalenata cijanidin-3-*O*-glukozida (eng. *Cyanidin-3-O-glucoside equivalents*, Cy3GE) po litru i koja se računa preko sledeće formule [190,191]:

$$C = \frac{A \cdot MW \cdot R \cdot 1000}{\epsilon \cdot l} \quad (1)$$

Gde je:

C – koncentracija antocijanina,

A – apsorbanca izražena kao $A = (A_{520} - A_{700}) \text{ pH } 1,0 - (A_{520} - A_{700}) \text{ pH } 4,5$

MW – molarna masa cijanidin-3-*O*-glukozida, 449,2 g/mol

R – faktor razblaženja

ϵ – molarni ekstincioni koeficijent cijanidin-3-*O*-glukozida, 26900 L/(mol·cm)

l – širina kivete, 1 cm

Finalni rezultat je izražen kao miligrami ekvivalenata cijanidin-3-*O*-glukozida po gramu suve materije korišćenog voća ili tropa.

3.2.4.4. Određivanje sadržaja ukupnih flavanola

Sadržaj ukupnih flavanola u ekstraktima je određen metodom koja podrazumeva primenu aluminijum(III) hlorida u prisustvu acetatnih jona, pri čemu nastaje stabilan kompleks koji daje intenzivno narandžasto obojenje [191,192]. Prema proceduri, 0,5 mL ekstrakta se pomeša sa 0,5 mL 2 % (w/v) rastvora aluminijum hlorida u metanolu i 1,5 mL 5 % (w/v) rastvora natrijum acetata. Nakon toga, smeša se inkubira 2,5 h u mraku, a zatim se meri apsorbanca na 440 nm na spektrofotometru u odnosu na slepu probu koja sadrži rastvarač umesto ekstrakta. Sadržaj flavanola je kvantifikovan pomoću standardne prave za kvercetin (nagib 75,19 $\mu\text{g/mL}$), koja je pripremljena na isti način kao i uzorci, u opsegu koncentracija od 10 – 100 $\mu\text{g/mL}$. Rezultati su izraženi kao miligrami ekvivalenata kvercetina (QE) po gramu suve materije korišćenog voća ili tropa.

3.2.4.5. Određivanje sadržaja ukupnih fenolnih kiselina

Sadržaj ukupnih fenolnih kiselina u ekstraktima je određen metodom pomoću Arnog-reagensa, koji se priprema rastvaranjem natrijum nitrita i natrijum molibdat dihidrata u destilovanoj vodi, u odnosu 1:1:10. Mehanizam reakcije podrazumeva stvaranje intermedijarnog nitrofenolnog kompleksa, a zatim kompleksa sa molibdatnim jonom koji daje narandžasto – crveno obojenje [193]. Prema proceduri, u ekstrakt zapremine 0,1 mL doda se 0,6 mL destilovane vode, 0,1 mL 0,5 M hlorovodonične kiseline, 0,1 mL Arnog-og reagensa i 0,1 mL 1 M natrijum hidroksida, i snažno promeša 30 s. Apsorbanca uzorka se odmah meri spektrofotometrijski na 490 nm, u odnosu na slepu probu koja sadrži rastvarač umesto ekstrakta. Sadržaj fenolnih kiselina je kvantifikovan pomoću standardne prave za kofeinsku kiselinu (nagib 212,77 $\mu\text{g/mL}$), koja je pripremljena na isti način kao i uzorci, u opsegu koncentracija od 10 - 100 $\mu\text{g/mL}$. Rezultati su izraženi kao miligrami ekvivalenata kofeinske kiseline (eng. *Caffeic acid equivalent*, CAE) po gramu suve materije korišćenog voća ili tropa.

3.2.4.6. Određivanje sadržaja ukupnih hidrolizabilnih tanina

Sadržaj ukupnih hidrolizabilnih tanina u ekstraktima je određen metodom koja se zasniva na upotrebi rastvora kalijum jodata pri čemu nastaje jedinjenje plavo-ljubičaste boje [194]. Prema proceduri, prvo je potrebno zagrejati 2,5 mL 2,5 % (w/v) vodenog rastvora kalijum jodata na 30 °C tokom 7 min, a zatim dodati 0,5 mL ekstrakta. Zatim se smeša zagreva još 3 min na 30 °C, a apsorbanca se meri odmah na 550 nm na spektrofotometru, u odnosu na slepu probu koja sadrži rastvarač umesto ekstrakta. Sadržaj hidrolizabilnih tanina je kvantifikovan pomoću standardne prave za galnu kiselinu (0,954 mg/mL), koja je pripremljena na isti način kao i uzorci, u opsegu koncentracija od 0,2 – 2 mg/mL. Rezultati su izraženi kao miligrami ekvivalenata galne kiseline (GAE) po gramu suve materije korišćenog voća ili tropa.

3.2.4.7. Određivanje sadržaja ukupnih kondenzovanih tanina

Sadržaj ukupnih kondenzovanih tanina u ekstraktima je određen metodom sa *n*-butanolom i hlorovodoničnom kiselinom, koja se zasniva na oksidativnoj depolimerizaciji kondenzovanih tanina i formiranju antocijanidina koji u kiseloj sredini daju crveno obojenje [119,191]. Kiseli rastvor gvožđe sulfata se priprema rastvaranjem 77 mg gvožđe sulfata heptahidrata u 500 mL smeše *n*-butanola i hlorovodonične kiseline pomešane u odnosu 2:3. Prema proceduri, ekstrakt zapremine 0,5 mL se pomeša sa 5 mL kiselog rastvora gvožđe sulfata i zagreva u vodenom kupatilu na 90 °C tokom 15 min. Nakon hlađenja, apsorbanca uzorka se spektrofotometrijski meri na 530 nm u odnosu na slepu probu koja je sadržala rastvarač umesto ekstrakta. Koncentracija ukupnih kondenzovanih tanina u uzorcima je izražena kao miligrami ekvivalenata cijanidina (eng. *Cyanidin equivalents*, CyE) po litru, koja se računa pomoću sledeće formule:

$$C = \frac{A \cdot MW \cdot R \cdot 1000}{\epsilon \cdot l} \quad (2)$$

Gde je:

C – koncentracija kondenzovanih tanina,

A – apsorbanca

MW – molarna masa cijanidina, 287,28 g/mol

R – faktor razblaženja

ϵ – molarni ekstincioni koeficijent cijanidin, 34700 L/(mol·cm)

l – širina kivete, 1 cm

Finalni rezultat je izražen kao miligrami ekvivalenata cijanidina po gramu suve materije korišćenog voća ili tropa.

3.2.4.8. Određivanje sadržaja ukupnih redukujućih šećera

Sadržaj ukupnih redukujućih šećera u ekstraktima određen je pomoću DNS (3,5-dinitrosalicilna kiselina) metode koja se zasniva na redukciji DNS reagensa u redukujućim šećerima, uz formiranje crveno obojenog jedinjenja [195]. DNS reagens se priprema mešanjem 300 mL vodenog rastvora koji sadrži 16 g natrijum hidroksida i 10 g 3,5-dinitrosalicilne kiseline, 200 mL vodenog rastvora koji sadrži 300 g kalijum natrijum tartarata i 500 mL destilovane vode, i naknadnim filtriranjem smeše. Prema proceduri, ekstraktu zapremine 0,25 mL se doda 0,25 mL DNS reagensa i zagreva u ključaloj vodi tokom 5 min. Prekidanje reakcije se vrši dodavanjem 2 mL destilovane vode, nakon čega se meri apsorbanca na 540 nm u odnosu na slepu probu koja sadrži odgovarajući rastvarač umesto ekstrakta. Sadržaj redukujućih šećera je kvantifikovan pomoću standardne prave za glukozu (nagib 7,41 mM/L), koja je pripremljena na isti način kao i uzorci, u opsegu koncentracija od 0,5 – 10 mM. Rezultati su izraženi kao

miligrami ekvivalenta glukoze (eng. *Glucose equivalents*, GE) po gramu suve materije korišćenog voća ili tropa.

3.2.4.9. HPLC analiza antocijanina

Kvantitativna analize uzoraka i odabranih standarda antocijanina je izvršena pomoću sistema tečne hromatografije visokih performansi (HPLC) Dionex Ultimate 3000 Thermo Scientific (Valtham, Masačusets, SAD) i kolone za reverzno faznu hromatografiju (ZORBAX Eclipse Plus C18, 4,6, 150 mm, 5 µm). Elucija je vršena gradijentski koristeći sledeće dve mobilne faze (A) H₂O:TFA=100:0,1 % i (B) metanol:TFA = 100:0,1 % na sledeći način: 0–5 min izokratski sa 5 % B, 5–45 min sa gradijentom od 5 % do 50 % B, 45–55 min ponovo izokratski sa 50 % B, 55–55,1 min sa gradijentom od 50 % do 5 %, 55,1–60 min izokratski sa 5 % B. Injekciona zapremina uzoraka bila je 50 µL, brzina protoka 1 mL/min, a temperatura kolone održavana je na 45 °C. Detekcija antocijanina iz analiziranih ekstrakata i komercijalnih standarda sprovedena je UV detektorom na 520 nm. Koncentracije antocijanina su izračunate na osnovu standardnih krivih dobijenih sa komercijalnim standardima antocijanina.

3.2.5. Određivanje antioksidativnih karakteristika ekstrakata

3.2.5.1. FRAP metoda

Procena antioksidativne aktivnosti ekstrakata određena je FRAP metodom (eng. *Ferric Reducing Antioxidant Power*) koja se zasniva na prenosu elektrona i određuje sposobnost antioksidanata da redukuju jone gvožđa iz kompleksa gvožđe sa 2,4,6-tripiridil-s-tirazinom ($[\text{Fe}^{3+}-(\text{TPTZ})_2]^{3+}$ u $[\text{Fe}^{2+} - \text{TPTZ}]_2^{2+}$) u kiseljoj sredini [188,196]. Reakcija je praćena nastankom intenzivno plavog obojenje koje ima apsorpcioni maksimum na 593 nm. Radni FRAP reagens se priprema svež, mešanjem 300 mM natrijum acetatnog pufera (pH=3,6), 10 mM rastvora 2,4,6-tripiridil-s-tirazina u 40 mM hlorovodoničnoj kiselini i 20 mM vodenog rastvora gvožđe(III) hlorida heksahidrata u odnosu 10:1:1 (v/v/v) redom. Prema proceduri, u ekstrakt zapremine 50 µL doda se 1,5 mL FRAP reagensa i inkubira u mraku 5 min. Apsorbanca uzoraka se spektrofotometrijski meri na 593 nm u odnosu na FRAP reagens. Antioksidativna aktivnost ekstrakata je kvantifikovana pomoću standardne prave za troloks (nagib 0,53 mmol/L), koja je pripremljena na isti način kao i uzorci, u opsegu koncentracija od 0,1 – 1 mmol/L. Rezultati su izraženi kao milimolovi ekvivalenta troloksa (eng. *Trolox equivalent*, TE) po gramu suve materije korišćenog voća ili tropa.

3.2.5.2. CUPRAC metoda

Procena antioksidativne aktivnosti ekstrakata određena je CUPRAC metodom (eng. *Cupric Reducing Antioxidant Power*) koja se zasniva na prenosu elektrona i određuje sposobnost antioksidanata da redukuju jone bakra iz kompleksa bakra sa neokuproinom (Cu^{3+} u Cu^{2+}) [196,197]. Reakcija je praćena nastankom žuto-narandžastog obojenja sa apsorpcionim maksimumom na 450 nm. Prema proceduri, u ekstrakt zapremine 0,1 mL doda se 1 mL 10 mM vodenog rastvora bakar hlorida, 1 mL 7,5 mM rastvora neokuproina pripremljenog u 96 % etanolu, 1 mL 1 M amonijum acetatnog pufera (pH=7) i 1 mL destilovane vode. Nakon inkubacije u mraku od 30 min, spektrofotometrijski se meri apsorbanca na 450 nm u odnosu na slepu probu koja sadrži rastvarač umesto ekstrakta. Antioksidativna aktivnost ekstrakata je kvantifikovana pomoću standardne prave za troloks (nagib 2,49 mmol/L), koja je pripremljena na isti način kao i uzorci, u opsegu koncentracija od 0,1 – 1 mmol/L. Rezultati su izraženi kao milimolovi ekvivalenta troloksa (TE) po gramu suve materije korišćenog voća ili tropa.

3.2.5.3. DPPH metoda

Procena antioksidativne aktivnosti ekstrakata određena je DPPH metodom (eng. *2,2-di(4-tert-octylphenyl)-1-picrylhydrazyl*) koja se zasniva na kombinaciji dva mehanizma – prenosu atoma vodonika i prenosu pojedinačnih elektrona [188,196]. Ova metoda procenjuje sposobnosti antioksidanata da neutralizuju DPPH radikale (DPPH[•] do DPPH-H). Reakcija je praćena promenom boje od ljubičaste do žute, odnosno smanjenjem apsorpcije. Prema proceduri, u ekstrakt zapremine 50 µL doda se 3,95 mL metanola i 1 mL 0,2 mM rastvora DPPH u metanolu. Nakon inkubacije u mraku od 30 min, spektrofotometrijski se meri apsorbanca na 517 nm u odnosu na metanol. Stepen inhibicije slobodnih DPPH radikala u odnosu na kontrolni uzorak (0,2 mM DPPH rastvor) računa se preko sledeće formule:

$$\text{Stepen inhibicije (\%)} = \frac{A_K - A_U}{A_K} \cdot 100 \quad (3)$$

Gde je:

A_K – Apsorbanca kontrolnog uzorka

A_U – Apsorbanca uzorka

Antioksidativna aktivnost ekstrakata je kvantifikovana pomoću standardne prave dobijene kao zavisnost stepena inhibicije i različitih koncentracija troloksa (nagib 0,014 mmol/L), koja je pripremljena na isti način kao i uzorci, u opsegu koncentracija 0,1 – 1 mmol/L. Rezultati su izraženi kao milimolovi ekvivalenata troloksa (TE) po gramu suve materije korišćenog voća ili tropa.

3.2.5.4. ABTS metoda

Procena antioksidativne aktivnosti ekstrakata određena je ABTS metodom (eng. *2,2'-azinobis-3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonic acid*) koja se zasniva na kombinaciji dva mehanizma – prenosu atoma vodonika i prenosu pojedinačnih elektrona. Ova metoda procenjuje sposobnosti antioksidanata da neutralizuju ABTS katjon radikale (ABTS^{•+} do ABTS) [196,198]. Reakcija je praćena postepenim smanjenjem plavo-zelenog obojenja rastvora do potpunog obezbojavanja. Osnovni rastvor ABTS katjon radikala priprema se mešanjem jednakih zapremina 14 mM ABTS rastvora i 4,9 mM rastvora kalijum persulfata, pripremljenih u 5 mM fosfatnom puferu sa dodatkom soli (PBS, pH 7,4) i inkubacijom tokom 16 h na 25 °C. Radni ABTS rastvor se priprema razblaživanjem osnovnog rastvora pomoću 5 mM PBS pufera do postizanja apsorbanca ~0,700 koja se spektrofotometrijski meri na 734 nm. Prema proceduri, ekstrakt zapremine 10 µL se pomeša sa 1 mL radnog ABTS rastvora, snažno meša tokom 30 s. Nakon inkubacije u mraku od 5 min, meri se apsorbanca uzoraka u odnosu na 5 mM PBS pufer. Stepen inhibicije slobodnih ABTS katjon radikala u odnosu na kontrolni uzorak (radni ABTS rastvor) računa se preko formule (3). Antioksidativna aktivnost ekstrakata je kvantifikovana pomoću standardne prave dobijene kao zavisnost stepena inhibicije i različitih koncentracija troloksa (nagib 0,017 mmol/L), koja je pripremljena na isti način kao i uzorci, u opsegu koncentracija 0,1 – 1 mmol/L. Rezultati su izraženi kao milimolovi ekvivalenata troloksa (TE) po gramu suve materije korišćenog voća ili tropa.

3.2.5.5. Relativni antioksidativni kapacitet

Indeks relativnog antioksidativnog kapaciteta (RACI) izračunat je kao srednja vrednost standardnih Z-skora (eng. *Standard Score*, SS) transformisanih iz sirovih podataka dobijenih različitim metodama za određivanje antioksidativne aktivnosti. Na ovaj način je moguće izvršiti rangiranje antioksidativne aktivnosti uzoraka. SS je bezdimenzionalna vrednost izračunata pomoću jednačine [199]:

$$SS = \frac{x - \mu}{\sigma} \quad (4)$$

Gde je:

x – vrednost antioksidativnog kapaciteta željenog uzorka izračunatog pomoću jedne od primenjenih metoda (FRAP, CUPRAC, ABTS ili DPPH)

μ – srednja vrednost antioksidativnih kapaciteta svih uzoraka koji se porede izračunatih pomoću jedne od primenjenih metoda (FRAP, CUPRAC, ABTS ili DPPH)

σ – standardna devijacija antioksidativnih kapaciteta svih uzoraka koji se porede izračunatih pomoću jedne od primenjenih metoda (FRAP, CUPRAC, ABTS ili DPPH)

RACI željenog uzorka se dobija kao srednja vrednost SS dobijenog za FRAP, CUPRAC, ABTS i DPPH metodu.

3.2.6. Određivanje prebiotske aktivnosti ekstrakata i potvrđenih prebiotika

3.2.6.1. Priprema hranljivih podloga

U ovom radu korišćene su komercijalne hranljive podloge koje su pripremane prema uputstvu proizvođača. Tečne hranljive podloge su dobijene rastvaranjem odgovarajuće količine praha komercijalne podloge u destilovanoj vodi uz zagrevanje i konstantno mešanje. Čvrste hranljive podloge su dobijene na isti način, pri čemu je dodato 1,5 % (w/v) agara ukoliko podloga već ne sadrži agar. Sve podloge su sterilizovane u autoklavu tokom 15 min na 121 °C. Nakon sterilizacije, podloge sa agarom su ohlađene na 50 °C, a zatim pod sterilnim uslovima razliveno u Petri ploče. Pre upotrebe, podloge su čuvane na 4 °C.

3.2.6.2. Priprema bakterijskih inokuluma

Inokulumi bakterija *S. epidermidis* DSM 20044 i *S. aureus* ATCC 25923 pripremljeni su prebacivanjem 1-2 kolonije sa krvnog agara u tečnu hranljivu podlogu – TSB sa dodatkom kvašćevog ekstrakta, dok je za sve ostale aerobne bakterije korišćen BHI. Kulture su ostavljene da rastu u aerobnim uslovima tokom 16-20 h, u termostatu sa mešanjem od 120 rpm i temperaturi od 37 °C. Za prekončne kulture *S. epidermidis* DSM 20044 i *S. aureus* ATCC 25923 je utvrđena zavisnost optičke gustine (eng. *Optical density*, OD) i broja kolonija (CFU/mL) merene spektrofotometrijski na 600 nm.

Inokulumi izolata bakterije *C. acnes* pripremljeni su prebacivanjem 1-2 kolonije sa krvnog agara u tečnu hranljivu podlogu – BHI bujon. Kultura je ostavljena da raste u anaerobnim uslovima tokom 48 h na 37 °C bez mešanja. Anaerobni uslovi su obezbeđeni korišćenjem plastične anaerobne kutije i papirne kese sa askorbinskom kiselinom i aktivnim ugljem, koja vezuje kiseonik iz vazduha i oslobađa ugljen dioksid.

3.2.6.3. Određivanje uticaja galakto-oligosaharida na bakterijski rast

Uticaj smeše galakto-oligosaharida (GOS) na rast bakterija *S. aureus* ATCC 25923 i *S. epidermidis* DSM 20044 ispitivan je u tečnoj hranljivoj podlozi metodom brojanja kolonija na čvrstim hranljivim podlogama. U TSB bujonu rastvorena je odgovarajuća količina GOS-a kako bi se postigla finalna koncentracija od 1-5 % (w/v). Kontrolni uzorak je, pored bujona, sadržao šećere - glukozu, galaktozu i laktozu, pri čemu je koncentracija šećera odgovarala onoj u najvećoj primenjenoj koncentraciji GOS-a. Pripremljeni uzorci su sterilisani u autoklavu tokom 15 min i 121 °C. Prekončna kultura je dodata u bujon kako bi se dostigla koncentracija ćelija od 10^7 CFU/mL. Uzorci su inkubirani na 37 °C u aerobnim uslovima sa konstantnim mešanjem na 120 rpm. Bakterijski rast je praćen tokom 8 h, pri čemu je na svaka 2 h uziman alikvot za pripremu serije razblaženja i HPLC analizu. Odgovarajuće razblaženje je naneto na Petri ploče sa tripton soja agarom (TSA), a inkubacija inokuliranih ploča na

37 °C je trajala 24 h. Uticaj GOS-a na rast bakterija analiziran je brojanjem izraslih kolonija u uzorcima koji su sadržali ove oligosaharide i upoređivanjem sa kontrolnim uzorcima. Kao dodatni eksperiment, prema istoj proceduri, ispitan je rast pomenutih stafilokoka nakon 8 h gajenja u kozmetičkim formulacijama (hidrogel i krem gel tipa ulje u vodi) koje su sadržale 5 % (w/w) GOS-a. Kontrolni uzorci su bile formulacije sa glukozom, galaktozom i laktozom u koncentraciji koja odgovara primenjenoj koncentraciji GOS-a. Sterilizacija formulacija je izvršena UV zračenjem.

3.2.6.3.1. HPLC analiza galakto-oligosaharida

Kvantitativna analiza uzoraka je izvršena korišćenjem Dionex Ultimate 3000 Thermo Scientific HPLC sistem (Voltam, SAD). Za razdvajanje ugljenih hidrata korišćena je amino kolona (Hipersil™ APS-2, 250 mm × 4 mm, 5 mm) na 35 °C. Mobilna faza bila je smeša acetonitril:voda u odnosu 80/20 % (v/v), sa brzinom protoka od 1 mL/min. Injekciona zapremina bila je 10 µL. Detekcija je izvršena RI detektorom RefractoMax 520 (ERC, Riemerling, Nemačka) tokom 30 min. Obrada podataka vršena je korišćenjem Softver Chromeleon 7.2 Chromatographi Data Sistem.

3.2.6.4. Određivanje uticaja ekstrakata na bakterijski rast

Efekat dobijenih ekstrakata na rast bakterija *S. aureus* ATCC 25923 i *S. epidermidis* DSM 20044 ispitan je u tečnoj hranljivoj podlozi spektrofotometrijski, praćenjem promene optičke gustine. Pasterizacija ekstrakata je izvršena tretiranjem na 60 °C tokom 60 min. Ekstrakti su dodati u 20 mL sveže TSB podloge tako da je krajnja koncentracija ukupnih polifenola bila 0,025-0,1 mg GAE/mL. Prekonoćna kultura je dodata u bujon kako bi se dostigla koncentracija ćelija od 10⁷ CFU/mL. Uzorci su inkubirani na 37 °C u aerobnim uslovima i konstantnim mešanjem na 120 rpm. Kontrola je bila hranljivi bujon bez dodatka ekstrakta. Bakterijski rast je praćen tokom 24 h, pri čemu su od početka rasta (0 h) uzimani alikvoti bujona u odgovarajućim vremenskim intervalima. Apsorbanca alikvota je merena na 600 nm u odnosu na TSB bez inokuluma i ekstrakta.

U slučaju svih ostalih bakterija, uticaj ekstrakata je praćen u mikrotitarskim pločama sa 96 bunarčića, uz automatsko merenje optičke gustine očitavanjem apsorbance na 595 nm. Svaki od bunarčića sadržao je odgovarajuću zapreminu ekstrakta u MH bujonu (ukupne zapremine 0,1 mL) i 0,1 mL bakterijske suspenzije. Bakterijska suspenzija je dobijena razblaživanjem prekonoćne kulture 1000 puta u MH bujonu. Finalne koncentracije ekstrakata u bunarčićima bile su 5-100 µg/mL. Uzorci su inkubirani na 37 °C u aerobnim uslovima za aerobne sojeve ispitivanih bakterija. Izolati bakterije *C. acnes* inkubirani su na 37 °C u anaerobnim uslovima. Rast je praćen tokom 24 h. Negativna kontrola je sadržala samo MH bujon, dok je u pozitivnu kontrolu dodat inokulum.

Dobijene vrednosti merenja u različitim vremenskim intervalima korišćene su za prikaz krive rasta kao zavisnost optičke gustine (OD₆₀₀) i vremena gajenja (h). Takođe, uticaj dobijenih ekstrakata na rast bakterija nakon 24 h gajenja izražen je kao stepen inhibicije ili stimulacije koji se računa iz sledeće formule:

$$\text{Stimulacija ili Inhibicija (\%)} = \frac{OD_U - OD_K}{OD_K} \cdot 100 \quad (5)$$

Gde je:

OD_U – Optička gustina uzorka sa dodatkom ekstrakta

OD_K – Optička gustina kontrolnog uzorka

Pozitivne vrednosti ukazuju na stimulaciju rasta, dok negativne vrednosti ukazuju na inhibiciju rasta.

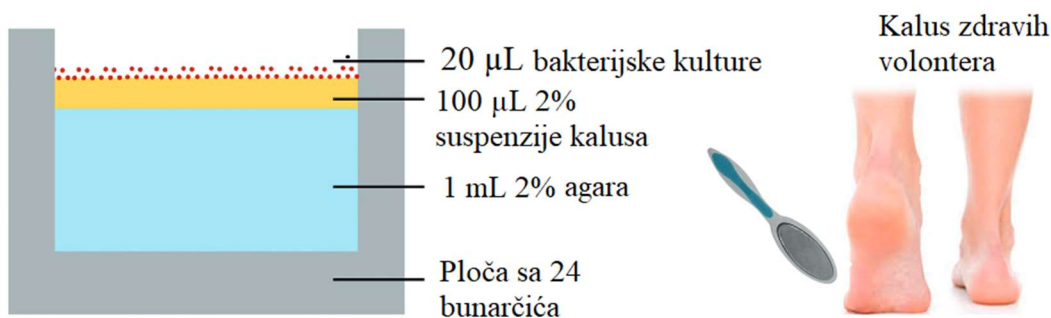
3.2.6.5. Određivanje uticaja ekstrakata na mešanu bakterijsku kulturu

Efekat dobijenih ekstrakata na rast mešane kulture bakterija *S. aureus* ATCC 25923 i *S. epidermidis* DSM 20044 ispitivan je u tačnoj hranljivoj podlozi metodom brojanja kolonija na čvrstim hranljivim podlogama. Ekstrakti su dodati u 10 mL sveže TSB podloge tako da je krajnja koncentracija ukupnih polifenola bila 0,025-0,1 mg GAE/mL. Koncentracija ćelija svake bakterije bila je 10^7 CFU/mL (ukupna konc. $\sim 2 \cdot 10^7$ CFU/mL). Kontrola je bila TSB bujon bez dodatka ekstrakta. Uzorci su inkubirani na 37°C u anaerobnim uslovima sa mešanjem na 120 rpm. Alikvoti za pripremu serije razblaženja uzeti su u nultom trenutku i nakon 24 h gajenja. Odgovarajuće razblaženje je naneto na Petri ploče sa manitol slanim agarom (MSA). Nakon inkubacije inokuliranih ploča na 37 °C tokom 48 h, određen je broj kolonija i upoređen sa kontrolom. Kolonije bakterije *S. aureus* na MSA podlozi su svetlo žute boje sa žutim zonama, dok su kolonije bakterije *S. epidermidis* ružičaste boje bez promene boje podloge.

3.2.6.6. Određivanje uticaja ekstrakata na bakterijski rast na *in vitro stratum corneum* modelu

Kao *in vitro* model površinskog sloja kože korišćen je kalus model (eng. *callus*) prema proceduri prethodno definisanoj na Departmanu za dermatologiju, Univerzitetskog medicinskog centra Radbod u Nijmegenu (Holandija).

Priprema kalus modela [200]: Kalus sa peta pet zdravih volontera prikupljen je pomoću turpije za pete. Kalus u praškastom obliku je pomešan sa fosfatnim puferom sa dodatkom soli (PBS) tako da se dobije suspenzija krajnje koncentracije od 2 % (w/v). Suspenzija je sterilisana u autoklavu tokom 15 min na 121 °C. U sledećem koraku, nakon pripreme i sterilizacije 2 % (w/v) rastvora agara u PBS-u, agar je ohlađen do ~ 50 °C i po 1 mL je razliven u svaki bunarčić sterilne ploče sa 24 bunarčića i ostavljen da se hladi dok ne očvrсне. Zatim je na svaki agar naneto po 0,1 mL suspenzije kalusa i ostavljeno da se osuši tokom 24 h na 37 °C, a ploče su zatim čuvane na 4 °C pre dalje upotrebe. Na slici 3.1 dat je šematski prikaz kalus modela.



Slika 3.1. *In vitro stratum corneum* model (preuzeto i prilagođeno prema referenci [200])

Priprema radne bakterijske kulture: Radna bakterijska kultura (*Staphylococcus* spp.) je pripremljena tako što je 30 µL prekonocne kulture dodato u 3 mL svežeg BHI bujona i ostavljena da raste tokom 3 h kako bi se dostigla ekspanzionalna faza rasta. U slučaju anaerobne bakterije *C. acnes*, korišćena je prekonocna kultura, bez dodatnog presejavanja. Kultura je zatim centrifugirana 5 min na 6000 rpm, a talog je dva puta ispiran PBS puferom. Bakterijski stok je dobijen mešanjem ispiranog taloga sa 3 mL sterilnog PBS pufera. Radna bakterijska kultura je dobijena razblaživanjem dobijenog stoka u PBS puferu u odnosu 1:1000.

U zavisnosti od eksperimenta, ekstrakt ili formulacija sa inkorporiranim ekstraktom je dodata na bunarčić sa agarom tako da koncentracija polifenola bude u opsegu od 5-100 µg GAE/mL agara, a ploče

su zatim ostavljene da se suše na 37 °C u aseptičnim uslovima. Ukoliko je ispitivan rast pojedinačnih bakterija, u svaki bunarčić dodato je 20 µL, dok je za ispitivanje rasta mešane kulture dodato po 10 µL svake kulture. Kontrola je umesto ekstrakta sadržala PBS pufer odnosno formulaciju bez inkorporiranog ekstrakta. Nakon inkubacije inokulisanih ploča na 37 °C tokom 24 h, svaki agar je sterilno prenesen u 10 mL PBS pufera i snažno vorteksiran 1 min, kako bi ćelije prešle u rastvor. Uzet je alikvot za pripremu serije razblaženja, a odgovarajuća razblaženja su naneta na krvni agar, dok su u slučaju ispitivanja mešane kulture, naneta na MSA agar. Ploče su inkubirane na 37 °C tokom 24-48 h, a uticaj ekstrakta ili formulacije sa ekstraktom praćen je brojanjem poraslih kolonija i poređenjem sa kontrolom.

3.2.6.7. Uticaj ekstrakata na mikrobiotu kože

Za ispitivanje uticaja odabranih ekstrakata na mikrobiotu kože, izabrana je mikrobiota pazuha, pri čemu je efekat praćen pomoću *in vitro stratum corneum* modela.

Priprema mikrobiote: Prethodno navlaženi vrhovi štapića za bris sterilnim SCF-1 puferom (koji se sastoji od 50 mM Tris pufera (pH 8) 1 mM EDTA (pH 8) i 0,5 % Tween-20) su korišćeni za uzimanje brisa sa pazuha šest zdravih volontera. Bris je uzet trljanjem površine kože pazuha 30 s. Svaki štapić za bris je zatim uronjen u ependorf sa 0,5 mL sterilnog SCF-1 pufera i promešan kako bi mikroorganizmi prešli u pufer. Svaki uzorak je centrifugiran na 12000 rpm tokom 5 min, a supernatant (SCF-1 pufer) je uklonjen. Talog je pomešan sa 1 mL sterilnog PBS pufera, snažno vorteksiran i ponovo centrifugiran na 12000 rpm tokom 5 min. Iz svakog uzorka je uklonjeno 0,85 mL supernatanta, a talog i preostali pufer (0,15 mL) svakog uzorka su spojeni tako da je krajnja zapremina bakterijske suspenzije (uzorka mikrobiote) bila 0,9 mL.

Pri izvođenju eksperimenta, na kalus model su dodati odabrani ekstrakti tako da koncentracija polifenola bude 5 µg GAE/mL agara i 25 µg GAE/mL agara. U svaki bunarčić je dodato i po 20 µL uzorka mikrobiote. Kontrola je umesto ekstrakta sadržala PBS pufer. Nakon inkubacije inokulisanih ploča na 37 °C tokom 24 h, iz svakog bunarčića je sterilno prenesen agar u 10 mL PBS pufera i snažno vorteksiran 1 min. Za svaki uzorak uzet je alikvot za pripremu serije razblaženja, a odgovarajuća razblaženja su preneti na dve ploče sa krvnim agarom. Kako bi se pratio rast samo aerobnih bakterija prisutnih u uzorku mikrobiote, jedna ploča je inkubirana u aerobnim uslovima na 37 °C tokom 24 h. Sa druge strane, za praćenje rasta anaerobnih bakterija, druga ploča je inkubirana u anaerobnim uslovima na 37 °C tokom 48 h. Takođe, uzorak odgovarajućeg razblaženja prenet je i na MSA agar kako bi se pratio ukupan rast koagulaza pozitivnih i koagulaza negativnih bakterija, a ploče su zatim inkubirane na 37 °C tokom 48 h. Uticaj ekstrakata praćen je brojanjem poraslih kolonija i poređenjem sa kontrolom.

Dodatno, kako bi se ispitaio uticaj istih ekstrakata na mikrobiotu kože pazuha sa atopijskim dermatitisom, na kalus model je pored uzorka mikrobiote dodata i bakterija *S. aureus* AD 17. Radna bakterijska kultura je pripremljena na prethodno opisan. Eksperiment je izveden na isti način kao u slučaju same mikrobiote, pri čemu je dodato 20 µL uzorka mikrobioma i 5 µL radne kulture.

3.2.6.8. Kvantifikacija prebiotskog efekta

Prebiotski efekat ispitivanih potvrđenih i potencijalnih prebiotika kvantifikovan je primenom modifikovane formule za izračunavanje prebiotske aktivnosti [201]. Iako je formula za prebiotsku aktivnost inicijalno osmišljena za mikroorganizme prisutne u gastrointestinalnom traktu, ovaj pristup je usvojen za poređenje rasta korisnih bakterija mikrobiote kože (*S. epidermidis*) sa i bez dodatka prebiotika, u odnosu na rast oportunističkih patogena (*S. aureus* ili *C. acnes*) pod istim uslovima. Vrednosti prebiotskog kapaciteta dobijene su primenom sledeće jednačine:

$$\text{Prebiotski kapacitet} = \frac{SEP_{24} - SEP_0}{SEK_{24} - SEK_0} - \frac{PP_{24} - PP_0}{PK_{24} - PK_0} \quad (6)$$

Gde je:

SEP₂₄ – Optička gustina ili broj kolonija (CFU/mL) bakterije *S. epidermidis* sa dodatkom prebiotika nakon 24 h rasta

SEP₀ – Optička gustina ili broj kolonija (CFU/mL) bakterije *S. epidermidis* sa dodatkom prebiotika u početnom trenutku rasta

SEK₂₄ – Optička gustina ili broj kolonija (CFU/mL) bakterije *S. epidermidis* bez dodatka prebiotika (kontrola) nakon 24 h rasta

SEK₀ – Optička gustina ili broj kolonija (CFU/mL) bakterije *S. epidermidis* bez dodatka prebiotika (kontrola) u početnom trenutku rasta

PP₂₄ – Optička gustina ili broj kolonija (CFU/mL) patogene bakterije *S. aureus* ili *C. acnes* sa dodatkom prebiotika nakon 24 h rasta

PP₀ – Optička gustina ili broj kolonija (CFU/mL) patogene bakterije *S. aureus* ili *C. acnes* sa dodatkom prebiotika u početnom trenutku rasta

PK₂₄ – Optička gustina ili broj kolonija (CFU/mL) patogene bakterije *S. aureus* ili *C. acnes* bez dodatka prebiotika (kontrola) nakon 24 h rasta

PK₀ – Optička gustina ili broj kolonija (CFU/mL) bakterije *S. aureus* ili *C. acnes* bez dodatka prebiotika (kontrola) u početnom trenutku rasta

U slučaju praćenja rasta monokultura, prebiotski kapacitet (PK_{OD}) je određen praćenjem optičke gustine rasta, dok je u slučaju ko-kultura prebiotski kapacitet (PK_{CFU}) određen brojanjem kolonija. Vrednosti PK_{OD} ili PK_{CFU} veće od nule ukazuju da ispitivana supstanca ima pozitivan efekat na odnos između dva mikroorganizma, ističući njen prebiotski potencijal. Sa druge strane, negativne vrednosti sugerišu na izraženiju stimulaciju patogenih bakterija, dok vrednosti jednake nuli ukazuju da ispitivana supstanca nema uticaja na rast bakterija.

3.2.7. Praćenje difuzije galakto-oligosaharida i antocijanina iz kozmetičkih formulacija

3.2.7.1. Priprema kozmetičkih formulacija i njihova karakterizacija

3.2.7.1.1. Priprema hidrogela

Hidrogel je pripremljen kao 2 % (w/v) rastvor komercijalnog polimera Aristoflex® AVC (kopolimer amonijum akriloiddimetilaurat i vinilpirolidona) i vode. Prilikom praćenja difuzije GOS-a iz ove formulacije, dodata je i odgovarajuća količina komercijalnog praha GOS-a tako da njihova krajnja koncentracija bude 5 % (w/v). U slučaju praćenja difuzije antocijanina iz ekstrakta crne ribizle, dodat je ekstrakt krajnje koncentracije od 1 % (v/v). Rastvori su mešani propellerskom mešalicom na 800 rpm tokom 5 min do formiranja stabilnog gela.

3.2.7.1.2. Priprema krem gela tipa ulje u vodi (u/v)

Krem gel tipa ulje u vodi (u/v) pripremljen je kao 3 % (w/v) rastvor komercijalnog gelirajućeg sredstva Heliogel™, koji se sastoji od kopolimera natrijum akrilata, hidrogenizovanog poliizobutena, fosfolipida, poligliceril-10 stearata i ulja semena suncokreta (lat. *Helianthus Annuus*). Prilikom praćenja difuzije GOS-a iz ove formulacije, dodata je i odgovarajuća količina komercijalnog praha GOS-a tako da njihova krajnja koncentracija bude 5 % (w/v). U slučaju praćenja difuzije antocijanina iz ekstrakta crne ribizle, ova formulacija je dobijena mešanjem 3 % (w/v) polimera Heliogel™, 10 % (v/v) izopropil

miristata i 1 % (v/v) ekstrakta crne ribizle u vodi. Dobijene smeše mešane su propelerskom mešalicom na 1000 rpm tokom 5 min do formiranja stabilne krem gel formulacije.

3.2.7.1.3. Priprema emulzije gela tipa ulje u vodi (u/v)

Za pripremu 100 g emulzije tipa ulje u vodi (u/v) prvo su odvojeno zagrejani voda i smeša 5 g Sabowax FL 65 emulgatora (u čiji sastav ulazi PEG-100 stearat i glicerol stearat), 1 g cetearil alkohola i 10 g izopropil miristata u vodenom kupatilu do 75 °C. Nakon dostizanja željene temperature i topljenja lipida, smeša je pomešana sa vodom i mešana propelerskom mešalicom prvo 1 min na 500 rpm, zatim 2min na 1000 rpm i na kraju 3 min na 700 rpm. Kada je temperatura emulzije opala na 50 °C, mešanje je nastavljeno 1 min na 1000 rpm kako bi se postigla bolja disperzija čestica ulja u vodenoj fazi. Ekstrakt crne ribizle je dodat do finalne koncentracije od 1 % (v/w).

3.2.7.1.4. TEWL test

TEWL (eng. *Transepidermal Water Loss*) testom kojim se određuje transepidermalni gubitak vode, korišćen je za procenu potencijala hidratacije kozmetičke formulacije (hidrogel sa ekstraktom crne ribizle krajnje koncentracije od 0,0-0,4 mg GAE/g). Merenje je vršeno na zatvorenoj komori kondenzovanog tipa (Aquaflux Biox System Ltd., London, Ujedinjeno Kraljevstvo) u skladu sa instrukcijama proizvođača. Ova metoda određuje brzinu isparavanja vode sa površine kože ili model sistema korišćenjem sledeće jednačine:

$$\frac{d_m}{d_t} = -D \cdot A \cdot \frac{d_p}{d_x} \quad (7)$$

Gde je:

d_m/d_t – brzina isparavanja vode

D – brzina difuzije

A – površina

p – pritisak vodene pare

x – udaljenost mernih tačaka

Promena pritiska vodene pare na površini merena je korišćenjem 1 mm Teflon polu-propustljive membrane, sa primenjenom kozmetičkom formulacijom i bez formulacije (kontrolni uzorak), u odgovarajućim vremenskim intervalima tokom 24 h. Krajnji rezultat je izražen kao maseni fluks isparavanja vode ($g/(m^2 \cdot h)$).

3.2.7.1.5. Zein test

Zein test je *in vitro* metoda za procenu potencijala iritacije kozmetičkih proizvoda. Zasniva se na rastvaranju kukuruznog proteina zeina (čija struktura podseća na proteine prisutne u ljudskoj koži i kosi) dejstvom surfaktanata. Prema Invitox protokolu br. 26, kozmetička formulacija sa inkorporiranom bioaktivnom supstancom (hidrogel sa ekstraktom crne ribizle krajnje koncentracije od 0-400 μ g GAE/g) se rastvori u destilovanoj vodi kako bi se dobio rastvor koncentracije od 10 mg/mL, a zatim pomeša sa 1 g Zein proteina. Nakon mešanja dobijene smeše na 100 rpm tokom 60 min, količina rastvorenog proteina određena je metodom po Kjeldalu. Dobijeni rezultati izraženi preko Zein broja kojim se definišu miligrami azota detektovanih u 100 mL uzorka. Ukoliko je vrednost Zein broja iznad 400 mg N/100 mL, kozmetičke formulacije se klasifikuju kao izrazito iritirajuće za kožu, u opsegu 200-400 mg N/100 mL kao umereno iritirajuće, dok one sa Zein brojem ispod 200 mg N/100 mL se smatraju neiritirajućim [202-204].

3.2.7.1.6. RBC test

RBC (eng. „*Red blood cell*“) test je *in vitro* metoda u kojoj se koriste crvena krvna zrnca za procenu potencijala iritacije kozmetičkih proizvoda. Ovom metodom se meri negativan uticaj surfaktanta i deterdženata na ćelijske membrane (hemoliza) i oštećenje slobodnih proteina (denaturacija). Oba efekta mogu se spektrofotometrijski detektovati praćenjem promene apsorbance obojenog oksihemoglobina, prisutnog u crvenim krvnim zrnima. Stoga, ovom metodom se određuje hemoliza (H50) odnosno koncentracija pri kojoj je 50 % crvenih krvnih zrnaca uništeno; indeks denaturacije (ID) i odnos hemolize i denaturacije (L/D odnos) koji pomaže u karakterizaciji efekta testirane supstance. Prema Invitox protokolu br. 37, eritrociti su izolovani centrifugiranjem citratnih uzoraka krvi pacova i pripremljeni tako da njihov broj po 1 mL bude $\sim 7 \cdot 10^9$. Alikvoti suspenzije eritrocita i uzoraka kozmetičke formulacije (hidrogel sa ekstraktom crne ribizle krajnje koncentracije od 0,0-0,4 mg GAE/g) su rastvoreni u PBS puferu (pH 7,4) i inkubirani 10 min na 25 °C, nakon čega su uzorci centrifugirani 1 min na 9000 rpm. Kao interni standard korišćen je natrijum dodecil sulfat (SDS) u koncentraciji 0,75 mg/mL. Udeo hemolize je određen upoređivanjem apsorbanci testiranih uzoraka i kontrolnih uzoraka, dobijenih merenjem na 560 nm. Kontrolni uzorci su dobijeni potpunom hemolizom eritrocita dejstvom destilovane vode. Vrednost H50 dobijena je iz standardne krive. Denaturacija oksihemoglobina detektovana je merenjem apsorbanci na talasnim dužinama u opsegu od 450 do 700 nm. Određen L/D odnos korišćen je za klasifikaciju potencijala iritacije ekstrakta kao: neiritirajući > 100, slabo iritirajući > 10, umereno iritirajući > 1, iritirajući > 0,1 i vrlo iritirajući < 0,1 [204,205].

3.2.7.2. Praćenje difuzije

Difuzija molekula je praćena u Francovoj difuzionoj ćeliji (Ø 25 mm) koja se sastoji od donorske i receptorske komore međusobno odvojene membranom. Receptorska komora zapremine 20 mL bila je ispunjena 0,01 M fosfatnim puferom sa dodatkom soli (PBS, pH 7,4). U svim eksperimentima, masa kozmetičke formulacije sa bioaktivnom komponentom nanete na donorski deo bila je $2 \pm 0,1$ g. Donorski deo je zatvoren parafilmom kako bi se sprečilo isparavanje. U prvom koraku ispitivanja, za procenu *in vitro* profila oslobađanja bioaktivne komponente iz formulacije korišćena je celulozno-acetatna (CA) membrana. U drugom koraku ispitivanja, za praćenje transdermalne difuzije korišćena je sintetička Strat[®] M membrana čija struktura imitira slojeve ljudske kože (epidermis, dermis i hipodermis). Pre upotrebe, CA membrana je prethodno natopljena PBS puferom i termostatirana na 25 °C tokom 30 min, dok Strat[®] M membrana nije zahtevala hidrataciju. Eksperimenti su izvedeni na 25 °C tokom 8-24 h uz konstantno mešanje receptorskog rastvora na 750 rpm. Uzorci za analizu HPLC zapremine 0,5 mL su uzimani u određenim vremenskim intervalima, a posle svakog uzorkovanja ista zapremina PBS pufera je vraćana u receptorsku komoru kako bi se zapremina održala konstantnom. Na osnovu dobijenih rezultata konstruisane su krive otpuštanja bioaktivnih komponenti iz formulacija tokom vremena.

Kao dodatni eksperiment, izvršena je ekstrakcija bioaktivnih komponenti iz Strat[®] M membrane kako bi se utvrdilo koji procenat komponenti je zadržan u slojevima membrane nakon transdermalne difuzije. Membrana je isečena na komadiće površine 1 mm², pomešana sa 20 mL rastvarača i ostavljena na 25 °C tokom 24 h uz mešanje na 150 rpm. U slučaju GOS-a kao rastvarač korišćena je voda, dok je za antocijanine korišćen 50 % etanol. Dobijeni ekstrakti prodifundovalih komponenti su koncentrisani na koncentratoru i analizirani na HPLC-u.

3.2.7.3. Izračunavanje koeficijenata difuzije

Difuzija molekula iz matrice polimera opisana je Fikovim zakonom koji ukazuju na spontano kretanje molekula iz oblasti veće koncentracije prema oblasti manje koncentracije [206]. Međutim, kada

difuzija molekula zavisi i od relaksacije polimernih lanaca u matrici, prenos postaje anomalni, odnosno predstavlja tzv. ne-Fikova difuziju [207].

Difuzija bioaktivnih komponenti iz polu-čvrstih polimernih formulacija je najčešće modelovana Korsmejer – Peppas jednačinom:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = k \cdot t^n \quad (8)$$

Gde je:

M_t – količina bioaktivne komponente oslobođene iz formulacije u trenutku t

M_∞ – količina bioaktivne komponente oslobođene iz formulacije u beskonačnom vremenu

k – kinetička konstanta

n – koeficijent koji ukazuje na mehanizam transporta molekula.

Vrednost koeficijenta n zavisi od geometrije sistema za kontrolisano otpuštanje. U slučaju tankog filma može imati vrednosti od 0,5 do 1 [208]. Za vrednost $n = 0,5$ transport molekula se odvija Fikovom difuzijom. Kada je $n = 1$, difuzija molekula se odvija isključivo usled relaksacije polimernih lanaca od kojih je formulacija izgrađena tzv. Case II transport [209,210]. U slučaju kada je $0,5 < n < 1,0$, znači da je prisutan kombinovani efekat ova dva mehanizma prenosa odnosno da je prisutna ne-Fikova difuzija.

U slučaju kada postoji vreme kašnjenja (t_{lag}) difuzije molekula, koristi se modifikovani oblik Korsmejer – Peppas jednačine:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = k \cdot (t - t_{lag})^n \quad (9)$$

Za opisivanje anomalnog prenosa bioaktivne komponente iz formulacije koristi se Peppas – Sahlin jednačina kojom se uzima u obzir doprinos molekulske difuzije i relaksacije polimera i glasi:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = k_1 \cdot t^{0,5} + k_2 \cdot t \quad (10)$$

U slučaju kada postoji vreme kašnjenja (t_{lag}) pre difuzije molekula, koristi se modifikovani oblik Peppas – Sahlin jednačine:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = k_1 \cdot (t - t_{lag})^{0,5} + k_2 \cdot (t - t_{lag}) \quad (11)$$

Gde su k_1 i k_2 kinetičke konstante, pri čemu se prvi deo jednačine prikazuje doprinos molekulske difuzije, dok drugi deo jednačine pokazuje doprinos relaksacije polimera.

Fitovanjem eksperimentalno dobijenih rezultata jednačinama (8-11) u Matlab programu (Matlab R2015a, The MathWorks, SAD) određene su vrednosti koeficijenta n i t_{lag} i određeni su vrednosti kinetičkih konstanti k ili k_1 . Kinetičke konstante korišćene su dalje za određivanje efektivnog koeficijenta difuzije (D_{eff}) upotrebom sledeće jednačine [209]:

$$D_{eff} = \frac{k_{(1)} \cdot \delta \cdot \pi}{4} \quad (12)$$

Gde δ predstavlja zbir debljine filma formulacije nanete na membranu i debljine same membrane.

3.2.8. Izolacija i karakterizacija pektinskih frakcija iz crne ribizle

3.2.8.1. Izolacija frakcija pektina iz crne ribizle

U prvom koraku izvršena je ekstrakcija polifenolnih jedinjenja crne ribizle maceracijom i to mešanjem 60 g supstrata i 0,1 M acetatnog pufera (pH 4,5) u odnosu 1:10 g/mL na 50 °C tokom 1 h uz konstanto mešanje na 250 rpm. Dobijena smeša je centrifugirana na 6000 rpm tokom 10 min, supernatant je uklonjen, a talog je dalje tretiran. Kako bi se izolovale supstance koje su rastvorljive u alkoholu, talog je dalje tretiran 70 % (v/v) etanolom u odnosu 1:10 g/mL tokom 30 min pod istim uslovima. Postupak je ponovljen tri puta, nakon čega je dobijeni talog dalje korišćen za izolaciju dve frakcije pektina – frakcije rastvorljive u kiselini i frakcije vezane za kalcijum.

Izolacija frakcije pektina rastvorljive u kiselini (LK-pektin) izvršena je dodavanjem 240 mL 20 % (w/v) limunske kiseline (pH 1,5) u prethodno dobijeni talog nakon čega je smeša inkubirana na 58 °C tokom 1 h uz mešanje na 250 rpm. Nakon toga, talog je odvojen centrifugiranjem na 6000 rpm tokom 10 min i korišćen za izolaciju frakcije pektina vezane za kalcijum. Supernatant je pomešan sa 480 mL 96 % (v/v) etanola sa dodatkom 0,2 % (v/v) hlorovodonične kiseline i ostavljen da stoji preko noći na 4 °C. Istaložena frakcija bogata pektinom odvojena je centrifugiranjem, a zatim je ispirana prvo rastvorom 0,04 % (v/v) hlorovodonične kiseline u 96 % (v/v) etanolu, a zatim čistim 96 % (v/v) etanolom. Dobijena frakcija pektina je liofilizovana i korišćena za dalja ispitivanja.

Izolacija frakcije pektina vezane za kalcijum (Ca-pektin) dobijena dodavanjem 0,76 % (w/v) amonijum-oksalata u odnosu 1:15 (g/mL) i inkubiranjem na 85 °C tokom 1,5 h uz mešanje na 250 rpm. Nakon toga, talog je odvojen centrifugiranjem, a dobijeni supernatant je dalje tretiran na već opisan način.

3.2.8.2. Karakterizacija pektinskih frakcija

3.2.8.2.1. Analiza strukturnih karakteristika pektinskih frakcija

3.2.8.2.1.1. Određivanje monosaharidnog sastava

Za određivanje monosaharidnog sastava uzoraka primenjena je metoda prethodno definisana na Institutu za nauku o hrani (CIAL) u Madridu (Španija).

Hidroliza 30 mg uzorka izvršena je tretiranjem sa 1,5 mL 2 M trifluorosirćetne kiseline i uduvanjem azota (eng. *Trifluoroacetic acid*, TFA) na 110 °C tokom 4 h. Nakon završene hidrolize, alikvot od 0,3 mL je uparen do suva na vakuum uparivaču kako bi se uklonili ostaci kiseline. Odmah je dodato 0,4 mL internog standarda fenil- β -D-glukopiranozida koncentracije 0,5 mg/mL i postupak uparavanja je ponovljen. Kako bi si izvršila derivatizacija, u upareni uzorak dodato je 0,25 mL 2,5 % (w/v) rastvora hidroksilamin-hidrohlorida u piridinu, snažno vorteksirano i inkubirano na 70 °C tokom 30 min. Nakon toga, dodato je 0,25 mL heksametildisilazana (eng. *Hexamethyldisilazane*, HMDS) i 25 μ L koncentrovane trifluorosirćetne kiseline, snažno vorteksirano i ostavljeno na 50 °C tokom 30 min. Nakon završene derivatizacije, uzorci su centrifugirani na 10000 rpm tokom 2 min, a supernatant je odvojen i čuvan na 4 °C.

Analiza uzoraka izvršena je primenom gasne hromatografije sa plamenojonizujućim detektorom (eng. *Gas Chromatography Flame Ionization Detector*, GC-FID) na uređaju Agilent Technologies 7820A (Agilent Technologies, Vilmington, SAD) opremljenom VF-5ht kapilarnom kolonom (30 m \times 0,25 mm, debljine filma 0,1 μ m; 5 % fenilmetilpolisiloksan, 95 % dimetilpolisiloksan, Agilent J&W, Folsom, SAD). Temperatura injektora bila je 280 °C, a temperatura detektora 385 °C. Mobilna faza (noseći gas) bio je azot sa protokom od 1 mL/min. Program temperature je bio sledeći: zagrevanje od 120 °C do

270 °C brzinom 3 °C/min. Podaci su obrađeni korišćenjem Agilent ChemStation softvera verzije Rev. B.04.03 (Vilmington, SAD). Odzivni faktori su određeni analizom monosaharida (glukoza, manoz, ramnoza, arabinoza, ksiloza, galaktoza i galakturonska kiselina) u koncentracijama od 0,02 do 2 mg/mL.

3.2.8.2.1.1.1. Određivanje strukturnih karakteristika pektina

Na osnovu monosaharidnog sastava određeni su sledeće strukturne karakteristike izolovanih frakcija pektina [211]:

- Sadržaj homogalakturonana (HG) određen je kao:

$$HG (\%) = Galakturonska\ kiselina - Ramnoza \quad (13)$$

- Sadržaj ramnogalakturonana I (RG I) određen je kao:

$$RG\ I (\%) = 2 \cdot Ramnoza + Arabinoza + Galaktoza \quad (14)$$

- Stepen grananja ramnogalakturonana I određen je kao:

$$Stepen\ grananja\ RGI = \frac{Galakturonska\ kiselina}{Ramnoza} \quad (15)$$

- Obim grananja ramnogalakturonana I određen je kao:

$$Obim\ grananja\ RGI = \frac{Arabinoza + Galaktoza}{Ramnoza} \quad (16)$$

- Stepen linearnosti pektinskog lanca određen je kao:

$$Stepen\ linearnosti\ lanca = \frac{Galakturonska\ kiselina}{Ramnoza + Arabinoza + Galaktoza} \quad (17)$$

- Stepen čistoće određen je kao:

$$Stepen\ čistoće\ pektina = \frac{Galakturonska\ kiselina + Ramnoza + Arabinoza + Galaktoza}{Glukoza + Manoz} \quad (18)$$

3.2.8.2.1.1.2. Određivanje raspodele molekulske mase

Raspodela molekulske mase (eng. *Molecular weight*, Mw) određena je korišćenjem metode prethodno definisane na Institutu za nauku o hrani (CIAL) u Madridu (Španija).

Uzorak je pripreman za analizu rastvaranjem u destilovanoj vodi kako bi se dobila krajnja koncentracija od 20 mg/mL. U slučaju otežanog rastvaranja, smeša je zagrejana na 50 °C tokom 30 min. Alikvot dobijenog rastvora od 0,1 mL pomešan je sa 0,9 mL 0,04 M rastvora amonijum acetata (mobilnom fazom), filtriran korišćenjem filtera veličina pora od 0,45 µm i analiziran pomoću hromatografije visokih performansi sa izdvajanjem po veličini (eng. *High Performance Size Exclusion Chromatography*, HPSEC) sa ELSD (eng. *Evaporative Light Scattering Detector*) detektorom proizvođača Agilent Technologies (Boblingen, Nemačka). Separacija je izvršena na dve TSK-Gel kolone koje su povezane serijski: G5000 PWXL (7,8 mm × 300 mm, 10 µm) i G2500 PWXL (7,8 mm ×

300 mm, 6 µm) sa TSK-Gel pretkolonom (6,0 mm × 400 mm) proizvođača Tosoh Bioscience (Štuttgart, Nemačka). Za određivanje raspodele molarnih masa korišćen je standard pululana u opsegu molarnih masa 0,342-788 kDa i koncentracija 0,2-2 mg/mL.

3.2.8.2.1.3. FTIR analiza

Infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom (eng. „*Fourier Transform Infrared Spectroscopy*“, FTIR) je analiza korišćena za dokazivanje prisustva funkcionalnih grupa u dobijenim frakcijama pektina primenom Bruker IFS66v (Bruker, Mineapolis, SAD) instrumenta. Diskovi od kalijum bromida su pripremljeni mešanjem uzorka frakcije pektina sa kalijum bromidom u odnosu 1:100, koji su zatim presovani. Podaci su prikupljeni u režimu apsorpcije korišćenjem opsega frekvencije od 4000 do 400 cm⁻¹ i rezolucije 4 cm⁻¹ (srednji infracrveni region) sa 250 zbirnih skeniranja [212]. Step en metil esterifikacije (DM) je određen kao prosečan odnos površine pikova na 1730 cm⁻¹ (COO–R) i zbir a površina pikova na 1730 cm⁻¹ (COO–R) i 1640 cm⁻¹ (COO⁻).

3.2.8.2.2. Određivanje tehno-funkcionalnih svojstava

3.2.8.2.2.1. Određivanje kapaciteta zadržavanja vode

Kapacitet zadržavanja vode frakcija bogatih pektinom je ispit an kombinovanjem 0,1 g uzorka sa 2 mL vode i inkubacijom smeše tokom 24 h uz mešanje na 250 rpm na 25 °C. Uzorci su zatim centrifugirani na 6000 rpm tokom 30 min. Rezultati su izraženi kao zapremina vode koja se zadržava po gramu testirane frakcije.

3.2.8.2.2.2. Određivanje kapaciteta zadržavanja ulja

Kapacitet zadržavanja ulja frakcija bogatih pektinom određen je kombinovanjem 0,1 g uzorka sa 2 mL suncokretovog ulja i inkubacijom smeše 30 min uz mešanje na 250 rpm na 25 °C. Nakon toga, uzorci su centrifugirani na 6000 rpm tokom 30 min i izmerena je zapremina ulja u supernatantu. Rezultati su izraženi kao količina zadržanog ulja po gramu ispitivane frakcije pektina.

3.2.8.2.2.3. Određivanje emulgujućih svojstava pektina

Emulgujući kapacitet frakcija bogatih pektinom i stabilnost emulzije određene su mešanjem 10 mL rastvora uzorka (1 % (w/v)) sa 5 mL suncokretovog ulja, a zatim je smeša snažno mešana na vorteksu tokom 3 min da bi se homogenizovala. Nakon toga, emulzija je centrifugirana na 3000 rpm tokom 5 min, a emulgujući kapacitet je određen korišćenjem sledeće jednačine [213]:

$$\text{Emulgujući kapacitet} = \frac{V_f}{V_i} \quad (18)$$

Gde je:

V_f – zapremina emulgovanog sloja dobijena nakon centrifugiranja

V_i – početna zapremina smeše

Da bi se procenila stabilnost emulzije, emulzija je zatim inkubirana na 80 °C tokom 30 min i ponovo centrifugirana na 3000 rpm tokom 5 min. Stabilnost emulzije je izračunata korišćenjem sledeće jednačine:

$$\text{Emulgujući kapacitet} = \frac{V_t}{V_f} \quad (19)$$

Gde je:

V_f – zapremina emulgovanog sloja dobijena nakon centrifugiranja

V_t – zapremina emulgovanog sloja dobijenog posle inkubacije i centrifugiranja

3.2.9. Statistička analiza

Svi rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm standardna devijacija dobijeni iz dva ili tri ponavljanja.

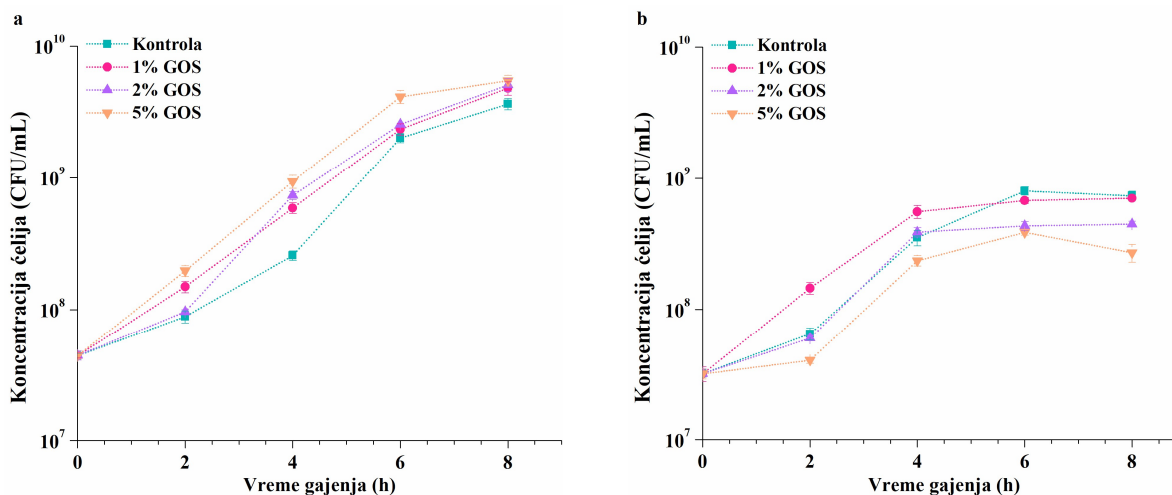
Da bi se utvrdila statistička značajnost razlika srednjih vrednosti za višestruka poređenja rezultata korišćena je jednosmerna analiza varijanse (ANOVA) praćena Tukey testom, a razlike $p \leq 0,05$ su smatrane značajnim. Različita slova mala ili velika slova označavaju statistički ($p \leq 0,05$) značajnu razliku između uzoraka koji se porede.

Pirsonovi koeficijenti korelacije (r) i jednačine linearne regresije su korišćene da bi se istražio odnos između različitih varijabli koristeći. Negativna vrednost za r implicira negativnu linearnu korelaciju, dok pozitivna vrednost sugeriše pozitivnu linearnu korelaciju. Ako je r vrednost $|r| < 0,20$ korelacija je veoma slaba; $0,20 < |r| < 0,39$ korelacija je slaba; $0,40 < |r| < 0,59$ korelacija je umerena; $0,60 < |r| < 0,79$ korelacija je jaka; $|r| > 0,8$ korelacija je veoma jaka [214].

4. REZULTATI I DISKUSIJA

4.1. Uticaj GOS na mikrobiotu kože

U inicijalnoj fazi eksperimentalnog rada ove disertacije ispitan je uticaj potvrđenih prebiotika gastrointestinalnog trakta – galakto-oligosaharida (GOS), na mikrobiotu kože. Kao reprezentativni komensalni član mikrobiote izabrana je koagulaza negativna bakterija *S. epidermidis* DSM 20044, dok je kao predstavnik patogenih mikroorganizama izabrana koagulaza pozitivna bakterija *S. aureus* ATCC 25923. Eksperiment je izveden u tečnoj hranljivoj podlozi, a koncentracija smeše GOS bila je u opsegu 1-5 % (w/v), kako bi se utvrdila optimalna koncentracija u pogledu postizanja najvišeg stepena stimulacije komensalne bakterije, odnosno najvećeg stepena inhibicije patogene bakterije. Koncentracije smeše oligosaharida izabrane su na osnovu ranije objavljenih studija o uticaju topikalnih prebiotika na mikrobiotu kože [104,105]. Komercijalna smeša GOS sastojala se od oligosaharida (70 % w/w), laktoze (21 % w/w), glukoze (6 % w/w) i galaktoze (3 % w/w), i da bi se pratio uticaj samo GOS, kontrolni uzorak je pored hranljive podloge sadržao i pomenute šećere koji se nalaze u najvećoj primenjenoj koncentraciji GOS smeše. Efekat smeše GOS na rast pojedinačnih kultura praćen je brojanjem kolonija (CFU/mL) i poređenjem sa kontrolom. Rast bakterija praćen je tokom 24 h, međutim kako je najizraženiji uticaj na bakterije bio tokom prvih 8 sati (nakon čega nije bilo promene rasta), na slici 4.1 prikazane su krive rasta za period od 8 h.



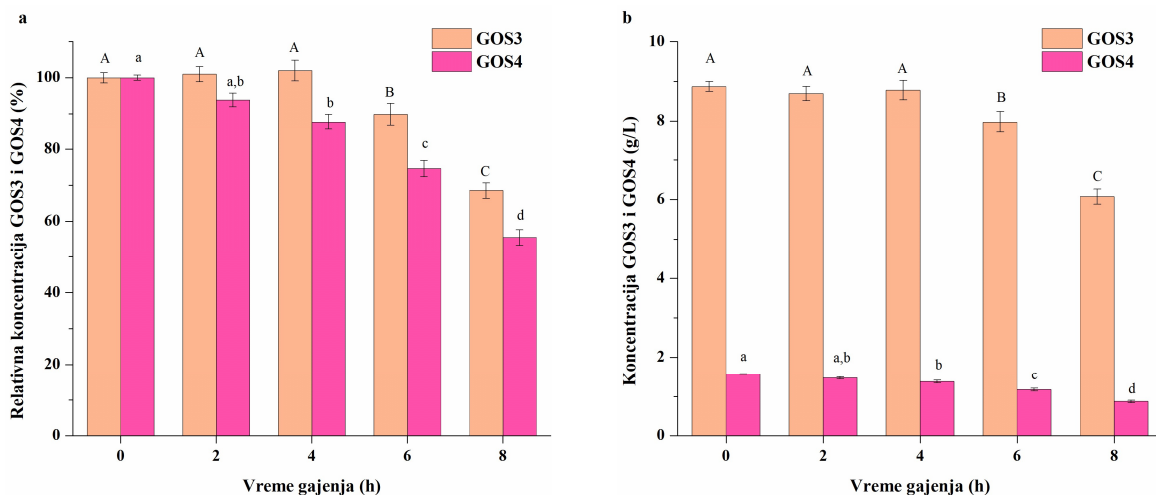
Slika 4.1. Uticaj različitih koncentracija galakto-oligosaharida (GOS) na rast bakterije *S. epidermidis* (a) i *S. aureus* (b)

Kao što se može videti sa slike 4.1.a, sve testirane koncentracije GOS-a su stimulisale rast bakterije *S. epidermidis*. Pored toga, ova bakterija je imala veću početnu brzinu rasta, kao i manje izraženu fazu adaptacije u slučaju dodatka oligosaharida u hranljivu podlogu. Sve koncentracije su pokazale pozitivan efekat na rast ove bakterije. Maksimalna i statistički značajna razlika ($p \leq 0,05$) u broju vegetativnih ćelija za sve primenjene koncentracije GOS-a u odnosu na kontrolu detektovana je u četvrtom satu gajenja, pri čemu je pri koncentraciji od 5 % (w/v) oligosaharida bio prisutan stimulatívni efekat tokom celokupnog ispitivanog perioda. Sa druge strane, primećeno je da je prisustvo GOS-a imalo različite efekte na rast bakterije *S. aureus* (slika 4.1.b). Tokom prvih 4 h, koncentracija 1 % (w/v) je promovisala rast ove bakterije, dok konc. 2 % (w/v) nije uticala na njen rast. Nakon šestog sata, sve primenjene koncentracije su u većoj ili manjoj meri inhibirale rast *S. aureus*, pri čemu je uočljiv trend da sa porastom doze oligosaharida, raste i stepen inhibicije. Takođe, sve vreme je bilo prisutno značajno

usporavanje rasta i smanjenje broja kolonija pri konc. od 5 % (w/v) ukazujući na bakteriostatički efekat ove koncentracije na bakteriju *S. aureus*. Interesantno, sličan trend dobijen je u studiji koja se bavila ispitivanjem uticaja gluko-oligosaharida na rast ovih bakterija, odnosno rezultati su pokazali da 5 % (w/v) gluko-oligosaharida u velikoj meri inhibira rast *S. aureus*, bez uticaja na rast *S. epidermidis* [215]. Dodatno, Di Lodoviko i saradnici, su potvrdili da GOS u koncentraciji 1-5 % (w/v) smanjuju rast ili ne utiču na različite sojeve *S. aureus*, što se slaže sa rezultatima ove doktorske disertacije. Međutim, studija je pokazala i da GOS ne utiče ili čak smanje rast *S. epidermidis*, u zavisnosti od ispitivanih sojeva [104]. Ovo neslaganje u rezultatima može biti uzrokovano varijacijama u sastavu smeše GOS-a, koji prvenstveno zavisi od porekla enzima i uslova koji se koriste za njihovu sintezu [100].

Sve je više istraživanja koja pokazuju da na koži pacijenata sa teškim oblikom atopijskog dermatitisa dominira *S. aureus*, dok je kod pacijenata sa blagim oblikom ovog oboljenja zastupljenija bakterija *S. epidermidis* [216,217]. Na osnovu ovoga, može se pretpostaviti da rezultati ove disertacije ukazuju na to da GOS ima potencijal da se koristi kao sredstvo za lečenje ili ublažavanje simptoma atopijskog dermatitisa, zbog sposobnosti modifikacije mikrobiote.

Uočeni trendovi najizraženije stimulacije rasta *S. epidermidis* i antimikrobne aktivnosti na *S. aureus* pri koncentraciji GOS-a od 5 % (w/v), dodatno su potvrđeni praćenjem potrošnje ovih oligosaharida u hranljivim podlogama tokom fermentacije. Prvenstveno, HPLC analiza smeše GOS-a je pokazala prisustvo dve vrste ovih oligosaharida i to: trisaharida (GOS3) i tetrasaharida (GOS4). Analiza hranljive podloge u kojoj je rasla bakterija *S. aureus* je pokazala da nije došlo do promene koncentracije GOS3 i GOS4, čak ni posle 8 h fermentacije. Međutim, promena koncentracije GOS-a tokom kultivacije *S. epidermidis* je bila primetna i statistički značajna ($p \leq 0,05$), a rezultati su prikazani na slici 4.2.a. Štaviše, udeo GOS3 i GOS4 molekula je smanjen za ~30 % i ~45 % u odnosu na početne koncentracije ovih molekula, redom. Iako je procentualno više GOS4 potrošeno nego GOS3, treba napomenuti da je početna koncentracija GOS3 bila ~5,5 puta veća od GOS4, što implicira da je potrošnja GOS-a nižeg stepena polimerizacije brža (4.2.b). Konstantno smanjenje koncentracije molekula GOS-a prisutnih u hranljivoj podlozi tokom posmatranog vremena fermentacije od 8 h ukazuje da ih bakterija *S. epidermidis* koristi za svoj rast, nasuprot bakteriji *S. aureus*.



Slika 4.2. Relativna (a) i stvarna (b) koncentracija trisaharida (GOS3) i tetrasaharida (GOS4) prisutnih u fermentacionoj smeši bakterije *S. epidermidis* tokom 8 h gajenja. Velika i mala slova predstavljaju statistički značajnu razliku koja se odnosi na GOS3 i GOS4, redom.

4.2. Hemijska i biološka karakterizacija ekstrakata iz bobičastog voća

Sledeći korak istraživanja odnosio se na dobijanje i ispitivanje prebiotske aktivnosti potencijalnih prebiotika – polifenola – kao kožnih prebiotika. U prvom delu, izvršena je ekstrakcija fitohemikalija iz osam različitih vrsta bobičastog voća (pasji trn, malina, jagoda, crvena ribizla, crna ribizla, borovnica, divlja borovnica i aronija) primenom tradicionalne tehnike ekstrakcije – maceracije, primenom vode ili 70 % (v/v) etanola kao rastvarača. Svaki ekstrakt je okarakterisan određivanjem polifenolnog sastava i antioksidativne aktivnosti koristeći odgovarajuće spektrofotometrijske metode. Nakon karakterizacije ekstrakata, sledeći korak istraživanja je bio ispitivanje njihovog uticaja na rast bakterija kože, praćenjem promene optičke gustine tokom vremena gajenja mikroorganizama. Na osnovu rezultata koji su pokazali prebiotski efekat ekstrakata na sastav mikrobiote kože, izvršen je odabir vrste rastvarača, kao i bobičastog voća koje će biti predmet daljih istraživanja.

4.2.1. Određivanje sastava i antioksidativne aktivnosti ekstrakata

4.2.1.1. Koncentracija različitih klasa polifenolnih jedinjenja i redukujućih šećera

Radi bolje karakterizacije sastava vodenih ekstrakata, dobijenih metodom opisanom u poglavlju 3.2.1, određen je sadržaj ukupnih polifenola, kao i flavonoida, flavonola, antocijanina, fenolnih kiselina i hidrolizabilnih i kondenzovanih tanina. Takođe, u svim ekstraktima određen je i sadržaj redukujućih šećera, a rezultati pomenutih analiza za vodene i etanolne ekstrakte prikazani su u tabeli 4.1 i 4.2, redom.

Tabela 4.1. Sadržaj polifenolnih jedinjenja i šećera u različitim vodenim ekstraktima bobičastog voća

Voće	Polifenoli mg GAE/g	Flavonoidi mg QE/g	Flavonoli mg QE/g	Antocijanini mg Cy3GE/g	Fenolne kiseline mg CAE/g	Hidroliz. tanini mg GAE/g	Kondenz. tanini mg CyE/g	Reduk. šećeri mmol GE/g
Pasji trn	3,96±0,15 ^c	0,58±0,01 ^{ef}	0,23±0,01 ^c	n.d.	0,51±0,03 ^g	2,45±0,12 ^f	0,02±0,00 ^c	0,22±0,01 ^g
Malina	8,25±0,36 ^d	0,68±0,04 ^e	0,49±0,01 ^c	0,38±0,03 ^c	0,65±0,02 ^{fg}	3,38±0,16 ^{ef}	0,07±0,00 ^d	0,88±0,04 ^b
Jagoda	7,75±0,08 ^d	0,43±0,01 ^g	0,32±0,01 ^{de}	0,27±0,01 ^d	1,41±0,06 ^e	4,01±0,12 ^{de}	0,10±0,00 ^c	1,24±0,06 ^a
Crvena ribizla	5,15±0,16 ^e	0,50±0,02 ^{fg}	0,34±0,01 ^d	0,16±0,01 ^e	0,93±0,03 ^f	4,36±0,09 ^d	0,09±0,00 ^c	0,56±0,01 ^e
Crna ribizla	9,75±0,35 ^{b,c}	1,51±0,06 ^a	0,98±0,03 ^a	0,61±0,01 ^b	2,11±0,08 ^d	8,18±0,24 ^c	0,20±0,01 ^b	0,77±0,01 ^c
Borovnica	8,57±0,43 ^{c,d}	0,87±0,03 ^d	0,84±0,01 ^b	0,63±0,03 ^b	4,10±0,12 ^b	9,78±0,34 ^a	0,23±0,01 ^a	0,67±0,01 ^d
Divlja borovnica	10,19±0,44 ^b	1,12±0,03 ^c	0,93±0,05 ^{a,b}	0,72±0,03 ^a	3,32±0,16 ^c	9,21±0,20 ^{a,b}	0,18±0,00 ^b	0,43±0,01 ^f
Aronija	15,95±0,49 ^a	1,33±0,05 ^b	0,94±0,08 ^{a,b}	0,77±0,01 ^a	4,60±0,18 ^a	8,68±0,13 ^{b,c}	0,20±0,01 ^b	0,39±0,02 ^f

Rezultati su izraženi po gramima suve materije supstrata i prikazani kao srednja vrednost ± standardna devijacija. Različita slova u istoj koloni označavaju statistički ($p \leq 0,05$) značajnu razliku između ekstrakata.

Za ispitano bobičasto voće, sadržaj ukupnih polifenolnih jedinjenja u vodenim ekstraktima je bio od 3,96 mg GAE/g do 15,95 mg GAE/g. Kao najbogatiji izvori ovih jedinjenja ističu se ekstrakti aronije, divlje borovnice i crne ribizle, praćeni ekstraktima pitome borovnice, maline i jagode. Niža vrednost ukupnog sadržaja polifenola detektovana je u ekstraktu crvene ribizle, dok se ekstrakt pasjeg trna pokazao kao najsiromašniji izvor ovih jedinjenja u poređenju sa ekstraktima ostalog bobičastog voća. Sadržaj polifenola u ekstraktu crne ribizle je ~2 puta viši nego u ekstraktu crvene ribizle, što je u skladu sa rezultatima drugih istraživanja [190,218]. Sa druge strane, sadržaj ukupnih flavonoida je najviši u

ekstraktu crne ribizle (1,51 mg GAE/mL) dok je 3,5 puta manji, ujedno i najniži, u ekstraktu jagode. Kada je reč o flavonolima i antocijaninima, potklasama flavonoida, više koncentracije obe klase jedinjenja bile su u ekstraktima crne ribizle, aronije, divlje i pitome borovnice, dok su niže koncentracije bile prisutne u ostalim ekstraktima. Isti trend je uočen i u sadržaju ukupnih hidrolizabilnih i kondenzovanih tanina. Sadržaj ukupnih fenolnih kiselina je bio u opsegu od 0,51 mg CAE/g do 4,60 mg GAE/g. Sa druge strane, najviši sadržaj redukujućih šećera bio je u ekstraktima jagode i maline, voću poznatom po slatkom ukusu, a najniži u ekstraktu pasjeg trna.

Tabela 4.2. Sadržaj polifenolnih jedinjenja i šećera u različitim etanolnim ekstraktima bobičastog voća

Voće	Polifenoli	Flavonoidi	Flavonoli	Antocijanini	Fenolne kiseline	Hidroliz. tanini	Kondenz. tanini	Reduk. šećeri
	mg GAE/g	mg QE/g	mg QE/g	mg Cy3GE/g	mg CAE/g	mg GAE/g	mg CyE/g	mmol GE/g
Pasji trn	3,52±0,16 ^c	0,54±0,01 ^c	0,24±0,01 ^d	n.d.	0,51±0,02 ^g	2,50±0,11 ^c	0,03±0,00 ^f	0,26±0,01 ^f
Malina	8,10±0,28 ^d	0,71±0,03 ^d	0,46±0,01 ^c	0,19±0,01 ^c	0,61±0,01 ^{f,g}	3,71±0,15 ^d	0,07±0,00 ^c	0,83±0,03 ^c
Jagoda	9,77±0,33 ^c	0,47±0,02 ^c	0,44±0,01 ^c	0,23±0,01 ^c	1,60±0,07 ^c	3,41±0,13 ^{d,c}	0,12±0,00 ^d	1,52±0,06 ^a
Crvena ribizla	4,65±0,19 ^c	0,44±0,01 ^c	0,37±0,01 ^c	0,13±0,01 ^d	0,97±0,06 ^f	4,76±0,09 ^c	0,07±0,00 ^c	0,71±0,03 ^d
Crna ribizla	12,72±0,76 ^b	1,74±0,07 ^a	1,27±0,07 ^a	0,93±0,02 ^b	2,29±0,08 ^d	8,73±0,20 ^b	0,34±0,01 ^b	0,95±0,04 ^b
Borovnica	9,41±0,32 ^{c,d}	0,96±0,05 ^c	1,17±0,02 ^a	0,88±0,03 ^b	4,06±0,14 ^b	10,42±0,25 ^a	0,37±0,01 ^{a,b}	0,64±0,03 ^d
Divlja borovnica	13,02±0,68 ^b	1,17±0,05 ^b	0,89±0,02 ^b	1,15±0,05 ^a	3,53±0,17 ^c	11,02±0,47 ^a	0,28±0,01 ^c	0,48±0,01 ^c
Aronija	21,36±0,98 ^a	1,38±0,02 ^b	1,19±0,05 ^a	1,12±0,04 ^a	4,47±0,13 ^a	9,18±0,24 ^b	0,38±0,01 ^a	0,43±0,02 ^c

Rezultati su izraženi po gramima suve materije supstrata i prikazani kao srednja vrednost ± standardna devijacija. Različita slova u istoj koloni označavaju statistički ($p \leq 0,05$) značajnu razliku između ekstrakata.

Kao što se može videti iz tabele 4.2, sadržaj ukupnih polifenolnih jedinjenja u uzorcima dobijenim ekstrakcijom 70 % (v/v) etanolom je povišen u ekstraktima pasjeg trna, jagode, crne ribizle, divlje i pitome borovnice i aronije za 8,5-34 %, u poređenju sa odgovarajućim vodenim ekstraktima. Sadržaj polifenola u ekstraktu maline se nije promenio korišćenjem ovog rastvarača, dok je u slučaju ekstrakta crvene ribizle dobijen 10 % manji sadržaj ovih jedinjenja. U studiji Georgescu i saradnika, sadržaj polifenola u etanolnom ekstraktu crvene ribizle bio je 4,39 mg GAE/g što je u skladu sa dobijenim rezultatima. Sa druge strane, sadržaji polifenola u etanolnim ekstraktima crne ribizle i jagode bili su niži – 10,23 mg GAE/g i 7,79 mg GAE/g, redom, što odgovara vrednostima dobijenim za iste vodene ekstrakte u okviru ove doktorske disertacije. Međutim dvostruko bolje rezultate dobili su za ekstrakte borovnice, pasjeg trna i maline [218]. U nekoliko studija je pokazano da je etanolni ekstrakt divlje borovnice bogatiji polifenolima u odnosu na ekstrakt pitome borovnice, što je u skladu sa dobijenim rezultatima [219,220].

Mnogi autori su prijavljivali veće prinose polifenolnih jedinjenja korišćenjem mešavine etanola i vode u poređenju sa čistom vodom [221-223]. Viši prinosi polifenola mogu biti posledica razlike u polarnosti rastvarača. Rastvorljivost polifenola zavisi od polarnosti rastvarača, pa se tako, vodom, koja je polarni rastvarač (indeks polarnosti 10 [224]), ekstrahuju polifenolna jedinjenja visoke polarnosti, dok se 70 % (v/v) etanolom, kao manje polarnim rastvaračem (indeks polarnosti 6,34 [224]), mogu izolovati i hidrofobniji polifenoli. Pored toga, etanol može uticati na fosfolipidni sloj ćelijske membrane, čime se povećava njena permeabilnost, a samim tim i olakšava difuzija polifenolnih jedinjenja [225].

4.2.1.2. Antioksidativna aktivnost

Antioksidativna aktivnost ekstrakata određena je primenom četiri različite metode (FRAP, CUPRAC, ABTS i DPPH), a dobijeni rezultati za vodene i etanolne ekstrakte prikazani su u tabeli 4.3.

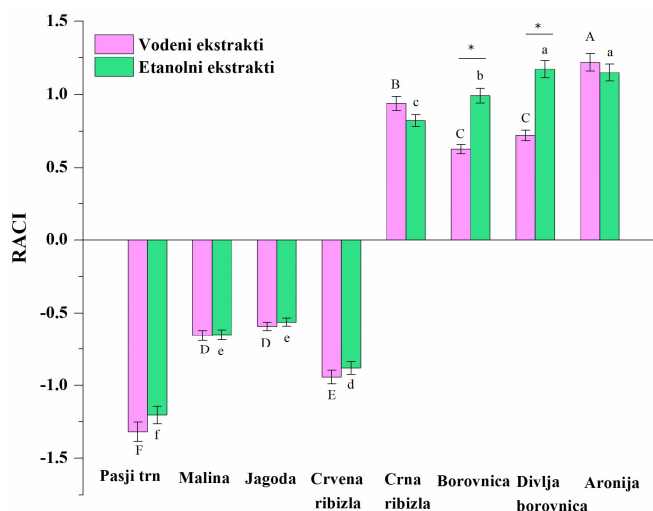
Tabela 4.3. Antioksidativna aktivnost vodenih i etanolnih (70 % (v/v)) ekstrakata bobičastog voća

Voće	Vodeni ekstrakti				Etanolni ekstrakti			
	FRAP μmol TE/g	CUPRAC μmol TE/g	ABTS μmol TE/g	DPPH μmol TE/g	FRAP μmol TE/g	CUPRAC μmol TE/g	ABTS μmol TE/g	DPPH μmol TE/g
Pasji trn	7,2±0,2 ^c	12,3±0,3 ^f	6,3±0,3 ^f	7,9±0,2 ^e	4,8 ±0,2 ^f	7,8±0,3 ^c	4,9±0,3 ^c	9,7±0,3 ^c
Malina	15,0±0,3 ^d	32,4±0,8 ^{d,c}	33,2±1,2 ^d	22,9±0,1 ^d	17,6±0,5 ^d	39,1±1,3 ^d	31,3±1,2 ^{d,c}	21,6±1,0 ^d
Jagoda	17,8±0,5 ^d	45,2±1,2 ^d	29,0±1,4 ^d	25,6±0,6 ^d	16,7±0,5 ^{d,c}	38,8±1,7 ^d	38,5±1,7 ^d	24,8±1,1 ^d
Crvena ribizla	9,4±0,2 ^c	22,5±0,7 ^c	19,7±0,8 ^c	21,4±0,3 ^d	10,1±0,2 ^{e,f}	15,6±0,6 ^c	23,4±0,9 ^e	19,3±0,8 ^d
Crna ribizla	57,3±2,4 ^a	145,4±6,5 ^b	53,7±1,8 ^{b,c}	58,7±1,8 ^b	76,1±3,2 ^b	131,3±4,3 ^{b,c}	79,3±3,4 ^b	51,9±2,4 ^c
Borovnica	46,9±1,6 ^c	105,8±3,1 ^c	57,5±2,3 ^{a,b}	51,8±1,7 ^c	84,0±3,8 ^a	145,4±3,1 ^b	69,8±2,8 ^c	70,3±2,6 ^b
Divlja borovnica	52,3±2,4 ^{a,b}	112,5±5,0 ^c	48,1±1,2 ^c	63,1±2,6 ^b	77,8±2,6 ^{a,b}	125,3±3,8 ^c	80,6±1,5 ^b	94,5±3,5 ^a
Aronija	47,6±0,8 ^{b,c}	171,0±4,2 ^a	63,1±1,9 ^a	75,5±1,4 ^a	53,5±2,1 ^c	192,0±5,7 ^a	95,6±4,3 ^a	66,8±2,4 ^b

Rezultati su izraženi po gramima suve materije supstrata i prikazani kao srednja vrednost ± standardna devijacija. Različita slova u istoj koloni označavaju statistički ($p \leq 0,05$) značajnu razliku između ekstrakata.

Kada je reč o vodenim ekstraktima, može se primetiti da vrednosti antioksidativne aktivnosti variraju od zavisnosti od primenjene metode. Pa tako, prema FRAP metodi, najveću antioksidativnu aktivnost pokazali su ekstrakti crne ribizle i divlje borovnice, dok je najniža vrednost dobijena za ekstrakte pasjeg trna i crvene ribizle. Prema svim ostalim metodama, kao najsnažniji antioksidant pokazao se ekstrakt aronije, dok je najslabiji bio ekstrakt pasjeg trna. Interesantno, u studiji u kojoj je dobijeno dvostruko više polifenola u vodenom ekstraktu crne ribizle nego u ekstraktu crvene ribizle, antioksidativna aktivnost merena ABTS metodom bila je identična, dok je u ovoj doktorskoj disertaciji antioksidativna aktivnost ekstrakta crvene ribizle trostruko niža u poređenju sa ekstraktom crne ribizle [190].

Antioksidativna aktivnost etanolnih ekstrakata je u zavisnosti od primenjene metode, u nekim slučajevima bila i do 80 % viša ili pak do 37 % niža u odnosu na odgovarajuće vodene ekstrakte. Stoga, kako bi sa sigurnošću moglo da se tvrdi da li tip rastvarača pozitivno ili negativno utiče na antioksidativnu aktivnost ekstrakata izračunat je indeks relativnog antioksidativnog kapaciteta (eng. *Relative antioxidant capacity index*, RACI), a dobijeni rezultati su prikazani na slici 4.3.



Slika 4.3. Indeks relativnog antioksidativnog kapaciteta (RACI) vodenih i etanolnih ekstrakata različitog bobičastog voća. Različita velika i mala slova ukazuju na statistički značajnu razliku ($p \leq 0,05$) između različitih etanolnih, odnosno različitih vodenih ekstrakata, redom. Zvezdica (*) ukazuje na statistički značajnu razliku ($p \leq 0,05$) između vodenog i etanolnog ekstrakta istog bobičastog voća.

Indeks relativnog antioksidativnog kapaciteta uzima u obzir rezultate svih primenjenih antioksidativnih metoda, čime se omogućava verodostojnije rangiranje antioksidativne aktivnosti dobijenih ekstrakata. Prema ovom indeksu, vodeni ekstrakti aronije i crne ribizle izdvojili su se kao oni sa najvišim antioksidativnim kapacitetom, a zatim ekstrakti divlje i pitome borovnice koji se statistički ne razlikuju ($p > 0,05$). Niži antioksidativni kapaciteti, koji takođe nisu pokazali statistički značajne razlike, bili su ekstrakti maline i jagode, praćeni ekstraktima crvene ribizle i pasjeg trna. Kod etanolnih ekstrakata je raspored bio sličan, pri čemu su se kao najbolji izdvojili ekstrakti aronije i divlje borovnice ($p > 0,05$), a zatim crne ribizle i pitome borovnice.

Ukoliko se uporede RACI vodenog i etanolnog ekstrakta istog bobičastog voća, može se primetiti da vrsta rastvarača ne utiče na promenu antioksidativnog kapaciteta kada su u pitanju pasji trn, malina, jagoda, crvena ribizla, crna ribizla i aronija. Sa druge strane, statistički značajne promene u antioksidativnom kapacitetu ($p \leq 0,05$) primećene su kod ekstrakata pitome i divlje borovnice, sa trendom da su etanolni ekstrakti imali izraženije antioksidativne kapacitete.

4.2.1.3. Korelacije između antioksidativne aktivnosti i polifenolnog sastava

Kako bi se stekao detaljniji uvid u veze između polifenolnog sastava ekstrakata i njihove antioksidativne aktivnosti, izračunati su Pirsonovi koeficijenti korelacije (eng. *Pearson correlation coefficient*, r), a dobijeni rezultati za vodene i etanolne ekstrakte prikazani su u tabelama 4.4 i 4.5, redom.

Tabela 4.4. Koeficijenti korelacije polifenolnog sastava i antioksidativne aktivnosti vodenih ekstrakata

	FRAP	CUPRAC	ABTS	DPPH	Polifenoli	Flavonoidi	Antocijanini	Flavonoli	Fenolne kiseline	Hidroliz. tanini	Kondenz. tanini
FRAP	1										
CUPRAC	0,937**	1**									
ABTS	0,911**	0,930**	1								
DPPH	0,939**	0,975**	0,943**	1							
Polifenoli	0,720**	0,881**	0,862**	0,888**	1						
Flavonoidi	0,898**	0,922**	0,798**	0,871**	0,740**	1					
Antocijanini	0,921**	0,911**	0,957**	0,961**	0,869**	0,822**	1				
Flavonoli	0,978**	0,943**	0,938**	0,956**	0,777**	0,919**	0,958**	1			
Fenol. kis.	0,816**	0,860**	0,881**	0,902**	0,799**	0,646**	0,857**	0,823**	1		
Hidroliz. t.	0,945**	0,884**	0,909**	0,927	0,684**	0,766**	0,902**	0,937**	0,916**	1	
Kondenz. t.	0,927**	0,902**	0,951**	0,921**	0,728**	0,745**	0,890**	0,914**	0,900**	0,970**	1

Zvezdice označavaju statistički značajnu korelaciju i to: * $p \leq 0,05$ i ** $p \leq 0,01$.

Dobijeni koeficijenti za vodene ekstrakte bobičastog voća su bili pozitivni i signifikantni pri kritičnom nivou signifikantne značajnosti od 1 % ($p \leq 0,01$). Korelacije između svih primenjenih antioksidativnih metoda bile su veoma jake (0,911-0,975), dok su sa sadržajem polifenola bile jake (0,720-0,881). Polifenoli su pokazali najbolju korelaciju sa antocijaninima (0,869), a najlošiju sa hidrolizabilnim taninima (0,684). S obzirom na to da su sa svim antioksidativnim metodama antocijanini (0,911-0,961) i kondenzovani tanini (0,902-0,951) dali najbolje rezultate, može se pretpostaviti da su oni u najvećoj meri odgovorni za dobra antioksidativna svojstva vodenih ekstrakata.

Tabela 4.5. Koeficijenti korelacije polifenolnog sastava i antioksidativne aktivnosti etanolnih ekstrakata

	FRAP	CUPRAC	ABTS	DPPH	Polifenoli	Flavonoidi	Antocijanini	Flavonoli	Fenolne kiseline	Hidroliz. tanini	Kondenz. tanini
FRAP	1										
CUPRAC	0,872**	1									
ABTS	0,861**	0,968**	1								
DPPH	0,910**	0,890**	0,858**	1							
Polifenoli	0,572*	0,888**	0,875**	0,679**	1						
Flavonoidi	0,827**	0,869**	0,837**	0,740**	0,739**	1					
Antocijanini	0,921**	0,975**	0,956**	0,947**	0,821**	0,889**	1				
Flavonoli	0,918**	0,937**	0,952**	0,799**	0,754**	0,889**	0,922**	1			
Fenol. kis.	0,828**	0,905**	0,943**	0,899**	0,792**	0,657**	0,902**	0,850**	1		
Hidroliz. t.	0,957**	0,903**	0,893**	0,964**	0,643**	0,791**	0,951**	0,889**	0,901**	1	
Kondenz. t.	0,924**	0,953**	0,975**	0,857**	0,779**	0,836**	0,939**	0,984**	0,927**	0,921**	1

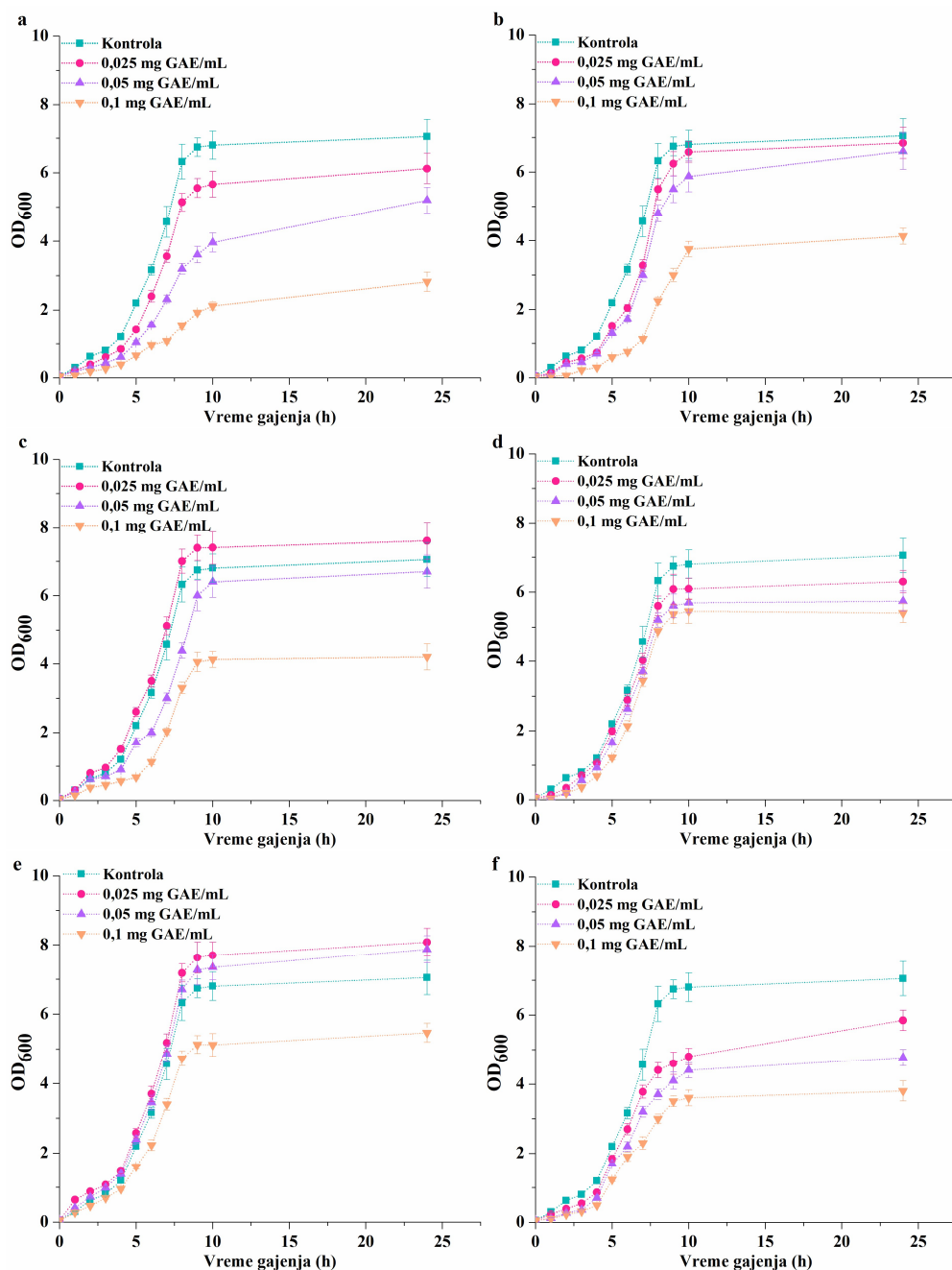
Zvezdice označavaju statistički značajnu korelaciju i to: * $p \leq 0,05$ i ** $p \leq 0,01$.

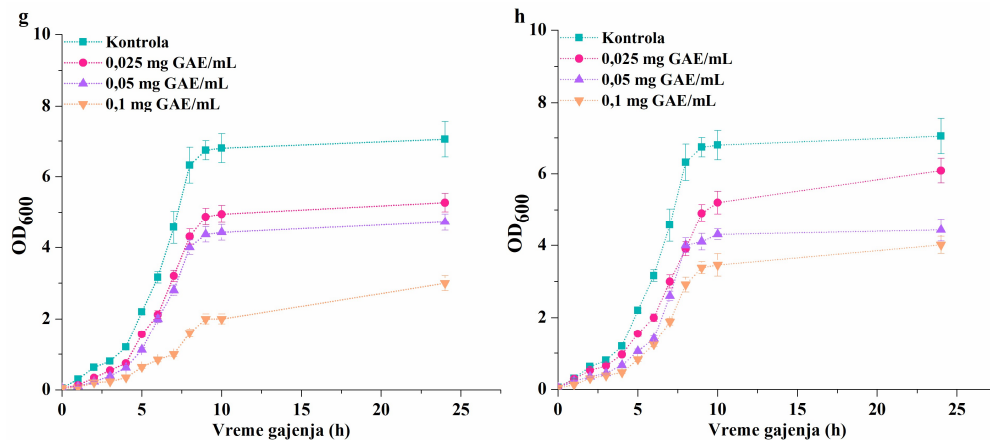
Rezultati koeficijenata etanolnih ekstrakata su takođe bili pozitivni i statistički signifikantni. U ovom slučaju, međusobne korelacije između antioksidativnih metoda su pokazale nešto slabije korelacije (0,858-0,968) u odnosu vrednosti dobijene za vodene ekstrakte. Veza polifenola sa FRAP metodom je bila umereno jaka (0,572), sa DPPH metodom je bila jaka (0,679), dok je sa ABTS i FRAP metodom bila veoma jaka (0,815-0,888). Takođe, dobijen je isti trend kao kod vodenih ekstrakata polifenoli su najbolji koeficijent korelacije pokazali sa antocijaninima (0,821), a najlošiji sa hidrolizabilnim taninima (0,643). Generalno, svi koeficijenti korelacije etanolnih ekstrakata bili su niži u poređenju sa koeficijentima korelacija dobijenim za vodene ekstrakte.

4.2.2. Identifikacija ekstrakata bobičastog voća sa prebiotskim efektom na mikrobiotu kože

4.2.2.1. Ispitivanje uticaja vodenih ekstrakata na rast bakterija *S. epidermidis* i *S. aureus*

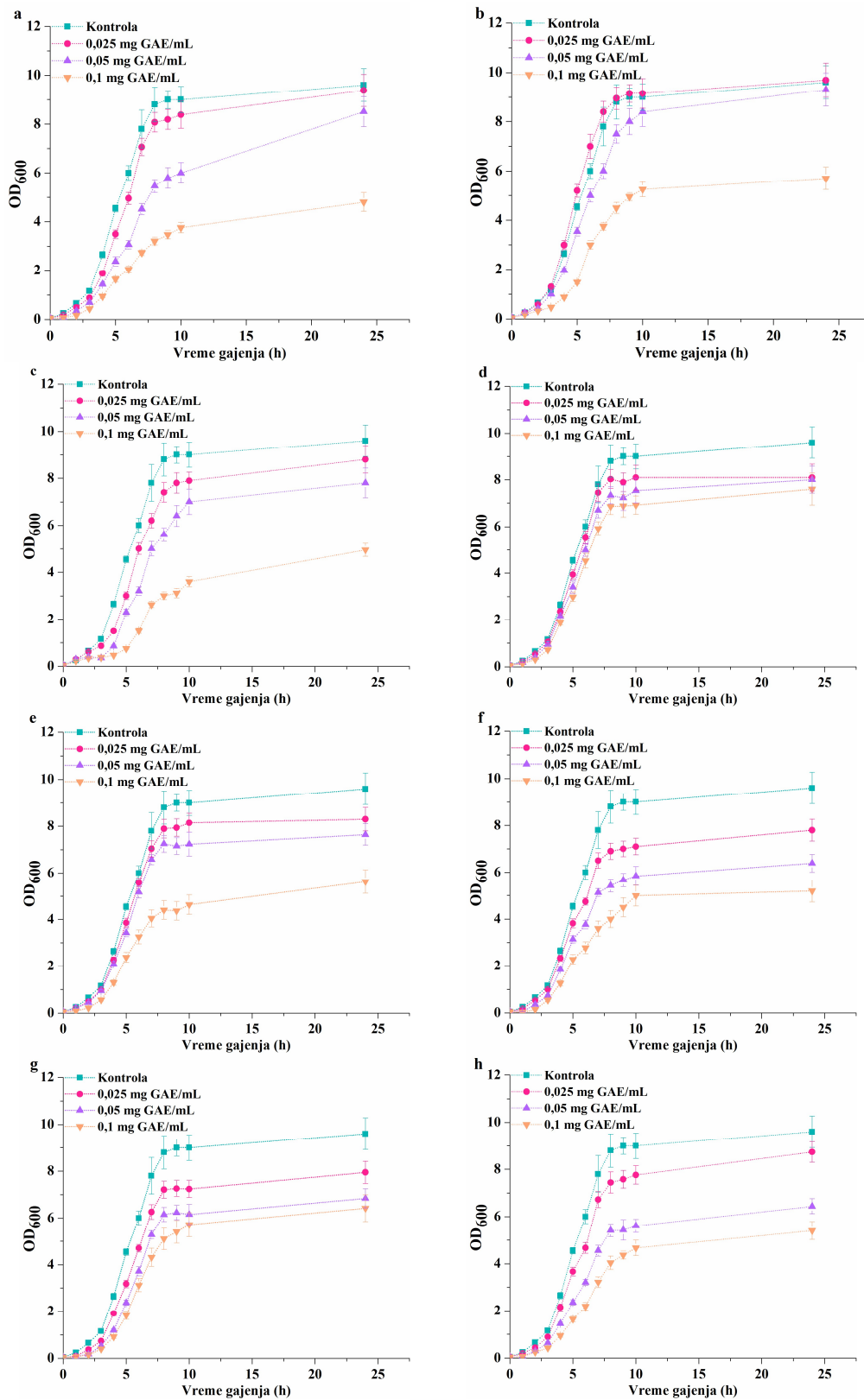
Efekat dobijenih vodenih ekstrakata ispitan je na rast bakterije *S. epidermidis*, predstavnika stalne mikrobiote kože, i bakterije *S. aureus*, člana prolazne mikrobiote sa patogenim potencijalom. Ekstrakti su dodati u tečnu hranljivu podlogu tako da krajnja koncentracijama ukupnih polifenola bude 0,025 mg GAE/mL, 0,05 mg GAE/mL i 0,1 mg GAE/mL. Početni broj obe bakterije u svim uzorcima je bio isti i iznosio je 10^7 CFU/mL. Kontrola je bila uzorak bez dodatog ekstrakta. Rast bakterija je praćen tokom 24 h gajenja, a na osnovu dobijenih rezultata merenja optičke gustine dobijene su krive rasta koje su prikazane na slici 4.4 za bakteriju *S. epidermidis*, i slici 4.5 za bakteriju *S. aureus*.





Slika 4.4. Uticaj vodenog ekstrakta pasjeg trna (a), maline (b), jagode (c), crvene ribizle (d), crne ribizle (e), borovnice (f), divlje borovnice (g) i aronije (h) na rast bakterije *S. epidermidis*.

Poređenjem postignute optičke gustine u podlozi sa ekstraktima u odnosu na kontrolnu podlogu konstatovano je da ekstrakt pasjeg trna inhibira rast bakterije *S. epidermidis* pri svim primenjenim koncentracijama, pri čemu je sa povećanjem koncentracije ekstrakta ovaj efekat bio izraženiji. Sa druge strane pri nižim koncentracijama ekstrakta maline (0,025 mg GAE/mL i 0,05 mg GAE/mL) bakterijski rast je bio blago inhibiran tokom eksponencijalne faze rasta, dok je nakon 24 h rast bakterije pri ovim koncentracijama bio isti sa kontrolnim uzorkom. Pri 0,1 mg GAE/mL ovog ekstrakta, period adaptacije je bio duži i trajao je oko 5 h, nakon čega je rast bio izrazito niži. Stepennost inhibicije nakon 24 h u odnosu na kontrolni uzorak bio je 40 %. Ekstrakt jagode je pri koncentraciji od 0,025 mg GAE/mL stimulisao rast *S. epidermidis*, pri čemu je ovaj efekat vidljiviji nakon 6 h gajenja. Pri višoj koncentraciji je postojala blaga inhibicija, dok je pri 0,1 mg GAE/mL, pored duže lag faze i brzina rasta bila manja. Rast *S. epidermidis* sa dodatkom vodenog ekstrakta crvene ribizle je pri svim primenjenim koncentracijama bio sličan kontroli tokom 8 h gajenja, nakon čega se može uočiti slabiji rast u odnosu na kontrolu. Stepennost inhibicije nakon 24 h bio je u opsegu 10-20 %. Interesantno, ekstrakt crne ribizle je stimulisao rast *S. epidermidis* pri 0,025 mg GAE/mL i 0,05 mg/mL tokom celog perioda gajenja, pri čemu je jači efekat bio pri najnižoj koncentraciji. Koncentracija od 0,1 mg/mL negativno je uticala na proliferaciju bakterijskih ćelija, uz stepennost inhibicije od 23 % nakon 24 h. Ekstrakti pitome i divlje borovnice su imali izraženo inhibitorno dejstvo na rast pri svim testiranim koncentracijama u opsegu od 17-46 % i 25-58 % redom, ukazujući na to da je ekstrakt divlje borovnice jače antimikrobno sredstvo od ekstrakta pitome borovnice. Na kraju, ekstrakt aronije u svim testiranim koncentracijama je uticao na smanjenje brzine rasta *S. epidermidis* tokom celokupnog perioda gajenja. Međutim, pri 0,025 mg GAE/mL stepennost inhibicije u odnosu na kontrolu bio je 24 %, nakon čega se smanjivao sve do 15 % koji je detektovan u 24. satu gajenja. Sumarno, vodeni ekstrakt jagode i crne ribizle imali su stimulatívni efekat na rast bakterije *S. epidermidis*, dok ostali ekstrakti nisu uticali na rast ili su pokazali inhibitorni efekat.



Slika 4.5. Uticaj vodenog ekstrakta pasjeg trna (a), maline (b), jagode (c), crvene ribizle (d), crne ribizle (e), borovnice (f), divlje borovnice (g) i aronije (h) na rast bakterije *S. aureus*.

Kada je u pitanju uticaj vodenih ekstrakata bobičastog voća na bakteriju *S. aureus* (slika 4.5), ekstrakt pasjeg trna je inhibirao rast pri koncentracijama od 0,05 mg GAE/mL i 0,1 mg GAE/mL, dok pri najnižoj koncentraciji rast je bio sličan kontrolnom uzorku. Ekstrakt maline je stimulisao rast ove bakterije pri 0,025 mg GAE/mL i 0,05 mg GAE/mL, dok su iste koncentracije ovog ekstrakta usporile rast komensalne bakterije *S. epidermidis*. S druge strane, ekstrakt jagode je pri svim koncentracijama inhibirao rast patogene bakterije *S. aureus*, nasuprot tome što je pri nižim koncentracijama stimulisao *S. epidermidis*. Upravo ovo ponašanje da ekstrakt promoviše rast korisne bakterije, a smanjuje rast patogene bakterije, ukazuje na njegovo potencijalno prebiotsko dejstvo. Sličan rezultat je pokazao i ekstrakt crne ribizle, koji je pri svim primenjenim koncentracijama inhibirao rast *S. aureus*. Ovaj efekat je za 0,025 mg GAE/mL i 0,05 mg GAE/mL vidljiv nakon 6 h gajenja, dok je za najvišu koncentraciju vidljiv već nakon lag faze od 2 h. Ostali ekstrakti (crvena ribizla, pitoma borovnica, divlja borovnica i aronija) pokazali su inhibiciju bakterije *S. aureus*, isti efekat koji su pokazali i prema komensalnoj bakteriji *S. epidermidis*. U studiji u kojoj su praćena antimikrobna svojstva ekstrakata različitog bobičastog voća na nekoliko vrsta bakterija, uključujući i *S. aureus* i *S. epidermidis*, potvrđen je isti efekat kao i u ovoj doktorskoj disertaciji za ekstrakt crne ribizle [226]. Tačnije, dobijena je jaka antimikrobna aktivnost usmerena prema bakteriji *S. aureus*, dok ista nije detektovana za *S. epidermidis*. Dodatno, ustanovljeno je da ekstrakti aronije i maline inhibiraju obe bakterije, što se takođe poklapa sa rezultatima dobijenim u ovoj doktorskoj disertaciji. Međutim, ekstrakt jagode u ranijoj studiji je inhibirao obe bakterije, pri čemu je *S. aureus* pokazao veću osetljivost na bioaktivna jedinjenja ekstrakta u odnosu na *S. epidermidis*. Takođe, ekstrakt pasjeg trna nije pokazao antimikrobnu aktivnost ni ka jednoj bakteriji, što odudara od rezultata ove studije [226].

Na osnovu uticaja testiranih ekstrakata na rast bakterija *S. epidermidis* i *S. aureus* u različitim koncentracijama, jasno je da postoji vrlo osetljiv balans između stimulacije i inhibicije, koji može biti posledica njihovog jedinstvenog hemijskog sastava. Ovi ekstrakti sadrže različite polifenole i koncentracije šećera, koji mogu imati kako pozitivan, tako i negativan uticaj na ljudsku mikrobiotu. Ranije su primećeni korisni efekti određenih polifenola (kumarinska kiselina, kofeinska kiselina, vanilinska kiselina, delfinidin i malvidin glikozidi) i ekstrakata bogatih polifenolima na predstavnike crevne mikrobiote, koji se manifestuju putem različitih metaboličkih puteva degradacije, u zavisnosti od njihove hemijske strukture [227-229]. Sa druge strane, brojna istraživanja su potvrdila antimikrobna svojstva ekstrakata bogatih polifenolima protiv komensalnih i patogenih mikroorganizama kože [230-234]

Kako bi se bolje razumeo ukupni efekat ekstrakata i primenjenih koncentracija na bakterije kože, kvantifikovan je prebiotski kapacitet (PK_{OD}) za vrednosti dobijene nakon 24 h rasta. Pozitivne vrednosti ukazuju da postoji pozitivan efekat u korist bakterije *S. epidermidis*, dok negativne vrednosti pokazuju da je došlo do povoljnijih uslova za rast patogene bakterije *S. aureus*. Sa druge strane, vrednosti jednake nuli ukazuju da ekstrakt nema efekta na odnos testiranih bakterija. Vrednosti izračunatog PK_{OD} prikazane su u tabeli 4.6.

Tabela 4.6. Prebiotski kapacitet vodenih ekstrakata bobičastog voća

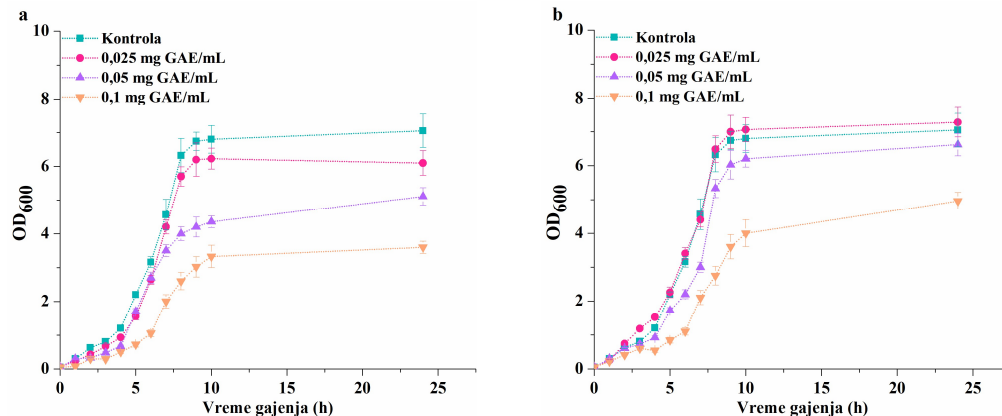
Voće	Koncentracija ekstrakta		
	0,025 mg GAE/mL	0,05 mg GAE/mL	0,1 mg GAE/mL
Pasji trn	-0,11	-0,15	0,10
Malina	-0,04	-0,03	-0,01
Jagoda	0,16	0,14	0,11
Crvena ribizla	0,05	-0,02	-0,03
Crna ribizla	0,28	0,34	0,21
Borovnica	0,02	0,01	0,00
Divlja borovnica	-0,09	-0,05	-0,08
Aronija	-0,05	-0,05	0,01

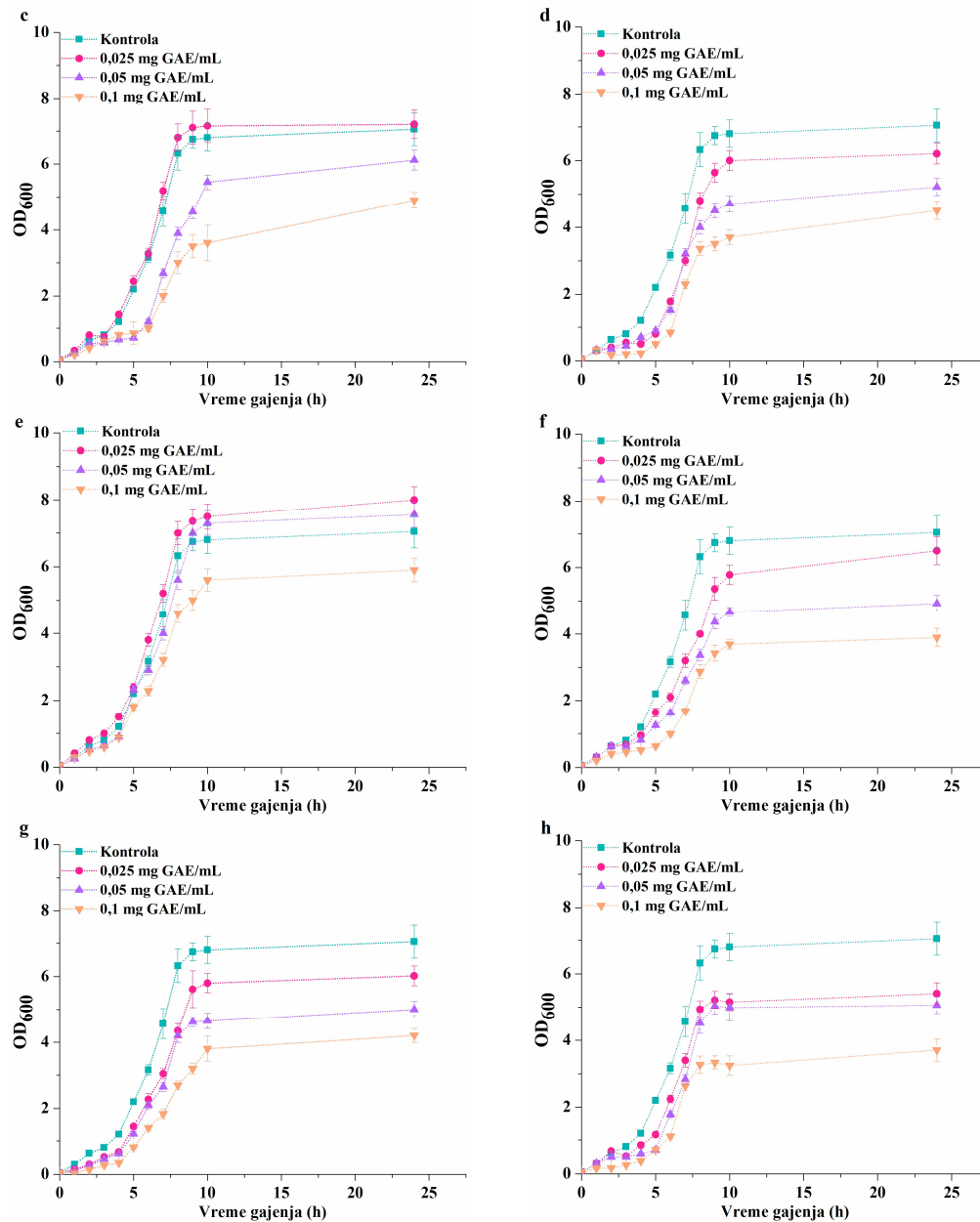
PK_{OD} pasjeg trna pri nižim koncentracija ima negativne vrednosti, a kako je rast obe bakterije bio inhibiran, ovo ukazuje da je bakterija *S. epidermidis* osetljivija na prisustvo ovog ekstrakta, odnosno da je veća inhibicija nje nego *S. aureus*. Nasuprot tome, koncentracija od 0,01 mg GAE/mL je dala pozitivan PK_{OD} (0,1) što bi značilo da postoji prebiotski efekat. Međutim, kako su obe bakterije bile inhibirane, rezultat ukazuje da pri ovoj koncentraciji *S. aureus* inhibiran više nego *S. epidermidis*. Iako veća inhibicija patogenih bakterija od korisnih bakterija može biti poželjna za modulaciju sastava mikrobiote kože, to nije bio cilj ovog istraživanja. Malina, crvena ribizla i borovnica dale su niske pozitivne i/ili negativne PK_{OD} čije su apsolutne vrednosti blizu nule, ukazujući na to da ukupni efekat ovih ekstrakata pri svim koncentracijama ne bi imao značajni efekat na odnos ove dve bakterije. Sa druge strane divlja borovnica je pri svim primenjenim koncentracijama dala negativne PK_{OD} što znači da ovaj ekstrakt u većoj meri inhibira *S. epidermidis* nego patogenu bakteriju *S. aureus*. Konačno, ekstrakti jagode i crne ribizle, dali su pozitivne vrednosti PK_{OD} pri svim primenjenim koncentracijama sa trendom da su vrednosti ekstrakta crne ribizle približno duplo više od vrednosti dobijene za ekstrakt jagode. S obzirom na to da su oba ekstrakta pri nižim koncentracijama pokazala stimulaciju *S. epidermidis*, a inhibiciju *S. aureus*, može se reći da ovi ekstrakti primenjeni u odgovarajućim koncentracijama imaju prebiotski potencijal za modulaciju sastava mikrobiote kože, a samim tim i lečenje kožne bolesti poput atopijskog dermatitisa [235,236]

4.2.2.2. Ispitivanje uticaja etanolnih ekstrakata na rast bakterija *S. epidermidis* i *S. aureus*

Radi poređenja efekta etanolnih ekstrakata sa efektom vodenih ekstrakata na rast bakterija *S. epidermidis* i *S. aureus*, urađen je eksperiment sa etanolnim ekstraktima pod istim uslovima. S obzirom na poznato antimikrobno dejstvo 70 % (v/v) etanola, ekstrakti su koncentrisani na vakuum uparivaču kako bi se etanol uklonio iz uzoraka, i time sprečio njegov uticaj na rezultat istraživanja. Konstruisane krive rasta predstavljene kao zavisnost optičke gustine od vremena gajenja mikroorganizama prikazane su na slici 4.6 za bakteriju *S. epidermidis*, i slici 4.7 za bakteriju *S. aureus*.

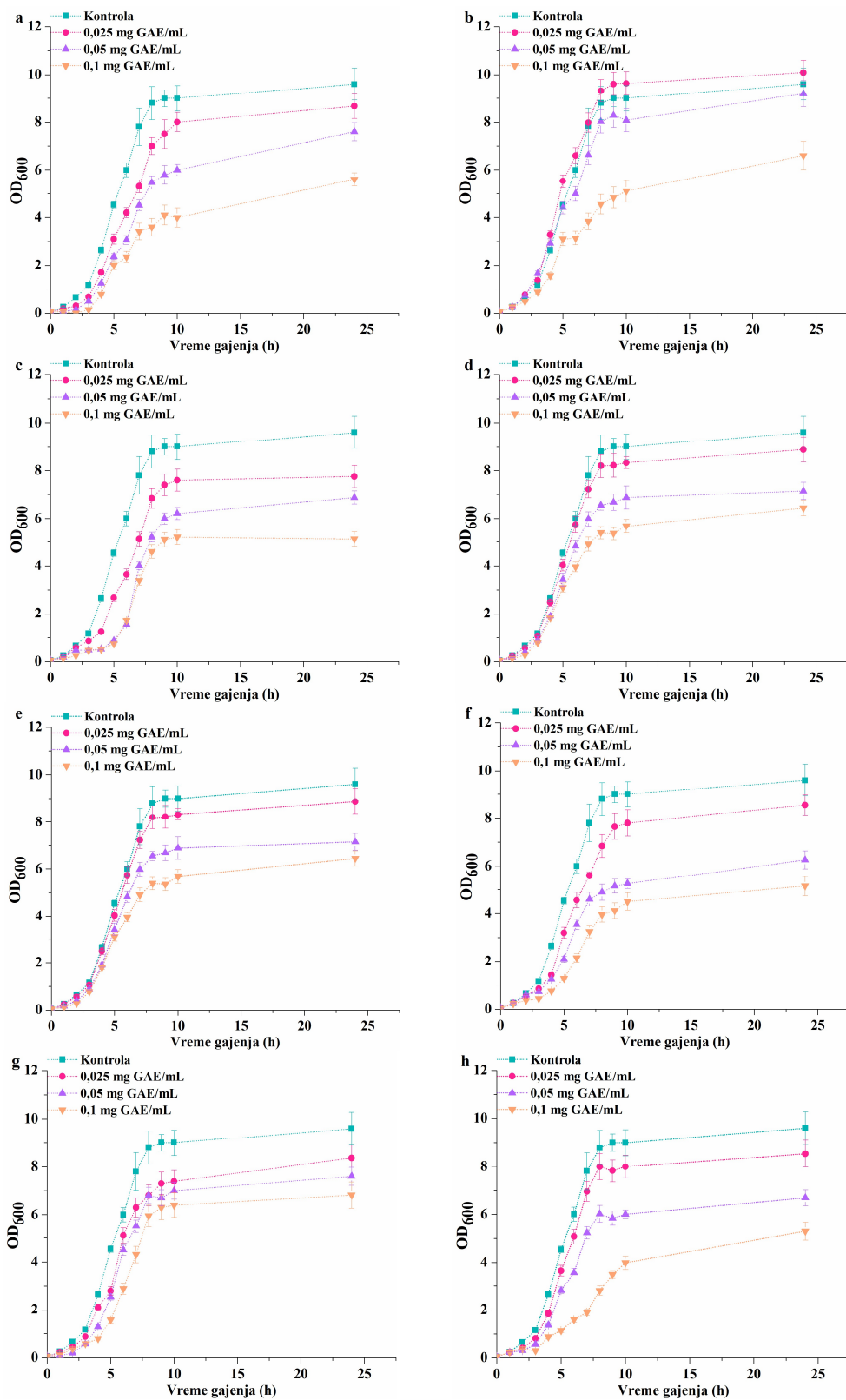
Kao što se može videti sa slike 4.6, etanolni ekstrakt pasjeg trna je pokazao antibakterijsku aktivnost prema *S. epidermidis*, sličnu onoj koju je pokazao i vodeni ekstrakt. Sa druge strane, etanolni ekstrakt maline je, nasuprot vodenom ekstraktu, pokazao blagu stimulaciju rasta ove bakterije pri 0,025 mg GAE/mL. Ostale koncentracije su pokazale inhibitorni efekat. Etanolni ekstrakti crvene ribizle, pitome borovnice, divlje borovnice i aronije inhibirali rast bakterije *S. epidermidis*, sa trendom da stepen inhibicije raste sa porastom koncentracije ekstrakta. Na kraju, etanolni ekstrakti jagode i crne ribizle su takođe imali stimulatívni efekat pri nižim koncentracijama, a inhibitorni pri višim, kao što je dobijeno i sa istim vodenim ekstraktima.





Slika 4.6. Uticaj etanolnog ekstrakta pasjeg trna (a), maline (b), jagode (c), crvene ribizle (d), crne ribizle (e), borovnice (f), divlje borovnice (g) i aronije (h) na rast bakterije *S. epidermidis*.

Svi etanolni ekstrakti (slika 4.7), osim ekstrakta maline, inhibirali su rast bakterije *S. aureus*, pri čemu je inhibicija bila izraženija pri višim koncentracijama ekstrakata. Etanolni ekstrakt maline je pri najmanjoj koncentraciji stimulisao rast ove patogene bakterije što je u suprotnosti sa rezultatima dobijenim za isti vodeni ekstrakt. S druge strane, pri višim koncentracijama 0,05-0,1 mg/mL bila prisutna inhibicija rasta, kao što je dobijeno i za vodeni ekstrakt.



Slika 4.7. Uticaj etanolnog ekstrakta pasjeg trna (a), maline (b), jagode (c), crvene ribizle (d), crne ribizle, (e), borovnice (f), divlje borovnice (g) i aronije (h) na rast bakterije *S. aureus*.

Za svaki etanolni ekstrakt određen je PK_{OD}, a dobijene vrednosti prikazane su u tabeli 4.7.

Tabela 4.7. Prebiotski kapacitet etanolnih ekstrakata bobičastog voća

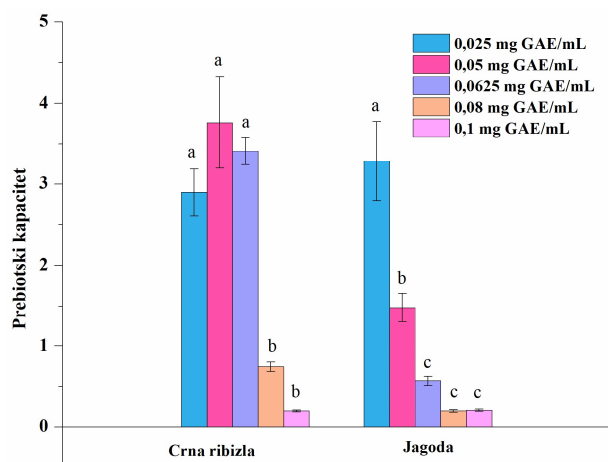
Voće	Konzentracija ekstrakta		
	0,025 mg GAE/mL	0,05 mg GAE/mL	0,1 mg GAE/mL
Pasji trn	-0,04	-0,07	-0,07
Malina	-0,02	-0,02	0,02
Jagoda	0,21	0,15	0,16
Crvena ribizla	0,03	-0,06	-0,04
Crna ribizla	0,21	0,33	0,17
Borovnica	0,03	0,05	0,02
Divlja borovnica	-0,02	-0,08	-0,11
Aronija	-0,12	0,02	-0,03

Dobijene vrednosti PK_{OD} za etanolne ekstrakte, koje odražavaju ukupan efekat ekstrakata na rast bakterija *S. epidermidis* i *S. aureus*, bile su slične onima koje su dobijene za odgovarajuće vodene ekstrakte. Konkretno, etanolni ekstrakti jagode i crne ribizle dali su pozitivan rezultat potvrđujući njihov potencijal da regulišu mikrobiološku disbiozu između bakterijskih vrsta *S. epidermidis* i *S. aureus* u korist komensalne bakterije, dok ostali ekstrakti nisu značajno uticali na odnos testiranih bakterija ili su u većoj meri pospešivali rast patogene bakterije. Nekoliko studija je potvrdilo da etanolni i vodeni ekstrakti različitih biljaka mogu imati sličan uticaj na rast mikroorganizama [237-242].

S obzirom na to da su etanolni i vodeni ekstrakti jagode i crne ribizle pokazali prebiotski efekat približnih vrednosti, za dalja ispitivanja kao rastvarač je izabrana voda. Pored toga, u cilju optimizacije procesa ekstrakcije kako bi se izolovale što veće koncentracije bioaktivnih jedinjenja, primenom enzimski potpomognute ekstrakcije, kao supstrati su odabrani upravo jagoda i crna ribizla.

4.2.2.3. Ispitivanje uticaja odabranih ekstrakata na ko-kulturu bakterija *S. epidermidis* i *S. aureus*

Svi dobijeni rezultati ukazuju na to da je pronalaženje specifičnih uslova u kojima će rast *S. epidermidis* biti podstaknut, dok će *S. aureus* biti inhibiran, vrlo kompleksno, ali ključno za buduće primene. Kako ova dva mikroorganizma koegzistiraju na ljudskoj koži i poznato je da međusobno interaguju, konačna procena prebiotskog kapaciteta vodenih ekstrakata crne ribizle i jagode ispitana je u eksperimentu sa ko-kulturom. Broj obe bakterije je bio podešen na 10⁷ CFU/mL, a koncentracije ekstrakata bile su 0,025 mg GAE/mL, 0,05 mg GAE/mL, 0,0625 mg GAE/mL, 0,08 mg GAE/mL i 0,1 mg GAE/mL. Uzorci su nanoseni na manitol slani agar, specijalizovani medijum koji omogućava razlikovanje koagulaza negativnih (*S. epidermidis*) i koagulaza pozitivnih (*S. aureus*) bakterija na osnovu različite obojenosti poraslih kolonija. U ovom slučaju, prebiotski kapacitet (PK_{CFU}) je izračunat na osnovu broja kolonija (CFU/mL), a dobijeni rezultati prikazani su na slici 4.8. Rezultati brojanja kolonija nakon 24 h su pokazali da ekstrakt crne ribizle pri koncentraciji od 0,025-0,08 mg GAE/mL povećao broj kolonija bakterije *S. epidermidis* u odnosu na kontrolni uzorak, dok pri je 0,1 mg GAE/mL primećen blagi pad u broju kolonije ove bakterije. Sa druge strane, ekstrakt jagode je doveo do povećanja broja kolonija *S. epidermidis* samo pri 0,025-0,05 mg GAE/mL, dok su veće koncentracije negativno uticale na broj kolonija u poređenju sa kontrolom. Oba ekstrakta su pri svim primenjenim koncentracijama uticale na smanjenje broja kolonija bakterije *S. aureus* u odnosu na kontrolu.



Slika 4.8. Prebiotski kapacitet ekstrakta crne ribizle i jagode na rast dobijen za ko-kulturu *S. epidermidis* i *S. aureus*. Različita mala slova označavaju statistički značajnu razliku ($p \leq 0,05$) između testiranih koncentracija svakog ekstrakta tropa.

Pozitivne vrednosti PK_{CFU} sugerišu da oba ekstrakta imaju prebiotski potencijal prema ispitivanim sojevima i kada rastu u ko-kulturi. Ekstrakt crne ribizle je pri koncentracijama 0,025-0,0625 mg GAE/mL dao najviše vrednosti PK_{CFU} (dostigavši maksimum od 3,76) koje se statistički značajno ne razlikuju ($p > 0,05$), dok je pri 0,08-0,1 mg GAE/mL PK_{CFU} bio ~0,2 ($p > 0,05$). Niže koncentracije polifenola su dovele do bolje proliferacije bakterije *S. epidermidis*, dok su inhibirale rast bakterije *S. aureus*, ukazujući na potencijal za regulaciju odnosa u broju ove dve bakterije. Sa druge strane, iako su dale pozitivne vrednosti PK_{CFU} , više koncentracije su inhibirale i rast *S. epidermidis*, pri čemu je antimikrobni efekat bio izraženiji prema *S. aureus*. Crna ribizla je najbogatija antocijaninima, za koje je poznat pozitivan efekat na rast korisnih bakterija gastrointestinalnog trakta [243-245], ali i negativan uticaj na rast različitih patogenih mikroorganizama [246,247]. Takođe, u velikom količinama sadrži i flavonole i proantocijanine za koje je u jednoj studiji pretpostavljeno da su odgovorni za stimulaciju rasta bakterije *S. epidermidis* [248,249]. Ekstrakt jagode je dao najveće vrednosti PK_{CFU} pri najnižoj primenjenoj koncentraciji, dok su se sa povećanjem koncentracije polifenola ove vrednosti smanjivale. Pri 0,025 - 0,05 mg GAE/mL rast *S. epidermidis* je bio stimulisan, dok sa daljim porastom koncentracija, broj ćelija ove bakterije se smanjivao. Inhibicija rasta *S. aureus* bila je prisutna pri svim primenjenim koncentracijama polifenola. Više studija je prijavilo inhibiciju rasta ovog patogena primenom ekstrakta jagode [250,251].

Poznato je da *S. epidermidis* putem različitih mehanizama delovanja može ograničiti rast *S. aureus* na koži održavajući ravnotežu u sastavu mikrobiote. U skladu sa tim, na osnovu sveobuhvatnih rezultata može se primetiti da adekvatna koncentracija ekstrakata jagode i crne ribizle može povoljno uticati na ovaj odnos i pospešiti antagonističko delovanje *S. epidermidis* usmereno ka *S. aureus*, pa je prebiotski kapacitet određen u uslovima koji su bliži realnim (ko-kultura) značajno veći nego u preliminarnom eksperimentu sa pojedinačnim kulturama. Takođe, prebiotski potencijal ekstrakta crne ribizle deluje značajno pogodniji za primenu jer obuhvata mnogo širi opseg koncentracija što olakšava doziranje potencijalnog proizvoda.

4.3. Hemijska i biološka karakterizacija ekstrakata bobičastog voća

Voćni tropovi su nusproizvodi prehrambene industrije koji se u velikim količinama dobijaju u industriji proizvodnje sokova, pa je njihovo ponovno korišćenje pogodan način da se smanji otpad i očuva životna sredina. Predstavljaju kašasti ostatak koji se sastoji od kore, pulpe, stabljika i semenki, a koji zaostaje nakon procesa ceđenja soka [252]. Iako se generalno smatraju otpadom, voćni tropovi ipak sadrže neki udeo fitohemikalija, te je iz tih razloga u ovoj disertaciji ispitan potencijal tropa crne ribizle, maline, jagode i aronije za primenu u kozmetici. Pomenuti tropovi su dobijeni nakon proizvodnje ceđenih sokova proizvođača „Floriva“, a kako su prethodni rezultati pokazali da vodeni i etanolni ekstrakti imaju slične efekte na mikrobiotu kože, u ovom koraku je klasična ekstrakcija tropova sprovedena isključivo korišćenjem vode kao rastvarača.

4.3.1. Određivanje sastava i antioksidativne aktivnosti ekstrakata

4.3.1.1. Koncentracija različitih klasa polifenolnih jedinjenja i redukujućih šećera

Karakterizacija vodenih ekstrakata tropa crne ribizle, maline, jagode i aronije određena je spektrofotometrijskim metodama, a dobijeni rezultati prikazani su u tabeli 4.8.

Tabela 4.8. Sadržaj polifenolnih jedinjenja i šećera u različitim ekstraktima tropa bobičastog voća

Voćni trop	Polifenoli mg GAE/g	Flavonoidi mg QE/g	Flavonoli mg QE/g	Antocijanini mg Cy3GE/g	Fenolne kisleline mg CAE/g	Hidroliz. tanini mg GAE/g	Kondenz. tanini mg CyE/g	Reduk. šećeri mmol GE/g
Crna ribizla	11,26±0,33 ^b	0,43±0,02 ^b	0,67±0,03 ^b	0,32±0,01 ^b	2,59±0,08 ^b	2,90±0,07 ^c	0,36±0,01 ^a	0,34±0,02 ^c
Malina	5,28±0,27 ^c	0,24±0,02 ^d	0,26±0,01 ^c	0,10±0,01 ^c	0,76±0,04 ^c	3,34±0,16 ^{b,c}	0,03±0,00 ^d	0,45±0,01 ^b
Jagoda	5,39±0,23 ^c	0,35±0,01 ^c	0,31±0,02 ^c	0,26±0,01 ^b	0,96±0,03 ^c	3,90±0,21 ^a	0,06±0,00 ^c	0,57±0,02 ^a
Aronija	13,39±0,78 ^a	0,80±0,0 ^a	0,92±0,05 ^a	0,68±0,03 ^a	4,09±0,20 ^a	6,37±0,24 ^a	0,27±0,01 ^b	0,32±0,01 ^c

Rezultati su izraženi po gramima suve materije supstrata i prikazani kao srednja vrednost ± standardna devijacija. Različita slova u istoj koloni označavaju statistički ($p \leq 0,05$) značajnu razliku između ekstrakata.

Koncentracija ekstrahovanih ukupnih polifenola iz četiri različita tropa bobičastog voća kretala se od 5,25 mg GAE/g do 13,39 mg GAE/g. Ukupni sadržaj polifenola bio je najveći u ekstraktu tropa aronije, zatim tropa crne ribizle, dok su ekstrakti tropa maline i jagode imali približno upola niži sadržaj u poređenju sa ekstraktima tropa crne ribizle i aronije. Što se tiče flavonoida, antocijanina, flavonola, fenolnih kiselina i hidrolizabilnih tanina, trop aronije se pokazao kao najbogatiji izvor. Sa druge strane, ekstrakt tropa maline je imao najnižu koncentraciju flavonoida i antocijanina, pri čemu nivoi flavonola i fenolnih kiselina nisu pokazali značajnu razliku ($p > 0,05$) u poređenju sa onima pronađenim u ekstraktu jagode. Zanimljivo, ekstrakt tropa crne ribizle imao je najniži sadržaj hidrolizabilnih tanina među svim ekstraktima, dok je istovremeno dao najviši nivo kondenzovanih tanina. Sadržaj polifenola u ekstraktima tropova bobičastog voća u velikoj meri zavisi kako od metode dobijanja tropova i procesa ekstrakcije, tako i od korišćene sorte voća. Stoga, postoji dosta studija koje su prijavile više, ali i niže vrednosti koncentracije polifenola u ekstraktima tropova bobičastog voća u poređenju sa rezultatima dobijenim u ovoj doktorskoj disertaciji [253-256]. Kada je reč o sadržaju redukujućih šećera, najviši sadržaj dao je trop jagode, zatim maline, i na kraju crne ribizle i aronije.

4.3.1.2. Antioksidativna aktivnost

Potencijal ekstrakata tropova bobičastog voća da deluju kao antioksidanti i spreče oksidativni stres ispitana je primenom četiri različite metode, a dobijeni rezultati prikazani su u tabeli 4.9.

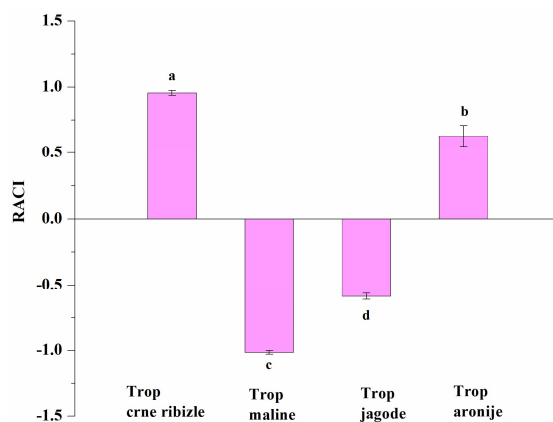
Tabela 4.9. Antioksidativna aktivnost različitih ekstrakata tropova bobičastog voća

Voćni trop	FRAP μmol TE/g	CUPRAC μmol TE/g	ABTS μmol TE/g	DPPH μmol TE/g
Crna ribizla	53,6 ± 2,5 ^a	187,4 ± 4,3 ^a	72,8 ± 5,4 ^a	46,3 ± 2,5 ^a
Malina	20,8 ± 1,8 ^c	64,8 ± 3,3 ^c	27,2 ± 2,4 ^c	22,9 ± 2,0 ^b
Jagoda	23,9 ± 0,5 ^c	102,0 ± 9,2 ^b	49,1 ± 4,8 ^b	24,9 ± 1,7 ^b
Aronija	33,9 ± 2,8 ^b	176,4 ± 12,7 ^a	60,1 ± 1,7 ^{a,b}	46,8 ± 3,1 ^a

Rezultati su izraženi po gramima suve materije supstrata i prikazani kao srednja vrednost ± standardna devijacija. Različita slova u istoj koloni označavaju statistički ($p \leq 0,05$) značajnu razliku između ekstrakata.

Prema FRAP metodi, najveću antioksidativnu aktivnost od 53,6 μmol TE/g pokazao je ekstrakt tropa crne ribizle, koji se značajno razlikuje od antioksidativne aktivnosti drugih ekstrakata koja je bila od 20,8 μmol TE/g do 33,9 μmol TE/g. ABTS testom se pokazalo da su ekstrakti tropa crne ribizle i aronije najefikasniji u uklanjanju slobodnih radikala, a potom ekstrakti tropa jagode i maline, pri čemu su dobijene vrednosti bile u opsegu od 27,2 μmol TE/g do 72,8 μmol TE/g. Najniža antioksidativna aktivnost ekstrakta tropa maline potvrđena je i CUPRAC metodom, koja je bila ~3 puta niža od vrednosti dobijenih za ekstrakte tropova crne ribizle i aronije. Na kraju, DPPH metoda je pokazala da su antioksidativni potencijali ekstrakta tropova crne ribizle i aronije, kao i ekstrakata tropova maline i jagode, bili uporedivi i nisu se statistički razlikovali ($p > 0,05$).

Dobijeni rezultati su u skladu sa nalazima studije u kojoj je pokazano da je antioksidativna aktivnost, određena DPPH metodom, slična između ekstrakata tropova aronije i crne ribizle (67,0–68,2 % inhibicija slobodnih radikala) i ~1,8 puta veća od jagode (39,4 % inhibicija slobodnih radikala) [257]. S druge strane, u studiji koja je takođe pratila antioksidativne karakteristike tropova bobičastog voća DPPH metodom, antioksidativna aktivnost ekstrakata tropova pokazala je rastući trend, rangirajući ih na sledeći način: trop crne ribizle < trop maline < trop jagode < trop aronije [258]. Neslaganja u rezultatima mogu se pripisati različitom sastavu tropova, verovatno usled različite sorte voća, uslova gajenja, stepena zrelosti ili načina prerade voća, starosti primenjenih tropova i dr. Prema vrednostima RACI (slika 4.9), najveću antioksidativnu aktivnost pokazao je ekstrakt tropa crne ribizle, praćen ekstraktom tropa aronije, zatim ekstrakt tropa jagode, dok je na poslednjem mestu ekstrakt tropa maline.



Slika 4.9. Indeks relativnog antioksidativnog kapaciteta (RACI) različitih ekstrakata tropova bobičastog voća. Različita mala slova ukazuju na statistički značajnu razliku ($p \leq 0,05$) ekstrakata.

4.3.1.3. Korelacije između antioksidativne aktivnosti i polifenolnog sastava ekstrakata tropova

Veza između antioksidativne aktivnosti i polifenolnih klasa za dobijene ekstrakte tropova bobičastog voća prikazane su u tabeli 4.10.

Tabela 4.10. Koeficijenti korelacije polifenolnog sastava i antioksidativne aktivnosti različitih ekstrakata tropova bobičastog voća

	FRAP	CUPRAC	ABTS	DPPH	Polifenoli	Flavonoidi	Antocijanini	Flavonoli	Fenolne kiseline	Hidroliz. tanini	Kondenz. tanini
FRAP	1										
CUPRAC	0,856**	1									
ABTS	0,887**	0,946**	1								
DPPH	0,831*	0,965**	0,864**	1							
Polifenoli	0,692*	0,920**	0,767**	0,963**	1						
Flavonoidi	0,318	0,724**	0,564	0,772**	0,879**	1					
Antocijanini	0,316	0,742**	0,598*	0,762**	0,858**	0,990**	1				
Flavonoli	0,611*	0,891**	0,738**	0,937**	0,989**	0,934**	0,917**	1			
Fenol. kis.	0,556	0,862**	0,694*	0,916**	0,979**	0,953**	0,936**	0,997**	1		
Hidroliz. t.	-0,165	0,329	0,148	0,394	0,565	0,878**	0,872**	0,666*	0,714**	1	
Kondenz. t.	0,972**	0,937**	0,913**	0,919**	0,833**	0,509	0,505	0,767**	0,722**	0,046	1

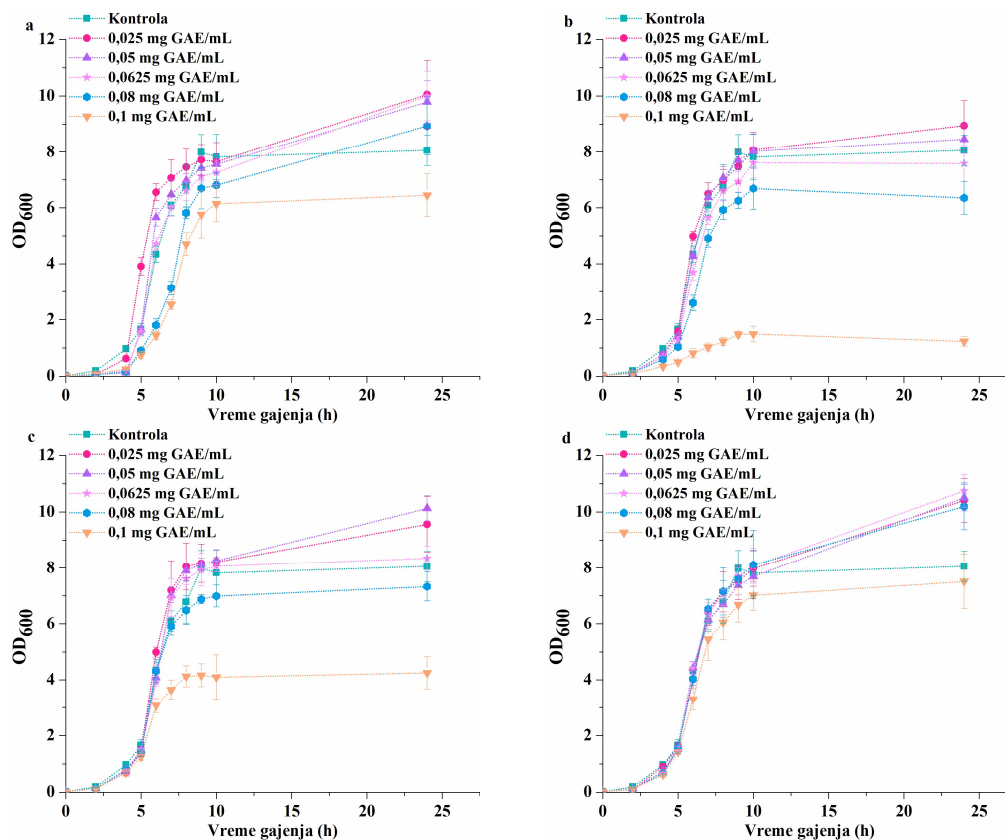
Zvezdice označavaju statistički značajnu korelaciju i to: * $p \leq 0,05$ i ** $p \leq 0,01$.

Koeficijenti korelacije koji su u opsegu od 0,831-0,965 ukazuju na veoma jaku i statistički značajnu pozitivnu korelaciju između antioksidativnih testova. Ovo sugerise da je antioksidativni kapacitet određen različitim metodama uporediv, i da ekstrakti koji pokazuju visoku antioksidativnu aktivnost jednim testom, verovatno će to pokazati i drugim testom. Kada je u pitanju sadržaj ukupnih polifenola, korelacije sa DPPH (0,963) i CUPRAC (0,920) metodama, bile su veoma jake, dok su korelacije sa ABTS (0,767) i FRAP (0,692) metodama bile jake. Interesantno, FRAP test je pokazao veoma jaku pozitivnu korelaciju sa ukupnim sadržajem kondenzovanih tanina (0,972) sugerisući da bi ova metoda mogla biti pogodna za procenu antioksidativne aktivnosti specifične klase polifenola – kondenzovanih tanina. Ovo bi potencijalno moglo da objasni visoku antioksidativnu aktivnost ekstrakta tropa crne ribizle u poređenju sa ostalim ekstraktima. Iako je ukupan sadržaj polifenola i drugih klasa polifenolnih jedinjenja znatno niži u poređenju sa ekstraktom tropa aronije, ekstrakt tropa crne ribizle sadrži više nivoa kondenzovanih tanina (tabela 4.8), a i značajno višu antioksidativnu aktivnost merenu FRAP metodom (tabela 4.9). Drugim rečima, kondenzovani tanini mogu biti odgovorni za povećanu antioksidativnu aktivnost tropa crne ribizle, kao što je objavljeno u prethodnim studijama [246,259]. Takođe, nekoliko studija je potvrdilo da oligomeri različitih flavonoida, u koje spadaju i kondenzovani tanini, mogu ispoljiti izrazito visoku antioksidativnu aktivnost u poređenju sa svojim monomernim jedinicama, što je u skladu sa rezultatima statističke analize sprovedene u ovoj doktorskoj disertaciji [110,260,261]. Dodatno, uočena je veoma slaba negativna korelacija između sadržaja hidrolizabilnih tanina i antioksidativne aktivnosti merene FRAP metodom (-0,165), dok su korelacije sa ostalim antioksidativnim metodama bile veoma slabe do slabe (0,148-0,394), što može ukazivati na to da ova klasa polifenolnih jedinjenja verovatno ne predstavlja glavni izvor antioksidativne aktivnosti u ispitivanim ekstraktima tropova bobičastog voća.

4.3.2. Identifikovanje ekstrakta sa prebiotskim efektom na mikrobiotu kože

4.3.2.1. Ispitivanje uticaja ekstrakata na rast bakterija *S. epidermidis* i *S. aureus*

Uticaj dobijenih vodenih ekstrakata tropova bobičastog voća analiziran je na prethodno opisan način. Praćen je uticaj dodatka ekstrakta u koncentracijama 0,025 mg GAE/mL, 0,05 mg GAE/mL, 0,0625 mg GAE/mL, 0,08 mg GAE/mL i 0,1 mg GAE/mL, u odnosu na kontrolnu podlogu bez ekstrakta. Konstruisane krive rasta prikazane su na slikama 4.10 i 4.11 za *S. epidermidis* i *S. aureus*, redom.

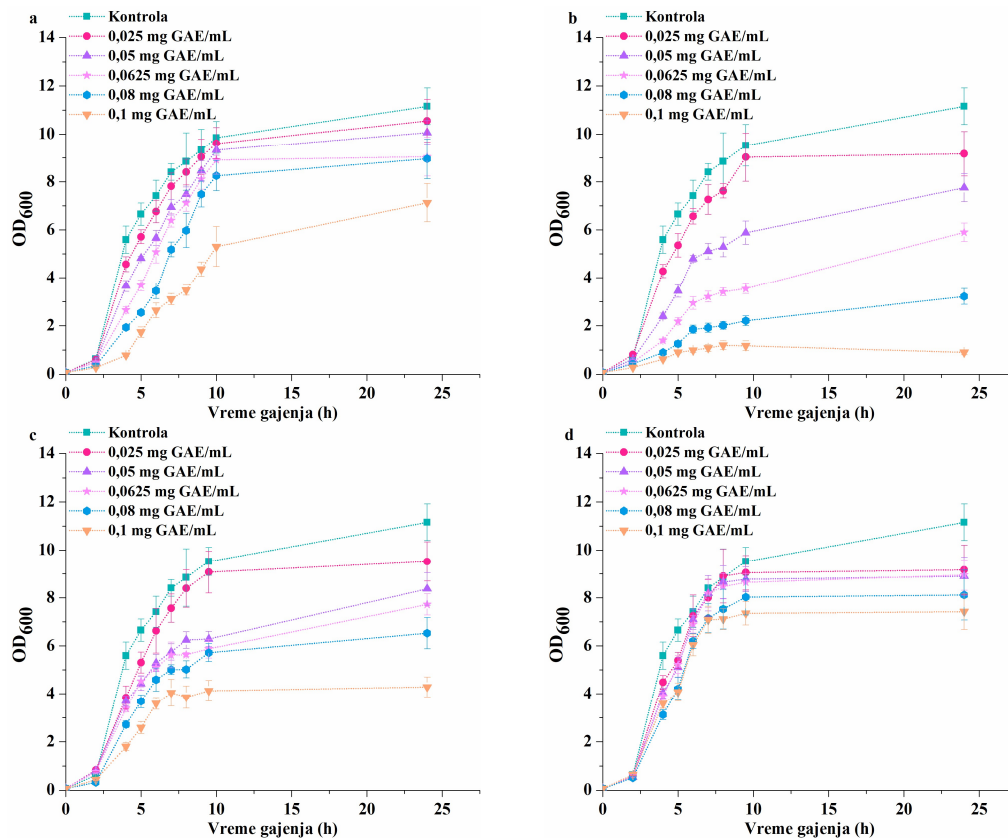


Slika 4.10. Uticaj ekstrakta tropa crne ribizle (a), maline (b), jagode (c) i aronije (d) na rast bakterije *S. epidermidis*.

Svi ekstrakti tropova bobičastog voća pokazali su da dejstvo na rast bakterije *S. epidermidis* zavisi od koncentracije primenjenih ekstrakata. Ekstrakt tropa crne ribizle pri koncentracijama od 0,025 mg GAE/mL i 0,05 mg GAE/mL doveo je do povećanja gustine rasta ove bakterije, dok pri 0,0625 mg GAE/mL nije zabeležen nikakav efekat. Sa druge strane, pri višim koncentracijama od 0,08 mg GAE/mL i 0,1 mg GAE/mL došlo je do smanjenja gustine rasta. Preostala tri ekstrakta nisu imala značajan uticaj na gustinu rasta pri koncentracijama u opsegu 0,025–0,0625 mg GAE/mL. Kada je koncentracija ekstrakata bila 0,08 mg GAE/mL, gustina rasta bila je blago smanjena za trop maline i jagode, dok je dalje povećanje koncentracije ekstrakata pokazalo značajniju inhibiciju rasta (82 % za malinu i 42 % za jagodu) u poređenju sa kontrolom. Ekstrakt tropa aronije pokazao je bakteriostatski efekat sa padom brzine rasta za 12 % samo pri najvišoj primenjenoj koncentraciji.

Nakon 24 h rasta, ekstrakti tropova crne ribizle i aronije stimulisali su rast bakterije *S. epidermidis* pri svim ispitivanim koncentracijama, sem pri 0,1 mg GAE/mL. Za ekstrakt tropa crne ribizle, maksimalna stimulacija od ~25 % postignuta je pri 0,025 mg GAE/mL, dok je za ekstrakt tropa aronije

stepen stimulacije rasta bio sličan pri primenjenim koncentracijama u opsegu 0,025–0,0625 mg GAE/mL i iznosio je u proseku ~30 %. Ekstrakt tropa maline je pokazao umeren stepen stimulacije pri dve najniže koncentracije (20 % i 15 %), dok je porast količine ekstrakta značajno usporio rast sve do maksimalnog stepena inhibicije od 85 % pri 0,1 mg GAE/mL. Slično tome, ekstrakt tropa jagode pri 0,0625 mg GAE/mL nije značajno uticao na vrednost optičke gustine uzorka posle 24 h gajenja, ali su niže koncentracije pospešivale rast *S. epidermidis* do ~20 % u poređenju sa kontrolom. Povećanje doze ovog ekstrakta povećavao je i stepen inhibicije rasta do maksimalnih 47 % pri 0,1 mg GAE/mL.



Slika 4.11. Uticaj ekstrakta tropa crne ribizle (a), maline (b), jagode (c) i aronije (d) na rast bakterije *S. aureus*.

Kao što se može videti sa slike 4.11, svi testirani ekstrakti su pokazali uticaj na gustinu rasta *S. aureus* pri svim koncentracijama ekstrakata većim od 0,025 mg GAE/mL, osim kada je reč o ekstraktu tropa aronije koji nije ispoljio značajan uticaj ni pri jednoj od ispitivanih koncentracija. Primećeno je da gustina rasta opada sa porastom koncentracije ekstrakata, pri čemu je maksimalno smanjenje od 89 % bilo pri 0,1 mg GAE/mL za ekstrakt tropa maline. Sličan trend se može uočiti i nakon 24 h rasta, gde je malina pokazala najveći stepen inhibicije (do 92 %), zatim jagoda (do 62 %), i na kraju crna ribizla (do 36 %) i aronija (do 34 %). Generalno, može se zaključiti da više koncentracije ekstrakata tropova slično deluju na obe vrste stafilokoka – veća inhibicija rasta u prisustvu ekstrakata tropova jagode i maline, a blaža inhibicija u prisustvu ekstrakata tropova crne ribizle i aronije. Takođe, viši stepeni inhibicije rasta dobijeni su za bakteriju *S. aureus*, ukazujući na njenu veću osetljivost na sastav ekstrakata u poređenju sa *S. aureus*. Prethodna istraživanja su pokazala da su neke Gram pozitivne bakterije, uključujući *S. epidermidis* i *S. aureus*, osetljive na ekstrakte bogate određenim vrstama tanina, poput galotanina. Štaviše, potvrđeno da je pentagalolil-O-β-D-glukoza povezana sa antimikrobnom aktivnošću usmerenoj

ka pomenutim bakterijama, pri čemu je bakterija *S. epidermidis* otpornija na prisustvo ovog jedinjenja u poređenju sa *S. aureus* [262-264]. S obzirom na to da su jagode i maline poznate kao prirodni izvori ovog jedinjenja [265], može se pretpostaviti da izražena inhibicija *S. aureus* upravo povezana sa ovim jedinjenjem.

Na osnovu prikazanih uticaja testiranih ekstrakata na rast pojedinačnih bakterijskih vrsta nakon 24 h rasta, njihov prebiotski efekat kvantifikovan je izračunavanjem PK_{OD}. Vrednosti dobijenih prebiotskih kapaciteta prikazanih u tabeli 4.11 su pozitivne, ukazujući na to da svi primenjeni ekstrakti tropova bobičastog voća imaju blagotvorni efekat na odnos bakterija *S. epidermidis* i *S. aureus*, odnosno da je favorizovan rast komensalne bakterije. Poređenjem ovih rezultata sa rezultatima eksperimenata sa ekstraktima bobičastog voća (tabela 4.7) može se zaključiti da ekstrakti tropova bobičastog voća imaju izraženiju prebiotsku aktivnost i da ju pokazuju u širokom opsegu koncentracija. Ovakav rezultat je jako poželjan iz aspekta razvoja proizvoda sa dermalnim prebioticima jer ukazuju na činjenicu da su jeftini nusproizvodi, čija primena je i u skladu sa principima cirkularne ekonomije, pogodnije sirovine za ekstrahovanje ovih aktivnih supstanci.

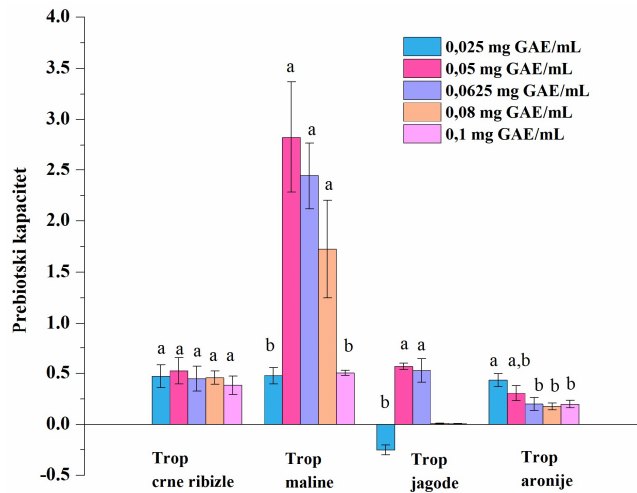
Kako su sva četiri ekstrakta pokazala potencijal za promenu sastava mikrobiote kože, odlučeno je da se sa svim tropovima nastavi dalji rad koji će biti usmeren ka testiranju njihovog efekta na ko-kulturu dva mikroorganizma i druge predstavnike mikrobiote kože, kao i optimizaciji enzimski potpomognute ekstrakcije u cilju dobijanja što većih prinosa bioaktivnih jedinjenja.

Tabela 4.11. Prebiotski kapacitet ekstrakata tropova bobičastog voća

Voćni trop	Koncentracija ekstrakata				
	0,025 mg GAE/mL	0,05 mg GAE/mL	0,0625 mg GAE/mL	0,08 mg GAE/mL	0,1 mg GAE/mL
Crna ribizla	0,22	0,24	0,35	0,24	0,11
Malina	0,22	0,29	0,35	0,45	0,06
Jagoda	0,26	0,43	0,28	0,27	0,11
Aronija	0,39	0,42	0,45	0,46	0,21

4.3.2.2. Ispitivanje uticaja odabranih ekstrakata na ko-kulturu bakterija *S. epidermidis* i *S. aureus*

Kako bi se potvrdio prebiotski efekat ekstrakata tropova bobičastog voća ispitan je i njihov uticaj na rast mešane kulture *S. aureus* i *S. epidermidis*, koji približnije opisuje njihov rast na koži. Broj kolonija nakon 24 h rasta na manitol slanom agaru je ukazao da pri koncentraciji ekstrakata tropa crne ribizle, maline, jagode i aronije u opsegu od 0,025-0,0625 mg GAE/mL je primećen veći broj kolonija u odnosu na kontrolu, dok je dalje povećanje koncentracije dovelo do smanjenja broja kolonija. Sa druge strane, sve primenjene koncentracije ovih ekstrakata su dovele do smanjenja broja kolonija bakterije *S. aureus* u poređenju sa kontrolom. Dobijeni rezultati PK_{CFU} prikazani su na slici 4.12.



Slika 4.12. Prebiotski kapacitet ekstrakta tropa crne ribizle, maline, jagode i aronije na rast dobijen za ko-kulturu *S. epidermidis* i *S. aureus*. Različita mala slova označavaju statistički značajnu razliku ($p \leq 0,05$) između testiranih koncentracija svakog ekstrakta tropa.

Svi testirani ekstrakti su dali različite vrednosti prebiotskog kapaciteta nakon 24 h rasta u mešanoj kulturi, a statistička analiza je pokazala različit uticaj koncentracija ekstrakata na njihov prebiotski potencijal. Ekstrakt tropa jagode je jedini pokazao negativnu vrednost PK_{CFU} što implicira da odgovarajuća koncentracija (0,025 mg GAE/mL) menja odnos između *S. epidermidis* i *S. aureus* u korist štetne bakterije. Pri visokim koncentracijama (0,08 mg GAE/mL i 0,1 mg GAE/mL) ovaj ekstrakt nije imao statistički značajan uticaj na PK_{CFU} , jer su oba soja bila inhibirana, dok su koncentracije od 0,05 mg GAE/mL i 0,625 mg GAE/mL pokazale prebiotski potencijal sa vrednostima PK_{CFU} od ~0,5. Ekstrakt tropa aronije je dao najvišu vrednost PK_{CFU} od ~0,5 pri najnižoj testiranoj koncentraciji, dok su veće koncentracije pokazale manje izražen efekat na odnos ova dva mikroorganizma. U slučaju ekstrakta tropa crne ribizle, testirani opseg koncentracija nije dao statistički značajnu promenu vrednosti PK_{CFU} , čiji je dostignut plato bio ~0,5.

Najbolji rezultati postignuti su sa ekstraktom tropa maline, koji je pokazao da vrednosti PK_{CFU} u velikoj meri zavise od primenjene koncentracije. Najveća i najmanja koncentracija pokazale su umeren prebiotski efekat (PK_{CFU} ~0,5), dok je pri 0,08 mg GAE/mL, 0,0625 mg GAE/mL i 0,05 mg GAE/mL vrednost PK_{CFU} bila 1,73, 2,44 i 2,85, redom, čime se trop maline ističe kao najperspektivniji izvor dermalnih prebiotika među testiranim tropovima. Poznato je da postoji antagonistički odnos između *S. epidermidis* i *S. aureus*, koji je dobro opisan u literaturi [266-268], i da je dodatno pojačan u hranljivoj podlozi obogaćenoj ekstraktom tropa maline ukazujući na sinbiotski efekat komensalne bakterije *S. epidermidis* i ovog ekstrakta [269]. Pored galotanina, malina je poznata i kao izvor ksilitola, dobro dokumentovanog kožnog prebiotika [270,271]. Istraživanja su pokazala da ksilitol efikasno smanjuje rast i formiranje biofilma bakterije *S. aureus*, dok sa druge strane podstiče rast bakterije *S. epidermidis* ili nema statistički značajnog efekta na njen rast [104,272], što sugerše moguće objašnjenje za visoku vrednost PK_{CFU} ekstrakta tropa maline primećenu u ovoj doktorskoj disertaciji.

4.4. Optimizacija enzimski potpomognute ekstrakcije fitohemikalija iz odabranog voća i tropova

Supstrati koji su pokazali da njihovi ekstrakti imaju potencijal za primenu kao kožni prebiotici su bili bobice crne ribizle i jagode, kao i trop crne ribizle, maline, jagode i aronije. Stoga, u ovom koraku izvršena je enzimski potpomognuta ekstrakcije fitohemikalija iz pomenutih materijala u cilju dobijanja ekstrakata sa bogatijim polifenolnim sadržajem. Optimizacija je urađena u nekoliko stupnjeva koji su podrazumevali odabir vrste i koncentracije enzimskog preparata, odnosa supstrata i rastvarača i vremena trajanja ekstrakcije.

4.4.1. Analiza monosaharidnog sastava polisaharida u supstratima

Da bi odabir enzimskih preparata koji mogu pospešiti ekstrakciju biomolekula iz ćelijskog zida biljnog materijala bio uspešno izvršen, neophodno je odrediti polisaharidni sastav materijala. Kako bi se u ovom smislu dodatno okarakterisali izabrani supstrati, podvrgnuti su totalnoj hidrolizi pomoću trifluorosirćetne kiseline. Jakom kiselinom razgrađene su glikozidne veze u prisutnim polisaharidima, a oslobođeni monosaharidi detektovani su pomoću gasne hromatografije. Udeli monosaharida (tabela 4.12) omogućili su uvid u polisaharide koji izgrađuju ćelijski zid supstrata. Pa tako, kada je reč o bobicama crne ribizle i jagode, glukoza predstavlja glavnu monosaharidnu komponentu sa udelom od 53,8-61,0 % koje najverovatnije potiče od celuloze. Međutim, prisustvo ksiloze i manoze, ukazuje da pored celuloze, sadrže i određene količine hemiceluloze. Visoki nivoi galakturonske kiseline u hidrolizatima crne ribizle i jagode ukazuju na to da obe voćke sadrže pektinske polisaharide, pri čemu je nešto veći udeo u crnoj ribizli (18,4 %). Uzimajući u obzir nivoje ramnoze, galaktoze i arabinoze, može se zaključiti da ovi pektinski polisaharidi uključuju i homogalakturonan i razgranati ramnogalakturonan [273].

Tropovi bobičastog voća dobijeni kao nusproizvod proizvodnje sokova, dali su drugačije profile monosaharidnog sastava prisutnih polisaharida u odnosu na profile bobica crne ribizle i jagode. Visok nivo galakturonske kiseline detektovan je u tropu maline, jagode i aronije (u proseku ~14,5 %), dok je skoro dvostruko manje bilo u tropu crne ribizle (7,8 %). Niži sadržaj pektinskih šećera u tropu crne ribizle može biti posledica gubitka pektina rastvorljivog u vodi usled visokog pritiska prilikom procesa proizvodnje soka [274]. Sa druge strane, udeo manoze je drastično viši u tropu crne ribizle u poređenju sa ostalim supstratima. Rezultat je potvrđen u nekoliko studija, koje ukazuju da je manoza dominantan šećer u semenu crne ribizle [275,276]. Tropovi maline, jagode i aronije sadrže velike količine glukoze (do 58,2 %), ali i ksiloze (do 19,5 %) i arabinoze (do 14,2 %), što može ukazivati na prisustvo ksilana ili arabinoksilana koji čine hemicelulozu, pored celuloze [277,278].

Tabela 4.12. Monosaharidni sastav prisutnih polisaharida u supstratima

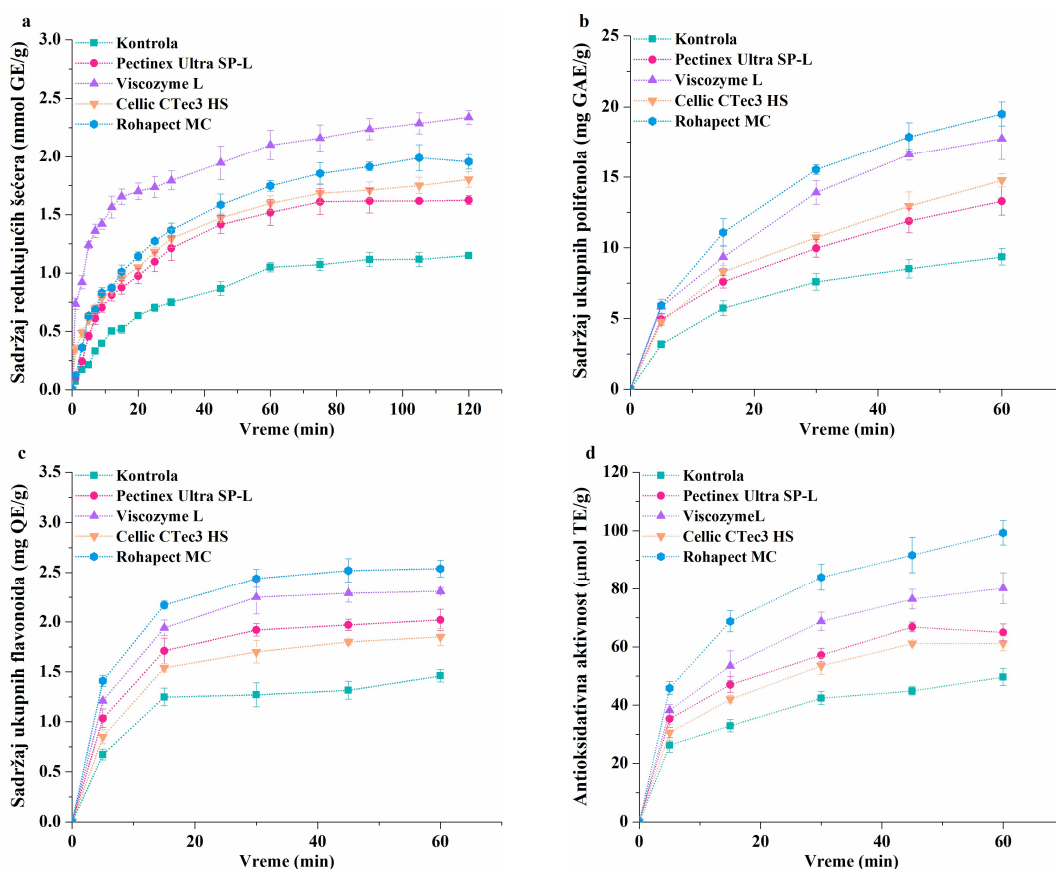
Voće ili voćni trop	Ksiloza (%)	Arabinoza (%)	Ramnoza (%)	Galaktoza (%)	Manoza (%)	Glukoza (%)	Galakturonska kiselina (%)
Crna ribizla	5,3 ± 0,1	1,4 ± 0,1	3,9 ± 0,1	6,3 ± 0,1	11,0 ± 0,1	53,8 ± 2,3	18,4 ± 0,3
Jagoda	8,6 ± 0,4	5,1 ± 0,1	2,2 ± 0,0	4,6 ± 0,0	1,3 ± 0,0	61,0 ± 0,7	17,3 ± 0,9
Trop crne ribizle	2,5 ± 0,1	6,6 ± 0,0	2,6 ± 0,1	6,2 ± 0,0	32,0 ± 1,6	42,2 ± 1,5	7,8 ± 0,4
Trop maline	19,5 ± 0,4	6,4 ± 0,3	2,6 ± 0,1	3,8 ± 0,2	1,1 ± 0,1	51,8 ± 2,7	14,8 ± 0,4
Trop jagode	13,5 ± 0,3	6,5 ± 0,3	2,4 ± 0,1	4,6 ± 0,1	0,8 ± 0,1	58,2 ± 1,7	14,0 ± 0,2
Trop aronije	15,0 ± 0,6	14,2 ± 0,3	0,6 ± 0,0	9,1 ± 0,1	1,3 ± 0,3	45,1 ± 0,2	14,8 ± 0,6

Rezultati su izraženi po gramima suve materije supstrata i prikazani kao srednja vrednost ± standardna devijacija.

4.4.2. Optimizacija enzimski potpomognute ekstrakcije fitoheikalija iz crne ribizle

4.4.2.1. Izbor enzimskih preparata

U prvom koraku optimizacije enzimski potpomognute ekstrakcije fitoheikalija iz crne ribizle, korišćena su četiri enzimska preparata - Viscozyme[®] L, Pectinex[®] Ultra SP-L, Cellic[®] CTec3 HS i Rohapect[®] MC, koja predstavljaju mešavinu enzima (sa različitim primarnim i sporednim aktivnostima) koji mogu da hidrolizuju polisaharide koji ulaze u sastav ćelijskog zida biljaka [279-283]. Izabrana temperatura bila je 50 °C, a kao rastvarač je korišćen acetatni pufer pH vrednosti 4,5. Koncentracija svakog od enzimskih preparata bila je 0,4 mL/g suve materije supstrata. Efikasnost procesa praćena merenjem sadržaja ukupnih redukujućih šećera da bi se pratio tok razgradnje strukturnih polisaharida, koncentracije ekstrahovanih polifenola i flavonoida, kao i antioksidativne aktivnosti ekstrakata određene FRAP metodom, a dobijeni rezultati (slika 4.13) su izraženi u odnosu na masu supstrata.



Slika 4.13. Praćenje efikasnosti ekstrakcije redukujućih šećera (a), polifenola (b) i flavonoida (c) i antioksidativna aktivnost ekstrakata crne ribizle dobijenih uz pomoć različitih enzimskih preparata.

Primena enzima u ekstrakciji povećala je sadržaj redukujućih šećera u svim uzorcima u poređenju sa kontrolnim uzorkom (uzorak bez enzima), što potvrđuje da je došlo do hidrolize ugljenih hidrata prisutnih u ćelijskom zidu crne ribizle. Najveća efikasnost u razgradnji ćelijskog zida postignuta je enzimskim preparatom Viscozyme[®] L. Nagli porast koncentracije redukujućih šećera detektovan je tokom prvog sata u svim uzorcima, dok u drugom satu nije bilo značajnih promena. Takođe, koncentracija ekstrahovanih jedinjenja i antioksidativne aktivnosti dostigle su plato nakon prvog sata, pa je vreme od 60 min odabrano kao optimalno vreme ekstrakcije pod pomenutim uslovima. Pa tako, nakon

60 min ekstrakcije potpomognute enzimima, ukupan sadržaj polifenola bio je 13,3 mg GAE/g za Pectinex[®] Ultra SP-L, 14,8 mg GAE/g za Cellic[®] CTec3 HS, 17,8 mg GAE/g za Viscozyme[®] L i 19,5 mg GAE/g za Rohapect[®] MC. Sadržaj polifenola dobijen primenom Rohapect[®] MC bio je ~2 viši u odnosu na sadržaj polifenola u kontrolnom uzorku. Najmanji sadržaj flavonoida dobijen je sa Cellic[®] CTec3 HS, dok je najviši sadržaj bio sa Rohapect[®] MC, koji je bio čak 74 % viši u odnosu na kontrolu (1,5 mg QE/g DM). Kao rezultat porasta sadržaja ukupnih polifenola, izmerena je i veća antioksidativna aktivnost uzoraka, koja je dvostruko poboljšana korišćenjem enzimskog preparata Rohapect[®] MC (100,0 μ mol TE/g) u poređenju sa kontrolom. Drugi po redu najbolji enzimski preparat bio je Viscozyme[®] L (80,2 μ mol TE/g) sa povećanjem antioksidativne aktivnosti od ~1,6 puta.

Razlike u efikasnosti testiranih enzimskih preparata mogu biti posledica različite aktivnosti i načina delovanja samih enzima na polisaharide prisutne u ćelijskom zidu crne ribizle. U jednom istraživanju je detaljnom analizom pokazano da polisaharidi prisutni u ćelijskom zidu crne ribizle obuhvataju celulozu, hemicelulozu odnosno ksilane, ksiloglukane i galaktomanane i značajnu količinu pektina, pri čemu je odnos delimično metilovanog homogalakturonana dvostruko viši od ramnogalakturonana I, dok je udeo ramnogalakturonana II bio znatno manji [284]. Pa tako, ključna aktivnost enzimskog preparata Viscozyme[®] L potiče od endo- β -glukanaze koja katalizuje hidrolizu (1,3)-ili (1,4)-veza u β -D-glukanima prisutnim u celulozi i ksiloglukanima. Pored toga, sporedne aktivnosti ksilanaza, hemicelulaza, pektinaza i arabinanaza dodatno povećavaju stepen razgradnje ćelijskog zida crne ribizle [281,285].

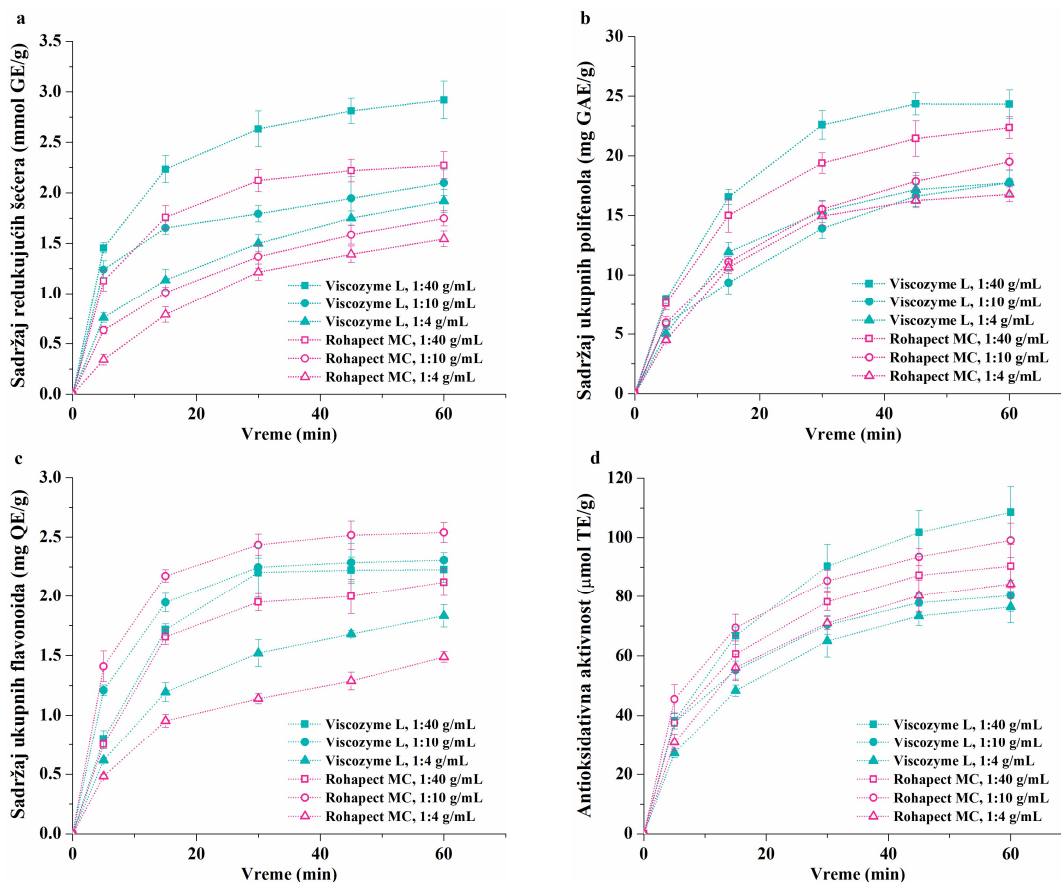
Nekoliko studija o enzimski potpomognutoj ekstrakciji fitohemikalija iz različitog bobičastog voća u prisustvu Viscozyme[®] L pokazalo je značajno veće prinose polifenola i šećera. U skladu sa tim, enzimska hidroliza brusnice pod istim uslovima ekstrakcije kao u ovoj disertaciji, sa deset puta manjom koncentracijom enzimskog preparata Viscozyme[®] L (0,04 mL/g), dala je prinos polifenola veći za 11 % i sadržaj šećera koji je bio ~3,6 puta viši u poređenju sa kontrolom [286]. Kada je Viscozyme[®] L korišćen za ekstrakciju fitohemikalija iz borovnice dobijeno je 30 % i 36,5 % više polifenola i šećera, respektivno, u poređenju sa kontrolom [179]. Poređenja radi, prinos polifenola u ekstraktu crne ribizle dobijenom u ovoj doktorskoj disertaciji primenom Viscozyme[®] L bio je viši za 51% u odnosu na kontrolu, dok je koncentracija redukujućih šećera porasla za čak 90,5% u poređenju sa kontrolom. Pomenute studije su ukazale da enzimska hidroliza hemiceluloze (glukana) u bobičastom voću povećava nivo šećera u ekstraktima, što ukazuje na izraženu celulaznu aktivnost enzimskog preparata Viscozyme[®] L. Međutim, razgradnja (hemi)celuloze u ćelijskom zidu crne ribizle jeste bitna, ali ne presudna za visok sadržaj redukujućih šećera koji je postignut primenom Viscozyme[®] L, jer je Cellic[®] CTec3 HS, enzimski preparat sa izraženom celulaznom i hemicelulaznom aktivnošću, dao značajno nižu koncentraciju redukujućih šećera.

Slično tome, dva testirana pektinolitička enzimski preparata, Pectinex[®] Ultra SP-L (primarna enzimski aktivnost potiče od endo-poligalakturonaze) i Rohapect[®] MC (primarna aktivnost potiče od pektin (metil) esteraze, pri čemu ima i značajnu aktivnost pektin-liaze) pokazuju različitu efikasnost u razgradnji ćelijskog zida crne ribizle i ekstrakciji polifenola [282,287]. Generalno, pektinolitički enzimi pomažu u razgradnji srednje lamele i primarnog ćelijskog zida, čime povećavaju sadržaj redukujućih šećera i oslobađaju polifenolna jedinjenja locirana u ćelijskim vakuolama [285]. Korišćenjem Rohapect[®] MC oslobođeno je samo ~15 % više redukujućih šećera u poređenju sa Pectinex[®] Ultra SP - L, ali je sadržaj polifenola bio za ~47 % viši. Može se pretpostaviti da je glavni razlog za ovakav rezultat niska aktivnost pektin metil esteraze u enzimskom preparatu Pectinex[®] Ultra SP-L, zbog čega endopoligalakturonaza nije u mogućnosti da efikasno hidrolizuje pektin, jer je uklanjanje metil grupa neophodno za optimalnu aktivnost ovog enzima [287].

Imajući u vidu sve rezultate, može se zaključiti da su najefikasniji enzimski preparati za ekstrakciju fitohemikalija iz crne ribizle Rohapect[®] MC i Viscozyme[®] L, pa je dalja optimizacija enzimski potpomognute ekstrakcije nastavljena upravo sa njima.

4.4.2.2. Odnos rastvarača i supstrata

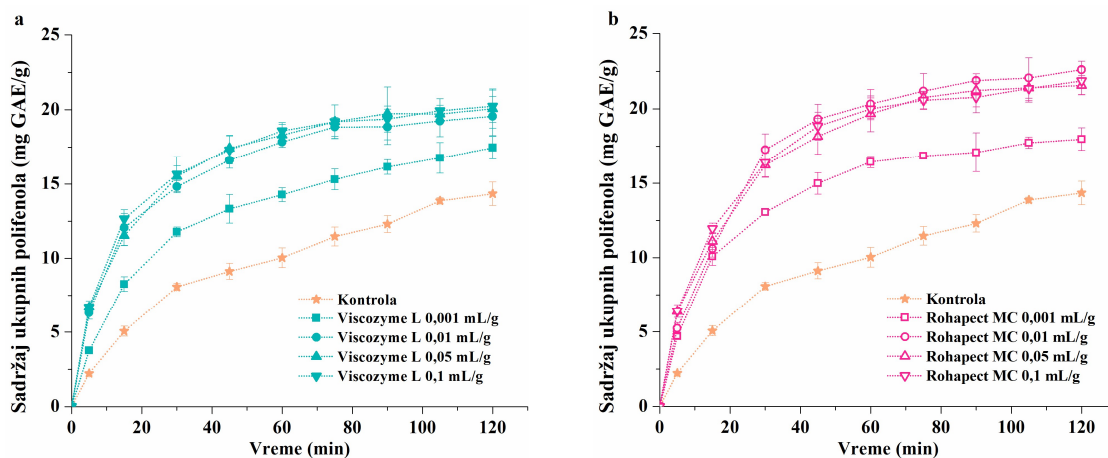
Sledeći korak optimizacije ekstrakcije podrazumevao je odabir adekvatnog odnosa rastvarača i supstrata, u prisustvu enzimskog preparata Rohapect[®] MC i Viscozyme[®] L pri koncentraciji od 0,4 mL/g supstrata. Testirana su tri odnosa čvrste (u g) i tečne (u mL), 1:4, 1:10 i 1:40, a dobijeni rezultati (slika 4.14) ukazuju da se efikasnost ekstrakcije redukujućih šećera povećava sa povećanjem razblaženja sistema. Ovo je u skladu sa principima prenosa mase, jer kada je količina rastvarača veća, koncentracija rastvorene supstance u samom rastvaraču je niža, što dovodi do većeg koncentracionog gradijenta između čvrste supstance i rastvarača, što pomaže u efikasnijem prenosu mase [288]. Međutim, primetno je da je najveći sadržaj flavonoida i antioksidativna aktivnost postignuta pri odnosu 1:10 sa enzimskim preparatom Rohapect[®] MC, kao i to da je pri istom odnosu takođe postignut najviši sadržaj flavonoida korišćenjem Viscozyme[®] L. Drugi su primetili sličan trend ukazujući na to da povećanje odnosa između supstrata i rastvarača ne mora nužno dovesti do povećanja prinosa ekstrakcije [289-291]. S obzirom na to da je odnos supstrata i rastvarača 1:10 dao zadovoljavajuće rezultate i da su dobijeni ekstrakti koncentrovani (polifenoli su akumulirani u manjoj zapremini rastvarača), ovaj odnos je izabran za dalja ispitivanja jer bi u budućem ekstrakcionom procesu bile potrebne manje zapremine ekstrakcionih sudova i olakšane kasnije faze koncentrovanja proizvoda.



Slika 4.14. Ekstrahovana količina redukujućih šećera (a), masa polifenola (b) i flavonoida (c) i antioksidativna aktivnost ekstrakata crne ribizle pri različitim odnosima supstrata i rastvarača, u prisustvu enzima Rohapect[®] MC i Viscozyme[®] L

4.4.2.3. Koncentracija enzimskih preparata

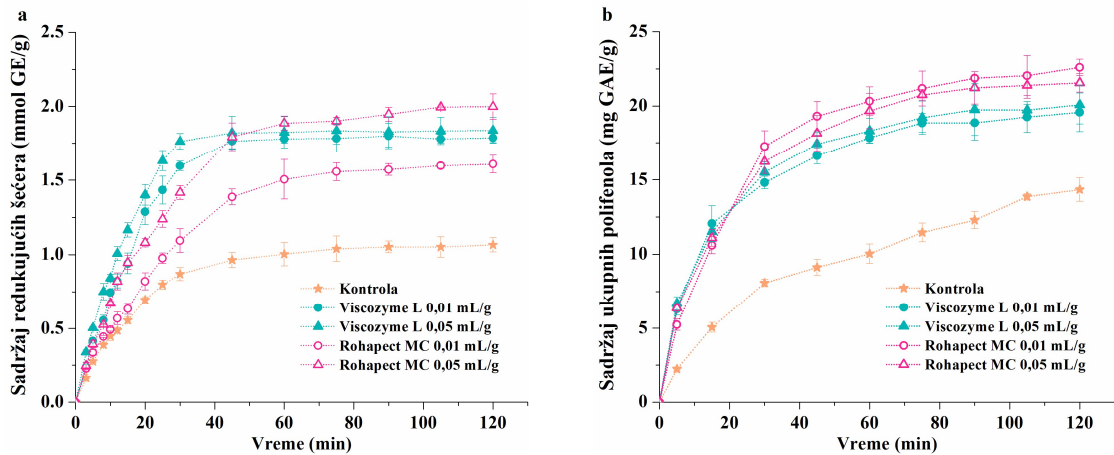
Nakon izbora najefikasnijih enzimskih preparata i optimalnog odnosa između supstrata i rastvarača, razmatran je uticaj koncentracije enzima na tok ekstrakcije polifenola iz crne ribizle. Ovde je potrebno naglasiti da početna koncentracija enzimskog preparata od 0,4 mL/g znatno viša u poređenju sa uobičajenim koncentracijama koje se koriste za degradaciju biljnih ćelijskih zidova [179,286,287]. Međutim, iako je doza veća, olakšala je selekciju najpogodnijih enzimskih preparata i količine rastvarača, što je omogućilo dalju optimizaciju koncentracije enzimskog preparata sa namerom da se poveća ekonomičnost procesa. Stoga, ispitan je uticaj enzimskih preparata Viscozyme[®] L i Rohapect[®] MC u opsegu koncentracija od 0,001 mL/g do 0,1 mL/g, a rezultati sadržaja ukupnih polifenola prikazani su na slici 4.15. S obzirom na to da je koncentracija enzima smanjena do 400 puta, vreme ekstrakcije je povećano na 120 min kako bi se bolje ispratio uticaj nižih koncentracija.



Slika 4.15. Sadržaj ukupnih polifenola u ekstraktima crne ribizle pri različitim koncentracijama enzimskog preparata Viscozyme[®] L (a) i Rohapect[®] MC (b)

Kada je u pitanju enzimski preparat Viscozyme[®] L, može se primetiti da sa povećanjem koncentracija enzima od 0,001 do 0,01 mL/g, 0,05 mL/g i 0,1 mL/g, nakon 120 min sadržaj polifenola se povećao za 12 %, 15 % i 16 %, redom. Male razlike u prinosima ukazuju na to da je pri 0,01 mL/g enzim zasićen supstratom, i da dalji porast koncentracije nije imao uticaja na enzimsku hidrolizu. Što se tiče Rohapect[®] MC, sadržaj polifenola je rastao sa povećanjem doze enzima sve do 0,01 mL/g, nakon čega je ostao gotovo nepromenjen. Radi boljeg poređenja efikasnosti ekstrakcije primenom Viscozyme[®] L i Rohapect[®] MC, za koncentracije enzimskog preparata od 0,01 mL/g i 0,05 mL/g, sadržaj ukupnih redukujućih šećera i polifenola prikazani su na slici 4.16. Kao što se može primetiti, celulolitički preparat Viscozyme[®] L je za obe primenjene koncentracije dao sličan sadržaj polifenola, ~1,8 mmol GE/g nakon samo 60 min, pri čemu je stepen hidrolize polisaharida crne ribizle bio znatno viši u poređenju sa stepenom hidrolize dobijenim uz pomoć Rohapect[®] MC. Ovo implicira da je enzimski preparat Viscozyme[®] L superiorniji u razgradnji ćelijskog zida čak i pri nižim koncentracijama nego Rohapect[®] MC. S druge strane, kada je primenjen Rohapect[®] MC, postignut je viši nivo polifenola nego sa Viscozyme[®] L pri obe testirane koncentracije, ukazujući na to da efikasnost ekstrakcije aktivnih jedinjenja nije direktno proporcionalna stepenu degradacije ćelijskog zida. To može biti zbog toga što biljni materijal pored slobodnih polifenola koji se nalaze unutar vakuola biljnih ćelija i mogu se uspešno ekstrahovati rastvaračem, sadrži i polifenole kovalentno vezane za strukturne komponente ćelijskog zida, koje je moguće izolovati tek nakon raskidanja tih veza [121,292]. Štaviše, može se pretpostaviti da su glavne i sporedne aktivnosti enzima Rohapect[®] MC odgovorne kako za razgradnju pektina, tako i za

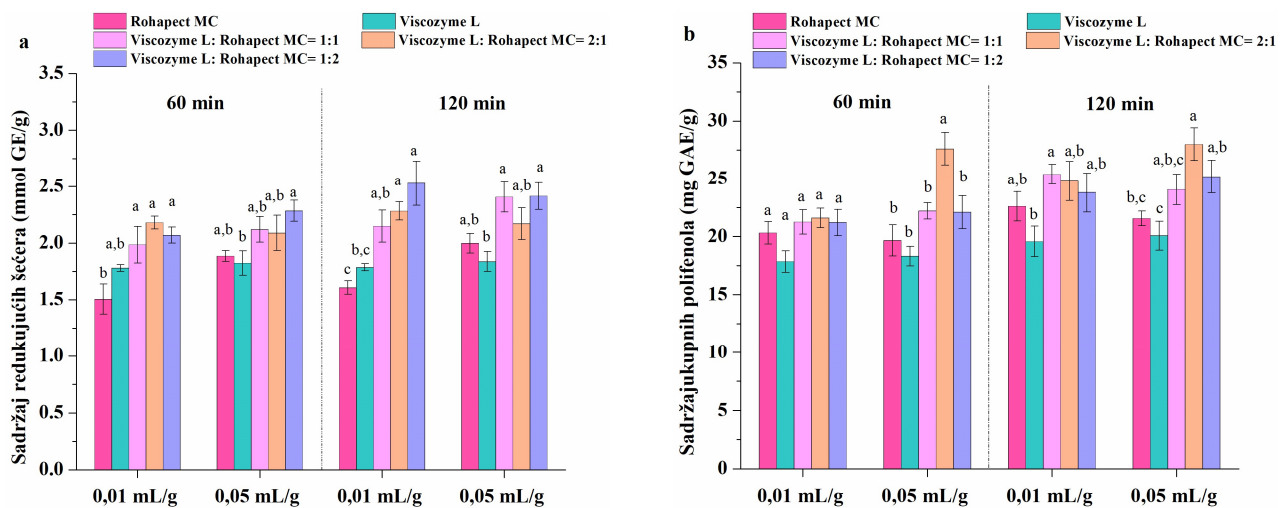
raskidanje veza između polifenola i ćelijskog zida, što doprinosi višem sadržaju polifenola. S obzirom na to da nije postignuto značajno poboljšanje efikasnosti ekstrakcije korišćenjem većih količina enzima, primena koncentracija enzima iznad 0,01 mL/g ne bi bila opravdana.



Slika 4.16. Sadržaj ukupnih redukujućih šećera (a) i polifenola (b) u ekstraktima crne ribizle dobijenim pomoću enzimskih preparata Viscozyme® L i Rohapect® MC, pri koncentraciji od 0,01 mL/g i 0,05 mL/g

4.4.2.4. Kombinovani efekat izabranih enzimskih preparata

Budući da je razlika u sastavu i načinu delovanja enzima prisutnih u preparatima Viscozyme® L i Rohapect® MC, najverovatnije odgovorna za varijacije u rezultatima, kao poslednji korak optimizacije enzimski potpomognute ekstrakcije, ispitan je kombinovani efekat ova dva enzimska preparata. U ovim eksperimentima odnos enzimskih preparata bio je 1:1, 1:2 i 2:1, a ukupna koncentracija 0,01 mL/g i 0,05 mL/g. Napredovanje ekstrakcije praćeno je promenama sadržaja ukupnih redukujućih šećera i sadržaja polifenola nakon 60 min i 120 min trajanja enzimskog procesa, prikazanim na slici 4.17.



Slika 4.17. Sadržaj ukupnih redukujućih šećera (a) i polifenola (b) u ekstraktima crne ribizle dobijenim kombinacijom enzimskih preparata Viscozyme® L i Rohapect® MC pri njihovim različitim odnosima i koncentracijama

Prema rezultatima dobijenim za ukupne redukujuće šećere, može se zaključiti da primenjene kombinacije enzimskih preparata oslobađaju veće količine šećera u poređenju sa pojedinačnim enzimskim preparatima. Ovo sugerise da istovremeno raskidanje glikozidnih i estarskih veza omogućava efikasniju hidrolizu ćelijskog zida crne ribizle čime se olakšava difuzija molekula, a samim tim se poboljšava ekstrakcija. Kombinacija dva enzimska preparata je takođe dovela do većeg sadržaja ukupnih polifenola u odnosu na upotrebu enzima pojedinačno, pri istoj primenjenoj koncentraciji. Sadržaj polifenola je dodatno porastao kada su korišćena dva enzimska preparata u ukupnoj koncentraciji od 0,05 mL/g, dok produženje vremena ekstrakcije nije dovelo do značajnog poboljšanja. Pa tako, nakon 60 min trajanja ekstrakcije potpomognute kombinacijom enzima Viscozyme® L i Rohapect® MC u odnosu 2:1 u ukupnoj koncentraciji od 0,05 mL/g, sadržaj ekstrahovanih polifenola bio je 26,9 mg GAE/g, što je u proseku za 43 % više u odnosu na sadržaj polifenola u ekstraktima dobijenim primenom pojedinačnih enzima pod istim uslovima. Poređenja radi, studija koja se bavila uticajem mešavine celulaza i pektinaza na ekstrakciju polifenola iz pogače crne ribizle, pokazala je da kombinovani efekat celulaza sa pektin esterazom i poligalakturonazom daje više prinose polifenola u odnosu na netretirani uzorak, što je u skladu sa rezultatima dobijenim u ovoj doktorskoj disertaciji [293].

Na osnovu svih dobijenih rezultata, kao optimalni uslovi enzimski potpomognute ekstrakcije fitohemikalija iz crne ribizle izabran je odnos rastvarača i supstrata 1:10 g/mL, vreme trajanje ekstrakcije od 60 min i kombinacija enzimskih preparata Viscozyme® L i Rohapect® MC u odnosu 2:1 u ukupnoj koncentraciji od 0,05 mL/g.

4.4.2.5. Karakterizacija ekstrakta

4.4.2.5.1. Sadržaj različitih klasa polifenolnih jedinjenja i redukujućih šećera

Sastav polifenola i sadržaj redukujućih šećera ekstrakta crne ribizle dobijenog pri optimalnim uslovima (odnos supstrata i rastvarača 1:10 g/mL, odnos enzimskih preparata Viscozyme® L i Rohapect® MC 2:1 pri ukupnoj koncentraciji od 0,05 mL/g i vreme trajanja ekstrakcije od 60 min) prikazani su u tabeli 4.13. Ukupni sadržaj polifenola je 26,9 mg GAE/g što je 2,8 puta više u poređenju sa istim vodenim ekstraktom (tabela 4.1) odnosno 2,1 puta više u poređenju sa istim etanolnim ekstraktom (tabela 4.2). Vidno je povećan sadržaj redukujućih šećera što je posledica enzimske hidrolize polisaharidnih jedinjenja, ali i svih ostalih klasa polifenola u odnosu na vodeni i etanolni ekstrakt, ukazujući na pozitivan uticaj enzima na izolaciju fitohemikalija iz crne ribizle.

Tabela 4.13. Sadržaj polifenolnih jedinjenja i šećera u ekstraktu crne ribizle dobijenim enzimski potpomognutom ekstrakcijom pod optimalnim uslovima

Polifenoli	Flavonoidi	Flavonoli	Antocijanini	Fenolne kiseline	Hidroliz. tanini	Kondenz. tanini	Reduk. šećeri
mg GAE/g	mg QE/g	mg QE/g	mg Cy3GE/g	mg CAE/g	mg GAE/g	mg CyE/g	mmol GE/g
26,90 ± 1,45	3,98 ± 0,24	2,57 ± 0,13	2,21 ± 0,08	3,85 ± 0,27	12,50 ± 0,42	1,5 ± 0,10	2,17 ± 0,14

Rezultati su izraženi po gramima suve materije supstrata i prikazani kao srednja vrednost ± standardna devijacija.

4.4.2.5.2. Monosaharidni sastav

Monosaharidni sastav ekstrakta dobijenog enzimski potpomognutom i klasičnom ekstrakcijom je značajno različit (tabela 4.14). Dodatak enzima uslovio značajne promene u sastavu monosaharida. Monosaharidi koji su detektovani u ekstraktu dobijenom maceracijom, nisu se nalazili u vezanom obliku u crnoj ribizli (slobodni šećeri), te su jednostavno izolovani rastvaračem. U ovom ekstraktu dominantan

šećer je glukoza (81,1 %). Sa druge strane, kombinovano delovanje pektinaza i celulaza je dovelo do degradacije ćelijskog zida, pa je monosaharidni sastav određen ne samo slobodnim šećerima, već i onim koji potiču od razgradnje polisaharida. Ekstrakt dobijen delovanjem enzima je pored glukoze (66,5 %), dao više prinose galakturonske kiseline (21,8 %) ukazujući na efikasnu hidrolizu pektinskih materija.

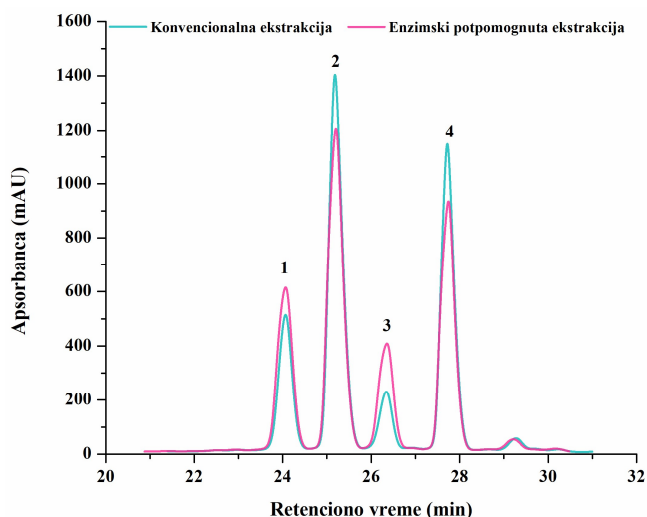
Tabela 4.14. Monosaharidni sastav ekstrakta crne ribizle dobijenog klasičnom i enzimski potpomognutom ekstrakcijom, pod optimalnim uslovima.

Tip ekstrakcije	Ksiloz (%)	Arabinoza (%)	Ramnoza (%)	Galaktoza (%)	Manoza (%)	Glukoza (%)	Galakturonska kiselina (%)
Klasična ekstrakcija	1,2 ± 0,0 ^a	3,1 ± 0,1 ^b	2,4 ± 0,1 ^a	3,3 ± 0,1 ^a	0,5 ± 0,0 ^b	81,1 ± 1,1 ^a	8,3 ± 0,3 ^b
Enzimski potpomognuta ekstrakcija	1,2 ± 0,4 ^a	4,1 ± 0,1 ^a	2,2 ± 0,0 ^a	3,2 ± 0,1 ^a	1,0 ± 0,0 ^a	66,5 ± 1,0 ^b	21,8 ± 1,0 ^a

Rezultati su izraženi po gramima suve materije supstrata i prikazani kao srednja vrednost ± standardna devijacija. Različita slova u istoj koloni označavaju statistički ($p \leq 0,05$) značajnu razliku između ekstrakata.

4.4.2.5.3. HPLC-UV analiza

S obzirom na to da je poznato da se crna ribizla svrstava među vrste bobičastog voća sa najvišim sadržajem antocijanina, izvršena je detekcija i kvantifikacija antocijanina prisutnih u ekstraktu crne ribizle koji je dobijen konvencionalnom ekstrakcijom i enzimski potpomognutom ekstrakcijom pod optimalnim uslovima. U tu svrhu je izvršena HPLC-UV analiza, a karakterističan HPLC profil ekstrakata, snimljen na 520 nm, predstavljen je na slici 4.18. Na osnovu komercijalnih standarda identifikovana su četiri glavna antocijanina, delfinidin-3-glukozid, delfinidin-3-rutinozid, cijanidin-3-glukozid i cijanidin-3-rutinozid. Poređenjem hromatograma ova dva ekstrakata crne ribizle može se primetiti da je u ekstraktu dobijenom enzimski potpomognutom ekstrakcijom količina diglikozida (cijanidin rutinozida i delfinidin rutinozida) vidno smanjena, dok je koncentracija odgovarajućih monoglukozida povećana, što ukazuje da je prisustvo enzima dovelo do biotransformacije molekula.



Slika 4.18. HPLC hromatogram antocijanina ekstrakta crne ribizle dobijenog konvencionalnom i enzimski potpomognutom ekstrakcijom pod optimalnim uslovima. Pikovi predstavljaju sledeće antocijanine: 1 – delfinidin-3-glukozid, 2 – delfinidin-3-rutinozid, 3 – cijanidin-3-glukozid i 4 – cijanidin-3-rutinozid

4.4.2.5.4. Antioksidativna aktivnost

Ekstrakcija potpomognuta enzimima je pozitivno uticala i na antioksidativnu aktivnost dobijenog ekstrakta crne ribizle (tabela 4.15) u poređenju sa antioksidativnom aktivnošću vodenog i etanolnog ekstrakta crne ribizle (tabela 4.3). Najizraženija razlika uočena je primenom ABTS metode, pri čemu je antioksidativna aktivnost ekstrakta dobijenog uz pomoć enzima bila približno ~4 puta viša od one dobijene za vodeni ekstrakt i 2,6 puta viša u odnosu na antioksidativnu aktivnost izmerenu za etanolni ekstrakt. Prema rezultatima dobijenim drugim metodama, ovaj ekstrakt je pokazao u proseku dvostruko viši sadržaj antioksidanata u poređenju sa vodenim i etanolnim ekstraktom.

Tabela 4.15. Antioksidativna aktivnost ekstrakta crne ribizle dobijenog enzimski potpomognutom ekstrakcijom, pod optimalnim uslovima

FRAP μmol TE/g	CUPRAC μmol TE/g	ABTS μmol TE/g	DPPH μmol TE/g
122,6 ± 7,0	338,4 ± 16,6	208,2 ± 5,3	103,9 ± 5,2

Rezultati su izraženi po gramima suve materije supstrata i prikazani kao srednja vrednost ± standardna devijacija.

4.4.3. Optimizacija enzimski potpomognute ekstrakcije fitohemikalija iz jagode

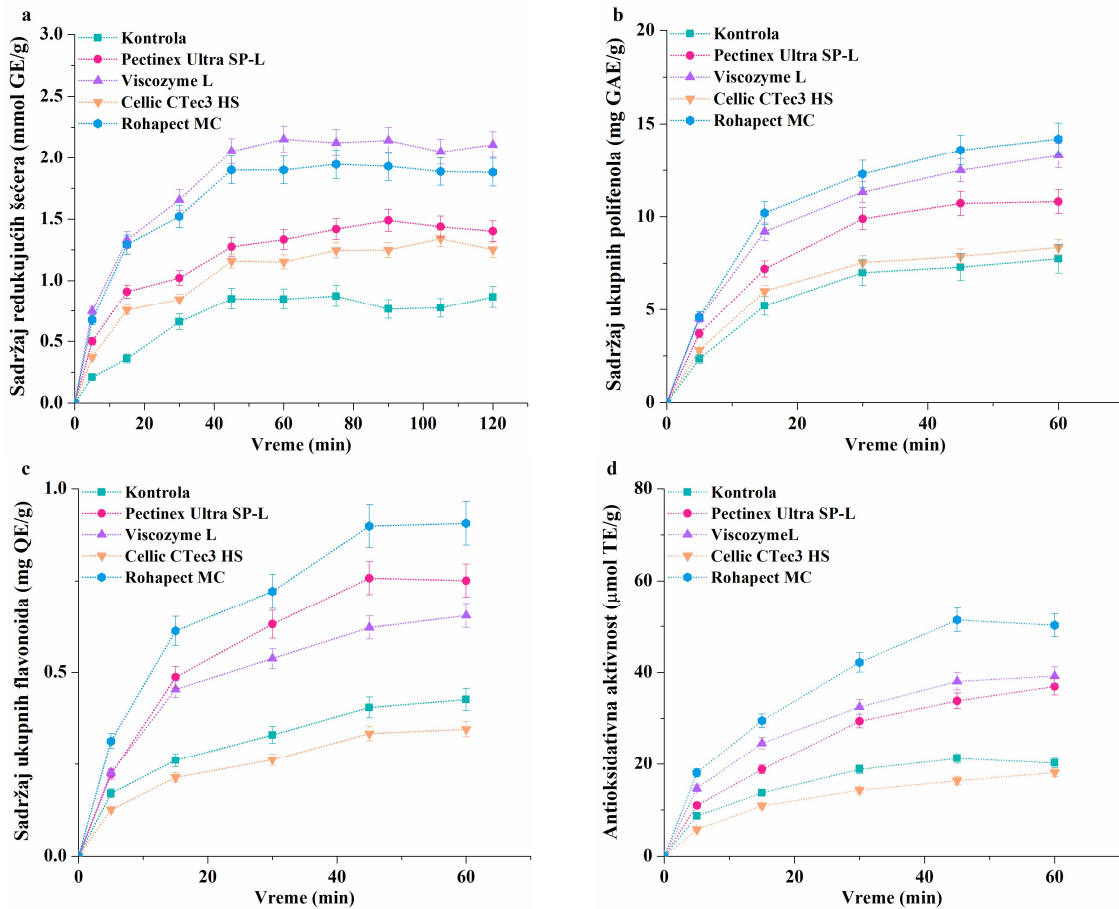
4.4.3.1. Izbor enzimskih preparata

Na isti način kao u slučaju crne ribizle je urađena i optimizacija ekstrakcije fitohemikalija iz jagode, a efekat četiri enzimski preparata (pri koncentraciji od 0,4 mL/g i odnosu supstrata i rastvarača 1:10 g/mL) na tok ekstrakcije prikazan je na slici 4.19. Na osnovu sadržaja redukujućih šećera tokom vremena, jasno se vidi da je već nakon 60 min trajanja ekstrakcije, nivo šećera ostao gotovo nepromenjen, a da su se kao najefikasniji enzimski preparati istakli Rohapect[®] MC i Viscozyme[®] L. Tokom prvih 60 min, primenom ovih enzima postignuti su do ~2,5 puta veći prinosi u poređenju sa uzorkom koji nije tretiran enzimima, dok je primenom Pectinex[®] Ultra SP-L i Cellic[®] CTec3 dobijeno u proseku ~1,5 puta bolji rezultat u odnosu na kontrolu. Ovo ukazuje da su svi enzimski preparati u manjoj ili većoj meri hidrolizovali polisaharide prisutne u ćelijskom zidu jagode. Sa druge strane, najviši sadržaj ukupnih polifenola je takođe postignut primenom Viscozyme[®] L i Rohapect[®] MC, u opsegu od 13,3 - 14,2 mg GAE/g, praćeni enzimskim preparatom Pectinex[®] Ultra SP-L (10,8 mg GAE/mL), dok se kao najmanje efikasan pokazao enzimski preparat Cellic[®] CTec3 HS (8,4 mg GAE/mL), koji je dao sličan rezultat kao i kontrolni uzorak (7,8 mg GAE/g). Dvostruko više udele flavonoida dali su pektinolitički enzimski preparati Rohapect[®] MC i Pectinex[®] Ultra SP-L, dok je celulolitički preparat Viscozyme[®] L bio za ~50 % bolji od kontrole. Interesantno, Cellic[®] CTec3 HS je dao niži prinos flavonoida i od kontrole. S obzirom na to da je primećeno da je samo u ovom ekstraktu došlo do delimičnog gubitka boje, može se pretpostaviti da je došlo do degradacije pigmenta odnosno izolovanih antocijanina, koji spadaju u grupu flavonoida. Istraživanja koja su se bavila degradacijom antocijanina često naglašavaju da do toga dolazi usled korišćenja veće doze enzima od preporučenih, i da su tada sporedne enzimске aktivnosti izraženije [294,295]. Konkretno se misli na aktivnost enzima β-glukozidaze, koji raskidanjem glikozidne veze u antocijaninima dovodi do stvaranja nestabilnih oblika antocijanidina (slobodnih aglikona) što za posledicu ima gubitak boje [181,296,297]. Kako je za enzimski preparat Cellic[®] CTec3 HS prijavljena aktivnost ovog enzima, može se zaključiti da je upravo ona odgovorna za smanjenje ukupnih flavonoida [279,298,299]. Takođe, istraživanja sugerišu da β-glukozidaza ima različit

afinitet prema različitim antocijaninima, pa se može pretpostaviti da je sastav antocijanina u ekstraktu jagode podložniji razgradnji nego u crnoj ribizli [296].

Analiza antioksidativne aktivnosti ekstrakata jagode je pokazala da ekstrakt dobijen uz pomoć Rohapect[®] MC ima najbolju antioksidativnu aktivnost (50 $\mu\text{mol TE/g}$), dok su ekstrakti dobijeni uz pomoć Viscozyme[®] L i Pectinex[®] Ultra SP-L imali sličnu antioksidativnu aktivnost (u proseku 37,5 $\mu\text{mol TE/g}$). Sa druge strane ekstrakt dobijen pomoću enzimskog preparata Cellic[®] CTec3 HS imao je antioksidativnu aktivnost za 10 % nižu od kontrole, a blago smanjenje antioksidativne aktivnosti može biti posledica upravo delimične degradacije antocijanina.

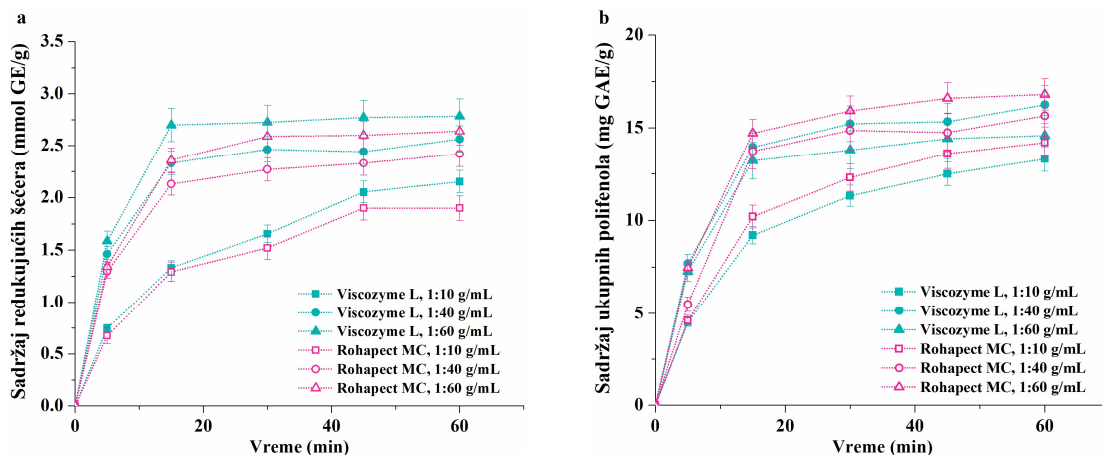
Na osnovu svega navedenog, može se zaključiti da su enzimski preparat Rohapect[®] MC i Viscozyme[®] L u najvećoj meri hidrolizovali ćelijski zid jagode, i ujedno dali najviši sadržaj polifenola i antioksidativnu aktivnost. Stoga, ova dva enzimska preparata su izabrana za dalji rad, kao i vreme od 60 min.



Slika 4.19. Sadržaj ukupnih redukujućih šećera (a), polifenola (b) i flavonoida (c) i antioksidativna aktivnost ekstrakata jagode dobijenih uz pomoć različitih enzimskih preparata.

4.4.3.2. Odnos supstrata i rastvarača

Kako je tokom prvog eksperimenta sa jagodom kao supstratom, uzorkovanje bilo otežano usled povećane viskoznosti sistema, testirani su veći odnosi supstrata i rastvarača odnosno 1:40 i 1:60. Koncentracija odabranih enzima bila je 0,4 mL/g, a u dobijenim ekstraktima sadržaj redukujućih šećera i sadržaj polifenola prikazani su na slici 4.20.

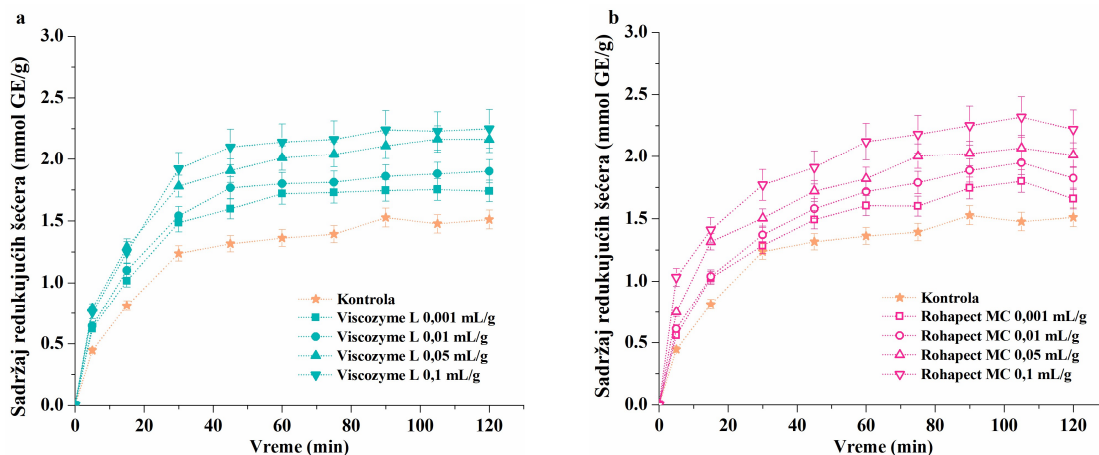


Slika 4.20. Sadržaj ukupnih redukujućih šećera (a) i polifenola (b) ekstrakata jagode pri različitim odnosima supstrata i rastvarača, u prisustvu enzima Rohapect[®] MC i Viscozyme[®] L

Očekivano je veća količina rastvarača dala više prinose redukujućih šećera i polifenola, pa su se odnosi 1:40 i 1:60 pokazali bolji u odnosu na prethodno testirani odnos 1:10. Sadržaj redukujućih šećera u ekstraktima dobijenim pomoću Viscozyme[®] L i Rohapect[®] MC za ove odnose supstrata i rastvarača bio je 20-30 % i 28-39 %, redom, viši od odgovarajućih vrednosti dobijenih za odnos 1:10. Kada je reč o sadržaju polifenola, Viscozyme[®] L je dao najbolje prinose pri odnosu 1:40 i to 16,3 mg GAE/g. Enzimski preparat Rohapect[®] MC je dao najbolji rezultat pri odnosu 1:60 (16,8 mg GAE/mL) koji je za manje od 10 % bolji u poređenju sa odnosom 1:40. S obzirom na to da je odnos 1:40 pokazao dobre rezultate, a ekstrakti su bili značajno koncentrovani u poređenju sa 1:60, a uz to je uzorkovanje bilo olakšano u odnosu na odnos 1:10, ovaj odnos je izabran za dalja ispitivanja.

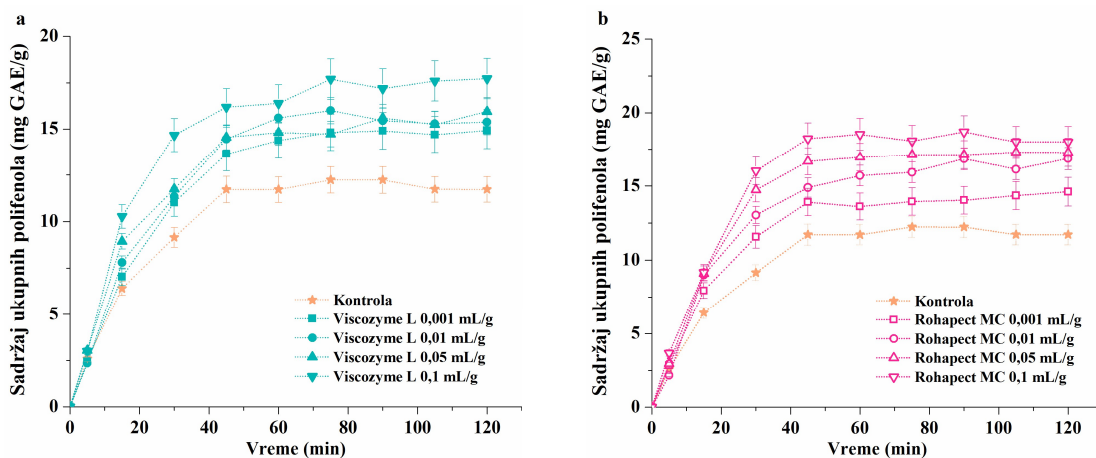
4.4.3.3. Koncentracija enzimskih preparata

Uticao različitih koncentracija enzimskih preparata Rohapect[®] MC i Viscozyme[®] L, ispitana je u opsegu od 0,001 mL/g do 0,1 mL/g, pri odnosu supstrata i rastvarača 1:40. S obzirom na drastično niže primenjene koncentracije, ispitano je duže vreme ekstrakcije od 120 min, a napredovanje enzimske reakcije praćeno preko sadržaja redukujućih šećera i polifenola. Na slici 4.21, prikazan je sadržaj redukujućih šećera i može se videti da sa porastom koncentracije enzima raste efikasnost hidrolize ćelijskog zida. Međutim, za Viscozyme[®] L učinak hidrolize raste sve do koncentracije 0,05 mL/g, nakon čega dalji porast koncentracije enzima nije doveo do značajnih promena u sadržaju redukujućih šećera ukazujući na zasićenje enzima supstratom. Sa druge strane, Rohapect[®] MC je pri koncentraciji 0,1 mL/g nakon 60 min, dao prinose koji je za 15 % viši od onog dobijenog pomoću koncentracije enzimskog preparata od 0,05 mL/g.



Slika 4.21. Sadržaj ukupnih redukujućih šećera u ekstraktima jagode dobijenim primenom različitih koncentracija enzimskih preparata Viscozyme[®] L (a) i Rohapect[®] MC (b)

Na osnovu sadržaja polifenola, prikazanog na slici 4.22, zaključuje se da su oba enzimska preparata su pokazala sličan trend odnosno da sa porastom koncentracije enzima raste i sadržaj ekstrahovanih polifenola. Maksimalni prinosi polifenola dobijeni su pri koncentraciji od 0,1 mL/g. S obzirom na to da je pri ovoj koncentraciji enzimskih preparata došlo do efikasne hidrolize polisaharida ćelijskog zida uz oslobađanje većeg sadržaja vezanih polifenola, koncentracija od 0,1 mL/g je izabrana kao najpogodnija.

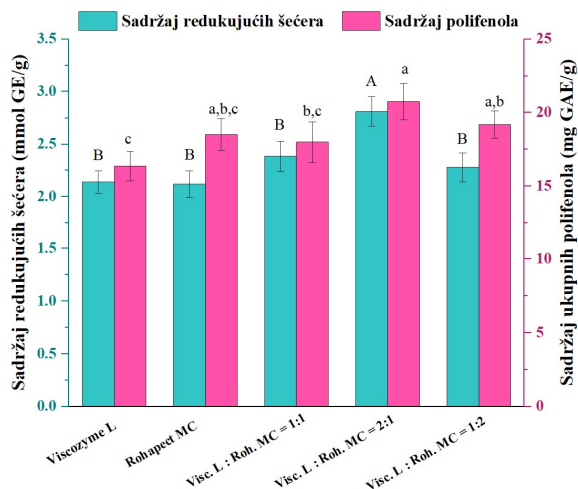


Slika 4.22. Sadržaj ukupnih polifenola u ekstraktima jagode dobijenim primenom različitih koncentracija enzimskih preparata Viscozyme[®] L (a) i Rohapect[®] MC (b)

4.4.3.4. Kombinovani efekat izabranih enzimskih preparata

Kao poslednji korak optimizacije enzimski potpomognute ekstrakcije fitohemikalija iz jagode, ispitan je kombinovani efekat Viscozyme[®] L i Rohapect[®] MC pri ukupnoj koncentraciji od 0,1 mL/g, odnosu supstrata i rastvarača 1:40 i trajanju ekstrakcije od 60 min. Sadržaj redukujućih šećera i polifenola prikazani su na slici 4.23. Na osnovu rezultata se može primetiti da je koncentracija redukujućih šećera najviša pri odnosu Viscozyme[®] L i Rohapect[®] MC 2:1 i iznosi 2,8 mmol GE/g, dok pri ostalim odnosima preparata ne postoje značajne razlike ($p > 0,05$) u sadržaju redukujućih šećera. Najviši sadržaj ukupnih polifenola od 20,75 mg GAE/g je postignut pri istom odnosu enzimskih preparata. Kako je kombinovani

efekat celulolitičkog preparata i pektinolitičkog preparata u odnosu 2:1 efikasno degradirao ćelijski zid, a samim tim pospešio ekstrakciju polifenolnih jedinjenja, ovaj odnos je izabran kao najpogodniji.



Slika 4.23. Sadržaj redukujućih šećera i ukupnih polifenola u ekstraktima jagode dobijenim primenom različitih kombinacija enzima Viscozyme[®] L i Rohapect[®] MC, pri ukupnoj koncentraciji od 0,1 mL/g. Različita velika i mala slova označavaju statistički značajnu razliku ($p \leq 0,05$) između ekstrakata u sadržaju redukujućih šećera i polifenola, redom.

4.4.3.5. Karakterizacija ekstrakta

4.3.5.1. Sadržaj različitih klasa polifenolnih jedinjenja i redukujućih šećera

Sastav polifenola i sadržaj redukujućih šećera ekstrakta jagode dobijenog pri optimalnim uslovima (odnos supstrata i rastvarača 1:40, odnos enzimskih preparata Viscozyme[®] L i Rohapect[®] MC 2:1 pri ukupnoj koncentraciji od 0,1 mL/g i vreme trajanja ekstrakcije od 60 min) prikazani su u tabeli 4.16. Koncentracija redukujućih šećera je povećana za 30 % u odnosu na kontrolni uzorak (slika 4.21), dok je sadržaj ukupnih polifenola (20,75 mg GAE/mL) povećan za ~40 % u odnosu na kontrolni uzorak (slika 4.22), što ukazuje da je došlo do efikasne izolacije kovalentno vezanih polifenolnih jedinjenja prisutnih u jagodi. Poređenja radi, rezultati studije koja se bavila ekstrakcijom polifenola iz jagode primenom kombinacije pektinolitičkog preparata Rohapect 10L i celulaza iz *Aspergillus niger* su pokazali da je izolovano do 20 % više polifenolnih jedinjenja u odnosu na netretirani uzorak [300].

Tabela 4.16. Sadržaj polifenolnih jedinjenja i šećera u ekstraktu jagode dobijenom enzimski potpomognutom ekstrakcijom pod optimalnim uslovima

Polifenoli	Flavonoidi	Flavonoli	Antocijanini	Fenolne kiseline	Hidroliz. tanini	Kondenz. tanini	Reduk. šećeri
mg GAE/g	mg QE/g	mg QE/g	mg Cy3GE/g	mg CAE/g	mg GAE/g	mg CyE/g	mmol GE/g
20,75 ± 0,92	2,13 ± 0,08	0,73 ± 0,02	0,44 ± 0,01	4,25 ± 0,19	5,70 ± 0,21	0,68 ± 0,13	2,28 ± 0,10

Rezultati su izraženi po gramima suve materije supstrata i prikazani kao srednja vrednost ± standardna devijacija.

4.4.3.5.2. Antioksidativna aktivnost

Antioksidativna aktivnost ekstrakta jagode dobijenog enzimski potpomognutom ekstrakcijom, određena pomoću četiri različite metode prikazana je u tabeli 4.17. Dobijeni rezultati su drastično bolji u poređenju sa antioksidativnim kapacitetom vodenog i etanolnog ekstrakta jagode (tabela 4.3), što ukazuje da je optimizacija ekstrakcije bila efikasna i da je izolovano više polifenolnih jedinjenja koja se ponašaju kao snažni antioksidanti. Drugim rečima, za postizanje željenog stepena neutralizacije slobodnih radikala bile bi potrebne manje količine ovako dobijenog ekstrakta u poređenju sa etanolnim ili vodenim ekstraktom.

Tabela 4.17. Antioksidativna aktivnost ekstrakta jagode dobijenog enzimski potpomognutom ekstrakcijom, pod optimalnim uslovima

FRAP	CUPRAC	ABTS	DPPH
$\mu\text{mol TE/g}$	$\mu\text{mol TE/g}$	$\mu\text{mol TE/g}$	$\mu\text{mol TE/g}$
52,3 \pm 1,3	132,5 \pm 3,6	156,0 \pm 7,6	92,5 \pm 5,3

Rezultati su izraženi po gramima suve materije supstrata i prikazani kao srednja vrednost \pm standardna devijacija.

4.4.4. Optimizacija enzimski potpomognute ekstrakcije fitohemikalija iz tropova bobičastog voća

4.4.4.1. Izbor enzimskih preparata

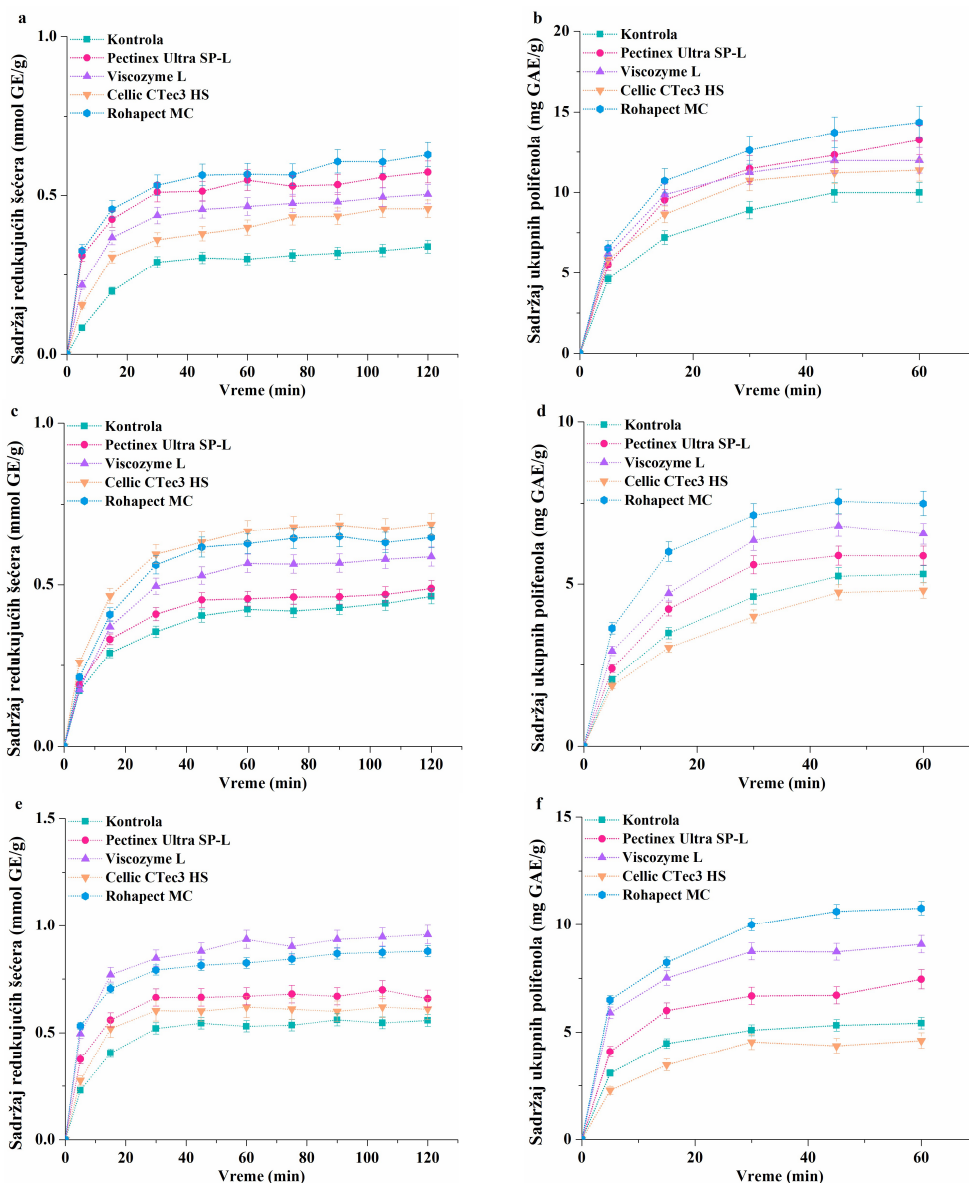
Optimizacija enzimski potpomognute ekstrakcije fitohemikalija iz tropa crne ribizle, maline, jagode i aronije vršena je na isti način kao što je opisano za crnu ribizlu i jagodu. Četiri enzimska preparata (Viscozyme[®] L, Pectinex[®] Ultra SP-L, Cellic[®] CTec3 HS i Rohapect[®] MC) primenjena su u koncentraciji od 0,4 mL/g i odnosu supstrata i rastvarača 1:10 g/mL. Odvijanje ekstrakcije praćeno je merenjem sadržaja redukujućih šećera i ukupnih polifenola koji su prikazani na slici 4.24.

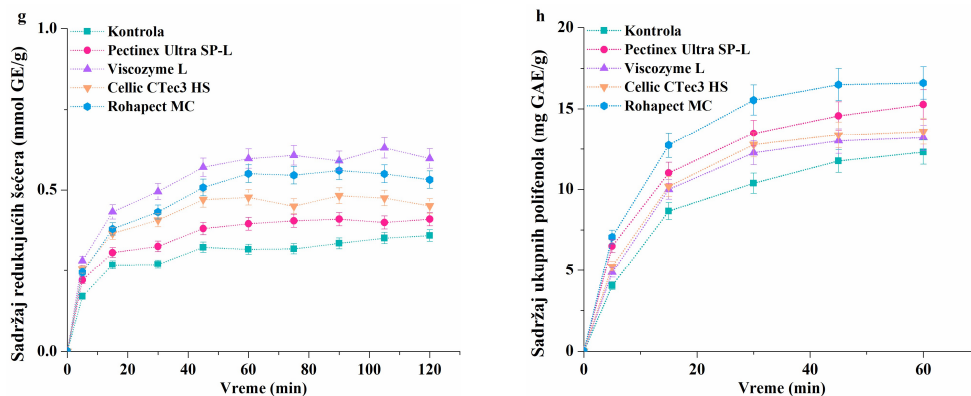
Kao najefikasniji enzimski preparati za razgradnju ćelijskog zida tropa crne ribizle (slika 4.24.a), pokazali su se Pectinex[®] Ultra SP-L i Rohapect[®] MC, dva pektinolitika preparata, praćeni celulolitičkim preparatima Viscozyme[®] L i Cellic[®] CTec3 HS. Isti trend je dobijen i kada je reč o polifenolima (slika 4.24.b), pri čemu su svi primenjeni preparati dali 14-44 % bolje rezultate u poređenju sa netretiranim uzorkom nakon 60 min trajanja procesa. U studijama koje su se bavile ekstrakcijom polifenola iz tropa crne ribizle uz pomoć različitih pektinaza ukazale su na povećanje prinosa polifenola do 25 % u odnosu na prinose konvencionalne ekstrakcije [181,293]. Sagledavanjem dobijenih rezultata, kao najpogodniji optimalni enzimski preparati izabrani su Pectinex[®] Ultra SP-L i Rohapect[®] MC.

Prinos ekstrakcije nakon hidrolize polisaharida tropa maline bila je najučinkovitija delovanjem Cellic[®] CTec3 HS, a najslabija delovanjem Pectinex[®] Ultra SP-L (slika 4.24.c). Međutim, Cellic[®] CTec3 HS je delimično degradirao polifenole iz tropa maline (slika 4.24.d), pa je izrazito nepogodan za ciljanu primenu jer daje za 10 % niži prinos od kontrolnog uzorka. Interesantno, u studiji Laroze i saradnika, enzimski preparat Cellubrix koji se sastoji od celulaza i hemicelulaza, je degradirao polifenole i dao za 14 % lošiji rezultat u poređenju sa kontrolom. U istoj studiji, Viscozyme[®] L je takođe doveo do manjeg prinosa polifenola za 10 %, dok Pectinex[®] Ultra SP-L nije pokazao efekat na ukupan sadržaj polifenola. Sa druge strane, enzimski preparat Grindamyl CA 150, sa dominantnom aktivnošću poligalakturonaze [301], je dao za 39 % bolji rezultat [184]. Neslaganja u rezultatima pomenute studije i ove doktorske disertacije mogu biti posledica razlike u sorti maline ili načina proizvodnje sokova, koji direktno utiče na sastav tropa. Kako je sa Rohapect[®] MC i Viscozyme[®] L, postignuto povećanje ekstrakcije polifenola koja je u pozitivnoj vezi sa enzimskom razgradnjom polisaharida tropa maline, ova dva enzimska preparata su izabrana za dalji rad.

Kada je reč o tropu jagode, ekstrakcija primenom enzimskih preparata Rohapect® MC i Viscozyme® L je bila najefikasnija, dajući u proseku ~60 % viši sadržaj redukujućih šećera u odnosu na kontrolu (slika 4.24.e), kao i do dvostruko viši sadržaj ukupnih polifenola (do 10,7 mg GAE/g) u poređenju sa kontrolom (slika 4.24.f), pa su oni izabrani za dalji rad. Enzimski preparat Cellie® CTec3 HS je dao negativan rezultat, kao i u slučaju jagode i tropa maline, najverovatnije usled delimične degradacije antocijanina.

Sadržaj redukujućih šećera u ekstraktima aronije je bio najviši primenom preparata Rohapect® MC i Viscozyme® L, i to 47 % i 67 %, redom, u poređenju sa kontrolnim uzorkom (slika 4.24.g). U ekstraktima dobijenim uz pomoć Pectinex® Ultra SP-L i Rohapect® MC detektovan je sadržaj polifenola od 15,3 i 16,6 mg GAE/g, redom, što je u 24-35 % više u poređenju sa kontrolom (slika 4.24.h). Druge studije su projavile povećanje sadržaja polifenola u ekstraktima aronije primenom pektinolitickih enzimskih preparata do 35 % [177,302], dok je povećanje bilo do 29 %, primenom celulolitičkih preparata [176,303]. Interesantno, iako je najviši sadržaj redukujućih šećera ostvaren pod dejstvom Viscozyme® L, sadržaj polifenola u ekstraktu bio je samo 7,5 % viši u poređenju sa kontrolom. Stoga, kao najpogodniji enzimski preparati izabrani su Pectinex® Ultra SP-L i Rohapect® MC.

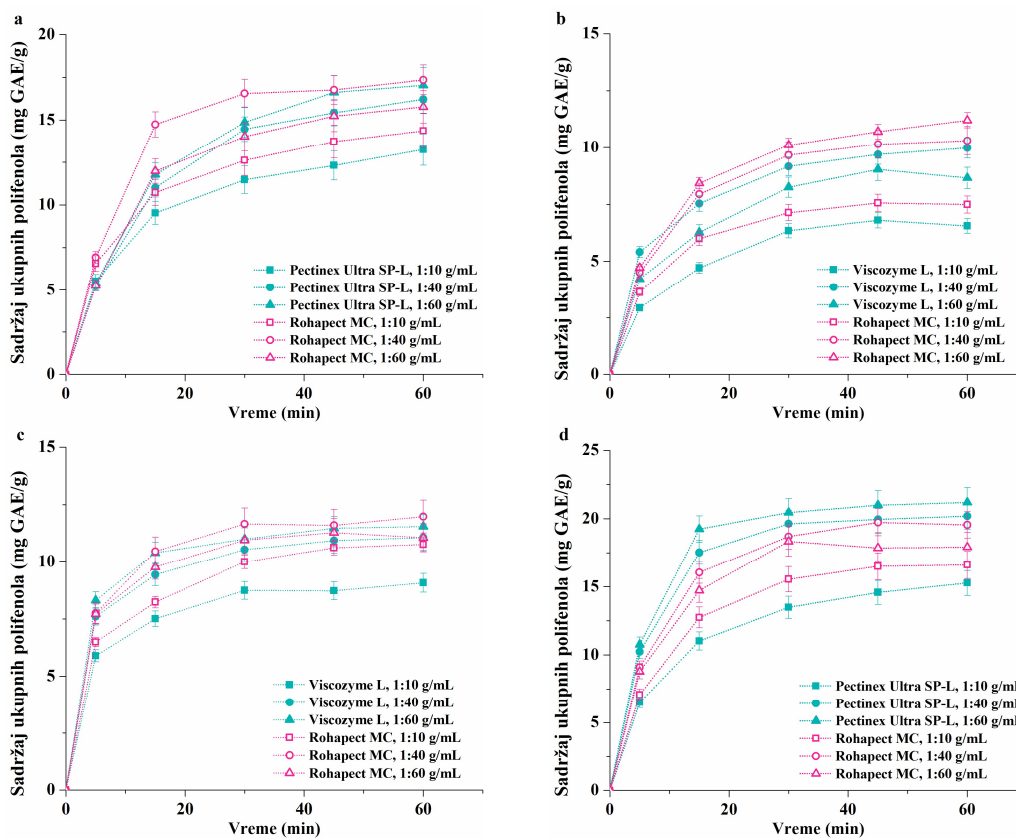




Slika 4.24. Sadržaj ukupnih šećera i polifenola u ekstraktima tropa crne ribizle (a-b), maline (c-d), jagode (e-f) i aronije (g-h) dobijenim primenom različitih komercijalnih enzimskih preparata.

4.4.4.2. Odnos supstrata i rastvarača

Nakon izbora enzimskih preparata, za svaki voćni trop urađena je optimizacija odnosa supstrata i rastvarača. Pored odnosa supstrata i rastvarača 1:10, ispitani su i odnosi 1:40 i 1:60 primenom odabranih enzimskih preparata u koncentraciji od 0,4 mL/g. Izbor odgovarajućeg odnosa izvršen je na osnovu sadržaja ukupnih polifenola, prikazanih na slici 4.25.

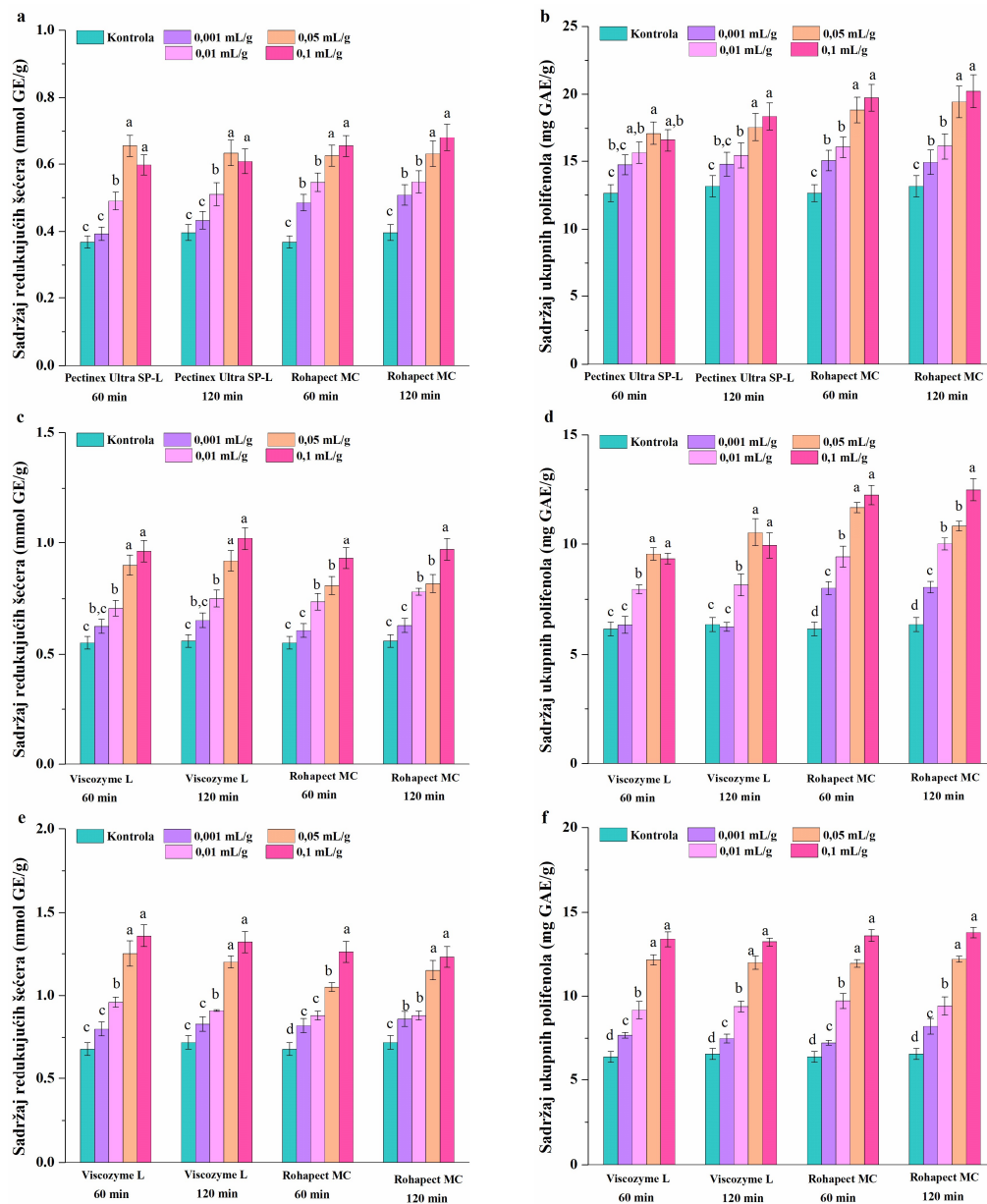


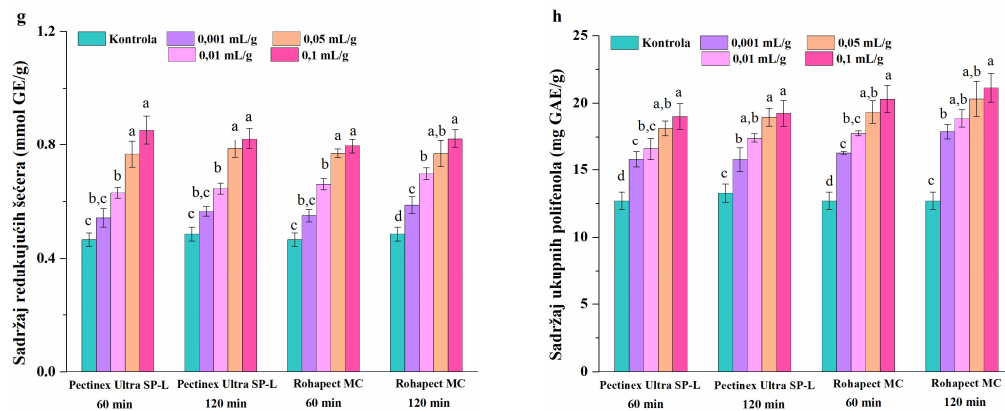
Slika 4.25. Sadržaj ukupnih polifenola u ekstraktima tropa crne ribizle (a), maline (b), jagode (c) i aronije (d) pri različitim odnosima supstrata i rastvarača, u prisustvu optimalnih enzimskih preparata.

Na osnovu dobijenih rezultata može se primetiti da je za sve tropove, pri odnosu supstrata i rastvarača 1:10 dobijen manji sadržaj polifenola u poređenju sa odnosima 1:40 i 1:60. Sa povećanjem količine rastvarača, ubrzana je i difuzija polifenola, pri čemu razlike u sadržaju polifenola 1:40 i 1:60 nisu bile značajne. Pa tako, s obzirom na to da je odnos supstrata i rastvarača 1:40 bio pogodniji za eksperimentalni rad, a ekstrakti su imali veći sadržaj polifenola po mililitru ekstrakta, ovaj odnos je izabran za dalji rad za ekstrakciju fitohemikalija iz svih tropova.

4.4.4.3. Koncentracija enzimskih preparata

Efekat koncentracije enzimskih preparata na efikasnost ekstrakcije fitohemikalija iz tropova bobičastog voća ispitan je u opsegu od 0,001 mL/g do 0,1 mL/g. Odnos supstrata i rastvarača bio je 1:40, a vreme ekstrakcije je produženo na 120 min, zbog značajnog smanjenja koncentracije enzima. Rezultati sadržaja redukujućih šećera i ukupnih polifenola dobijenih nakon 60 min i 120 min u ekstraktima tropova bobičastog voća, prikazani su na slici 4.26.





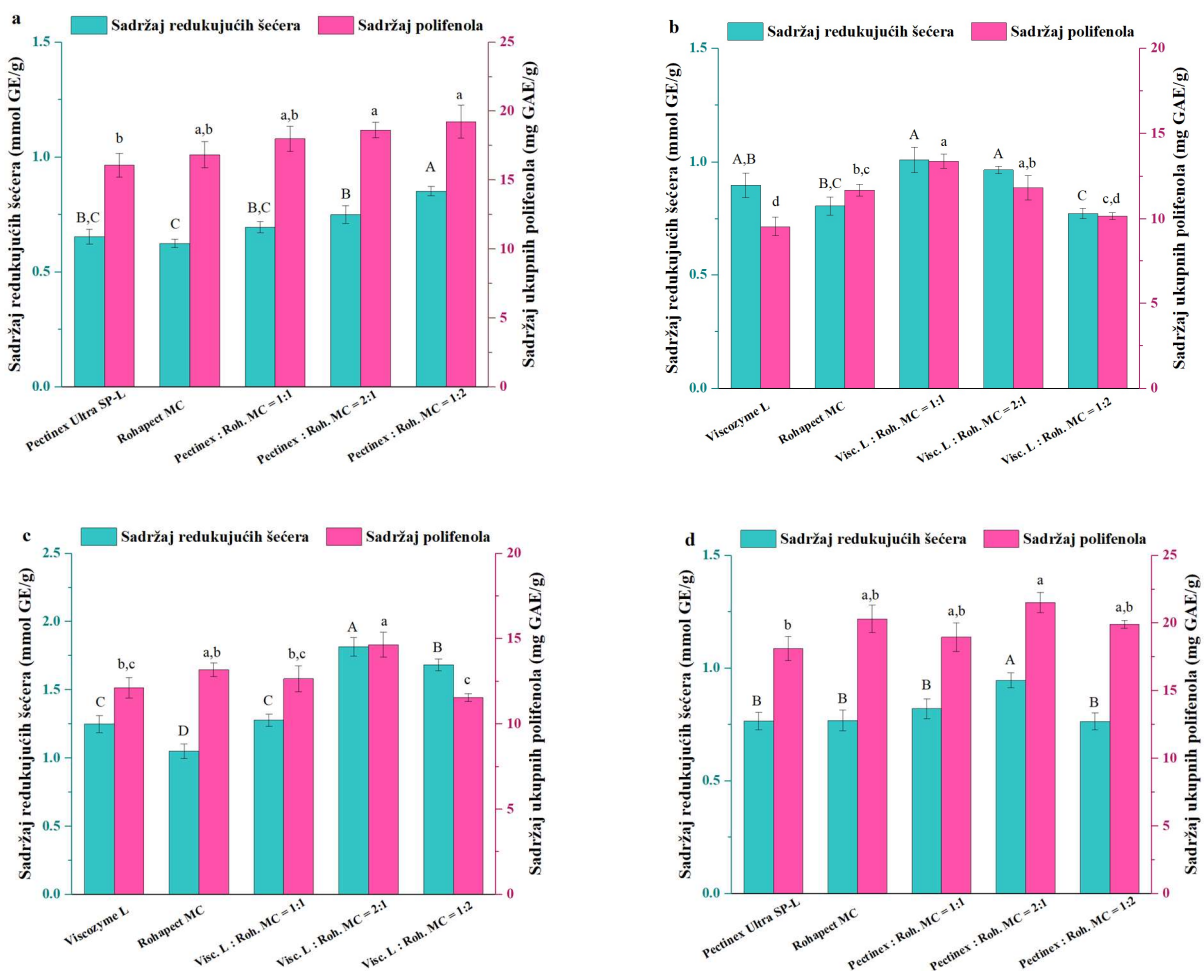
Slika 4.26. Sadržaj ukupnih šećera i polifenola u ekstraktima tropa crne ribizle (a-b), maline (c-d), jagode (e-f) i aronije (g-h) nakon 60 min i 120 min, pri različitim koncentracijama enzimskih preparata.

Oslobađanje redukujućih šećera iz tropa crne ribizle bio je efikasan pri koncentracijama 0,01 - 0,1 mL/g za Pectinex[®] Ultra SP-L, dok je za Rohapect[®] MC bio efikasan i pri najnižoj koncentraciji od 0,001 mL/g (slika 4.26.a). Vrednosti nakon 60 i 120 min, se nisu značajno promenile, pri čemu su za oba enzimska preparata koncentracije 0,05 mL/g i 0,1 mL/g dale najviši sadržaj redukujućih šećera. Budući da se pri ovim koncentracijama sadržaj redukujućih šećera nije statistički razlikovao ($p > 0,05$), može se zaključiti da koncentracije enzimskog preparata koje su više od 0,05 mL/g ne bi dodatno pospešile razgradnju ćelijskog zida. Sadržaj ukupnih polifenola (slika 4.26.b) je bio nešto viši za Rohapect[®] MC u poređenju sa Pectinex[®] Ultra SP-L pri svim primenjenim koncentracijama enzima, pri čemu se opet kao najefikasnije izdvojile koncentracije 0,05 mL/g i 0,1 mL/g, dajući slične rezultate ($p > 0,05$). Razgradnja polisaharidnih komponenti ćelijskog zida, merena preko koncentracije oslobođenih redukujućih šećera, se u slučaju ekstrakta tropa maline dobijenog uz pomoć Viscozyme[®] L povećavala se sa rastom doze enzimskog preparata do 0,05 mL/g, nakon čega je ostala nepromenjena. Sa druge strane, najefikasnija razgradnja polisaharidnih komponenti ćelijskog zida tropa maline primenom preparata Rohapect[®] MC je postignuta pri najvećoj primenjenoj koncentraciji (slika 4.26.c). Sadržaj polifenola je bio najveći u ekstraktima dobijenim primenom 0,05-0,1 mL/g za Viscozyme[®] L tokom 60 min i 120 min. U slučaju enzimskog preparata Rohapect[®] MC, tokom prvih 60 min najveća koncentracija polifenola postignuta je pri koncentracijama 0,05-0,1 mL/g, dok se nakon 120 min trajanja procesa koncentracija 0,1 mL/g istakla kao najefikasnija (slika 4.26.d). U slučaju hidrolize tropa jagode (slika 4.26.e), Viscozyme[®] L i Rohapect[®] MC su bili najefikasniji pri najvišim koncentracijama ($p > 0,05$) što je rezultiralo do 2,4 puta višim prinosom polifenola u poređenju sa netretiranim uzorkom (slika 4.26.f). Ekstrakti tropa aronije ekstrahovani pektinolitičkih preparatima su dali najbolje prinose redukujućih šećera (slika 4.26.g) i polifenola (slika 4.26.h) pri 0,05-0,1 mL ($p > 0,05$).

Na osnovu navedenih rezultata, kao najpogodnija koncentracija enzimskog preparata koja bi efikasno razgradila polisaharide i omogućila oslobađanje polifenolnih jedinjenja izabrana je koncentracija od 0,05 mL/g. S obzirom na to da nije bilo značajnih promena nakon 60 min i 120 min, kao optimalno vreme izabrano je 60 min.

4.4.4.4. Kombinovani efekt izabranih enzimskih preparata

Uzimajući u obzir definisane optimalne uslove, ispitan je kombinovani uticaj enzimskih preparata izabranih za svaki od tropova pri odnosima 1:1, 1:2 i 2:1 i pri ukupnoj koncentraciji od 0,05 mL/g. U slučaju tropa jagode i maline, praćen je efekat singerijskog delovanja celulaza i pektinaza (Viscozyme® L i Rohapect® MC), dok je za trop crne ribizle i aronije analiziran kombinovani efekat različitih tipova pektinaza (Pectinex® Ultra SP-L i Rohapect® MC). Uspešnost ekstrakcije praćena je merenjem sadržaja redukujućih šećera i polifenola, prikazanim na slici 4.27.



Slika 4.27. Sadržaj redukujućih šećera i ukupnih polifenola u ekstraktima tropa crne ribizle (a), maline (b), jagode (c) i aronije (d) dobijenim primenom različitih kombinacija izabranih enzimskih preparata, pri ukupnoj koncentraciji od 0,05 mL/g. Različita velika i mala slova označavaju statistički značajnu razliku ($p \leq 0,05$) između ekstrakata u sadržaju redukujućih šećera i polifenola, redom.

Združeni efekat preparata Pectinex® Ultra SP-L, koji ima izraženu aktivnost poligalakturonaze, i Rohapect® MC, koji ima izraženu aktivnost pektin metil esteraze i pektin liaze, je doveo do efikasne razgradnje polisaharida prisutnih u tropu crne ribizle pri njihovom odnosu 1:2 tj. kada je Rohapect® MC bio u višku (slika 4.27.a). Rezultat je bolji za 35 % u poređenju sa delovanjem pojedinačnih preparata, ukazujući na to da je nakon uklanjanja metil grupa iz lanca poligalakturonske kiseline, poligalakturonaza bila u mogućnosti da efikasnije razgradi pektinske lance nego kada je delovala samostalno [304]. Isti

rezultat potvrđen je i u studiji koja se bavila uticajem kombinacije pektinolitičkih preparata Rohapect® PTE (dominantna aktivnost pektin metil esteraze i pektin liaze) i Rohament® PL (dominantna aktivnost poligalakturonaze) pri istim odnosima na prinose soka crne ribizle. Tačnije, povećanje doze pektin metil esteraze i pektin liaze (odnos Rohapect® PTE : Rohament® PL = 2:1) je dalo za 36 % veće količine soka nego pri ostalim odnosima, kao rezultat intenzivnije degradacije pektinskih materija, a time i smanjenja viskoznosti sistema [305]. Sadržaj polifenola pri svim kombinacijama enzimskih preparata Pectinex® Ultra SP-L i Rohapect® MC se nije statistički razlikovao ($p > 0,05$), pa je kao optimalni izabran prinos koji je dao najveći sadržaj redukujućih šećera (slika 4.27.a). Trend da združeni efekat različitih pektinaza ne utiče značajno na sadržaj polifenola dobijen je u nekoliko studija [181,305,306]. Sa druge strane, isti enzimski preparati su bolje hidrolizovali polisaharide tropa aronije kada je Pectinex® Ultra SP-L bio u višku, dajući sadržaj polifenola koji se opet nije značajno razlikovao u poređenju sa ostalim odnosima (slika 4.27.d). Ovakav rezultat može ukazivati na manji udeo metil-estarskih grupa u pektinu tropa aronije u odnosu na trop crne ribizle. Sadržaj polifenola je takođe bio najviši pri odnosu Pectinex® Ultra SP-L i Rohapect® MC 2:1, pa je ovaj odnos izabran kao optimalan.

Kombinovani uticaj enzimskih preparata Viscozyme® L i Rohapect® MC na trop maline (slika 4.27.b) je dao bolje rezultate kada je Viscozyme® L bio u višku ili pak kada je delovao samostalno, što ukazuje na to da u tropu maline prevladavaju celulozne i hemicelulozne strukture. Sa druge strane, sadržaj polifenola pri većem udelu Viscozyme® L bio je niži, što može biti poledica toga da je viši stepen polifenola vezan za pektinske materije nego za celulozne ili hemicelulozne [307-309]. S obzirom na to da je pri jednakom odnosu enzimskih preparata Viscozyme® L i Rohapect® MC, došlo do istovremene degradacija pektina i (hemi)celuloze, dajući najviši sadržaj šećera i polifenola, odnos 1:1 je izabran kao optimalan. U slučaju jagode (4.27.c), Viscozyme® L i Rohapect® MC pri odnosu 2:1, je dao do 53 % viši sadržaj redukujućih šećera i do 25 % viši sadržaj polifenola u poređenju sa pojedinačnim delovanjem ovih enzimskih preparata enzima, pa je on izabran kao optimalan.

4.4.4.5. Karakterizacija ekstrakta

4.4.4.5.1. Sadržaj različitih klasa polifenolnih jedinjenja i redukujućih šećera

Sadržaj ukupnih polifenola, kao i svih ostalih klasa polifenola i redukujućih šećera (tabela 4.18), je značajno povećan u uzorcima dobijenim postupkom enzimski potpomognute ekstrakcije pod optimalnim uslovima u poređenju sa vodenim ekstraktima (tabela 4.8). Pa tako, kao ekstrakti sa najvišim sadržajem polifenola ističu se ekstrakti tropa crne ribizle i aronije (19,23-21,53 mg GAE/g), praćeni ekstraktima tropa maline i jagode (13,37-14,64 mg GAE/g).

Tabela 4.18. Sadržaj polifenolnih jedinjenja i šećera u različitim ekstraktima tropa bobičastog voća dobijenim enzimski potpomognutom ekstrakcijom pod optimalnim uslovima

Voćni trop	Polifenoli mg GAE/g	Flavonoidi mg QE/g	Flavonoli mg QE/g	Antocijanini mg Cy3GE/g	Fenolne kis. mg CAE/g	Hidroliz. t. mg GAE/g	Kondenz. t. mg CyE/g	Reduk. šećeri mmol GE/g
Crna ribizla	19,23±0,65 ^a	1,81±0,03 ^b	1,27±0,06 ^b	0,58±0,01 ^b	4,17±0,15 ^b	3,89±0,11 ^b	0,44±0,02 ^a	0,85±0,02 ^b
Malina	13,37±0,34 ^b	1,61±0,02 ^b	0,45±0,01 ^d	0,25±0,01 ^c	1,24±0,05 ^d	4,02±0,12 ^b	0,38±0,01 ^b	1,01±0,04 ^b
Jagoda	14,64±0,31 ^b	0,78±0,03 ^c	0,64±0,02 ^c	0,57±0,02 ^b	2,06±0,08 ^c	4,15±0,16 ^b	0,12±0,00 ^c	1,82±0,04 ^a
Aronija	21,53±0,95 ^a	2,19±0,04 ^a	1,74±0,07 ^a	1,12±0,03 ^a	7,24±0,21 ^a	8,53±0,44 ^a	0,41±0,02 ^{a,b}	0,95±0,03 ^b

Rezultati su izraženi po gramima suve materije supstrata i prikazani kao srednja vrednost ± standardna devijacija. Različita slova u istoj koloni označavaju statistički ($p \leq 0,05$) značajnu razliku između ekstrakata.

4.4.4.5.2. Antioksidativna aktivnost

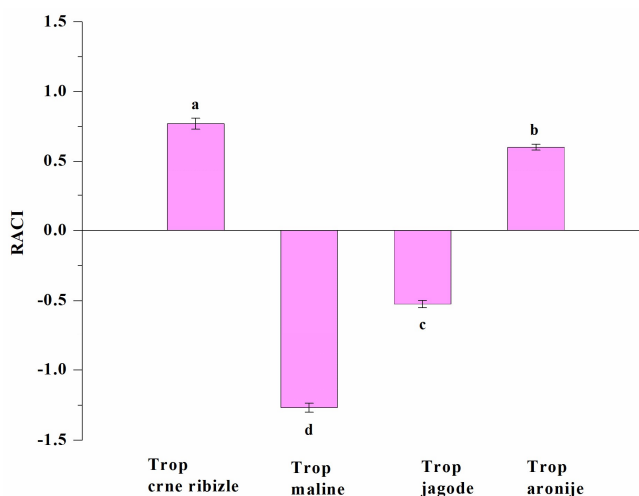
Antioksidativna aktivnost ekstrakata dobijenih enzimski potpomognutom ekstrakcijom (tabela 4.19) je takođe značajno poboljšana ukazujući na njihov potencijal za upotrebu u neutralizaciji slobodnih radikala u različitim kozmetičkim ili prehrambenim proizvodima.

Tabela 4.19. Antioksidativna aktivnost različitih ekstrakata tropova bobičastog voća dobijenih enzimski potpomognutom ekstrakcijom pod optimalnim uslovima

Voćni trop	FRAP μmol TE/g	CUPRAC μmol TE/g	ABTS μmol TE/g	DPPH μmol TE/g
Crna ribizla	72,3 ± 2,1 ^a	219,5 ± 8,8 ^a	143,1 ± 3,3 ^a	58,4 ± 1,0 ^a
Malina	27,7 ± 0,8 ^c	81,6 ± 3,4 ^c	71,9 ± 1,8 ^c	27,3 ± 0,2 ^b
Jagoda	48,4 ± 1,4 ^b	120,2 ± 4,0 ^b	123,2 ± 4,2 ^b	25,1 ± 0,6 ^b
Aronija	66,7 ± 1,6 ^a	197,7 ± 7,6 ^a	148,1 ± 4,1 ^a	54,8 ± 0,9 ^a

Rezultati su izraženi po gramima suve materije supstrata i prikazani kao srednja vrednost ± standardna devijacija. Različita slova u istoj koloni označavaju statistički ($p \leq 0,05$) značajnu razliku između ekstrakata.

Takođe, rezultati indeksa relativnog antioksidativnog kapaciteta prikazani na slici 4.28, ukazuju da najznačajniji efekat na antioksidativnu aktivnost ekstrakta ima biljna vrsta. Trend dobijen za ekstrakte iz tropa voća je identičan sa trendom dobijenim za vodene ekstrakte (slika 4.9). Odnosno, kao ekstrakt sa najvećim antioksidativnim kapacitetom ističe se ekstrakt tropa crne ribizle, zatim aronije i na kraju jagode i maline.



Slika 4.28. Indeks relativnog antioksidativnog kapaciteta (RACI) enzimskih ekstrakata različitog bobičastog voća. Različita mala slova ukazuju na statistički značajnu razliku ($p \leq 0,05$) između različitih ekstrakata.

4.4.4.5.3. Korelacije između antioksidativne aktivnosti i polifenolnog sastava

Sa ciljem utvrđivanja koja klasa polifenola najznačajnije utiče na antioksidativnu aktivnost, određeni su stepeni korelacije između izmerenih antioksidativnih kapaciteta i različitih klasa polifenolnih jedinjenja dobijenih ekstraktata (tabela 4.20).

Tabela 4.20. Koeficijenti korelacije polifenolnog sastava i antioksidativne aktivnosti ekstrakata tropa bobičastog voća dobijenih enzimski potpomognutom ekstrakcijom pod optimalnim uslovima

	FRAP	CUPRAC	ABTS	DPPH	Polifenoli	Flavonoidi	Antocijanini	Flavonoli	Fenolne kiseline	Hidroliz. tanini	Kondenz. tanini
FRAP	1										
CUPRAC	0,983**	1									
ABTS	0,963**	0,903**	1								
DPPH	0,885*	0,955**	0,759*	1							
Polifenoli	0,894**	0,920**	0,862**	0,927**	1						
Flavonoidi	0,438	0,577	0,300	0,785*	0,737*	1					
Antocijanini	0,862**	0,887**	0,844**	0,899**	0,994**	0,741*	1				
Flavonoli	0,717*	0,681	0,814*	0,632	0,873**	0,504	0,905**	1			
Fenol. kis.	0,787*	0,806*	0,799*	0,825*	0,968**	0,733*	0,988**	0,947**	1		
Hidroliz. t.	0,407	0,415	0,499	0,472	0,731*	0,631	0,785*	0,904**	0,871**	1	
Kondenz. t.	0,329	0,498	0,114	0,729*	0,544	0,925**	0,523	0,174	0,473	0,289	1

Zvezdice označavaju statistički značajnu korelaciju i to: * $p \leq 0,05$ i ** $p \leq 0,01$.

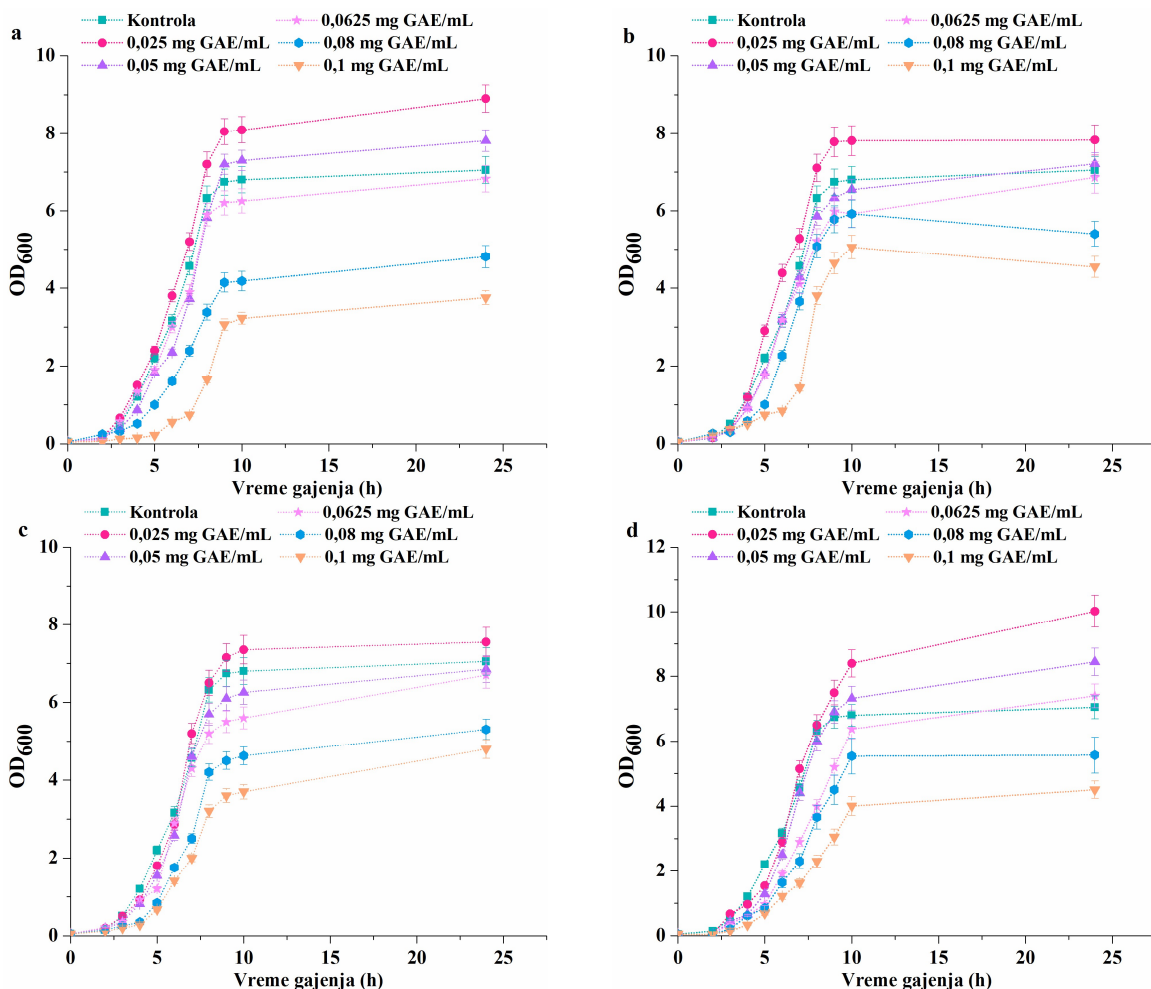
Sve metode određivanja antioksidativne aktivnosti su dale veoma jake međusobne korelacije (0,885-0,983), pri čemu je između DPPH i ABTS bila jaka korelacija (0,759). Ukupan sadržaj polifenola je pokazao veoma jaku korelaciju sa svim metodama u opsegu od 0,862-0,927 ($p \leq 0,01$), kao i sa antocijaninima (0,994), fenolnim kiselinama (0,968) i flavonolima (0,873), dok je jaku korelaciju imao sa flavonoidima (0,737) i hidrolizabilnim taminima (0,731). Sa druge strane, umereno jaku korelaciju koja nije bila statistički značajna dao je sa kondenzovanim taninima (0,544). Interesantno, kondenzovani tanini imali su slabu korelaciju sa FRAP, CUPRAC, ABTS metodama (0,114-0,329), a jaku korelaciju samo sa DPPH metodom (0,729) za razliku od veza između ove grupe jedinjenja i antioksidativnih kapaciteta izmerenih različitim metodama za ekstrakte dobijene konvencionalnom ekstrakcijom koje su bile veoma jake (tabela 4.10). Takođe, koeficijenti korelacije između hidrolizabilnih tanina i metoda za merenje antioksidativne aktivnosti su umereno jake (0,407-0,499), za razliku od istih koeficijenata za ekstrakte dobijene klasičnom ekstrakcijom (-0,165–0,394). Na osnovu svih korelacija, može se pretpostaviti da je za visoku antioksidativnu aktivnost ekstrakata tropova bobičastog voća dobijenih u procesu enzimski potpomognute ekstrakcije, odgovoran povećan sadržaj antocijanina i fenolnih kiselina, s obzirom na to da su dali najjače veze sa svim metodama za određivanje antioksidativne aktivnosti, kao i sa ukupnim sadržajem polifenola.

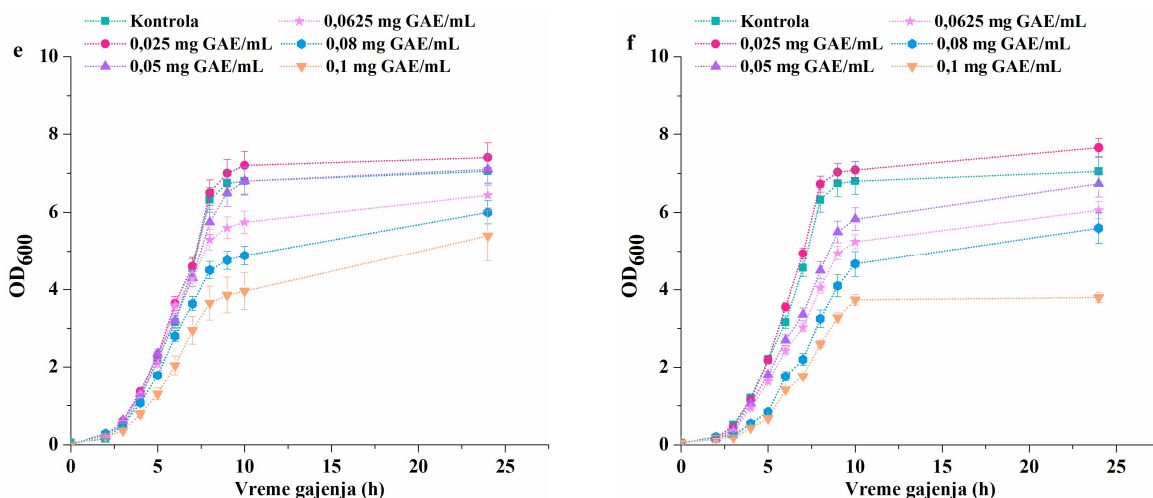
4.5. Ispitivanje prebiotskog potencijala ekstrakata dobijenih enzimski potpomognutom ekstrakcijom

Ekstrakti bobičastog voća – crne ribizle i jagode, kao i tropova bobičastog voća – crne ribizle, maline, jagode i aronije, koji su dobijeni pomoću različitih kombinacija enzimskih preparata pod optimalnim uslovima korišćeni su za ispitivanje njihovog uticaja na rast komensalnih i oportunistički patogenih članova mikrobiote kože. Tačnije, u prvom koraku ispitan je efekat ovih ekstrakata na rast pojedinačnih kultura, ali i na rast bakterija u ko-kulturi. Zatim, za ekstrakte koji su dali najbolje rezultate izvršena je procena prebiotskog efekta uz pomoć modela koji imitira površinski sloj kože (tzv. kalus modela) korišćenjem komercijalnih kultura, kliničkih izolata ili pak celokupne mikrobiote uzete sa površine kože pazuha zdravih volontera.

4.5.1. Ispitivanje uticaja ekstrakata na rast bakterija *S. epidermidis* i *S. aureus*

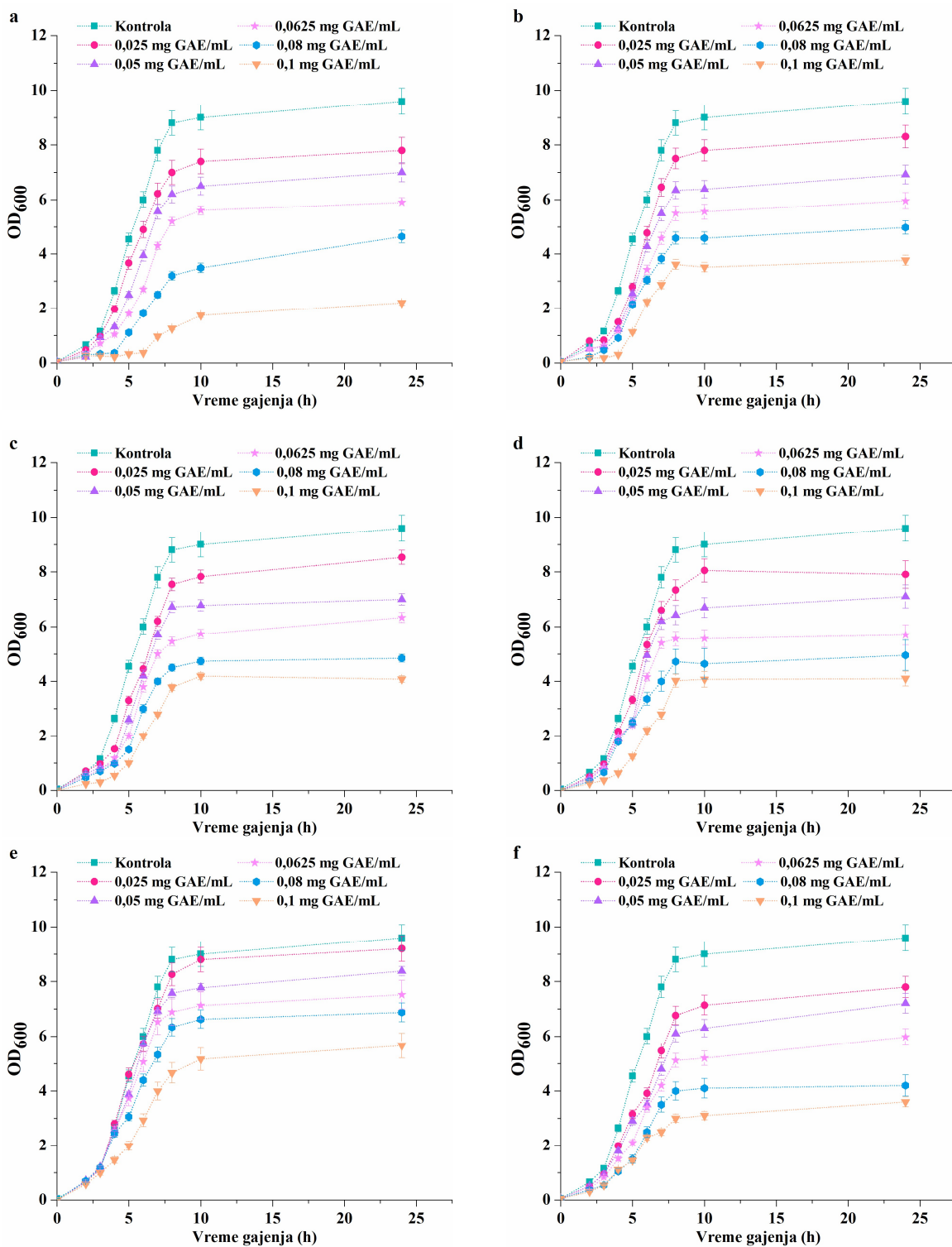
Ekstrakti koji su pripremljeni pod optimalnim uslovima dodati su u tečnu hranljivu podlogu tako da krajnja koncentracija ukupnih polifenola bude u opsegu od 0,025-0,1 mg GAE/mL. Rast je praćen tokom 24 h merenjem promene optičke gustine, a korišćene bakterije bile su *S. epidermidis* DSM 20044 i *S. aureus* ATCC 25923. Kontrola je bila zasejana hranljiva podloga bez dodatka ekstrakata. Krive rasta za dobijene bakterije *S. epidermidis* i *S. aureus* prikazane su na slici 4.29 i 4.30, redom.





Slika 4.29. Uticaj ekstrakata crne ribizle (a), jagode (b), tropa crne ribizle (c), tropa maline (d), tropa jagode (e) i tropa aronije (f) dobijenih enzimski potpomognutom ekstrakcijom na rast bakterije *S. epidermidis*.

Kao što se na slici 4.29 može uočiti, sa porastom koncentracije ekstrakta crne ribizle smanjivao se stimulatívni efekat na rast bakterije *S. epidermidis*, pri čemu je ovaj stepen bio najviši za 0,025 mg GAE/mL i iznosio je ~30 %, dok je za 0,05 mg GAE/mL bio ~22,5 %. Koncentracija od 0,0625 mg GAE/mL nije imala izražen efekat na rast ove bakterije, dok je pri višim koncentracijama gustina rasta *S. epidermidis* bila smanjena. Štaviše, nakon 24 h stepen inhibicije bio je do 47 % u poređenju sa kontrolom (slika 4.29.a). Ekstrakt jagode se pokazao kao dobar stimulator rasta *S. epidermidis* samo pri najnižoj koncentraciji dajući za 11 % veću vrednost OD₆₀₀ u poređenju sa kontrolnim uzorkom nakon 24 h rasta (slika 4.29.b). Dalje povećanje koncentracije je tokom prvih 10 h uticalo na blago smanjenje gustine rasta, pri čemu nakon 24 h nije zapažen ovaj efekat. Štaviše koncentracije 0,05-0,0625 mg GAE/mL dale su isti rezultat kao i kontrolni uzorak. Sa druge strane, pri 0,08-0,1 mg GAE/mL došlo je do inhibicije rasta 23-36 %. Ekstrakti tropova crne ribizle (slika 4.29.c), jagode (slika 4.29.e) i aronije (slika 4.29.f) su pokazali sličan uticaj na rast *S. epidermidis*, odnosno promociju rasta pri 0,025 mg GAE/mL do 10 %, dok se sa povećanjem koncentracije polifenola smanjivala brzina proliferacije, tako da je rast bio inhibiran do 46 % pri najvećoj koncentraciji. Ekstrakt tropa maline (slika 4.29.d) je pokazao odlične rezultate pri koncentracijama 0,025-0,05 mg GAE/mL tj. promociju rasta do maksimalnih 43 % u poređenju sa kontrolnim uzorkom nakon 24 h gajenja. Koncentracija od 0,0625 mg GAE/mL je blago inhibirala rast tokom početnih sati gajenja, dok je nakon 24 h rasta bila prisutna blaga stimulacija. Očekivano, najviše koncentracije (0,08-0,1 mg GAE/mL) su inhibirale rast, i to do 36 %.



Slika 4.30. Uticaj ekstrakata crne ribizle (a), jagode (b), tropa crne ribizle (c), tropa maline (d), tropa jagode (e) i tropa aronije (f) dobijenih enzimski potpomognutom ekstrakcijom na rast bakterije *S. aureus*.

Svi ekstrakti su pokazali isti trend kada je u pitanju bakterija *S. aureus* (slika 4.30.a-f) – supresiju rasta sa porastom koncentracije polifenola ekstrakata. Stepem inhibicije *S. aureus* u prisustvu ekstrakta crne ribizle (slika 4.30.a) je bio u opsegu od 19 % do maksimalnih 77 %, ukazujući na snažna

antibakterijska svojstva ovog ekstrakta. Ostali ekstrakti su pokazali stepen inhibicije od 11-63 % u zavisnosti od primenjene koncentracije.

Pošto su svi ekstrakti pokazali manji ili veći stepen stimulacije rasta komensalne bakterije *S. epidermidis* pri nižim koncentracijama, a inhibirali rast patogene bakterije *S. aureus* pri svim primenjenim koncentracijama, izračunat je PK_{OD} (tabela 4.21) da bi se kvantifikovao ukupan efekat na obe bakterije. Ekstrakt crne ribizle je dao ~2 puta veće vrednosti PK_{OD} u poređenju sa istim vodenim ekstraktom (tabela 4.11), ukazujući na to da je enzimski potpomognuta ekstrakcija poboljšala ne samo antioksidativna svojstva ekstrakata, već je poboljšala i njihov prebiotski potencijal. Sve vrednosti su bile pozitivne, što znači da je pri svim testiranim koncentracijama udeo komensalne bakterije *S. epidermidis* bio viši u poređenju sa patogenom bakterijom *S. aureus*. Međutim, samo pri nižim koncentracijama (0,025-0,05 mg GAE/mL) je postojala stimulacija bakterije *S. epidermidis* uz istovremenu inhibiciju *S. aureus*. Sa porastom koncentracije ekstrakta, bakterija *S. epidermidis* je bila osetljivija na komponente ekstrakta što je dovelo do neželjene inhibicije rasta. Izrazito poboljšan prebiotski efekat u poređenju sa odgovarajućim vodenim ekstraktom, pokazao je i ekstrakt tropa maline. Pri 0,025 mg GAE/mL njegov PK_{OD} bio je maksimalan i iznosio je 0,597, dok je pri 0,05-0,625 mg GAE/mL prebiotski efekat bio približnih vrednosti (u proseku PK_{OD} 0,458). Dalje povećanje koncentracije je inhibiralo obe bakterije odnosno pri ovim koncentracijama je izostao prebiotski efekat.

Ekstrakt jagode dobijen enzimski potpomognutom ekstrakcijom je dao veće vrednosti PK_{OD} u poređenju sa vodenim, pri čemu je prebiotski efekat postojao pri koncentraciji od 0,025-0,05 mg GAE/mL, dok su više koncentracije inhibirale rast obe bakterije. Sa druge strane, ekstrakti tropova crne ribizle, jagode i aronije dali su nešto niže vrednosti u poređenju sa odgovarajućim vodenim ekstraktima. Smanjenje prebiotskog efekta je posledica manje stimulacije *S. epidermidis*, odnosno manje inhibicije *S. aureus*.

Tabela 4.21. Prebiotski kapacitet ekstrakata dobijenih enzimski potpomognutom ekstrakcijom

Ekstrakt	Koncentracija ekstrakata				
	0,025 mg GAE/mL	0,05 mg GAE/mL	0,0625 mg GAE/mL	0,08 mg GAE/mL	0,1 mg GAE/mL
Crna ribizla	0,450	0,379	0,353	0,198	0,303
Jagoda	0,245	0,302	0,352	0,248	0,252
Trop crne ribizle	0,182	0,243	0,290	0,248	0,256
Trop maline	0,597	0,459	0,456	0,274	0,211
Trop jagode	0,091	0,134	0,129	0,135	0,176
Trop aronije	0,273	0,204	0,237	0,357	0,164

Razlike prebiotske aktivnosti između ekstrakata dobijenih enzimski potpomognutom ekstrakcijom i konvencionalnom ekstrakcijom, očigledno je da potiču od sastava samih ekstrakata. Prvenstveno, enzimi koji su korišćeni u ekstrakciji su razgradnjom strukturnih polisaharida oslobodili vezane polifenole i time povećali prinose polifenola, ali i sadržaj različitih oligo- i monosaharida. Svakako, dejstvom enzima nije proporcionalno povećan sadržaj svih polifenolnih klasa, niti tipova šećera, što bi moglo značiti da pri istoj koncentraciji vodenog i enzimski dobijenog ekstrakta, odnos između polifenolnih klasa, kao i odnos između šećera (mono- i oligosaharida), nije isti, i da je to uzrok izraženijeg prebiotskog efekta [310-312].

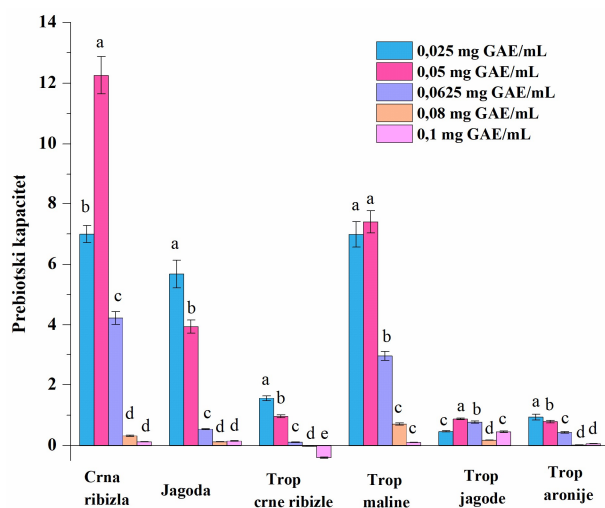
Drugo objašnjenje bi moglo biti to da su određene enzimске aktivnosti iz korišćenih enzimskih preparata dovele do modifikacije polifenolnih jedinjenja. Očekivano je da su glikozil hidrolaze dovele do raskidanja glikozidnih veza između polifenola i šećernih jedinica dajući aglikone koji pored toga što imaju veću antioksidativnu aktivnost, snažniji su i antimikrobni agensi [227,313,314]. Takođe, ovi enzimi mogu raskinuti glikozidne veze u samoj šećernoj jedinici glikozida, dajući glikozide sa manjim brojem šećernih jedinica. Ova pretpostavka je za ekstrakt crne ribizle potvrdila i RP-HPLC analiza, budući da

su hromatogrami enzimski tretiranog i netretiranog ekstrakta pokazali različite profile antocijanina merene na 520 nm (slika 4.18). Stoga, pretpostavlja se da formirani monoglukozidi pokazuju izmenjeni efekat na rast ispitivanih sojeva bakterija u poređenju sa nativnim oblicima. Ovo je u skladu sa literaturnim podacima u kojima je prijavljena promena delovanja nekoliko glikozida flavonoida na predstavnike ljudske mikrobiote nakon delimične deglikolizacije. Sličan uticaj dominantnih i sporednih enzimskih aktivnosti u korišćenim preparatima najverovatnije je bio glavni razlog razlika u sastavu ekstrakata dobijenih konvencionalnom ekstrakcijom i enzimski potpomognutom ekstrakcijom i u slučaju drugih testiranih supstrata, što je dalje dovelo do detektovanih razlika u prebiotskom efektu.

Takođe, potencijalno prisustvo transferaza (poput glukozil transferaze) iz enzimskih preparata ili samog biljnog materijala, može katalizovati reakciju između aglikona i šećernih jedinica formirajući nove glikozide polifenola [315-318]. Dodatno, potencijalno prisustvo esteraza (poput feruloil esteraze i dr.) u primenjenim enzimskim preparatima, mogu dovesti do raskidanja estarskih veza između polifenola i šećerne jedinice dajući slobodne polifenole ili pak mogu vršiti biotransformaciju jedinjenja koji mogu dovesti do izmenjenog uticaja na rast bakterija kože [319].

4.5.2. Ispitivanje uticaja ekstrakata na ko-kulturu bakterija *S. epidermidis* i *S. aureus*

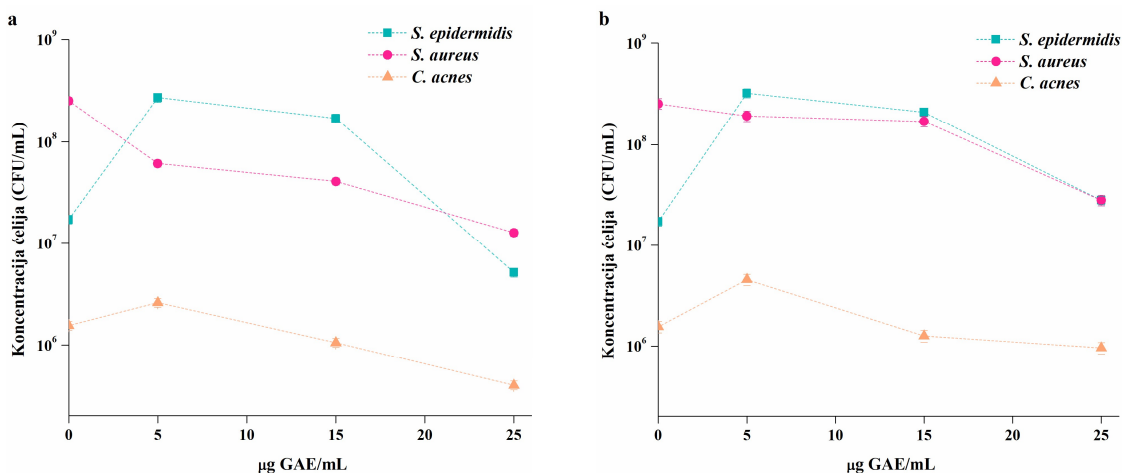
Uticaj ekstrakata dobijenih enzimski potpomognutom ekstrakcijom ispitan je i na ko-kulturu bakterija *S. epidermidis* i *S. aureus* u koncentracijama od 0,025-0,1 mg GAE/mL. Rezultati brojanja kolonija nakon 24 h su pokazali veći broj kolonija bakterije *S. epidermidis* pri koncentraciji 0,025 mg GAE/mL i 0,05 mg GAE/mL za ekstrakt crne ribizle i tropa maline, i pri 0,025 mg GAE/mL za ostale ekstrakte, u poređenju sa kontrolom. Pri svim ostalim koncentracijama bio je prisutan manji broj kolonija u poređenju sa kontrolom. Sa druge strane, broj kolonija bakterije *S. aureus* je pri svim koncentracijama i ekstraktima bio niži u poređenju sa kontrolom, pri čemu je primećen trend da porast koncentracije polifenola dovodi do smanjenja broja kolonija. Na osnovu broja kolonija izračunat je PK_{CFU} (slika 4.31), koji je pokazao značajno poboljšan prebiotski efekat u odnosu na vodene ekstrakte crne ribizle, jagode i tropa maline (slike 4.8 i 4.12). Ekstrakti tropa crne ribizle, jagode i aronije su dali niže vrednosti PK_{CFU} u odnosu na vodene ekstrakte, ukazujući na to da manje efikasno utiču na željeni odnos bakterija *S. epidermidis* i *S. aureus*. Kako su ekstrakti crne ribizle i tropa maline dali bolje rezultate u većem opsegu koncentracija u poređenju sa ekstraktom jagode, odabrani su za dalja ispitivanja.



Slika 4.31. Prebiotski kapacitet odabranih ekstrakata bobičastog voća i tropova dobijenih enzimski potpomognutom ekstrakcijom za ko-kulturu *S. epidermidis* i *S. aureus*. Različita mala slova označavaju statistički značajnu razliku ($p \leq 0,05$) između testiranih koncentracija svakog ekstrakta.

4.5.3. Ispitivanje uticaja izabranih ekstrakata na *stratum corneum* modelu

Stratum corneum model je pojednostavljen *in vitro* model koji imitira površinski sloj kože, i sastoji se od agara prekrivenim kalusom dobijenim struganjem peta zdravih volontera. Pošto bakterije žive na ljudskoj koži vezane za mrtve korneocite, kalus je zamišljen kao prirodni izvor nutrijenata za mikroorganizme. Na ovom modelu je ispitan rast aerobnih bakterija *S. epidermidis* i *S. aureus*, kao i anaerobne bakterije *C. acnes*. U prvim eksperimentima, ekstrakti crne ribizle i tropa maline su bili u opsegu 25-100 µg GAE/mL, međutim koncentracije više od 25 µg GAE/mL su pored patogenih bakterija, inhibirale i rast *S. epidermidis*, pa je zbog toga ispitan niži opseg koncentracija (5-25 µg GAE/mL). Bakterije su gajene na kalus modelu u prisustvu ekstrakata ili bez (kontrola) tokom 24 h, nakon čega je određen broj kolonija izražen kao broj kolonija po mL agara (CFU/mL agara) i prikazan na slici 4.32.

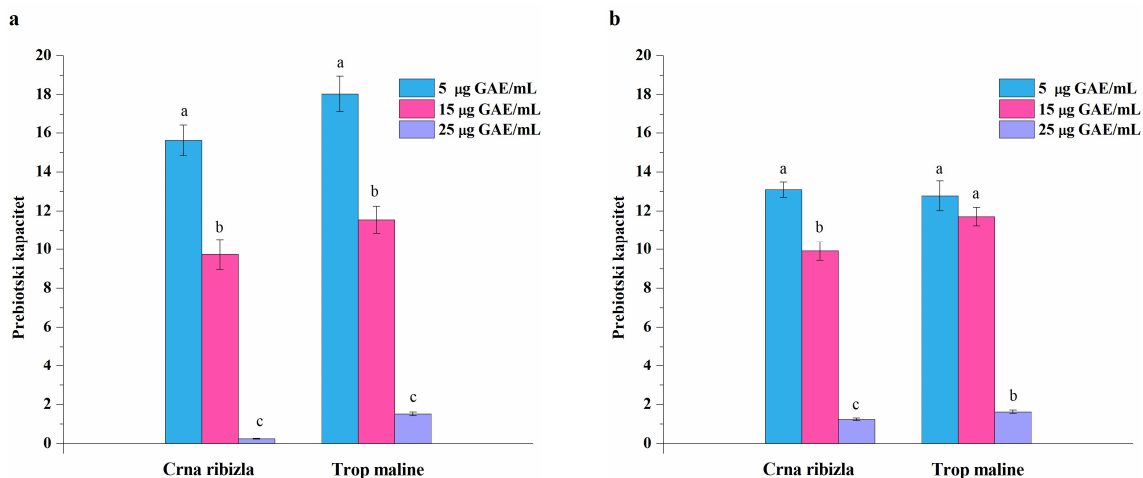


Slika 4.32. Broj kolonija (CFU/mL agara) bakterije *S. epidermidis*, *S. aureus* i *C. acnes* u prisustvu ekstrakta crne ribizle (a) i tropa maline (b) pri koncentracijama od 0-25 µg GAE/mL nakon 24 h gajenja.

Slučaj da optimalne koncentracije ispitivane komponente, dobijene pri gajenju dermalnih bakterija u tečnoj hranljivoj podlozi, ne daju isti rezultat kao i kada rastu na *stratum corneum* modelu je dobijen i u studiji Uehare i saradnika [320]. Različiti rezultati su posledica toga što je tečna hranljiva podloga bogatija hranljivim materijama, što im omogućava brži rast, a posledično i veću otpornost na ispitivane komponente.

Kao što se može videti sa slike 4.32.a, koncentracije ekstrakta crne ribizle 5-10 µg GAE/mL su povećale broj vijabilnih ćelija *S. epidermidis* u poređenju sa kontrolnim uzorkom, dok je koncentracija 25 µg GAE/mL dovela do blage inhibicije rasta. Primećena je blaga stimulacija bakterije *C. acnes* pri 5 µg GAE/mL ovog ekstrakta, dok su preostale koncentracije smanjile broj vijabilnih ćelija. Sa druge strane, sve primenjene koncentracije su usporile rast *S. aureus*. Ekstrakt tropa maline (slika 4.32.b) je u manjoj ili većoj meri podstakao rast *S. epidermidis* pri svim primenjenim koncentracijama. Koncentracije 5 - 10 µg GAE/mL ovog ekstrakta nisu značajno uticale na rast *S. aureus*, ali je pri 25 µg GAE/mL primećena inhibicija. Kao i u slučaju ekstrakta crne ribizle, najmanja koncentracija ekstrakta tropa maline je dovela do povećanja broja kolonija *C. acnes* i to trostruko više u odnosu na kontrolu, dok preostale dve koncentracije nisu uticale na rast.

Prebiotski efekat ekstrakata je izražen preko PK_{CFU} koji uzima u obzir uticaj na rast komensalne bakterije *S. epidermidis* i oportunistički patogene *S. aureus*. Međutim, kako je i *C. acnes* potencijalni patogeni mikroorganizam, u ovom delu je izračunat PK_{CFU} i za bakterije *S. epidermidis* i *C. acnes*, a dobijeni rezultati prikazani su na slici 4.33.



Slika 4.33. Prebiotski kapacitet ekstrakta crne ribizle i tropa maline izračunat na osnovu broja kolonija bakterija *S. epidermidis* i *S. aureus* (a) i broja kolonija *S. epidermidis* i *C. acnes* (b) nakon 24 h gajenja. Različita mala slova označavaju statistički značajnu razliku ($p \leq 0,05$) između testiranih koncentracija svakog ekstrakta.

Bakterija *S. aureus* je prolazni mikroorganizam, ali u slučaju oslabljenog imunološkog sistema domaćina i različitih spoljašnjih faktora može se zadržati na koži i nekontrolisano razmnožiti. Povećan broj ovog mikroorganizma je povezan sa mnogim oboljenjima, pri čemu se kao najpoznatiji među svim starosnim dobima pacijenata ističe upravo atopijski dermatitis. *S. epidermidis* može da kontroliše rast *S. aureus* sekrecijom specifičnih antimikrobnih peptida, pa je zato ključno da se broj ove bakterije u kožnim oboljenjima poveća kako bi mogla da ispolji svoj simbiotski efekat. Stoga, kao što se može videti sa slike 4.33.a, oba ekstrakta pri svim primenjenim koncentracijama su dali pozitivan PK_{CFU} ukazujući na to da je broj ćelija *S. epidermidis* viši u odnosu na broj *S. aureus*. Oba ekstrakta su pokazala isti trend – povećanje koncentracije polifenola smanjuje prebiotski efekat. Kao najefikasnije izdvojile su se koncentracije 5 µg GAE/mL i 15 µg GAE/mL oba ekstrakta, dajući PK_{CFU} od 9,75-18,05, usled prisutne istovremene stimulacije komensalne bakterije i inhibicije patogene bakterije. Najviša koncentracija ekstrakta crne ribizle je negativno uticala na proliferaciju i *S. epidermidis* (PK_{CFU} od 0,25), dok ekstrakt maline nije povećao broj kolonija ove bakterije u poređenju sa kontrolom (PK_{CFU} od 1,52).

Kao što je već pomenuto, bakterija *C. acnes* je sastavni deo stalne mikrobiote kože i u normalnim uslovima živi u homeostazi sa domaćinom. Štaviše, predstavlja bitan mikroorganizam, jer je poznato da kontroliše rast ostalih bakterija, ujedno i *S. aureus* održavajući kožu zdravom. Međutim, veća pažnja je usmerena ka patogenom delovanju ove bakterije, jer je jedan od glavnih mikroorganizama odgovornih za nastanak akni. Za akne je karakterističan disbalans između bakterije *S. epidermidis* i *C. acnes* i jedna od hipoteza je da upravo povećanje broja ćelija *S. epidermidis* u odnosu na *C. acnes* može olakšati lečenje. Upravo taj efekat je i postignut korišćenjem ekstrakata crne ribizle i tropa maline, na šta ukazuje pozitivan PK_{CFU} dobijen pri svim primenjenim koncentracijama (slika 4.33.b). Ekstrakt crne ribizle je pokazao da porast koncentracije polifenolnih jedinjenja smanjuje PK_{CFU} , dok je dodatak ekstrakta tropa maline izazvao sličan rezultat pri 5-15 µg GAE/mL ($p > 0,05$), a najslabiji pri 25 µg GAE/mL.

Ukoliko se uporedi dejstvo ekstrakta crne ribizle i tropa maline na testirane bakterije, može se zaključiti da su koncentracije od 5-10 µg GAE/mL optimalni izbor, s obzirom na to da je tada detektovan najveći rast potencijalne probiotske bakterije *S. epidermidis*. Drugim rečima, moglo bi se reći da stimulacijom ove koagulaza negativne bakterije putem pomenutih ekstrakata je moguće uticati na disbalans dermalne mikrobiote, čime bi se stvorili uslovi da ova bakterija deluje kao prirodna odbrana od patogena kroz različite mehanizme delovanja.

4.5.4. Ispitivanje uticaja izabranih ekstrakata na rast različitih sojeva bakterija kože

Kroz dodatni eksperiment ispitan je uticaj ekstrakata crne ribizle i tropa maline dobijenih enzimski potpomognutom ekstrakcijom na rast drugih predstavnika mikrobiote kože. Eksperimenti su urađeni na Departmanu za dermatologiju, Univerzitetskog medicinskog centra Radbod u Nijmegenu (Holandija) i pri radu su korišćeni mikroorganizmi iz kolekcije pomenute ustanove. Efekat ekstrakta na nekoliko patogenih i komensalnih bakterija, kao i različitih kliničkih izolata, ispraćen je u opsegu koncentracija (5-100 µg GAE/mL), merenjem optičke gustine hranljive podloge tokom 24 h. Dobijeni stepeni inhibicije/stimulacije nakon 24 h rasta za ekstrakt crne ribizle prikazani su u tabeli 4.22, a za ekstrakt tropa maline u tabeli 4.23.

Tabela 4.22. Stepen stimulacije ili inhibicije rasta različitih komensalnih i patogenih bakterija kože u prisustvu različitih koncentracija ekstrakta crne ribizle

Bakterijski soj	Koncentracija ekstrakta				
	5 µg GAE/mL	15 µg GAE/mL	25 µg GAE/mL	50 µg GAE/mL	100 µg GAE/mL
<i>C. acnes</i> ATCC 6919	b.e.	b.e.	-	--	--
<i>C. acnes</i> H199-04, klinički izolat	-	--	---	---	---
<i>C. acnes</i> H186-60, klinički izolat	--	--	---	----	---
<i>C. aurimucosum</i> , klinički izolat	b.e.	b.e.	--	---	---
<i>S. aureus</i> ATCC 2913	-	-	--	--	---
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	-	-	--	--	---
<i>S. aureus</i> MRSA	b.e.	b.e.	-	---	---
<i>S. aureus</i> AD 9, klinički izolat	b.e.	b.e.	b.e.	-	--
<i>S. aureus</i> AD 11, klinički izolat	-	-	--	--	---
<i>S. aureus</i> AD 17, klinički izolat	-	-	--	---	---
<i>S. aureus</i> AD 20, klinički izolat	b.e.	-	-	-	--
<i>S. aureus</i> AD 23, klinički izolat	b.e.	-	--	--	---
<i>S. capitis</i> , klinički izolat	b.e.	b.e.	-	-	---
<i>S. epidermidis</i> BHF 389	b.e.	b.e.	+	-	---
<i>S. epidermidis</i> ATCC 14990	b.e.	+	b.e.	-	---
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	b.e.	+	-	---	---
<i>S. hominis</i> , klinički izolat	b.e.	b.e.	-	-	---

Legenda: „-“ – inhibicija rasta, „+“ – stimulacija rasta, b.e. – bez efekta na rast. Vrednosti stepena inhibicije ili stimulacije od 0-10% ne utiču na rast. Vrednosti između 11-30% predstavljaju umerenu inhibiciju (-) odnosno stimulaciju (+). Vrednosti između 31-70% predstavljaju jaku inhibiciju (--) odnosno stimulaciju (++). Vrednosti između 71-100% predstavljaju veoma jaku inhibiciju (---) odnosno stimulaciju (+++).

Dodatak ekstrakta crne ribizle je pokazao različit efekat na *C. acnes* u zavisnosti od primenjene koncentracije, ali i od ispitivanog soja. Svakako je rast većine sojeva bio inhibiran već pri najmanjoj koncentraciji, dok je stepen inhibicije rastao sa porastom doze ekstrakta. U literaturi se sojevi bakterije *C. acnes* klasifikuju u tri grupe na osnovu genetskih i morfoloških karakteristika, pri čemu novija istraživanja ističu da su uglavnom sojevi prve grupe povezani sa nastankom akni i drugim kožnim oboljenjima, dok sojevi druge i treće grupe žive u simbiozi sa domaćinom i održavaju kožu zdravom [321]. Bakterija *C. acnes* ATCC 6919 pripada prvoj grupi [322], a dobijeni rezultat pokazuje da ekstrakt crne ribizle može efikasno inhibirati njen rast pri koncentracijama većim od 15 µg GAE/mL. Ekstrakt crne ribizle pokazuje veliki potencijal za lečenje akni, s obzirom na to da već pri vrlo niskim koncentracijama inhibira rast kliničkih izolata *C. acnes*. Kada je u pitanju *Corynebacterium aurimucosum* (*C. aurimucosum*), bakterija koja je prisutna u normalnoj mikrobioti kože, može se videti da je inhibicija prisutna tek pri koncentracijama većim od 25 µg GAE/mL [323]. Međutim, ova bakterija se smatra i oportunističkim patogenom i često je povezuju sa pojavom akni, pa se može pretpostaviti da bi ekstrakt crne ribizle, čak i pri minimalnoj koncentraciji od 25 µg GAE/mL, efikasno smanjio rast različitih bakterijskih vrsta uključenih u razvoj akni [324].

Ekstrakt crne ribizle je pokazao jako antimikrobno dejstvo i prema drugim sojevima bakterije *S. aureus* (ATCC 2913 i ATCC 6538) pri najmanjoj koncentraciji, pri čemu je ovaj efekat bio izraženiji sa porastom sadržaja ekstrakta, dok je meticilin rezistentni soj (MRSA) pokazao manju osetljivost na komponente ekstrakta i tek pri koncentracijama 50-100 µg GAE/mL zapažena je veoma jaka inhibicija. Klinički sojevi izolovani sa lezija na koži pacijenata sa atopijskim dermatitisom (AD 9, AD 11, AD 17, AD 20, AD 23) su pokazali različit stepen osetljivosti na prisustvo ekstrakta crne ribizle. Generalno, može se reći da bi koncentracije više od 50 µg GAE/mL efikasno inhibirale rast ovih izolata i mogle bi biti primenjene kao zamena za antibiotike i bez stvaranja neželjene rezistencije na antibiotike [325]. Poznato je da polifenoli deluju na membrane ili ćelijski zid mikroorganizama specifičnim vezivanjem za njihove ćelijske membrane izazivajući funkcionalna i strukturna oštećenja [326].

Komensalne bakterije poput koagulaza negativnih stafilokoka, među koje spadaju različiti sojevi *S. epidermidis*, *S. hominis* i *S. capitis*, su poznate po tome da sprečavaju razvoj upalnih procesa na koži kroz kontrolu rasta patogenih ostvarenu dejstvom antimikrobnih peptida. Konkretno, istraživanja ukazuju da je nastanak atopijskog dermatitisa povezan sa smanjenjem broja koagulaza negativnih bakterija [89,327]. Ekstrakt crne ribizle nije uticao na smanjenje broja ovih bakterija ili je čak stimulisao njihov rast u opsegu koncentracija od 5-25 µg GAE/mL, ukazujući na pozitivno delovanje ispitivanog ekstrakta na specifičnu grupu bakterija. Štaviše, ovo bi značilo da je odabirom odgovarajućih koncentracija ekstrakta moguće postići prebiotski efekat odnosno inhibiciju sojeva *S. aureus*, bez uticaja ili čak uz stimulaciju koagulaza negativnih bakterija koje bi u novonastalim uslovima mogle da dodatno smanje rast patogena i olakšaju lečenje kože prirodnim mehanizmima odbrane [78,328,329].

Tabela 4.23. Stepen stimulacije ili inhibicije rasta različitih komensalnih i patogenih bakterija kože u prisustvu različitih koncentracija ekstrakta tropa maline

Bakterijski soj	Koncentracija ekstrakta				
	5 µg GAE/mL	15 µg GAE/mL	25 µg GAE/mL	50 µg GAE/mL	100 µg GAE/mL
<i>C. acnes</i> ATCC 6919	b.e.	b.e.	b.e.	-	--
<i>C. aurimucosum</i> , klinički izolat	-	--	--	---	---
<i>S. aureus</i> ATCC 2913	--	--	--	--	--
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	--	--	--	--	--
<i>S. aureus</i> MRSA	b.e.	-	--	---	---
<i>S. aureus</i> AD 9, klinički izolat	b.e.	-	-	--	---
<i>S. aureus</i> AD 11, klinički izolat	-	--	--	---	---
<i>S. aureus</i> AD 17, klinički izolat	-	--	-	---	---
<i>S. aureus</i> AD 20, klinički izolat	-	-	--	---	---
<i>S. aureus</i> AD 23, klinički izolat	-	--	--	--	---
<i>S. capitis</i> , klinički izolat	b.e.	b.e.	++	+	--
<i>S. epidermidis</i> BHF 389	--	--	--	--	---
<i>S. epidermidis</i> ATCC 14990	b.e.	+	b.e.	-	---
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	-	---	---	---	---
<i>S. hominis</i> , klinički izolat	b.e.	b.e.	b.e.	-	--

Legenda: „-“ – inhibicija rasta, „+“ – stimulacija rasta, b.e. – bez efekta na rast. Vrednosti stepena inhibicije ili stimulacije od 0-10% ne utiču na rast. Vrednosti između 11-30% predstavljaju umerenu inhibiciju (-) odnosno stimulaciju (+). Vrednosti između 31-70% predstavljaju jaku inhibiciju (--) odnosno stimulaciju (++) . Vrednosti između 71-100% predstavljaju veoma jaku inhibiciju (---) odnosno stimulaciju (+++).

Kada je u pitanju ekstrakt tropa maline (tabela 4.23), može se primetiti da je prema bakteriji *C. acnes* ATCC 6919 ispoljio inhibitorno dejstvo tek pri koncentraciji od 50 µg GAE/mL i to slabije u poređenju sa ekstraktom crne ribizle. Sa druge strane, pri svim koncentracijama je pokazao antimikrobno dejstvo usmereno ka *C. aurimucosum* koje se pojačavalo sa porastom koncentracije ekstrakta. Takođe, dodatak ovog ekstrakta u hranljivu podlogu je u većoj meri redukovao rast MRSA i kliničkih izolata bakterije *S. aureus* u poređenju sa ekstraktom crne ribizle, s obzirom na to da je već pri manjim dozama (5-15 µg GAE/mL) pokazao efekat od umerene do jake inhibicije. Jak antimikrobni efekat je primećen i

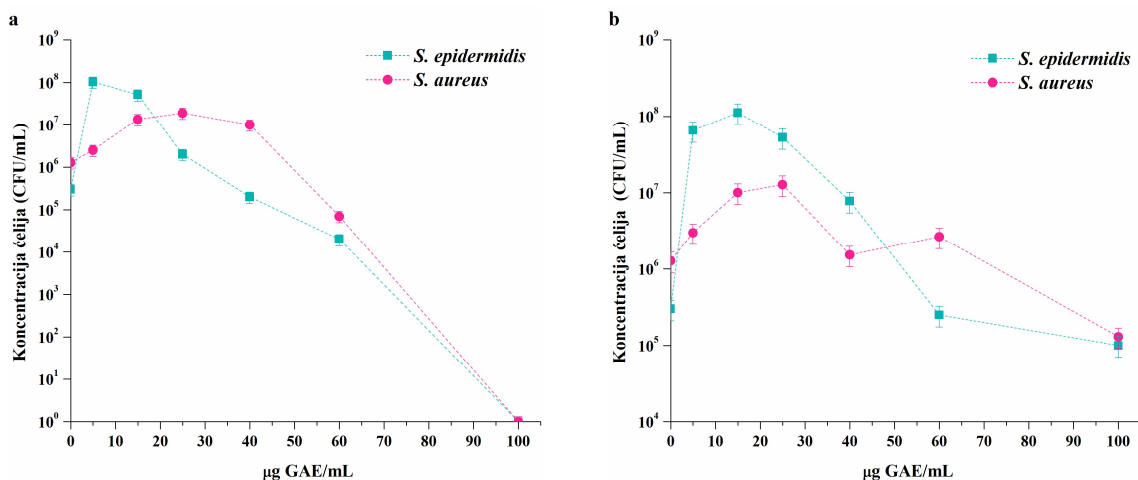
prema sojevima bakterije *S. epidermidis* (BHF 389 i ATCC 12228). Interesantno, niže primenjene koncentracije ovog ekstrakta nisu imale uticaj na rast *S. capitis*, dok je pri 25-50 µg GAE/mL primećena jaka stimulacija rasta.

Generalno, može se zaključiti da oba ekstrakta imaju sposobnost da utiču na diverzitet mikrobiote kože i to u korist komensalnih bakterija kada se primene u odgovarajućim koncentracijama.

4.5.5. Ispitivanje uticaja izabranih ekstrakata na rast ko-kulture *S. epidermidis* i kliničkog izolata bakterije *S. aureus* na *stratum corneum* modelu

Kako bi se potvrdila hipoteza da bakterija *S. epidermidis* u prisustvu prebiotika odnosno ekstrakata crne ribizle i tropa maline može da nadraste *S. aureus* i pokaže svoj probiotski potencijal, urađen je dodatni eksperiment. Tačnije, ispitan je rast mešane kulture *S. epidermidis* DSM 20044 i soja izolovanog sa kože pacijenata sa atopijskim dermatitisom – *S. aureus* AD 17 na *stratum corneum* modelu. Koncentracija ekstrakata bila je 5-100 µg GAE/mL. Nakon delovanja ekstrakata tokom 24 h, određen je broj kolonija na manitol slanom agaru kao CFU/mL agara (slika 4.34).

Delovanje ekstrakta crne ribizle na ko-kulturu koagulaza negativne *S. epidermidis* i kliničkog izolata *S. aureus* je bilo pozitivno pri koncentraciji od 5-15 µg GAE/mL, jer je tada broj vijabilnih kolonija *S. epidermidis* bio viši u odnosu na *S. aureus*, dok je dalje povećanje koncentracije ekstrakta pokazalo antibakterijsku aktivnost usmerenu ka ovoj bakteriji. Nasuprot tome, koncentracije 25 - 60 µg GAE/mL su pokazale bakteriostatički efekat na *S. aureus*, dok je koncentracija od 100 µg GAE/mL imala bakteriocidno dejstvo. Sa druge strane, ekstrakt tropa maline je u širem opsegu koncentracija (5-25 µg GAE/mL) pokazao stimulaciju rasta *S. epidermidis* i *S. aureus* u poređenju sa odgovarajućim kontrolama, dok je dalje povećanje doze ovog ekstrakta (60-100 µg GAE/mL) dovelo do veće inhibicije *S. epidermidis* nego *S. aureus*.

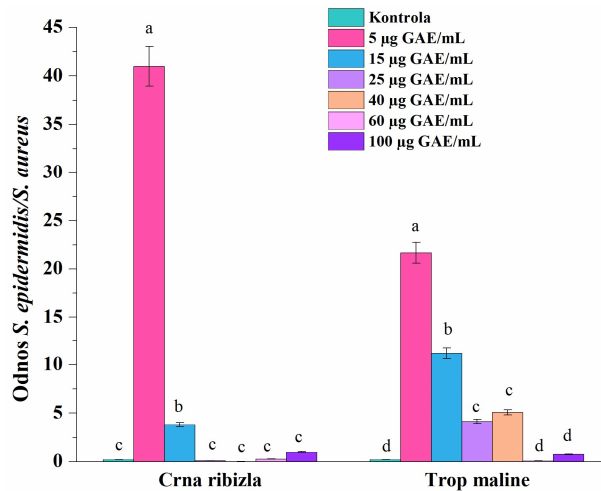


Slika 4.34. Broj kolonija (CFU/mL agara) bakterije *S. epidermidis* DSM 20044 i *S. aureus* AD 17 nakon rasta u ko-kulturi u prisustvu ekstrakta crne ribizle (a) i tropa maline (b) pri koncentracijama od 0-100 µg GAE/mL tokom 24 h gajenja.

Kao što se može videti sa slike 4.35 koja prikazuje odnos broja kolonija bakterija *S. epidermidis* i *S. aureus*, u uzorku bez dodatka ekstrakta (kontrola) odnos je bio 0,23 što govori da je ravnoteža pomerena u korist patogene bakterije. Međutim, dodatak ekstrakta do krajnje koncentracije od 5 µg GAE/mL je dovelo do povećanja broja vijabilnih kolonija *S. epidermidis* čak ~41 put za ekstrakt crne ribizle, odnosno ~22 puta za ekstrakt tropa maline, u poređenju sa brojem kolonija kliničkog izolata

S. aureus. Primer izraslih kolonija na pločama sa manitol slanim agarom sa dodatkom najmanje i najveće koncentracije ekstrakta crne ribizle, kao i kontrolnog uzorka, prikazan je u Prilogu 1.

Dalje povećanje koncentracije polifenola je dovelo do drastičnog pada vrednosti odnosa broja vijabilnih kolonija ove dve bakterije kada je u pitanju ekstrakt crne ribizle, dok je kod ekstrakta tropa maline primećen blaži pad pomenutih odnosa. Različito ponašanje bakterija u prisustvu ova dva ekstrakta je najverovatnije posledica njihovog različitog hemijskog i saharidnog sastava. Svakako, dobijen rezultat potvrđuje hipotezu da odabir odgovarajuće koncentracije ekstrakta crne ribizle ili tropa maline ima prebiotski efekat na mikrobiotu kože i da može uticati na njen diverzitet.



Slika 4.35. Odnos broja vijabilnih kolonija bakterija *S. epidermidis* DSM 20044 i *S. aureus* AD 17 nakon rasta u ko-kulturi u prisustvu ekstrakta crne ribizle i tropa maline tokom 24 h gajenja.

4.5.6. Ispitivanje uticaja izabranih ekstrakata na mikrobiom kože

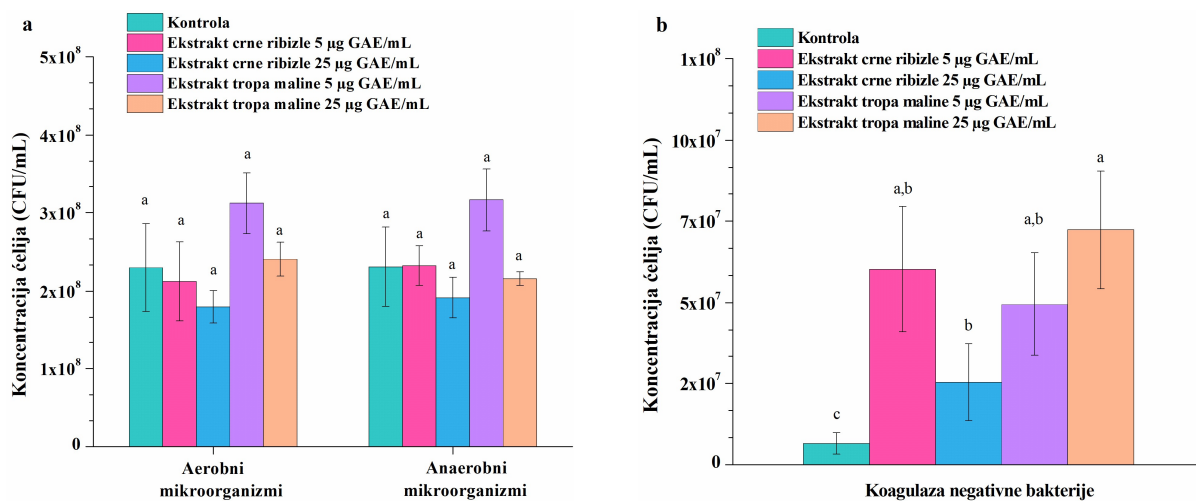
4.5.6.1. Uticaj na mikrobiom zdrave kože

Kao poslednji eksperiment za procenu prebiotskog efekta ekstrakata crne ribizle i tropa maline dobijenih enzimski potpomognutom ekstrakcijom, ispitan je njihov uticaj na mikrobiotu kože. Koncentracije ekstrakata bile su 5 µg GAE/mL i 25 µg GAE/mL. Uzorak mikrobiote kože dobijen je mešanjem briseva pazuha pet zdravih volontera. Rast mikroorganizama je ispitan na *stratum corneum* modelu, pri čemu je nakon 24 h delovanja ekstrakata određen broj kolonija nanošenjem na manitol slani agar i krvni agar. Manitol slani agar je korišćen kako bi se video uticaj na koagulaza negativne i pozitivne bakterije, dok su ploče sa krvnim agarom inkubirane u aerobnim i anaerobnim uslovima u cilju brojanja kolonija mikroorganizama koje žive u pomenutim uslovima.

Broj kolonija aerobnih i anaerobnih bakterija (slika 4.36.a) je pokazao da nakon 24 h delovanja ekstrakata nije došlo do statistički značajne promene ($p > 0,05$) u broju kolonija u poređenju sa odgovarajućom kontrolom. Pretpostavlja se da je pri svim koncentracijama ekstrakata došlo do kombinovanog efekata koji obuhvata različite stepene stimulacije i inhibicije bakterijskog rasta, ali da ovaj združeni efekat ne utiče na ukupan broj aerobnih i anaerobnih mikroorganizama u uzorku mikrobioma. Slični rezultati dobijeni su u nekoliko *in vivo* studija koje su ispitivale efekat različitih kozmetičkih sastojaka na mikrobiom kože. Tačnije, ove studije naglašavaju da je došlo do povećanja ili smanjenja nekih vrsta mikroorganizama, ali da nije bilo uticaja na ukupni broj ćelija [330-332]. Stoga može se zaključiti da ekstrakti crne ribizle i tropa maline imaju potencijal za očuvanje diverziteta i

ravnoteže mikrobiote kože i da se mogu smatrati pogodnim za mikrobitu (eng. „*microbiome friendly*“) [330].

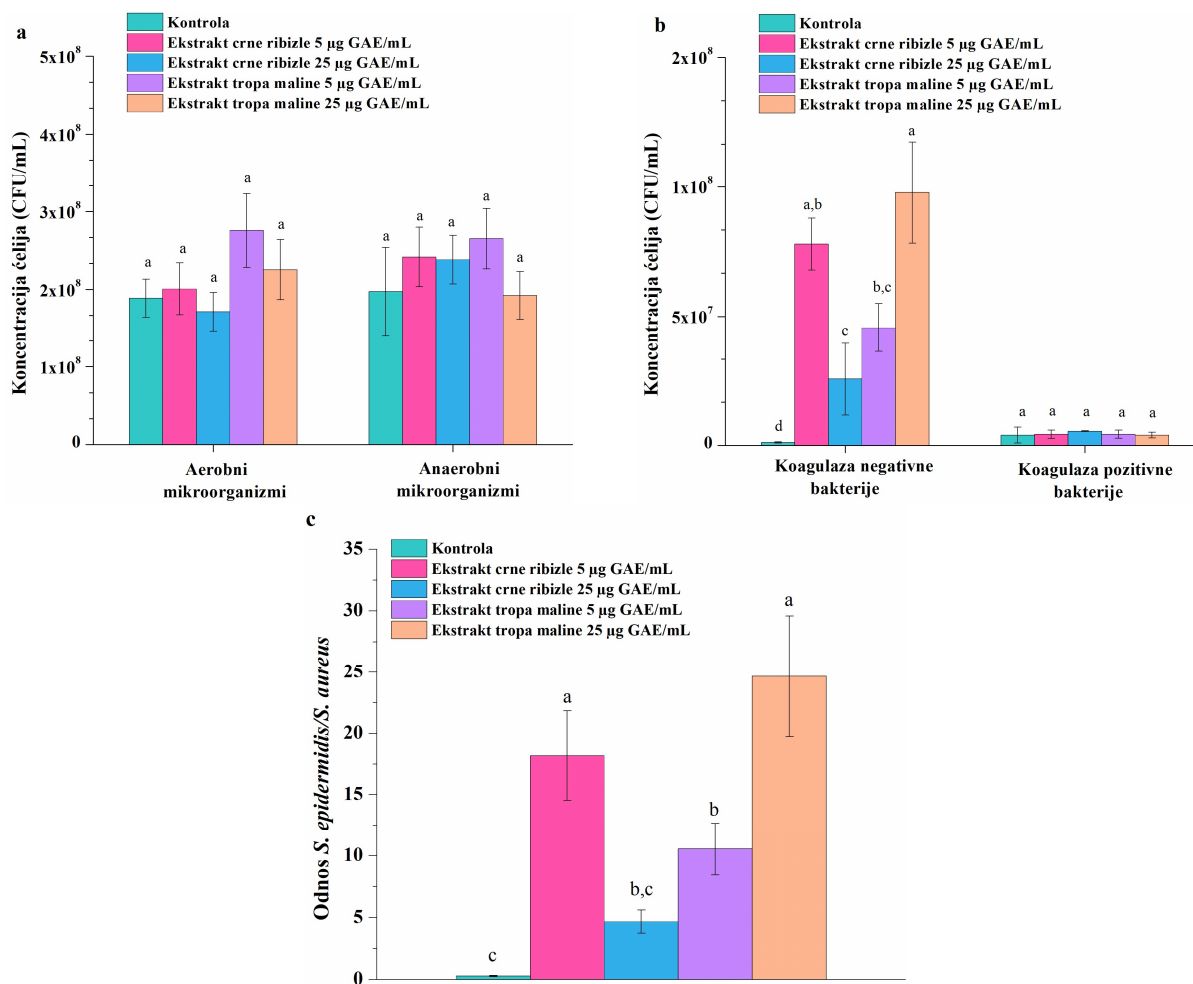
Kolonije detektovane na manitol slanom agaru bile su crvene boje nezavisno od toga da li su gajene sa dodatkom ekstrakata ili bez (Prilog 2), ukazujući na to da u sastavu mikrobiote nisu bile prisutne koagulaza pozitivne bakterije poput bakterije *S. aureus*. S obzirom na to da je uzorak mikrobiote doniran od strane zdravih volontera, ovaj rezultat je bio očekivan [89]. Međutim, broj kolonija koagulaza negativnih bakterija (slika 4.36.b) se statistički razlikovao ($p \leq 0,05$) pri svim primenjenim koncentracijama ekstrakta crne ribizle i tropa maline. Oba ekstrakta su stimulisala rast koagulaza negativnih bakterija, pri čemu je najbolji efekat dobijen u prisustvu ekstrakta crne ribizle pri koncentraciji od 5 $\mu\text{g GAE/mL}$, odnosno pri 25 $\mu\text{g GAE/mL}$ u prisustvu ekstrakta tropa maline. S obzirom na to da se broj kolonija pri pomenutim koncentracijama ekstrakata nije razlikovao ($p > 0,05$), može se primetiti da je ekstrakt crne ribizle efikasniji prebiotik, jer je pri 5 puta manjoj koncentraciji dao slične rezultate kao ekstrakt tropa maline.



Slika 4.36. Ukupan broj kolonija (CFU/mL agara) aerobnih i anaerobnih mikroorganizama uzorka mikrobioma kože dobijenih nakon rasta na krvnom agaru (a) i koagulaza negativnih bakterija dobijenih nakon rasta na manitol slanom agaru (b) bez ili u prisustvu ekstrakata crne ribizle i tropa maline. Različita mala slova označavaju statistički značajnu razliku ($p \leq 0,05$).

4.5.6.2. Uticaj na mikrobiom kože sa atopijskim dermatitisom

Kako je u prethodnom eksperimentu pokazano da ekstrakti crne ribizle i tropa maline pozitivno utiču na mikrobiotu zdrave kože, sledeći korak istraživanja je bio ispitivanje njihovog uticaja na mikrobiotu kože osoba sa atopijskim dermatitisom. Eksperiment je urađen na isti način, pri čemu je kao mikrobiota korišćen uzorak mikrobiote zdravih volontera sa dodatkom kliničkog izolata *S. aureus* AD 17. Na ovaj način izvršena imitacija mikrobioma kože prisutnog na koži pacijenata sa blagim atopijskim dermatitisom, a dobijeni rezultati prikazani su na slici 4.37.



Slika 4.37. Ukupan broj kolonija (CFU/mL agara) aerobnih i anaerobnih mikroorganizama uzorka mikrobioma koji imitira mikrobiom kože sa atopijskim dermatitisom, dobijenih nakon rasta na krvnom agaru (a) i koagulaza negativnih bakterija dobijenih nakon rasta na manitol slanom agaru (b) bez ili u prisustvu ekstrakata crne ribizle i tropa maline. Odnos broja koagulaza pozitivnih i koagulaza negativnih bakterija (c). Različita mala slova označavaju statistički značajnu razliku ($p \leq 0,05$).

Rezultati su pokazali da i u slučaju mikrobiote koji imitira mikrobiotu kože sa atopijskim dermatitisom, broj kolonija aerobnih i anaerobnih mikroorganizama (slika 4.37.a) se nije značajno promenio ($p > 0,05$) pri dodatku ekstrakta crne ribizle ili tropa maline u poređenju sa netretiranim uzorkom. Kada je reč o kolonijama koje su rasle na manitol slanom agaru, bile su prisutne koagulaza negativne i koagulaza pozitivne stafilokoke. Broj kolonija koagulaza negativnih bakterija (slika 4.37.b) je bio viši pri svim primenjenim koncentracijama ekstrakata u poređenju sa kontrolom ($p \leq 0,05$), pri čemu je opet primećeno da je ekstrakt crne ribizle pokazao najbolji rezultat pri 5 µg GAE/mL, a ekstrakt tropa maline pri 25 µg GAE/mL ($p > 0,05$). Nepromenjen broj kolonija koagulaza pozitivne bakterije *S. aureus* ukazuje na to da u ovim uslovima ekstrakti nisu pokazali očekivano inhibitorno dejstvo. Međutim, potrebno je naglasiti da je odnos broja kolonija koagulaza negativnih bakterija i *S. aureus* u kontrolnom uzorku bio 0,3 što implicira da je favorizovan patogen rast, dok je sa dodatkom ekstrakata odnos ovih bakterija bio u opsegu 2-25 u zavisnosti od primenjene doze i vrste ekstrakta (slika 4.37.c).

Ovim eksperimentom je pokazano da je aktivnost ekstrakata crne ribizle i tropa maline usmerena ka stimulaciji rasta koagulaza negativnih bakterija, komensalnih članova mikrobiote kože. Veliki broj *in*

vitro i *in vivo* studija je potvrdio da je povećanje broja koagulaza negativnih bakterija ključno za suzbijanje patogenih bakterija poput *S. aureus*, a samim tim i lečenje atopijskog dermatitisa [89,236,333,334].

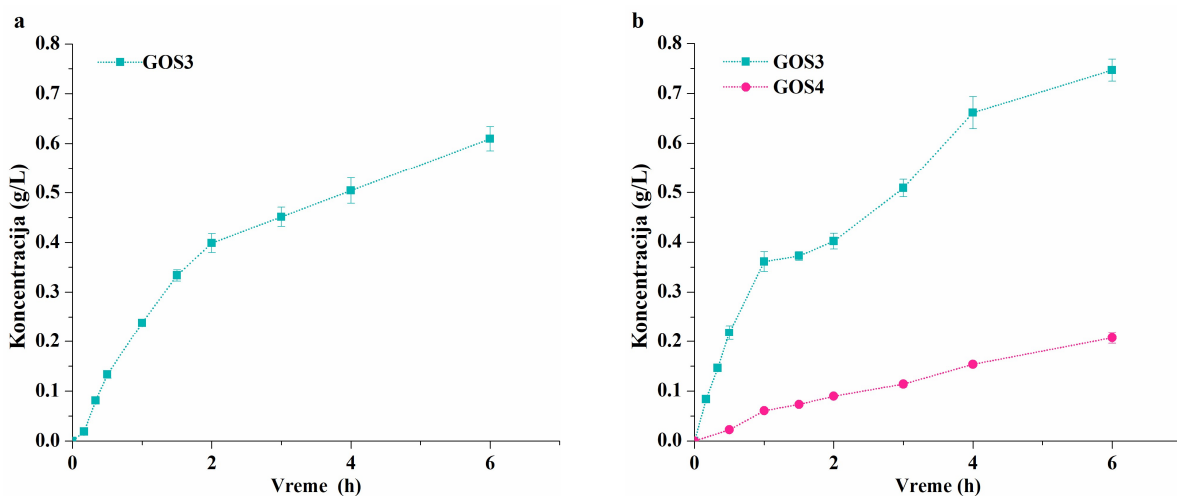
4.6. Ispitivanje difuzionih karakteristika odabranih dermalnih prebiotika

Na osnovu svih dobijenih rezultata, kao najbolji ekstrakti sa prebiotskim dejstvom na mikrobiotu kože izdvojili su se ekstrakti crne ribizle i tropa maline dobijeni enzimski potpomognutom ekstrakcijom pod optimalnim uslovima korišćenjem pufera kao rastvarača. Međutim, s obzirom na to da je ekstrakt crne ribizle imao veći sadržaj antioksidanata od ekstrakta tropa maline, koji su poželjni u kozmetici u borbi protiv preranog starenja ili zaštite od UV zračenja, za difuzione eksperimente je odabran ekstrakt crne ribizle [230]. Takođe, kako su GOS pokazali odličan prebiotski potencijal za modulacijom dermalne mikrobiote, uz dodatnu opravdanost njihove upotrebe u kozmetici kao humektanata [102], u ovom delu disertacije ispitane su i njihove difuzione karakteristike. Eksperimenti su izvedeni primenom celulozno-acetatne membrane, koja se uglavnom koristi za procenu pogodnosti različitih formulacija kao nosača aktivnih komponenti, dok je transdermalni prenos ispitan pomoću Strat-M[®] membrane koja svojom strukturom imitira slojeve kože.

4.6.1. Difuzija galakto-oligosaharida iz različitih kozmetičkih formulacija

4.6.1.1. Difuzija kroz celulozno - acetatnu membranu

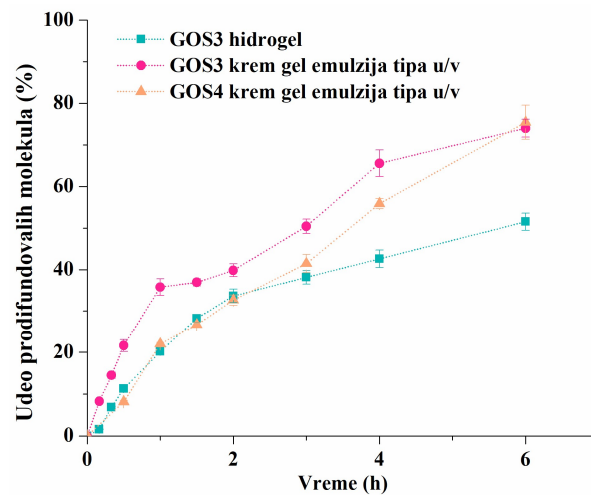
Nakon utvrđivanja koncentracije GOS sa najboljim prebiotskim efektom, smeša GOS-a inkorporirana je u kozmetičke formulacije radi utvrđivanja profila oslobađanja GOS3 i GOS4. Kao model formulacije za praćenje difuzionih karakteristika pomenutih molekula izabrani su hidrogel i krem gel emulzija tipa ulje u vodi (u/v), a krajnja koncentracija GOS-a u njima bila je 5 % (w/v). Prvi set difuzionih eksperimenata izveden je u Francovoj difuzionoj ćeliji korišćenjem celulozno-acetatne membrane (CA), koja se obično koristi za analizu profila oslobađanja i karakteristika difuzije polarnih molekula iz različitih formulacija, pošto je visoko hidrofилна. Pored toga, poseduje veliki prečnik pora čime ni na koji način ne ograničava i ne utiče na brzinu difuzije molekula [206,335,336]. Koncentracija GOS-a u receptorskom rastvoru je praćena tokom vremena korišćenjem HPLC analize, a dobijene krive oslobađanja molekula GOS-a su prikazane na slici 4.38.



Slika 4.38. Koncentracija oslobodjenih molekula galakto-oligosaharida i to trisaharida (GOS3) i tetrasaharida (GOS4) iz hidrogela (a) iz krem gel emulzije u/v (b) tokom vremena.

Rezultati su pokazali da je u slučaju hidrogela (slika 4.38.a) u receptorskom medijumu detektovana merljiva količina samo GOS3 molekula, dok je koncentracija GOS4 molekula bila izuzetno niska i detektovana u tragovima tek nakon 6 h difuzije. Poznato je da što je veća količina inkorporirane komponente u formulaciji, više molekula će proći kroz membranu sve dok se ne postigne koncentraciono zasićenje [337]. Rukovodeći se ovim, može se pretpostaviti da količina GOS4 nije bila dovoljna da obezbedi značajnu pogonsku sliku za prenos mase. S druge strane, najveće povećanje koncentracije GOS3 molekula u receptorskom rastvoru bilo je tokom prvih 2 h eksperimenta, nakon čega su ovi molekuli nešto sporije difundovali kroz CA membranu. Kada je reč o krem gel emulziji tipa u/v (slika 4.38.b), može se primetiti da su oba tipa molekula detektovana u receptorskom rastvoru tokom celokupnog vremena praćenja difuzije. Najveća količina GOS3 i GOS4 molekula otpuštena je iz pomenute formulacije tokom prvih 1,5 h vremena, sa uočenim trendom da GOS3 molekuli imaju veću brzinu difuzije u poređenju sa GOS4 molekulima.

Udeli prodifundovanih molekula iz obe formulacije prikazani su na slici 4.39, uočljivo je da je koncentracija GOS3 molekula koji su otpušteni iz emulzije tipa ulje u vodi za ~30 % viša u poređenju sa udelom istih molekula otpuštenih iz hidrogela. Pošto je početna koncentracija molekula GOS-a bila ista u obe formulacije ovo implicira da hidrogel ima izraženiji efekat kontrolisanog otpuštanja. Takođe, u istom vremenskom intervalu, gotovo 70 % početne koncentracije GOS4 detektovano je u receptorskom rastvoru kada je kao nosač korišćena emulzija, dok ovi molekuli nisu difundovali iz hidrogela. Ukoliko se uporede ukupni udeli otpuštanja molekula GOS-a iz testiranih formulacija tokom posmatranog vremena od 6 h, može se primetiti da je količina GOS3 i GOS4 molekula u receptorskom delu viša kada je kao nosač korišćena gel emulzija u poređenju sa hidrogelom. Ovakav rezultat je najverovatnije posledica različite prirode i sastava komercijalnih polimera koji su korišćeni za pripremu formulacija, s obzirom na to da Heliogel™, za razliku od Aristoflex® AVC, sadrži malu količinu fosfolipida, koji su poznati po tome da poboljšavaju efikasnost difuzije aktivnih sastojaka u kozmetičkim formulacijama [338].



Slika 4.39. Udeo prodifundovanih molekula galakto-oligosaharida (trisaharida (GOS3) i tetrasaharida (GOS4)) iz hidrogela i krem gel emulzije tipa ulje u vodi tokom vremena.

Određivanje efektivnih koeficijenata difuzije molekula GOS3 i GOS4 iz kozmetičkih formulacija hidrogel i emulzija tipa ulje u vodi, izvedeno je primenom jednačina br. 8-12, a dobijeni rezultati su prikazani u tabeli 4.24.

Tabela 4.24. Koeficijenti difuzije i ostali kinetički parametri molekula galakto-oligo trisaharida (GOS3) i tetrasaharida (GOS4) iz hidrogela i krem gel emulzije tipa ulje u vodi

Tip formulacije	Aktivna komponenta	n	t _{lag} s	k ₁ ·10 ³ s ^{-0,5}	D _{eff} ·10 ⁷ cm ² /s
Hidrogel	GOS3	0,57	-	3,50	32,25
Hidrogel	GOS4	-	-	-	-
Krem gel emulzija tipa u/v	GOS3	0,53	-	5,40	56,09
Krem gel emulzija tipa u/v	GOS4	0,71	567	0,27	0,14

Dobijene vrednosti parametra n, koji određuje vrstu difuzije, bile su u opsegu 0,53-0,71 odnosno između 0,5 i 1,0 što ukazuje na to da mehanizam otpuštanja ovih molekula iz testiranih formulacija zavisi od kombinovanog prenosa – molekulske difuzije i relaksacije polimernih lanaca [207]. Poređenjem izračunatih efektivnih koeficijenata (D_{eff}) difuzije GOS3 molekula inkorporiranih u ispitivane formulacije, može se videti da je efektivni koeficijent difuzije iz emulzije tipa ulje u vodi (5,61·10⁻⁶ cm²/s) veći u odnosu na koeficijent difuzije aktivne komponente iz hidrogela (3,22·10⁻⁶ cm²/s). Pošto je početna koncentracija GOS-a u obe formulacije bila ista, očigledno je da efektivni koeficijent difuzije ovih ugljenih hidrata zavisi od fizičko-hemijskih karakteristika nosača. Na ovaj zaključak takođe ukazuje i vrednost koeficijenta n, čija je vrednost u slučaju emulzije 0,53, što pokazuje da prenos GOS3 molekula kroz CA membranu u većoj meri zavisi od molekulske difuzije, a minimalno od relaksacije polimera. Sa druge strane, nešto viša vrednost koeficijenta n (0,57) za hidrogel, sugerise da postoji nešto izraženiji efekat relaksacije polimernih lanaca. Dakle, promena u strukturi hidrogela od polu-čvrstog ka fleksibilnijem stanju, olakšala je migraciju molekula.

Kao što je već pomenuto, nije detektovana značajna difuzija molekula GOS4 iz hidrogela kroz CA membranu. Ovo se može pripisati glomaznoj strukturi molekula i njihovoj nemogućnosti da probiju umreženu strukturu hidrogela, ili jačim interakcijama između molekula i polimera čime je ograničena dalja difuzija molekula. Međutim, GOS4 molekuli su otpušteni iz krem gel emulzije, a izračunati koeficijent difuzije (1,41·10⁻⁸ cm²/s) bio je znatno niži od koeficijenata dobijenih za GOS3 za obe formulacije. Uzimajući u obzir vrednost koeficijenta n (0,71), može se pretpostaviti da je na difuziju GOS4 molekula više uticala relaksacija polimera nego na molekule GOS3. Dodatno, viša vrednost koeficijenata difuzije GOS3 se može pripisati manjoj veličini molekula u poređenju sa GOS4 [339].

Svi određeni efektivni koeficijenti difuzije GOS3 i GOS4 bili su viši za gel emulziju u poređenju sa odgovarajućim koeficijentima difuzije za hidrogel, što pokazuje da formulacije na bazi ulja mogu postići veće koncentracije bioaktivnih komponenti za kraće vreme, dok je hidrogel obezbedio njihovo kontrolisano otpuštanje.

4.6.1.2. Transdermalna difuzija galakto-oligosaharida iz različitih kozmetičkih formulacija

U drugom delu ovog eksperimenta, ispitana je transdermalna difuzija molekula GOS-a korišćenjem sintetičke membrane (Start-M[®]) koja se najčešće koristi za predikciju difuzije aktivnih sastojaka [206,207]. Difuzija je praćena 24 h, a HPLC analizom je pokazano da nije bilo GOS-a u receptorskom rastvoru ni pri jednoj od korišćenih formulacija, ukazujući da nije došlo do difuzije kroz Start-M[®] membranu iliti transdermalne difuzije tokom ispitivanog perioda.

Kako bi se utvrdilo da li je deo molekula prošao u dublje slojeve membrane, Start-M[®] membrana je podvrgnuta ekstrakciji vodom, a HPLC analiza uzoraka je pokazala da molekuli GOS-a nisu bili prisutni u membrani nakon difuzije iz obe formulacije. Ovaj rezultat ukazuje da nakon topikalne primene kozmetičkih formulacija sa inkorporiranim galakto-oligosaharidima, ovi molekuli neće biti prisutni u sistemskoj cirkulaciji, kao ni u dubljim slojevima kože. Svakako, može se reći da je ovaj rezultat očekivan, s obzirom da su GOS molekuli veoma polarni i očigledno nisu u stanju da prođu kroz gornji sloj membrane koji imitira rožnati sloj kože, pa ostaju na površini membrane odnosno na površini ljudske

kože. Imajući u vidu da je prebiotski efekat GOS-a usmeren ka bakterijama (*S. epidermidis* i *S. aureus*) koje uglavnom nastanjuju površinu kože, ovaj rezultat je pogodan za primenu formulacija obogaćenih GOS-om za regulaciju disbalansa ovih bakterija koji dovode do nastanka kožnih oboljenja.

4.6.1.3. Ispitivanje uticaja kozmetičkih formulacija sa galakto-oligosaharidima na rast bakterija

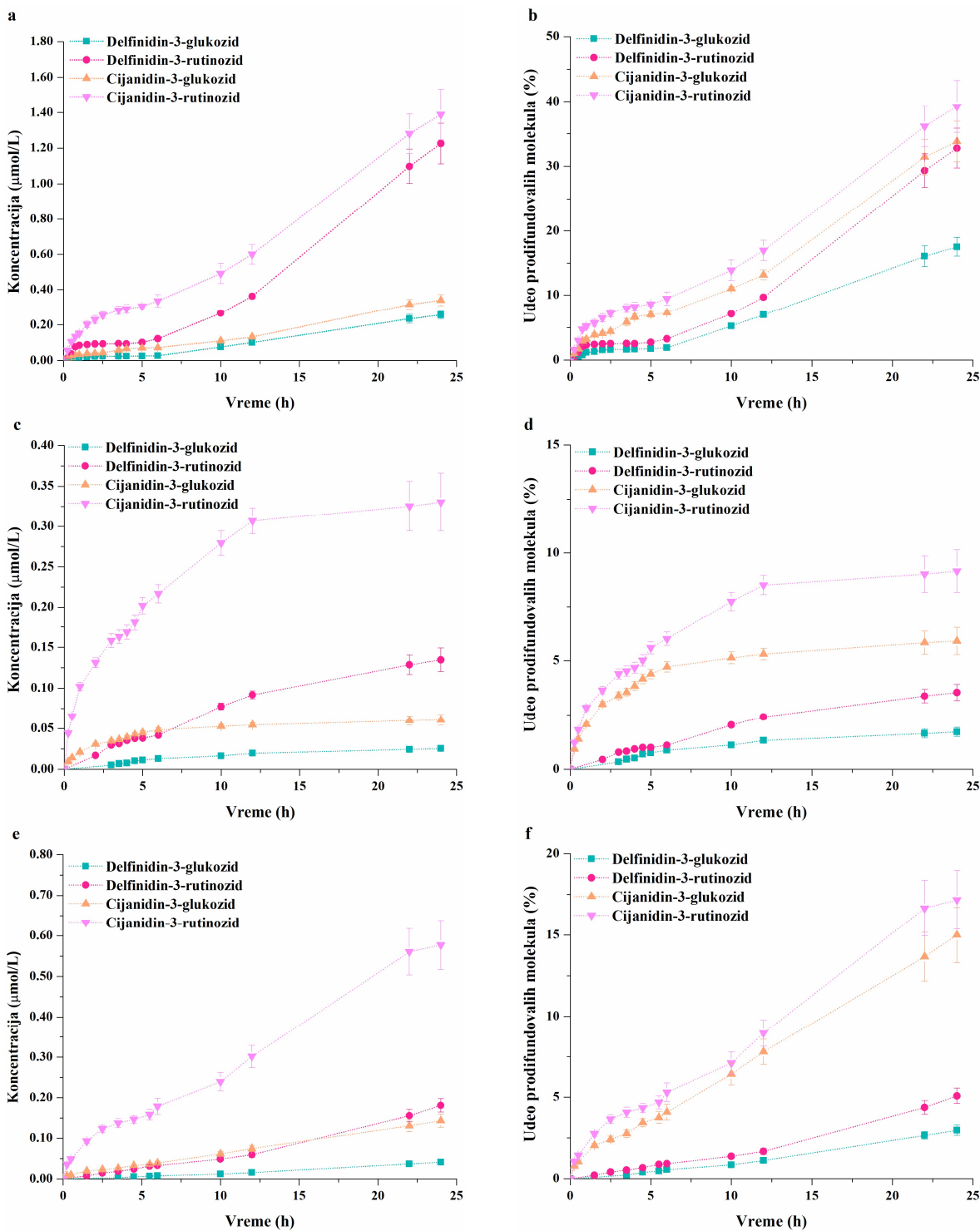
Kao dodatni test karakterizacije u kojem je procenjen potencijalni prebiotski efekat GOS molekula, kao i uticaj samih kozmetičkih formulacija na dva bakterijska soja (*S. epidermidis* DSM 20044 i *S. aureus* 25923) praćen je rast mikroorganizma u obe testirane formulacije sa inkorporiranom smešom GOS-a. Formulacije – hidrogel i emulzija tipa ulje u vodi su sadržale smešu GOS-a u krajnjoj koncentraciji od 5 % (w/w), dok su kao kontrolni uzorci bile korišćene formulacije bez dodatka oligosaharida.

Analizom kontrolnih uzoraka i formulacija obogaćenih smešom GOS-a, otkriveno je da je stimulativni efekat na *S. epidermidis* blago promenjen nakon 8 h u oba slučaja u poređenju sa eksperimentima u tečnoj hranljivoj podlozi, odnosno došlo je do smanjenja ovog efekta sa 33,4 % na 23,7 % u hidrogelu i povećanja sa 33,4 % na 42,8 % u krem gel emulziji tipa u/v. S druge strane, emulzija sa smešom GOS-a je dovela do blagog smanjenja inhibicije *S. aureus* (sa 63,1 % u tečnoj podlozi na 54,7 % nakon 8 h), dok u slučaju hidrogela nije detektovan značajan uticaj. Imajući u vidu da su sve ove promene bile vrlo blage i da efekat komponenti formulacija nije ugrozio ukupnu prebiotsku aktivnost GOS-a utvrđenu u eksperimentima sprovedenim u tečnoj hranljivoj podlozi (slika 4.1), dobijeni rezultati impliciraju da su obe formulacije sa smešom GOS-a zadržale prebiotska svojstva.

4.6.2. Difuzija polifenola ekstrakta crne ribizle iz različitih kozmetičkih formulacija

4.6.2.1. Difuzija kroz celulozno - acetatnu membranu

Budući da su antocijanini najzastupljenija vrsta polifenola u ekstraktu crne ribizle koji su od posebnog značaja za kozmetičku primenu, zbog sposobnosti da na različite načine poboljšaju izgled kože, ispitana je njihova difuzija iz različitih kozmetičkih formulacija. Ekstrakt crne ribizle dobijen enzimski potpomognutom ekstrakcijom pod optimalnim uslovima inkorporiran je u tri različite kozmetičke formulacije (hidrogel, krem gel tipa ulje u vodi i klasična emulzija tipa ulja u vodi) u krajnjoj koncentraciji do 1 % (v/w). Primenom HPLC-UV reverzno fazne hromatografije i komercijalnih standarda, kvantifikovane su koncentracije četiri glavna antocijanina delphinidin-3-glukozid, delphinidin-3-rutinozid, cijanidin-3-glukozid i cijanidin-3-rutinozid, u polaznom ekstraktu koje iznose 1,34 mmol/L, 3,43 mmol/L, 0,92 mmol/L i 3,25 mmol/L, redom. Profili difuzije i udeli ovih molekula koji su prošli kroz CA membranu za sve tri formulacije, za ispitivani vremenski period od 24 h, prikazane su na slici 4.40.



Slika 4.40. Krive difuzije i udeo prodifundovalih antocijanina ekstrakta crne ribizle iz hidrogela (a-b), krem gel emulzije tipa u/v (c-d) i klasične emulzije tipa u/v (e-f).

Na osnovu profila koncentracije molekula oslobođenih iz hidrogela prikazanih na slici 4.40.a, očigledno je da je količina cijanidin-3-rutinozida i delfinidin-3-rutinozida bila značajno viša tokom ispitivanog vremena u poređenju sa cijanidin-3-glukozidom i delfinidin-3-glukozidom. Koncentracija cijanidin-3-rutinozida je konstantno bila viša u odnosu na koncentraciju delfinidin-3-rutinozida, sa

najvećim detektovanim porastom tokom prvih 2 h, nakon čega je ovaj tip antocijanina nešto sporije difundovao kroz CA membranu. S obzirom na to da je veća količina delfinidin-3-rutinozida bila prisutna u hidrogelu u odnosu na cijanidin-3-rutinozid, a molekuli su imali manju brzinu difuzije, može se pretpostaviti da razlike u molekularnoj strukturi antocijanina znatno utiču na njihovu difuziju iz hidrogela. S druge strane, detektovane koncentracije cijanidin-3-glukozida i delfinidin-3-glukozida bile su slične tokom ispitivanog perioda. Poređenjem udela prodifundovanih molekula iz hidrogela (slika 4.40.b), može se primetiti da je udeo oba molekula cijanidina bio veoma sličan i konstantno viši od udela oba molekula delfinidina. Takođe, delfinidin-3-glukozid i delfinidin-3-rutinozid su imali približno iste brzine otpuštanja tokom prvih 6 sati, nakon čega je usledilo naglo povećanje koncentracije delfinidin-3-rutinozida. Pa tako, udeo prodifundovanih molekula cijanidina tokom prvih 6 h bio je u opsegu 7,3 - 9,5 %, dok je udeo oba molekula delfinidina bio u opsegu 1,9-3,3 %, što ukazuje na sporiju difuziju delfinidin glukozida u poređenju sa cijanidin glukozidima. Nakon 24 h difuzije, udeo cijanidin-3-rutinozida je ostao najviši i iznosio je 39,2 %, dok nije bilo značajne razlike u udelima cijanidin-3-glukozida i delfinidin-3-rutinozida (u proseku ~33 %). Svega 17,5 % početne količine delfinidin-3-glukozida je detektovano tokom posmatranog perioda, što ukazuje na kontrolisano oslobađanje ovog molekula iz hidrogela.

Profil oslobađanja antocijanina crne ribizle iz druge testirane formulacije, krem gel emulzije tipa u/v (slika 4.40.c), je pokazala da je cijanidin-3-rutinozid bio najzastupljeniji u receptorskom rastvoru, praćen delfinidin-3-rutinozidom, cijanidin-3-glukozidom i na kraju delfinidin-3-glukozidom. Međutim, udeo prodifundovanih molekula cijanidin-3-rutinozida nakon 24 h (slika 4.40.d) iznosio je 9,2 %, što je ~4,3 puta niže u odnosu na udeo koji je dobijen nakon difuzije iz hidrogela, dok su udeli ostalih antocijanina bili do ~10,2 puta niži od onih koji su dobijeni difuzijom iz hidrogela.

Kod difuzije antocijanina iz poslednje formulacije, klasične emulzije tipa u/v, primećen je sličan trend koncentracija u receptorskoj tečnosti (slika 4.40.e) kao i u slučaju njihove difuzije iz hidrogela i gel krem emulzije tipa ulje u vodi. Udeli prodifundovanih molekula nakon 24 h (slika 4.40.f), bili su u opsegu 3,0-17,2 % i značajno niži u odnosu na one dobijene nakon difuzije iz hidrogela, ali nešto viši u odnosu na one dobijene nakon difuzije iz krem gel emulzije tipa u/v. Ovaj rezultat implicira da je za smanjenje koncentracije prodifundovanih molekula posledica prisustva uljane faze u formulaciji. Lipidne komponente su negativno uticale na oslobađanje antocijanina iz krem gela i klasične emulzije tipa u/v, što je u skladu sa drugim studijama koje su ukazale da veći sadržaj uljane faze u formulacijama dovodi do sporijeg oslobađanja polifenola [14,340]. Drugo potencijalno objašnjenje za bržu difuziju antocijanina iz hidrogela u poređenju sa formulacijama na bazi ulja je to da ovi molekuli imaju šećernu jedinicu u svojoj strukturi, koja im daje amfifilni karakter, čineći ih površinski aktivnim. Shodno tome, verovatno je da su antocijanini jače vezani za granicu ulje-voda, što ometa njihovo oslobađanje [14].

Kako bi se definisao mehanizam difuzije molekula antocijanina ekstrakta crne ribizle iz primenjenih kozmetičkih formulacija, podaci o difuziji su obrađeni primenom Korsmeyer-Peppas jednačine, koju je predložilo nekoliko autora čiji je predmet istraživanja bila difuzija polifenola iz polučvrstih formulacija [14,341,342]. Efektivni koeficijenti difuzije (D_{eff}) i kinetičke konstante antocijanina ekstrakta crne ribizle (delfinidin-3-glukozida, delfinidin-3-rutinozida, cijanidin-3-glukozida i cijanidin-3-rutinozida) iz kozmetičkih formulacija prikazani su u tabeli 4.25.

Tabela 4.25. Koeficijenti difuzije i ostali kinetički parametri antocijanina ekstrakta crne ribizle iz hidrogela, krem gel emulzije tipa ulje u vodi i klasične emulzije tipa u/v.

Tip formulacije	Aktivna komponenta	t_{lag} min	$k \cdot 10^4$ $s^{-0,5}$	$D_{eff} \cdot 10^8$ cm^2/s
Hidrogel	delfinidin-3-glukozid	15,0	2,08	0,72
	delfinidin-3-rutinozid	13,8	3,41	1,93
	cijanidin-3-glukozid	3,6	5,73	5,47
	cijanidin-3-rutinozid	0	7,66	9,73
Krem gel emulzija tipa u/v	delfinidin-3-glukozid	150,8	0,87	0,13
	delfinidin-3-rutinozid	73,4	0,98	0,17
	cijanidin-3-glukozid	0	3,61	2,26
	cijanidin-3-rutinozid	0	4,54	3,57
Klasična emulzija tipa u/v	delfinidin-3-glukozid	180,8	0,60	0,05
	delfinidin-3-rutinozid	77,4	0,75	0,08
	cijanidin-3-glukozid	3,1	2,98	1,35
	cijanidin-3-rutinozid	0	3,93	2,35

Dobijena vrednost za n bila je veća od 0,5 za sve testirane formulacije, što sugerira da mehanizam oslobađanja antocijanina iz svih formulacija prati zakone molekulske difuzije. Lag faza (t_{lag}), odnosno vreme koje prođe pre detekcije molekula u receptorskoj tečnosti, postojala je samo za formulacije koje sadrže uljanu fazu i za oba molekula delfinidina, dok je u drugim slučajevima difuzija započela sa postavkom eksperimenta. Kao što se može videti iz tabele 4.25, kinetička konstanta (k) i posledično, koeficijenti difuzije (D_{eff}) pokazali su trend koji je u skladu sa prethodno dobijenim rezultatima difuzije ovih antocijanina (slika 4.40). Efektivni koeficijent difuzije antocijanina iz hidrogela kroz CA membranu bio je najviši za cijanidin-3-rutinozid ($9,73 \cdot 10^{-8} cm^2/s$), zatim cijanidin-3-glukozid ($5,46 \cdot 10^{-8} cm^2/s$), delfinidin-3-rutinozid ($1,93 \cdot 10^{-8} cm^2/s$) i na kraju delfinidin-3-glukozid ($0,72 \cdot 10^{-8} cm^2/s$). Antocijanini su iz ostale dve formulacije na bazi ulja difundovali nešto sporije, na šta ukazuju koeficijenti difuzije koji su do čak ~ 10 puta niži u poređenju sa koeficijentima dobijenim nakon difuzije iz formulacije samo na bazi vode tj. hidrogela.

Iako je poznato da je molekulska masa obrnuto proporcionalna sposobnosti molekula da difunduju kroz membrane [339,342], dobijeni rezultati su pokazali da delfinidin-3-rutinozid (611,5 g/mol) i cijanidin-3-rutinozid (595,5 g/mol) imaju veće koeficijente difuzije pri svim korišćenim formulacijama, u poređenju sa onim dobijenim za delfinidin-3-glukozid (464,4 g/mol) i cijanidin-3-glukozid (449,4 g/mol).

Uočeno odstupanje u rezultatima od opšteg pravila potencijalno može biti posledica varijacija u koeficijentima raspodele (oktanol–voda) molekula, pošto ovi koeficijenti igraju važnu ulogu u migraciji molekula iz formulacije ka membrani [14,342,343]. Da bi se proverila ova hipoteza, izračunati su koeficijenti raspodele oktanol–voda ($\log P$) antocijanina, a dobijene vrednosti su sledeće: -2,99 za cijanidin-3-glukozid, -3,08 za delfinidin-3-glukozid, -3,49 za cijanidin-3-rutinozid i -3,78 za delfinidin-3-rutinozid. Prema $\log P$ vrednostima, svi antocijanini pokazuju hidrofilne karakteristike, pri čemu oni koji sadrže rutinozu kao šećernu jedinicu pokazuju nešto veću hidrofilnost, što doprinosi njihovom izraženijem kretanju kroz hidrofilnu CA membranu u poređenju sa odgovarajućim antocijaninima koji imaju glukozu za šećernu jedinicu. Pored toga, kašnjenje početka difuzije delfinidin-3-glukozida i delfinidin-3-rutinozida iz obe formulacije na bazi ulja može biti posledica njihove nešto bolje rastvorljivosti u uljanoj fazi, pa su prvo morali da prevaziđu granicu ulje-voda pre difuzije kroz membranu [14].

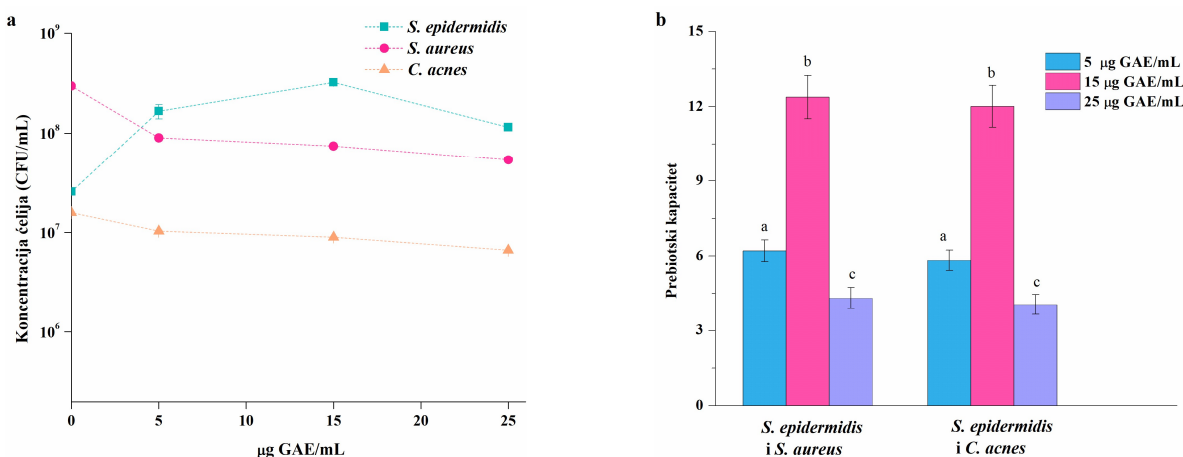
4.6.2.2. Transdermalna difuzija antocijanina iz različitih kozmetičkih formulacija

Procena transdermalne difuzije antocijanina ekstrakta crne ribizle izvedena je primenom Strat-M[®] membrane tokom 72 h. Analiza receptorskog rastvora je pokazala da čak i nakon ovog produženog procesa difuzije, antocijanini nisu difundovali kroz membranu ni iz jedne od tri testirane formulacije (hidrogel, krem gel tipa u/v i klasična emulzija tipa u/v). S obzirom na to da je Strat-M[®] membrana posebno dizajnirana da imitira slojevitost strukturu i sastav lipida koji se nalazi u ljudskoj koži, nije bilo iznenađujuće da će antocijanini, kao hidrofilna jedinjenja, imati poteškoća da prođu kroz nju. Studija difuzije cijanidin-3-glukozida i delfinidin-3-glukozida iz ekstrakta lista grožđa kroz ljudski epidermis je takođe potvrdila njihovu veoma slabu difuziju, štaviše samo 0,05-0,07 % početne doze je uspešno prodiralo [344].

Da bi se utvrdilo da li je određeni procenat antocijanina ostao zadržan u Strat-M[®] membrani, izvršena je ekstrakcija membrane. Analiza je pokazala da je samo 0,5 % početne ukupne količine antocijanina iz donorskog odeljka ekstrahovano iz same membrane u slučaju hidrogela, dok u slučaju krem gela i emulzije nisu detektovane merljive koncentracije antocijanina. Dobijeni rezultati ukazuju da bi testirane formulacije mogle da obezbede isključivo lokalnu isporuku antocijanina crne ribizle, što ih čini pogodnim za primenu u proizvodima za površinsku negu kože gde bi mogli da ispolje svoju prebiotsku aktivnost ili da zaštite kožu od ultra violetnog zračenja.

4.6.2.3. Ispitivanje uticaja kozmetičkih formulacija na rast bakterija

Na osnovu dobijenih rezultata difuzije, zaključeno je da je najpogodnija formulacija za isporuku antocijanina i ostalih polifenola na površinu kože formulacija na bazi vode odnosno hidrogel. Stoga, kako bi se procenilo da li ekstrakt crne ribizle inkorporiran u hidrogel ima istu prebiotsku aktivnost kao kada deluje slobodan, urađen je dodatni eksperiment. Uticaj hidrogela sa ekstraktom crne ribizle ispitan je na modelu *stratum corneum*, a testirane bakterije bile su *S. epidermidis* DSM 20044, *S. aureus* ATCC 25923 i *C. acnes* ATCC 11827. Hidrogel je dodat na model tako da krajnja koncentracija polifenola bude u opsegu 5-25 µg/mL agara, dok je kontrola bio uzorak sa hidrogelom bez dodatka ekstrakta. Broj kolonija dobijen nakon 24 h delovanja formulacija sa inkorporiranim ekstraktom i PK_{CFU} prikazani su na slici 4.41



Slika 4.41. Broj kolonija (CFU/mL agara) bakterije *S. epidermidis*, *S. aureus* i *C. acnes* u prisustvu formulacija sa inkorporiranim ekstraktom crne ribizle (a) i prebiotski kapacitet (b).

Kao što se može videti sa slike 4.41.a, formulacija sa inkorporiranim ekstraktom crne ribizle je stimulisala rast bakterije *S. epidermidis*, a inhibirala rast bakterije *S. aureus* pri svim primenjenim koncentracijama. Sa druge strane, formulacija sa ekstraktom crne ribizle je pokazala blago inhibitorno dejstvo usmereno ka bakteriji *C. acnes*. PK_{CFU} izračunat u odnosu na patogenu bakteriju *S. aureus* ili *C. acnes* pokazao je isti trend, odnosno kada je naneta količina formulacije sa sadržajem polifenola od 15 µg GAE/mL agara, PK_{CFU} je bio najveći. Ono što je interesantno jeste da u slučaju slobodnog ekstrakta, najbolji PK_{CFU} postignut pri najmanjoj koncentraciji (slika 4.41.b), dok je sa porastom doze ekstrakta prebiotski kapacitet opadao. Razlike u rezultatima mogu biti posledica sporije difuzije polifenola iz kozmetičkih formulacija, zbog kojih je dostupnost polifenola bakterijama bila ograničena. Svakako, ovaj rezultat ukazuje da je za krajnji kozmetički proizvod neophodno optimizovati dozu ekstrakta korišćenjem i drugih *ex/in vivo* modela.

4.6.2.4. Određivanje efekta hidratacije, dermatološke kompatibilnosti i iritabilnosti formulacija

Nakon određivanja difuzionih i prebiotskih karakteristika hidrogela sa inkorporiranim ekstraktom crne ribizle, određena su i kozmetička svojstva formulacije. Efekat dermatološke kompatibilnosti, iritabilnosti i hidratacije ispitan je pri koncentraciji ekstrakta crne ribizle u formulaciji od 25 µg GAE/g i pri drastično višim koncentracijama ekstrakta 100-400 µg GAE/g. Takav izbor koncentracija ekstrakta je napravljen zbog činjenice da bi budući eksperimenti na drugim modelima kože ili kliničke studije mogle pokazati promene u optimalnim koncentracijama. Ispitivani efekti hidrogela sa inkorporiranim ekstraktom crne ribizle upoređeni su kontrolnom formulacijom (hidrogel bez dodatog ekstrakta), a rezultati su prikazani u nastavku teksta.

Rezultati testa iritabilnosti formulacija tj. Zein testa (tabela 4.26) su pokazali da kontrolna formulacija, kao ni formulacija sa inkorporiranim ekstraktom crne ribizle neće izazvati iritaciju kože. Kontrolna formulacija je dala Zein broj od 4,34, što je blizu prihvatljive granice za proizvode za negu kože, dok su formulacije obogaćene ekstraktom pokazale značajno nižu ili nikakvu iritaciju opisanu vrednostima Zein broja od 0-1,23 [202-204].

Dodatno ispitivanje dermatološke kompatibilnosti pripremljenih hidrogelova sprovedeno je RBC (eng. „Red blood cell“, RBC) testom, a prema rezultatima za kontrolne formulacije i formulacije sa dodatkom ekstrakta (tabela 4.26), dodavanje ekstrakta crne ribizle dovelo je do povećanja dermatološke kompatibilnosti što je predstavljeno povećanim odnosom hemolitičkog i denaturacionog potencijala hidrogelova. Formulacije sa ekstraktom u krajnjoj koncentraciji od 25-100 µg GAE/g klasifikovane su kao slabo iritirajući, dok je ona sa 400 µg GAE/g koncentracijom ekstrakta bila neiritirajuća [204,205].

Tabela 4.26. Određivanje vrednosti Zein (mg azota na 100 mL formulacije) i RBC testa

	Kontrolna formulacija	Hidrogel sa ekstraktom crne ribizle	Kontrolna formulacija	Hidrogel sa ekstraktom crne ribizle
Zein broj	4,34	1,23	1,00	0,00
RBC test (L/D odnos)	20,5	45,6	88,2	103,2

Što se tiče testa hidratacije (eng. „*Transepidermal water loss*“, TEWL) rezultati dobijeni tokom 24 h praćenja pokazali su da ekstrakt crne ribizle dobijen enzimski potpomognutom ekstrakcijom pokazuje pojačan efekat hidratacije u poređenju sa kontrolnom formulacijom pri svim ispitivanim koncentracijama (tabela 4.27). Ovaj uticaj je zavisio od doze i dostigao je svoj maksimum za formulaciju sa ekstraktom u krajnjoj koncentraciji od 400 µg GAE/g, za koju nisu otkrivene razlike u gustini fluksa u roku od 24 h. Ovakav rezultat ukazuje na sposobnost formulacije obogaćene ekstraktom da kompenzuje transepidermalni gubitak vode vodom iz formulacije, odnosno, na površini se postiže dinamička ravnoteža isparavanja i apsorpcije vode [204].

Ukupni rezultati su pokazali da je, pored antioksidativnog i potencijala za balansiranje sastava mikrobiote kože, ekstrakt crne ribizle dobijen enzimski potpomognutom ekstrakcijom pod optimalnim uslovima pogodan za primenu u kozmetici za negu kože zbog efekta hidratacije, niske iritacije i dobre dermatološke kompatibilnosti.

Tabela 4.27. Promena fluksa isparavanja vode ($\text{g/m}^2\cdot\text{h}$) koja je izmerena pre i nakon dodavanja formulacija na model

Vreme (h)	Kontrola bez dodatka formulacije	Kontrolna formulacija	Hidrogel sa ekstraktom crne ribizle 25 µg GAE/g	Hidrogel sa ekstraktom crne ribizle 100 µg GAE/g	Hidrogel sa ekstraktom crne ribizle 400 µg GAE/g
0	10,5	10,5	10,6	10,6	10,6
2	5,7	9,0	10,5	10,5	10,6
4	2,7	8,2	10,5	10,5	10,6
6	1,2	7,5	10,0	10,5	10,6
8	0,7	6,2	10,0	10,5	10,6
10	0,5	5,5	9,5	10,5	10,6
12	0,4	4,4	9,0	10,0	10,6
14	0,2	3,5	8,5	9,5	10,6
16	0,2	2,2	8,0	9,5	10,6
18	0,1	2,2	7,0	8,5	10,6
20	0	2,0	6,0	8,5	10,6
22	0	2,0	5,0	8,5	10,6
24	0	2,0	4,0	8,5	10,6

4.7. Ekstrakcija fitohemikalija odabranog bobičastog voća i tropa primenom eutektičkih smeša

U ovoj disertaciji je, pored etanola i vode, ispitana i upotreba eutektičkih smeša kao zelenih rastvarača za ekstrakciju fitohemikalija iz biljnog materijala koji su pokazali najbolje prebiotsko dejstvo – crna ribizla i trop maline. U prvom koraku je postupkom klasične ekstrakcije primenom pet različitih eutektičkih smeša izvršena izolacija fitohemikalija i dobijeni ekstrakti su okarakterisani primenom spektrofotometrijskih metoda. Zatim, eutektičke smeše koje su dale najbolje rezultate su korišćene kao rastvarači u ekstrakciji potpomognutoj enzimima, a za dobijene ekstrakte je ispitan prebiotski potencijal na *stratum corneum* modelu.

4.7.1. Ekstrakcija fitohemikalija crne ribizle i tropa maline primenom eutektičkih smeša

4.7.1.1. Karakterizacija ekstrakata

U svim smešama akceptor vodoničnih veza (HBA) bio je betain, dok su kao donori vodoničnih veza (HBD) bili glicerol, glukoza, urea, sorbitol, limunska kiselina i propilen glikol. Kako bi se smanjila viskoznost smeša, a samim tim i povećala difuzija molekula, u svaku od smeša je dodata voda sa krajnjim udelom od 30 % (w/w). Istraživanja su pokazala da su supramolekulske strukture eutektičkih smeša očuvane kada je sadržaj vode do 50 % (w/w), dok dalje razblaživanje dovodi do vodenog rastvora slobodnih oblika pojedinačnih komponenti [345]. Uslovi ekstrakcije su bili oni koji su određeni kao optimalni pri enzimskoj ekstrakciji, pri čemu u ovom koraku nije dodat enzim. Pa tako, odnos supstrata i rastvarača za crnu ribizlu bio je 1:10 g/mL, a za trop crne ribizle 1:40 g/mL, dok je temperatura bila 50 °C, a vreme ekstrakcije 60 min. Efikasnost različitih eutektičkih smeša kao rastvarača za ekstrakciju fitohemikalija praćena je merenjem sadržaja ukupnih polifenola, polifenolnih klasa i redukujućih šećera koji su prikazani u tabeli 4.28.

Tabela 4.28. Sadržaj polifenolnih jedinjenja i šećera u ekstraktima crne ribizle i tropa maline

Vrsta eutektičke smeše	Polifenoli mg GAE/g	Flavonoidi mg QE/g	Flavonoli mg QE/g	Antocijanini mg Cy3GE/g	Fenolne kiseline mg CAE/g	Hidroliz. tanini mg GAE/g	Kondenz. tanini mg CyE/g	Reduk. šećeri mmol GE/g
Crna ribizla								
B-PG	20,86±1,03 ^a	2,55±0,12 ^a	0,79±0,04 ^c	0,98±0,01 ^{c,d}	1,88±0,05 ^a	9,82±0,44 ^a	0,81±0,04 ^a	0,49±0,01 ^d
B-GLU	13,08±0,58 ^c	2,03±0,10 ^{c,d}	0,98±0,03 ^b	1,02±0,02 ^c	1,33±0,03 ^b	5,59±0,12 ^c	0,68±0,02 ^b	1,12±0,04 ^a
B-GLIC	22,11±1,13 ^a	2,24±1,11 ^{b,c}	1,52±0,09 ^a	1,04±0,02 ^c	1,07±0,02 ^c	5,67±0,14 ^c	0,72±0,03 ^b	0,61±0,02 ^c
B-LK	17,43±0,43 ^b	1,58±0,04 ^c	0,41±0,01 ^d	1,37±0,06 ^a	0,95±0,03 ^d	7,02±0,28 ^b	0,46±0,02 ^d	0,45±0,01 ^d
B-SOR	17,37±0,57 ^b	1,74±0,06 ^{d,c}	0,48±0,01 ^d	0,94±0,04 ^d	1,09±0,05 ^c	5,51±0,27 ^c	0,57±0,02 ^c	0,73±0,02 ^b
B-UREA	22,87±0,91 ^a	2,51±0,11 ^{a,b}	0,83±0,02 ^c	1,19±0,06 ^b	1,02±0,04 ^{c,d}	10,45±0,16 ^a	0,74±0,02 ^b	0,79±0,01 ^b
Trop maline								
B-PG	14,64±0,73 ^a	1,13±0,05 ^a	0,46±0,02 ^b	0,32±0,01 ^d	0,73±0,03 ^b	7,94±0,40 ^b	0,06±0,00 ^c	0,48±0,02 ^b
B-GLU	6,98±0,21 ^d	0,93±0,03 ^b	0,31±0,01 ^c	0,37±0,01 ^{b,c}	0,96±0,03 ^a	4,98±0,20 ^c	0,08±0,00 ^b	0,35±0,00 ^c
B-GLIC	11,96±0,30 ^b	0,65±0,02 ^d	0,61±0,02 ^a	0,42±0,01 ^b	0,37±0,01 ^d	5,43±0,18 ^c	0,04±0,00 ^d	0,33±0,01 ^c
B-LK	6,66±0,13 ^d	0,29±0,01 ^c	0,34±0,01 ^c	1,06±0,03 ^a	0,31±0,01 ^e	1,98±0,10 ^d	0,03±0,00 ^e	0,36±0,02 ^c
B-SOR	9,24±0,46 ^c	0,65±0,01 ^d	0,27±0,00 ^d	0,31±0,01 ^{c,d}	0,54±0,01 ^c	5,46±0,20 ^c	0,04±0,00 ^d	0,34±0,01 ^c
B-UREA	10,14±0,43 ^c	0,77±0,03 ^c	0,33±0,01 ^c	0,34±0,01 ^d	0,53±0,02 ^c	8,10±0,20 ^a	0,09±0,00 ^a	0,53±0,02 ^a

Rezultati su izraženi po gramima suve materije supstrata i prikazani kao srednja vrednost ± standardna devijacija. Različita slova u istoj koloni označavaju statistički ($p \leq 0,05$) značajnu razliku između eutektičkih smeša istog supstrata. Skraćenice: B-PG je betain – propilen glikol; B-GLU je betain – glukoza; B-GLIC je betain – glicerol; B-LK je betain – limunska kiselina; B-SOR je betain – sorbitol; B-UREA je betain – urea.

Upotrebljeni sastojci za pripremu eutektičkih smeša su izabrani na osnovu njihove visoke kompatibilnosti sa kožom, što je potvrđeno i regulativama Evropske unije, i koje se već aktivno koriste i nalaze u različitim kozmetičkim proizvodima. Konkretno, betain se koristi kao sredstvo za kontrolu viskoziteta i ima visok kapacitet zadržavanja vlage [346]. Propilen glikol i glicerol se koriste kao emolijenti koji pomažu u održavanju hidratacije kože tokom dužeg vremenskog perioda [347,348]. Glukoza i šećerni alkohol – sorbitol, su humektanti koji sprečavaju isušivanje kože, a takođe stabilizuju kozmetičke formulacije i poboljšavaju njihovu teksturu što ujedno olakšava njihovo nanošenje [349,350]. Urea se često sreće u kozmetičkim proizvodima, jer pomaže u održavanju optimalnog nivoa vode čineći kožu mekom i glatkom [351]. Na kraju, limunska kiselina se primenjuje za eksfolijaciju kože, ali i zbog svojih svojstava kao odličan helirajući agens i prirodni konzervans, čime produžava rok trajanja kozmetičkih proizvoda [352,353].

Sve primenjene eutektičke smeše su bile efikasnije u ekstrakciji polifenola iz crne ribizle i tropa maline u poređenju sa vodom kao rastvaračem (tabela 4.1 i 4.8). Ovo se može objasniti time što eutektičke smeše ne samo što imaju veću moć solvatacije polifenola, već mogu delimično da razgrade ćelijski zid biljaka usled formiranja vodoničnih veza sa njegovim strukturnim elementima, što direktno utiče na oslobađanje i sadržaj polifenola u ekstraktu [354]. Ekstrakti crne ribizle dobijeni uz pomoć smeša na bazi betaina i glicerola, uree ili propilen glikola, imali su najviši sadržaj polifenola 20,86 - 22,87 mg GAE/g ($p > 0,05$), što je do ~30 % manje u poređenju sa sadržajem polifenola u ekstraktu dobijenim enzimski potpomognutom ekstrakcijom pod optimalnim uslovima. S druge strane, kada je u pitanju trop maline, kao najefikasnija istakla se smeša betain-propilen glikol (14,64 mg GAE/g), praćena smešom betain-glicerol, zatim smešama betain-urea i betain-sorbitol, i na kraju smešama betain-glukoza i betain-limunska kiselina. Niži prinosi polifenola u ekstraktima smeša sa glukozom, sorbitolom i limunskom kiselinom kao HBD, u poređenju sa ostalim smešama, može biti posledica izražene viskoznosti sistema usled nagrađene čvrste mreže vodoničnih veza, zbog koje je smanjena solvatacija željenih molekula [355,356]. Ekstrakcija flavonoida je bila najuspešnija primenom eutektičke smeše betain-propilen glikol, dajući sadržaj ukupnih flavonoida od 2,55 mg QE/g u ekstraktu crne ribizle i 1,13 mg QE/g u ekstraktu tropa maline. Smeša betain-glicerol dala je maksimalne prinose flavanola za oba supstrata, što je u skladu sa nekoliko studija koje su potvrdile veću rastvorljivost flavanola u smešama na bazi glicerola [357,358]. Eutektička smeša na bazi betaina i limunske kiseline je pokazala najveću moć ekstrakcije antocijanina, što je u skladu sa rezultatima drugih studija u kojima su korišćene smeše sa organskim kiselinama kao HBD [355,359-361]. Naime, organske kiseline utiču na smanjenje pH vrednosti sistema i tada je favorizovana ekstrakcija antocijanina koji se nalaze u svom stabilnom obliku (flavilijum jonu) [362]. Najveći prinosi fenolnih kiselina dobijeni su smešama betain-propilen glikol i betain-glukoza, dok je smeša sa limunskom kiselinom dala najlošije rezultate. Nekoliko studija je potvrdilo da eutektičke smeše koje sadrže alkohol ili šećere kao HBD su najpogodnije za izdvajanje fenolnih kiselina [363-365]. Kada je reč o hidrolizabilnim taninima, smeša betain-urea je dala najbolje rezultate za oba supstrata. Studija koja je ispitivala ekstrakciju hidrolizabilnih tanina iz biljke *Alchemilla vulgaris L.* (poznate kao virak) pomoću 17 različitih eutektičkih smeša, je takođe potvrdila da je smeša sa ureom kao HBD, najefikasniji rastvarač za ovu vrstu jedinjenja [363].

4.7.1.2. Antioksidativna aktivnost

Antioksidativna aktivnost svih dobijenih ekstrakata ispitana je primenom FRAP, CUPRAC, ABTS i DPPH metode, a dobijeni rezultati prikazani su u tabeli 4.29.

Tabela 4.29. Antioksidativna aktivnost različitih ekstrakata tropova bobičastog voća dobijenih enzimski potpomognutom ekstrakcijom pod optimalnim uslovima

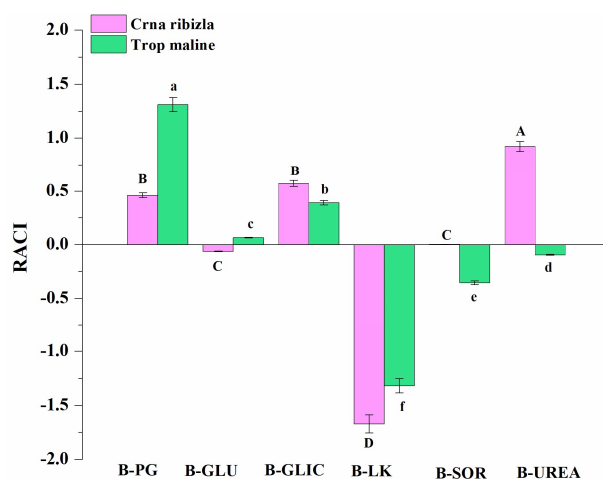
Vrsta eutektičke smeše	FRAP	CUPRAC	ABTS	DPPH
	μmol TE/g	μmol TE/g	μmol TE/g	μmol TE/g
Crna ribizla				
Betain – propilen glikol	91,2 ± 3,2 ^a	173,8 ± 8,7 ^b	182,8 ± 8,3 ^a	106,4 ± 5,3 ^d
Betain – glukoza	84,9 ± 2,8 ^b	180,1 ± 10,1 ^b	125,2 ± 6,3 ^c	129,5 ± 6,5 ^{b,c}
Betain – glicerol	85,2 ± 3,4 ^b	220,0 ± 13,3 ^a	148,6 ± 7,4 ^b	141,7 ± 7,1 ^{a,b}
Betain – limunska kiselina	34,4 ± 1,7 ^d	145,0 ± 5,9 ^c	72,5 ± 3,1 ^d	75,6 ± 3,8 ^c
Betain – sorbitol	66,5 ± 1,9 ^c	209,7 ± 7,3 ^a	129,0 ± 6,5 ^c	116,0 ± 5,8 ^{c,d}
Betain – urea	92,9 ± 1,4 ^a	226,4 ± 7,6 ^a	167,7 ± 8,4 ^{a,b}	157,3 ± 7,5 ^a
Trop maline				
Betain – propilen glikol	38,9 ± 1,9 ^a	92,7 ± 4,6 ^a	102,3 ± 4,5 ^b	54,2 ± 2,4 ^a
Betain – glukoza	32,3 ± 1,6 ^b	87,8 ± 4,4 ^{a,b}	47,7 ± 2,4 ^c	39,9 ± 2,0 ^b
Betain – glicerol	19,8 ± 0,7 ^{d,c}	89,6 ± 3,6 ^a	115,8 ± 5,1 ^a	34,4 ± 1,5 ^{c,d}
Betain – limunska kiselina	17,8 ± 0,9 ^c	51,0 ± 1,5 ^d	54,5 ± 2,0 ^c	20,1 ± 0,7 ^c
Betain – sorbitol	23,8 ± 0,9 ^c	68,0 ± 2,2 ^c	67,7 ± 1,9 ^d	36,1 ± 1,0 ^{b,c}
Betain – urea	22,4 ± 0,9 ^{c,d}	79,8 ± 3,3 ^b	87,4 ± 4,1 ^c	31,0 ± 1,4 ^d

Rezultati su izraženi po gramima suve materije supstrata i prikazani kao srednja vrednost ± standardna devijacija. Različita slova u istoj koloni označavaju statistički ($p < 0,05$) značajnu razliku između ekstrakata.

Zbog značajnih razlika u udelima ekstrahovanih jedinjenja, koje su zavisile od primenjene eutektičke smeše (tabela 4.28), bilo je očekivano da će se primetiti i razlike u antioksidativnoj aktivnosti u zavisnosti od korišćene metode za procenu antioksidativne aktivnosti. Pa tako, prema FRAP metodi najveću antioksidativnu aktivnost imao je ekstrakt crne ribizle dobijene smešom betain-urea (92,9 μmol TE/g), dok je za trop maline najbolji rezultat dobijen smešom betain-propilen glikol (38,9 μmol TE/g). Smeše sa glicerolom kao HBD su dale najbolje rezultate prema CUPRAC metodi, dok je sposobnost neutralizacije slobodnih radikala, merena DPPH i ABTS metodom varirala u zavisnosti od primenjene HBD. Stoga, kako bi se adekvatno rangirale eutektičke smeše na osnovu antioksidativnih svojstava, izračunat je relativni antioksidativni kapacitet za svaki dobijeni ekstrakt (slika 4.42).

Relativni antioksidativni kapacitet je pokazao da najveću antioksidativnu aktivnost ima ekstrakt crne ribizle dobijen smešom betain-urea, zatim ekstrakt dobijen smešama betain-glicerol i betain-propilen glikol ($p > 0,05$) i na kraju ekstrakt dobijen smešom betain-sorbitol i betain-limunska kiselina. Sa druge strane, opadajući redosled smeša koje su dale ekstrakte tropa maline sa najviše antioksidanata je sledeći: betain-propilen glikol > betain-glicerol > betain-glukoza > betain-urea > betain-limunska kiselina.

Uzimajući u obzir ukupni sadržaj polifenola i antioksidativnu aktivnost (tabela 4.28 i 4.29), za ispitivanje enzimski potpomognute ekstrakcije fitohemikalija crne ribizle i tropa maline primenom eutektičkih smeša kao najoptimalnije izabrane su betain-propilen glikol, betain-glicerol i betain-urea.



Slika 4.42. Indeks relativnog antioksidativnog kapaciteta (RACI) ekstrakata crne ribizle i tropa maline dobijenih korišćenjem različitih eutektičkih smeša. Različita velika i mala slova ukazuju na statistički značajnu razliku ($p \leq 0,05$) između različitih ekstrakata crne ribizle odnosno maline, redom. Skraćenice: B-PG je betain – propilen glikol; B-GLU je betain – glukoza; B-GLIC je betain – glicerol; B-LK je betain – limunska kiselina; B-SOR je betain – sorbitol; B-UREA je betain – urea.

4.7.2. Enzimski potpomognuta ekstrakcija fitohemikalija iz crne ribizle i tropa maline primenom eutektičkih smeša

4.7.2.1. Karakterizacija ekstrakata

Enzimski potpomognuta ekstrakcija fitohemikalija iz crne ribizle i tropa maline, korišćenjem eutektičkih smeša na bazi betaina i propilen glikola, glicerola ili uree kao rastvarača, sprovedena je pod prethodno definisanim optimalnim uslovima. Kombinacija enzimskih preparata Viscozyme[®] L i Rohapect[®] MC bila je 2:1 za crnu ribizlu odnosno 1:1 za trop maline, dok je ukupna koncentracija bila 0,05 mL/g supstrata.

Na osnovu dobijenih karakteristika ekstrakata (tabela 4.30) može se primetiti da je sadržaj polifenola viši u odnosu na odgovarajuće ekstrakte dobijene samo primenom eutektičkih smeša kao rastvarača (tabela 4.28). Sadržaj polifenola u ekstraktima ekstrakta crne ribizle bio je u opsegu 24,31 - 30,25 mg GAE/g, pri čemu je uz pomoć smeša betain-propilen glikol i betain-glicerol ostvaren u proseku ~10% viši sadržaj polifenola u poređenju sa ekstraktom dobijenim enzimski potpomognutom ekstrakcijom pod optimalnim uslovima uz upotrebu pufera kao rastvarača. Sa druge strane, sadržaj polifenola u ekstraktima tropa maline bio 10,74-16,36 mg GAE/g. Najveći sadržaj polifenola kod ekstrakata maline postignut je primenom smeše betain–glicerol, koji je bio za 22% viši u odnosu na sadržaj polifenola u ekstraktu dobijenom primenom enzima i pufera kao rastvarača. Takođe, prinos svih ostalih polifenolnih klasa i redukujućih šećera bio je viši nakon enzimskog tretmana, pri čemu su najmanji prinosi dobijeni u smeši koja sadrži ureu kao HBD.

Kombinovani efekat eutektičkih smeša i enzima podrazumeva razgradnju ćelijskog zida uz oslobađanje vezanih polifenola i bolju difuziju molekula u rastvarač koji ima visoku moć solvatacije polarnih molekula. Svakako, primena eutektičkih smeša i enzima, bez dodatka vode može dovesti do „zarobljavanja“ proteina unutar strukture eutektičkih smeša usled formiranja jakih vodoničnih veza što posledično dovodi do inhibicije enzima, pa je primena vode kao kosolventa dodatno opravdana [366]. Štaviše, istraživanja su pokazala da su konformacije celulaza i pektinaza stabilnije i kompaktnije u eutektičkim smešama sa određenim sadržajem vode u poređenju sa anhidrovanim eutektičkim smešama.

Međutim, višak vode čini celulaze i pektinaze previše kompaktnim što dovodi do smanjenja njihove aktivnosti [367], što može biti razlog za niži sadržaj polifenola kada je u enzimski potpomognutoj ekstrakciji kao rastvarač korišćen pufer (voda).

Tabela 4.30. Sadržaj polifenolnih jedinjenja i šećera u ekstraktima crne ribizle i tropa maline

Vrsta eutektičke smeše	Polifenoli mg GAE/g	Flavonoidi mg QE/g	Flavonoli mg QE/g	Antocijanini mg Cy3GE/g	Fenolne kiseline mg CAE/g	Hidroliz. tanini mg GAE/g	Kondenz. tanini mg CyE/g	Reduk. šećeri mmol GE/g
Crna ribizla								
B-PG	28,70±1,15 ^a	4,85±0,20 ^a	2,02±0,12 ^a	2,52±0,11 ^a	4,93±0,25 ^b	14,68±0,59 ^a	0,89±0,04 ^a	1,11±0,03 ^a
B-GLIC	30,25±0,90 ^a	4,13±0,16 ^b	1,94±0,09 ^a	2,83±0,13 ^a	5,07±0,02 ^a	11,64±0,42 ^b	0,84±0,03 ^a	1,06±0,04 ^a
B-UREA	24,31±1,65 ^b	3,24±0,11 ^c	0,92±0,01 ^b	1,46±0,08 ^b	2,62±0,04 ^c	10,22±0,47 ^b	0,66±0,02 ^b	0,87±0,03 ^b
Trop maline								
B-PG	13,53±0,68 ^b	2,08±0,05 ^a	0,89±0,04 ^b	1,04±0,04 ^a	1,01±0,04 ^b	8,15±0,20 ^b	0,27±0,01 ^b	0,82±0,02 ^b
B-GLIC	16,36±0,49 ^a	1,01±0,03 ^b	1,11±0,05 ^a	0,84±0,03 ^b	2,00±0,08 ^a	7,88±0,21 ^b	0,24±0,01 ^c	1,03±0,05 ^a
B-UREA	10,74±0,48 ^c	0,82±0,01 ^b	0,80±0,03 ^b	0,67±0,01 ^c	0,88±0,03 ^c	9,56±0,33 ^a	0,36±0,01 ^a	0,67±0,03 ^c

Rezultati su izraženi po gramima suve materije supstrata i prikazani kao srednja vrednost ± standardna devijacija. Različita slova u istoj koloni označavaju statistički ($p \leq 0,05$) značajnu razliku između eutektičkih smeša istog supstrata. Skraćenice: B-PG je betain – propilen glikol; B-GLIC je betain – glicerol; B-UREA je betain – urea.

4.7.2.2. Antioksidativna aktivnost

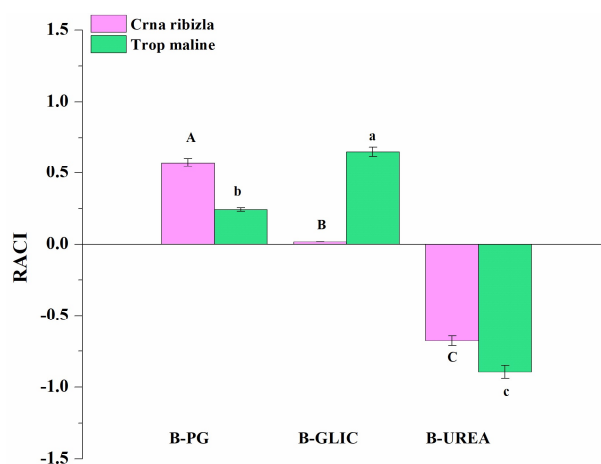
Antioksidativna aktivnost ekstrakata crne ribizle i tropa maline dobijenih uz pomoć enzima i eutektičkih meša kao rastvarača (tabela 4.31) ukazuje na to da su svi ekstrakti imali značajno višu antioksidativnu aktivnost u poređenju sa ekstraktima dobijenim samo primenom eutektičkih smeša (tabela 4.29) ili pak primenom enzima i pufera (vode) kao rastvarača (tabela 4.3 i 4.9).

Tabela 4.31. Antioksidativna aktivnost različitih ekstrakata tropova bobičastog voća dobijenih enzimski potpomognutom ekstrakcijom pod optimalnim uslovima

Vrsta eutektičke smeše	FRAP μmol TE/g	CUPRAC μmol TE/g	ABTS μmol TE/g	DPPH μmol TE/g
Crna ribizla				
Betain – propilen glikol	124,2 ± 4,8 ^a	321,0 ± 8,7 ^b	214,6 ± 10,3 ^a	180,6 ± 8,8 ^a
Betain – glicerol	125,6 ± 4,7 ^a	460,6 ± 10,9 ^a	225,5 ± 7,6 ^a	150,2 ± 6,7 ^b
Betain – urea	109,6 ± 4,5 ^b	350,8 ± 14,7 ^b	193,3 ± 7,0 ^b	124,8 ± 6,2 ^c
Trop maline				
Betain – propilen glikol	45,3 ± 2,2 ^a	133,7 ± 4,6 ^a	147,6 ± 7,4 ^a	73,1 ± 3,5 ^a
Betain – glicerol	30,2 ± 1,7 ^b	140,2 ± 3,6 ^a	137,1 ± 6,2 ^{a,b}	51,6 ± 2,3 ^b
Betain – urea	31,5 ± 1,1 ^b	135,6 ± 3,3 ^a	125,5 ± 5,6 ^b	43,8 ± 1,6 ^c

Rezultati su izraženi po gramima suve materije supstrata i prikazani kao srednja vrednost ± standardna devijacija. Različita slova u istoj koloni označavaju statistički ($p \leq 0,05$) značajnu razliku između ekstrakata.

Prema relativnom antioksidativnom kapacitetu (slika 4.43) može se videti da je najveću antioksidativnu aktivnost imao ekstrakt crne ribizle kada je korišćena smeša betain-propilen glikol, dok je ekstrakt tropa maline imao najveću antioksidativnu aktivnost dobijen smešom betain-glicerol. Sa druge strane, smeša betain-urea se pokazala kao najlošiji rastvarač za izolaciju antioksidanata.



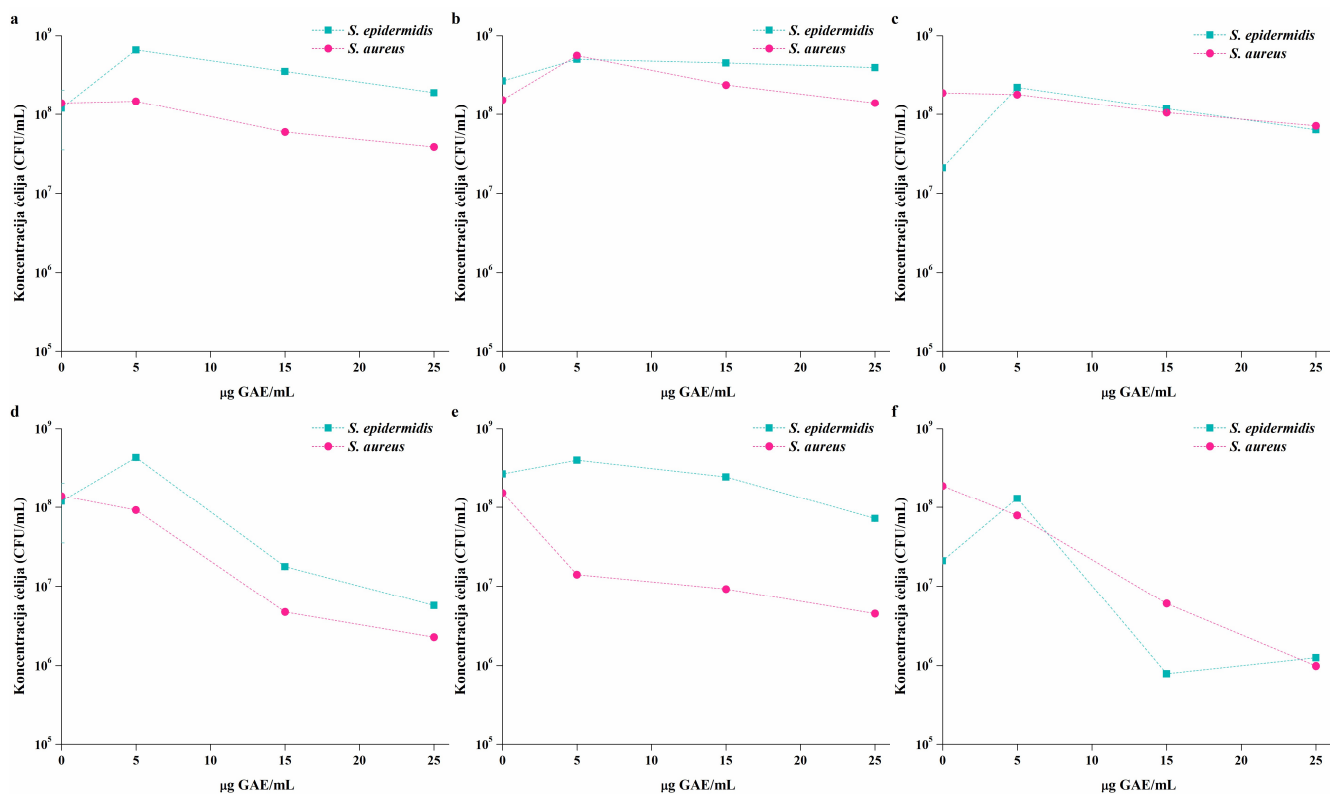
Slika 4.43. Indeks relativnog antioksidativnog kapaciteta (RACI) ekstrakta crne ribizle i tropa maline dobijenih korišćenjem različitih eutektičkih smeša i enzimskih preparata. Različita velika i mala slova ukazuju na statistički značajnu razliku ($p \leq 0,05$) između različitih ekstrakata crne ribizle odnosno maline, redom. Skraćenice: B-PG je betain – propilen glikol, B-GLIC je betain – glicerol; B-UREA je betain – urea.

4.7.2.3. Ispitivanje prebiotskog potencijala ekstrakata

Uticaj ekstrakata crne ribizle i tropa maline dobijenih enzimski potpomognutom ekstrakcijom pod optimalnim uslovima i primenom eutektičkih smeša, na rast *S. epidermidis* DSM 20044 i *S. aureus* ATCC 25923 ispitan je na *stratum corneum* modelu u opsegu koncentracija 5-25 μg GAE/g. Kontrolni uzorak bile su čiste eutektičke smeše. Nakon delovanja ekstrakata tokom 24 h, određen je broj kolonija (CFU/mL), a dobijeni rezultati prikazani su na slici 4.44.

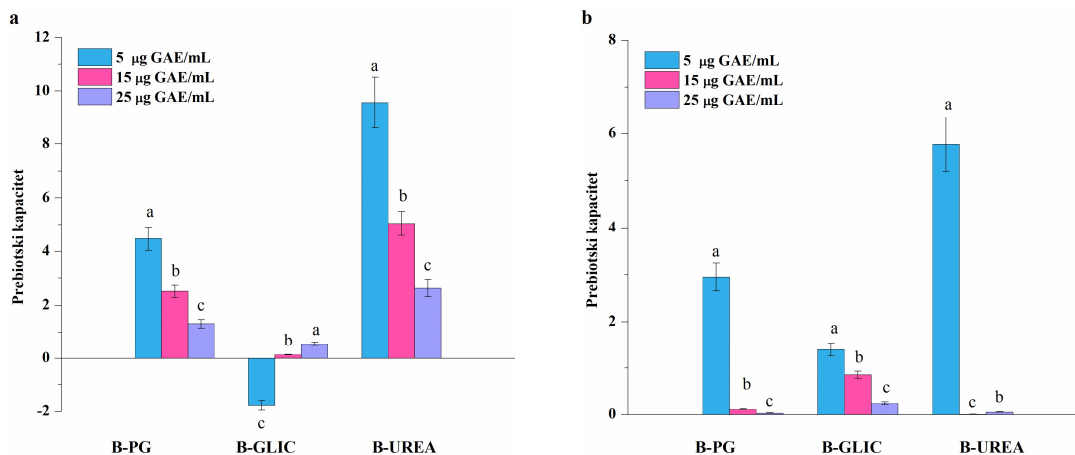
Pre svega, bitno je napomenuti da je broj kolonija na *stratum corneum* modelu koji je sadržao samo suspenziju kalusa (bez dodatka čiste eutektičke smeše ili eutektičke smeše sa ekstraktom) nakon 24 h rasta bio $1,7 \cdot 10^7$ CFU/mL agara za *S. epidermidis*, odnosno $1,4 \cdot 10^8$ CFU/mL agara za *S. aureus*. Na osnovu dobijenog broja kolonija nakon 24 h rasta (slika 4.44), to bi značilo da same eutektičke smeše betain-propilen glikol i betain-glicerol imaju blago stimulatívno dejstvo na rast bakterije *S. epidermidis*, dok nisu značajno uticale na rast patogene bakterije *S. aureus*. Istraživanja pokazuju da *S. epidermidis* može da metaboliše glicerol i koristi ga kao izvor ugljenika, i ujedno dovodi i do veće brzine rasta ove bakterije. Sa druge strane, literatura o uticaju propilen glikola na *S. epidermidis* je ograničena, ali postoje indicacije da ova bakterija može koristiti ovaj kozmetički sastojak takođe kao izvor ugljenika [368].

Kao što se može videti sa slike 4.44.a-c, broj vijabilnih kolonija bakterije *S. epidermidis* pri svim dobijenim i primenjenim koncentracijama je bio veći u odnosu na odgovarajući kontrolni uzorak (čista eutektička smeša). Isti ekstrakti, nisu značajno uticali na broj vijabilnih kolonija bakterije *S. aureus* pri svim primenjenim koncentracijama. Kada je reč o ekstraktu maline, najveća razlika u broju vijabilnih kolonija bakterije *S. epidermidis* i *S. aureus* primećen je kada je kao rastvarač korišćena smeša betain-propilen glikol i betain-glicerol.



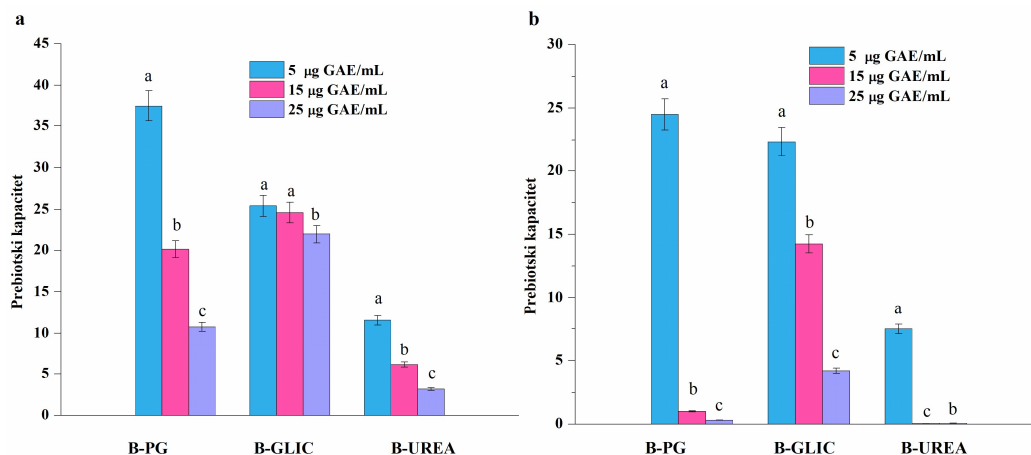
Slika 4.44. Broj kolonija (CFU/mL agara) bakterije *S. epidermidis* i *S. aureus* u prisustvu ekstrakta crne ribizle dobijenog enzimski potpomognutom ekstrakcijom i korišćenjem eutektičke smeše betain-propilen glikol (a), betain-glicerol (b) i betain urea (c) i u prisustvu ekstrakta tropa maline dobijenog enzimski potpomognutom ekstrakcijom korišćenjem eutektičke smeše betain-propilen glikol (d), betain-glicerol (e) i betain urea (f). Koncentracije ekstrakata bile su 0-25 µg/mL agara.

Da bi se sagledao ukupan uticaj dobijenih ekstrakata na rast predstavnika komensalne i patogene mikrobiote, izračunat je PK_{CFU} (slika 4.45) za ekstrakte crne ribizle i tropa maline u odnosu na kontrolni uzorak koji je sadržao odgovarajuću količinu eutektičkih smeša. PK_{CFU} izračunati za ekstrakte crne ribizle dobijene pomoću enzima i eutektičkih smeša betain-propilen glikol i betain-urea bili su veći od nule što znači da su pozitivno uticali na odnos ove dve bakterije u korist komensalne bakterije *S. epidermidis*. Kod ovih ekstrakata je primećen trend da sa porastom njihove koncentracije opada njihov prebiotski efekat. Interesantno, ekstrakt crne ribizle dobijen primenom enzima i smeše betain-glicerol je pri najmanjoj koncentraciji dao negativan PK_{CFU} , usled veće stimulacije *S. aureus*. Sa porastom doze ovog ekstrakta, povećavao se i PK_{CFU} , jer je došlo do većeg smanjenja broja vijabilnih ćelija *S. aureus*. Sa druge strane, PK_{CFU} ekstrakata tropa maline su bili najviši pri najmanjoj koncentraciji, dok je povećanje doze ekstrakata doveo do drastičnog pada vrednosti PK_{CFU} . Svakako, ukoliko se ove vrednosti uporede sa vrednostima PK_{CFU} izračunatim za ekstrakte crne ribizle i tropa maline dobijene enzimski potpomognutom ekstrakcijom i primenom pufera kao rastvarača može se primetiti da su ove vrednosti 2-3 puta niže, što ukazuje na razlike u sastavu izolovanih polifenola.



Slika 4.45. Prebiotski kapacitet dobijen na osnovu broja kolonija bakterija *S. epidermidis* i *S. aureus* nakon 24 h gajenja u prisustvu različitih ekstrakata crne ribizle (a) i tropa maline (b), u odnosu na kontrolu uzorak koji je sadržao odgovarajuću količinu eutektskih smeša. Različita mala slova označavaju statistički značajnu razliku ($p \leq 0,05$) između testiranih koncentracija svakog ekstrakta. Skraćenice: B-PG je betain – propilen glikol, B-GLIC je betain – glicerol; B-UREA je betain – urea.

Međutim, kao što je već napomenuto, određeni sastojci primenjenih eutektskih smeša imaju stimulatívni efekat na rast komensalne bakterije *S. epidermidis* i u skladu sa tim izračunati su i PK_{CFU} (slika 4.46) u odnosu na kontrolni uzorak bez dodatka eutektskih smeša, kako bi se kvantifikovao zbirni efekat eutektskih smeša i ekstrakata. Kao što se može videti, zajedničko delovanje sastojaka eutektskih smeša betain-propilen glikol i betain-glicerol i ekstrakata je za rezultat imalo znatno više vrednosti PK_{CFU} (za crnu ribizlu do 37,5, a za trop maline do 24,5) u odnosu na ekstrakte dobijene uz pomoć enzima i pufera kao rastvarača. Stoga, može se zaključiti da ekstrakti crne ribizle i tropa maline dobijeni uz pomoć eutektskih smeša i enzima ne zahtevaju naknadno izdvajanje iz samih eutektskih smeša, jer sastojci eutektskih smeša ne samo da pokazuju značajan prebiotski efekat na dermalnu mikrobiotu, već imaju i potvrđene korisne efekte na izgled i zdravlje kože.



Slika 4.46. Prebiotski kapacitet dobijen na osnovu broja kolonija bakterija *S. epidermidis* i *S. aureus* nakon 24 h gajenja u prisustvu različitih ekstrakata crne ribizle (a) i tropa maline (b), u odnosu na kontrolu uzorak bez dodatka eutektskih smeša. Različita mala slova označavaju statistički značajnu razliku ($p \leq 0,05$) između testiranih koncentracija svakog ekstrakta. Skraćenice: B-PG je betain – propilen glikol, B-GLIC je betain – glicerol; B-UREA je betain – urea.

Svakako, iako je pokazano da su nekonvencionalnim rastvaračima poput eutektičkih smeša dobijeni visoki prinosi polifenola i prebiotska aktivnost, neophodno je dalje ispitati njihov uticaj na čitav mikrobiom kože, kao i transdermalnu difuziju nakon inkorporiranja u različite kozmetičke formulacije, ali to nije bio predmet ove doktorske disertacije.

4.8. Izolacija pektina iz bobičastog voća/crne ribizle

Poslednji korak istraživanja ove doktorske disertacije bila je izolacija i karakterizacija pektina iz crne ribizle kao potencijalnih sastojaka kozmetičkih proizvoda. Cilj ovog dela bio je iskorišćenje taloga crne ribizle koji zaostaje nakon ekstrakcije fitohemikalija, kako bi se dobile nove frakcije bogate drugim bioaktivnom jedinjenjima. Stoga, nakon vodene i trostruke etanolne ekstrakcije polifenola iz crne ribizle, talog je tretiran na odgovarajući način kako bi se dobile dve frakcije pektina: pektin dobijen nakon kiselinske hidrolize limunskom kiselinom (LK-pektin) i kalcijum vezani pektin (Ca-pektin). Dobijeni pektini su detaljno okarakterisani primenom različitih tehnika, a ispitani su i njihov prebiotski potencijal.

4.8.1. Fizičko-hemijske karakteristike izolovanih frakcija pektina

Nakon izolacije polifenola, dobijeni talog tretiran je limunskom kiselinom kako bi se dobio pektin rastvorljiv u kiselinama (LK-pektin), dok je daljim tretiranjem novodobijenog taloga rastvorom amonijum oksalata dobijen kalcijum vezani (Ca-pektin). Prinosi dobijenog LK-pektina i Ca-pektina bio je 2,9 % (w/w) i 1,8 % (w/w), redom (tabela 4.32), što je u skladu sa rezultatima pojedinih studija koje su se bavile izolacijom pektina iz crne ribizle [369,370]. Varijacije u sadržaju pektina najverovatnije su posledica korišćenja različitih sorti crne ribizle, uslova gajenja, zrelosti ploda itd., ili načina izvođenja ekstrakcije polifenola.

Pektin se u kozmetici koristi kao prirodno sredstvo za zgušnjavanje ili stabilizator kozmetičkih proizvoda, čime pozitivno utiče na njihovu strukturu i viskozitet bez dodatka sintetičkih aditiva. Nakon nanošenja, pektin deluje kao agens za stvaranje filma, pružajući zaštitnu barijeru koja zadržava vlagu i poboljšava mekoću kože [371,372]. Fizičko-hemijske karakteristike dobijenih frakcija pektina (tabela 4.32) ukazuju da je sadržaj vlage bio u opsegu 6,4-7,1 %, dok je aktivnost vode (a_w) bila u proseku $\sim 0,33$. Prema regulativi Evropske komisije, vrednosti a_w koje su niže od 0,75 su poželjne za dalju primenu u kozmetici, jer je tada ograničena mogućnost kontaminacije proizvoda što pozitivno utiče na rok trajanja proizvoda [373]. Poznato je da površinski sloj kože ima $\text{pH} < 5$, a kako dobijeni pektini imaju pH vrednost od 2,9-3,2, ovo ukazuje da nakon nanošenja na kožu neće uticati na kiselost kože i na njenu prirodnu sposobnost odbrane od patogenih mikroorganizama [374].

Tabela 4.32. Fizičko-hemijske karakteristike pektinskih frakcija

Pektinska frakcija	Prinos (% (w/w))	pH	Sadržaj vlage (%)	Aktivnost vode
LK-pektin	$2,90 \pm 0,18^a$	$2,95 \pm 0,14^a$	$6,35 \pm 0,54^a$	$0,32 \pm 0,01^a$
Ca-pektin	$1,77 \pm 0,17^b$	$3,15 \pm 0,18^a$	$1,12 \pm 0,63^a$	$0,34 \pm 0,02^a$

Legenda: LK-pektin – pektinska frakcija dobijena hidrolizom pomoću limunske kiseline; Ca-pektin – Kalcijum vezani pektin. Različita slova u istoj koloni označavaju statistički ($p \leq 0,05$) značajnu razliku između pektinskih frakcija.

4.8.2. Monosaharidni sastav frakcija pektina

Kako bi se odredio sastav monosaharida i pretpostavila struktura dobijenih pektinskih frakcija, obe frakcije pektina (LK-pektin i Ca-pektin) su podvrgnute totalnoj kiselinskoj hidrolizi i analizirane pomoću GC-FID hromatografije, a dobijeni rezultati su prikazani u tabeli 4.33.

Tabela 4.33. Monosaharidni sastav pektinskih frakcija

Pektinska frakcija	Ksiloza (%)	Arabinoza (%)	Ramnoza (%)	Galaktoza (%)	Manoza (%)	Glukoza (%)	Galakturonska kiselina (%)
LK-pektin	0,9 ± 0,0 ^a	10,4 ± 0,8 ^a	3,8 ± 0,2 ^b	10,7 ± 0,4 ^a	0,2 ± 0,0 ^b	1,7 ± 0,1 ^b	72,3 ± 6,4 ^a
Ca-pektin	0,9 ± 0,0 ^a	2,6 ± 0,1 ^b	11,4 ± 0,7 ^a	6,8 ± 0,3 ^b	25,6 ± 1,5 ^a	4,4 ± 0,3 ^a	48,3 ± 3,7 ^b

Legenda: LK-pektin – pektinska frakcija dobijena hidrolizom pomoću limunske kiseline; Ca-pektin – Kalcijum vezani pektin. Različita slova u istoj koloni označavaju statistički ($p \leq 0,05$) značajnu razliku između pektinskih frakcija.

Kao što se i očekivalo, najzastupljeniji monosaharid u obe frakcije pektina bila je galakturonska kiselina, pri čemu je njen udeo u LK-pektinu bio 72,3 %, a u Ca-pektinu 48,3 %. Prema regulativi Evropske unije i Organizacije za hranu i poljoprivredu (eng. *Food and Agriculture Organization*, FAO) pektinom se smatraju sve frakcije koje sadrže najmanje 65 % galakturonske kiseline [375], što bi značilo da LK-pektin zadovoljava pomenuti uslov. Veći udeo pektina ukazuje na njegovu veću čistoću, ali i bolju sposobnost formiranja gelova, pa se može pretpostaviti da bi LK-pektin bio nešto efikasniji poređenju sa Ca-pektinom za pripremu hidrogelova. Ramnoza, galaktoza i arabinoza najverovatnije potiču od ramnogalakturonana I, dok niske koncentracije ksiloze mogu biti sastavni deo ksilogalakturonana. Interesantno, značajno više vrednosti manoze detektovane su u Ca-pektinu što može ukazivati na prisustvo manano-oligosaharida, ali i na to da je došlo do razgradnje semena crne ribizle i oslobađanja šećera među kojima dominira manoza [275,276].

Na osnovu monosaharidnog sastava pektinskih frakcija, primenom odgovarajućih formula (13 - 8) izračunati su njihovi strukturni parametri (tabela 4.34), na osnovu kojih se može primetiti da je u oba slučaja većinski udeo frakcija linearni lanac galakturonske kiseline – homogalakturonan, pri čemu je viša vrednost dobijena za LK-pektin (68,5 %) u poređenju sa Ca-pektinom (36,9 %). Pored toga, kao što je pretpostavljeno, obe frakcije sadrže i ramnogalakturonan I (28,7 % i 32,1 % za LK-pektin i Ca-pektin, redom). Stepen i obim grananja su bili viši za LK-pektin, dok je linearnost bila relativno niska za obe frakcije pektina. Sa druge strane, čistoća pektina koja je definisana kao odnos pektina i drugih polimera, je bila drastično viša (~22 puta) za LK-pektin u poređenju sa Ca-pektinom [211].

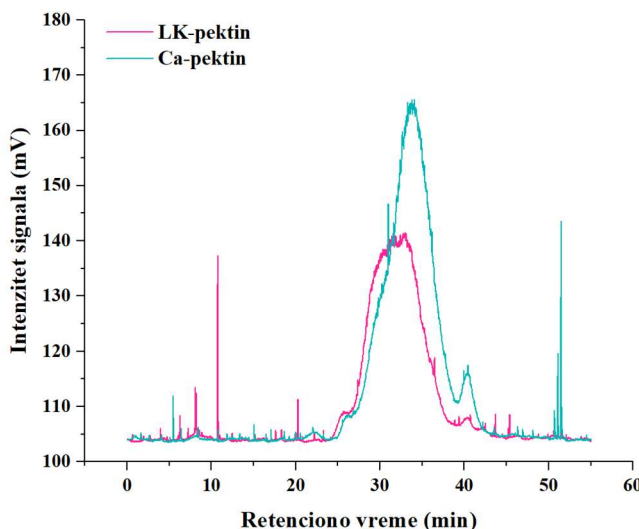
Tabela 4.34. Strukturni parametri pektinskih frakcija

Pektinska frakcija	HG (%)	RGI (%)	Stepen grananja	Obim grananja	Linearnost pektina	Čistoća pektina
LK-pektin	68,5 ± 2,4 ^a	28,7 ± 1,4 ^b	19,0 ± 1,4 ^a	5,5 ± 0,2 ^a	2,91 ± 0,0 ^a	50,3 ± 1,9 ^a
Ca-pektin	36,9 ± 1,1 ^b	32,1 ± 1,0 ^a	4,3 ± 0,2 ^b	0,8 ± 0,0 ^b	2,33 ± 1,5 ^b	2,3 ± 0,2 ^b

Legenda: LK-pektin – pektinska frakcija dobijena hidrolizom pomoću limunske kiseline; Ca-pektin – Kalcijum vezani pektin; HG – homogalakturonan; RGI – ramnogalakturonan I. Različita slova u istoj koloni označavaju statistički ($p \leq 0,05$) značajnu razliku između pektinskih frakcija.

4.8.3. Raspodela molekulskih masa

Kako bi se utvrdila raspodela molekulskih masa u LK-pektinu i Ca-pektinu, dobijene frakcije su analizirane korišćenjem HPSEC hromatografije (slika 4.47). U obe frakcije pektina, bili su prisutni fragmenti molarnih masa iznad 5000 kDa (7,5 %) za LK-pektin odnosno iznad 4000 kDa (4,7 %) za Ca-pektin, u niskim udelima koji mogu biti posledica agregacije manjih polisaharida tokom liofilizacije uzorka. U slučaju Ca-pektina, uočen je još jedan pik koji se odnosi na molekulsku masu 788 kDa sa udelom od 18,9 %. Obe frakcije pektina imale su po jedan dominantan pik na 218,1 kDa za LK-pektin (79,8 %) i 134,1 kDa za Ca-pektin (64,2 %). Značajno manji pikovi detektovani pri dužim retencionim vremenima potiču od niskih udela fragmenata malih molekulskih masa (do 7,2 kDa za LK-pektin (12,7 %) i do 8,2 kDa (12,2 %) za Ca-pektin) koji su najverovatnije nastali usled delimične degradacije pektina tokom ekstrakcije.



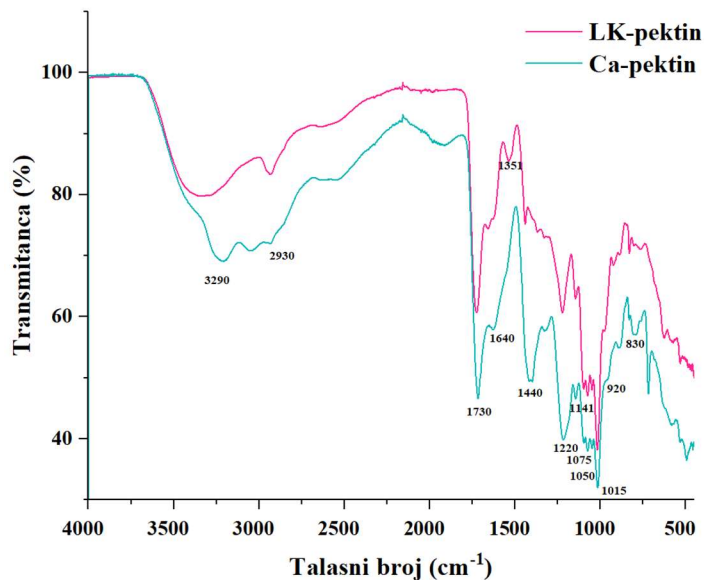
Slika 4.47. Preklapljeni HPSEC-ELSD hromatogrami pektinske frakcije dobijene pomoću limunske kiseline (LK-pektin) i kalcijum vezane pektinske frakcije (Ca-pektin).

4.8.4. FTIR analiza

Radi boljeg definisanja hemijskih struktura dobijenih pektinskih frakcija, uzorci su okarakterisani korišćenjem infracrvene spektroskopije sa Furijeovom transformacijom (FTIR), a njihovi spektri tipičnih hemijskih grupa u području od 500-4000 cm^{-1} prikazani su na slici 4.48.

Obe pektinske frakcije imale su karakteristične pikove na 3290 cm^{-1} , 2930 cm^{-1} , 1073 cm^{-1} i 1016 cm^{-1} koji se prepisuju intermolekulskom i intramolekulskom istežanju hidroksilnih grupa, vibraciji istežanja C-H veze kod CH_2 i CH_3 grupe, C-OH veze bočnih grupa ili C-O-C glikozidnih komponenti, redom. Dodatno, pik apsorpcije na 1730 cm^{-1} odnosi se na vibracije istežanja metil esterifikovane karboksilne grupe (COO-R), dok pik apsorpcije na 1640 cm^{-1} odgovara vibracijama istežanja karboksilatnih jona odnosno slobodnih karboksilnih grupa (COO^-). Na osnovu vrednosti ova dva pika izračunat je stepen esterifikacije dobijenih frakcija pektina. Stepenski stepen esterifikacije ima značajan uticaj na funkcionalna svojstva pektina, a dobijena vrednost za LK-pektin je 48,7 % ukazujući na to da ova pektinska frakcija spada u kategoriju nisko metilovanih pektina. Sa druge strane, stepen esterifikacije Ca-pektina je viša od 50 % (51,3 %) zbog čega spada u kategoriju visoko metilovanih pektina [375,376]. Takođe, razlika u sposobnosti apsorpcije vode određena je stepenom esterifikacije pektina, odnosno što je niži stepen esterifikacije, veća je sposobnost apsorpcije vode, pa se može reći da LK-pektin ima veću

sposobnost vezivanja vode od Ca-pektina [302]. Pik koji se nalazi na 1440 cm^{-1} takođe potiče od istežanja karboksilnih grupa, što ukazuje na prisustvo alifatičnih ili aromatičnih metilen ili metoksil grupa u strukturi. Pikovi na 1221 cm^{-1} i 1143 cm^{-1} potiču od vibracija istežanja etarskih (R-O-R) i C-C veza u cikličnim pektinskim strukturama, dok pikovi na 1351 cm^{-1} , 920 cm^{-1} i 829 cm^{-1} su pripisane deformacijama $-\text{CH}_3$ ili $-\text{COOH}$ grupa [377-379].



Slika 4.48. Preklapljeni FTIR spektri pektinske frakcije dobijene pomoću limunske kiseline (LK-pektin) i kalcijum vezane pektinske frakcije (Ca-pektin).

4.8.5. Tehno-funkcionalne karakteristike pektinskih frakcija

S obzirom na to da je ekstrakcija pektina izvršena sa ciljem dobijanja kozmetičkih sastojaka, za obe frakcije pektina su određena karakteristična tehno-funkcionalna svojstva (tabela 4.35). Pa tako, kapacitet zadržavanja vode (eng. *Water holding capacity*, WHC) predstavlja karakteristiku materijala da apsorbuje vodu i ukazuje da li će doći do izdvajanja tečnosti nakon formiranja gela ili ne. Zависи od veličine čestica, sadržaja kalcijuma, pH vrednosti, poroznosti uzorka, broja slobodnih hidroksilnih grupa i dr. Vrednost ovog parametra za frakciju LK-pektin bila je 10,0, a za Ca-pektin 7,3, a poznato je da što je vrednost ovog parametra niža veća je verovatnoća da će doći do izdvajanja vode usled manje stabilnosti gela [380]. Kapacitet zadržavanja ulja (eng. *Oil holding capacity*, OHC) je važno funkciono svojstvo, jer utiče na teksturu proizvoda i odnosi se na fizičko vezivanje uljane faze nekovalentnim vezama (poput hidrofobnih, elektrostatičkih i vodoničnih veza) unutar ispitivanog materijala. Dobijeni rezultati su pokazali da se vrednost OHC obe frakcije pektina statistički ne razlikuju (u proseku $\sim 19,1$). Istraživanja ukazuju da je OHC povezan sa stepenom acetilovanja i esterifikovanja molekula zbog povećanja njihove hidrofobnosti, a kako obe frakcije pektina imaju sličan stepen metil esterifikovanja, očekivano je da imaju slične kapacitete zadržavanja ulja [381]. Emulgujući kapacitet (eng. *Emulsifying capacity*, EC) pektinskih frakcija koje daju informaciju o njihovoj sposobnosti da stabilišu sisteme na bazi ulja i vode, bile su više za Ca-pektin (49,3 %) u poređenju sa LK-pektinom (33,3 %). Sa druge strane, stabilnost dobijenih emulzija (eng. *Emulsion stability*, ES) sa LK-pektinom bila je viša u odnosu na stabilnost emulzije dobijene sa Ca-pektinom. Dobijeni sadržaj polifenola je bio 43,3 mg GAE/g pektina za LK-pektin što je ~ 10 puta više u odnosu na sadržaj polifenola dobijen za Ca-pektin, a usled većeg sadržaja polifenola bilo je očekivano da ova frakcija ima i izraženija antioksidativna svojstva.

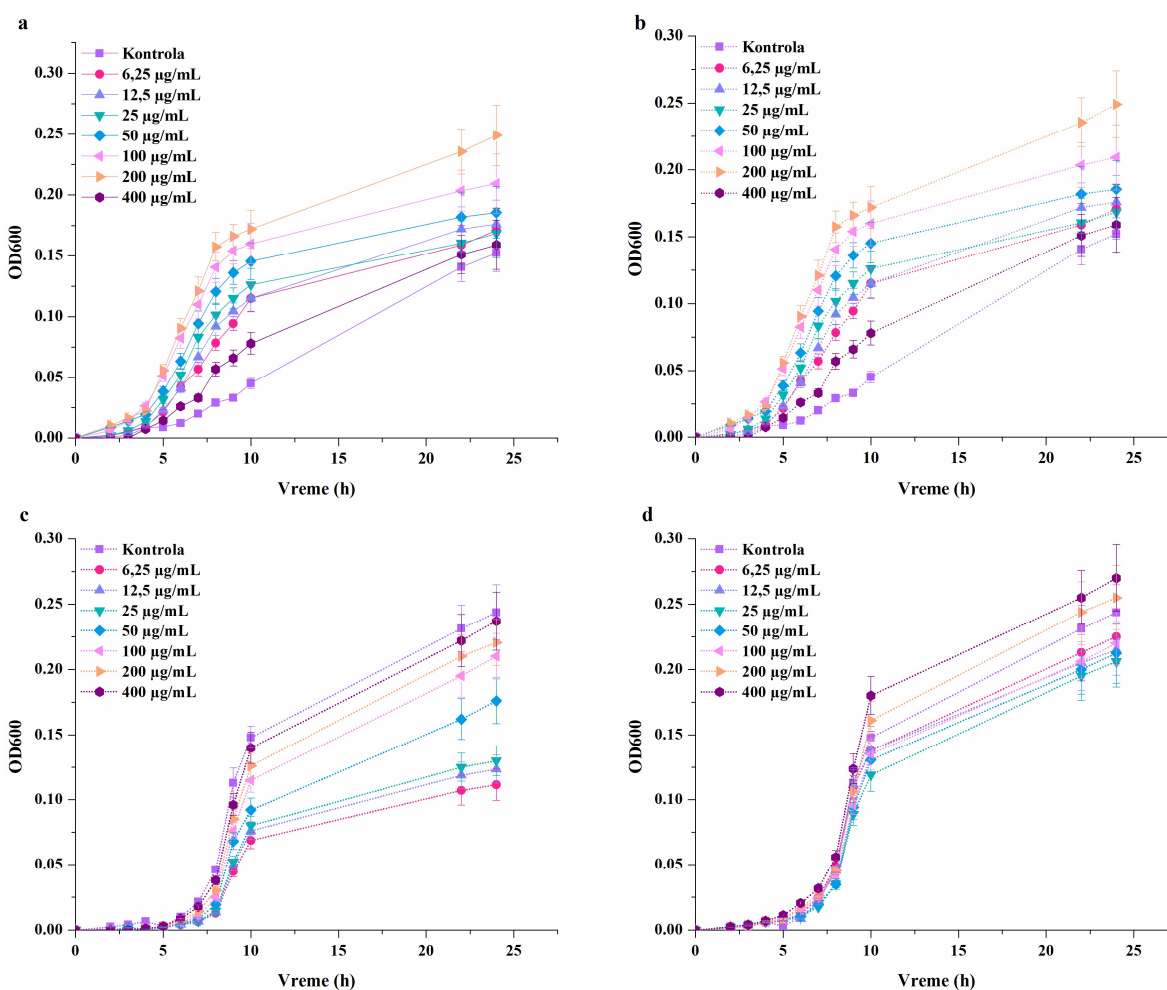
Tabela 4.35. Strukturni parametri pektinskih frakcija

Pektinska frakcija	Kapacitet zadržavanja vode (mL/g)	Kapacitet zadržavanja ulja (mL/g)	Emulgujući kapacitet (%)	Stabilnost emulzije (%)	Sadržaj polifenola (mg GAE/g)	FRAP (μmol TE/g)
LK-pektin	10,0 ± 0,4 ^a	19,0 ± 1,3 ^a	33,3 ± 2,4 ^b	100,0 ± 0,0 ^a	43,8 ± 3,2 ^a	131,4 ± 5,5 ^a
Ca-pektin	7,3 ± 0,5 ^b	19,3 ± 1,4 ^a	49,3 ± 3,1 ^a	94,1 ± 3,5 ^b	4,6 ± 0,4 ^b	45,2 ± 2,2 ^b

Legenda: LK-pektin – pektinska frakcija dobijena hidrolizom pomoću limunske kiseline; Ca-pektin – Kalcijum vezani pektin; HG – homogalakturnan; RGI – ramnogalakturnan I. Različita slova u istoj koloni označavaju statistički ($p \leq 0,05$) značajnu razliku između pektinskih frakcija.

4.8.6. Prebiotski potencijal dobijenih frakcija pektina

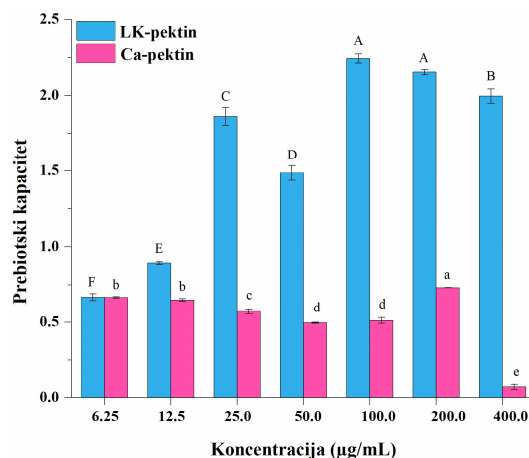
Poslednji korak ovog dela istraživanja bio je ispitivanje potencijalne prebiotske aktivnosti dobijenih frakcija pektina na rast *S. epidermidis* DSM 20044 i *S. aureus* ATCC 25923 merenjem promene optičke gustine tokom gajenja od 24 h. Pektinske frakcije su dodate u podlogu u opsegu koncentracija od 6,25-400 μg/mL, dok je kontrolni uzorak bio hranljiva podloga bez dodatka frakcije pektina. Dobijene krive rasta pomenutih bakterija u prisustvu LK-pektina i Ca-pektina prikazane su na slici 4.49.



Slika 4.49. Krive rasta bakterije *S. epidermidis* u prisustvu pektinskih frakcija LK-pektin (a) i Ca-pektin (b) i bakterije *S. aureus* u prisustvu istih frakcija, LK-pektin (c) i Ca-pektin (d).

Kao što se može videti sa slike 4.49.a-b, obe frakcije pektina su uticale na smanjenje faze prilagođavanja i uticale na povećanje specifične brzine rasta bakterije *S. epidermidis*. Sve primenjene koncentracije LK-pektina su stimulisale rast *S. epidermidis*, pri čemu se uočava trend da porast koncentracije pektina u hranljivoj podlozi vodi do boljeg rasta ove bakterije u odnosu na kontrolu bez dodatog pektina. Nakon 24 h rasta, može se primetiti da je najveći stepen stimulacije postignut pri koncentracijama 200 µg/mL, a da dalje povećanje do 400 µg/mL nije uticalo na značajno povećanje stimulacije. Sa druge strane, rast *S. epidermidis* uz dodatak Ca-pektina nije zavisio od koncentracije pektinske frakcije. Interesantno, najjači stimulatorni efekat je pokazala koncentracija od 200 µg/mL, dok je rast pri 400 µg/mL bio najmanje efikasan. Razlike u aktivnosti ovih frakcija pektina verovatno proizlaze kako iz njihove strukturne raznolikosti, tako i iz prisustva različitih polifenolnih jedinjenja koja su ostala vezana nakon ekstrakcije. S obzirom na to da LK-pektin ima veći udeo polifenola, može se pretpostaviti da su upravo oni delimično odgovorni za izraženiju prebiotsku aktivnost ove frakcije. Što se tiče uticaja obe frakcije pektina na rast bakterije *S. aureus* (slika 4.49.c-d), može se primetiti da je efekat ovih frakcija na rast bio vidljiv tek nakon 10 h kultivacije. Sve primenjene koncentracije LK-pektina su inhibirale rast ove bakterije, pri čemu je stepen inhibicije bio najizraženiji pri nižim koncentracijama (6,25-25 µg/mL). Inhibicija pri nižim koncentracijama pektina nije tako česta, ali može se pretpostaviti da su polifenoli prisutni u frakcijama pektina odgovorni za antibakterijsko ponašanje. Frakcija Ca-pektin nije pokazala statistički značajan uticaj na rast ove patogene bakterije.

PK_{OD} (slika 4.50) izračunat nakon 24 h gajenja je za obe frakcije pektina bio veći od nule, pri svim primenjenim koncentracijama, što ukazuje na pozitivan efekat obe frakcije pektina na ravnotežu ispitanih sojeva. Generalno, veće vrednosti su postignute za LK-pektin u poređenju sa Ca-pektinom, ali je potrebno napomenuti da je izražena stimulacija *S. epidermidis* značajno doprinela ovom rezultatu, čak i pri koncentracijama pri kojima je primećena određena stimulacija *S. aureus*.



Slika 4.50. Prebiotski kapacitet frakcija pektina. Različita velika i mala slova označavaju značajnu ($p \leq 0,05$) razliku između različitih koncentracija LK-pektina i Ca-pektina, redom.

Dobijeni rezultati ukazuju da dobijene pektinske frakcije imaju izraženije stimulatívno dejstvo na komensalnu bakteriju *S. epidermidis*, od očekivanog inhibitornog dejstva usmerenog ka patogenoj bakteriji *S. aureus*. Svakako, prvobitna ideja izolacije pektina iz taloga crne ribizle jeste iskorišćenje otpada i dobijanje sastojaka za pripremu kozmetičkih formulacija, koji su pokazali zadovoljavajuće tehno-funkcionalne karakteristike. Iako nije dobijen željeni prebiotski efekat, činjenica da pektinske frakcije u odgovarajućim koncentracijama stimulišu rast koagulaza negativne bakterije *S. epidermidis* i ne utiču ili inhibiraju rast *S. aureus* ukazuju da su pogodni za mikrobiotu kože i da mogu da potpomognu delovanje topikalnih prebiotika.

5. ZAKLJUČAK

Na osnovu rezultata istraživanja u okviru ove doktorske disertacije mogu se izvesti sledeći zaključci i definisati najvažniji naučni doprinosi:

- Istraživanja posvećena potencijalnoj primeni oligosaharida kao dermalnih prebiotika su pokazala da GOS mogu da stimulišu rast koagulaza negativne bakterije *S. epidermidis*, komensalnog člana mikrobiote kože i istovremeno inhibiraju rast koagulaza pozitivne, patogene bakterije *S. aureus* kada su primenjeni u koncentraciji od 5 % (w/v). Dodatno je potvrđeno da *S. epidermidis*, za razliku od *S. aureus*, koristi GOS kao izvor nutrijenata, što potvrđuje njihovu buduću primenu kao topikalnih prebiotika.
- Najvažnija saznanja koja su proistekla iz dela istraživanja posvećenog evaluaciji različitih vrsta bobičastog voća kao potencijalnih izvora dermalnih prebiotika su:
 - Konvencionalnom metodom ekstrakcije fitohemikalija iz različitog bobičastog voća (crna ribizla, crvena ribizla, malina, jagoda, pitoma borovnica, divlja borovnica, aronija i pasji trn) vodom ili 70 % (v/v) etanolom kao rastvaračem dobijeni su ekstrakti bogati polifenolnim jedinjenjima i visoke antioksidativne aktivnosti. Vodeni i etanolni ekstrakti bobičastog voća su pokazali sličan uticaj na rast bakterija *S. epidermidis* i *S. aureus*, ukazujući da biološka aktivnost ekstrakata ne zavisi od ekstragensa. Prebiotsku aktivnost su pokazali jedino ekstrakti crne ribizle primenjeni u koncentraciji od 0,025 mg GAE/mL i 0,05 mg GAE/mL i ekstrakti jagode primenjeni u koncentraciji od 0,025 mg GAE/mL. Isti ekstrakti primenjeni na ko-kulturu pomenutih bakterija, koja približnije imitira uslove na koži, takođe su potvrdili prebiotsku aktivnost.
 - Ustanovljeno je da se enzimski potpomognutom ekstrakcijom, usled razgradnje polisaharida ćelijskog zida i oslobađanja kovalentno vezanih polifenolnih jedinjenja, može značajno povećati prinos aktivnih komponenti iz ovih biljaka. Izborom ključnih parametara poput vrste i koncentracije enzimskih preparata, odnosa supstrata i rastvarača i vremena trajanja ekstrakcije, omogućeno je da dobijeni ekstrakti imaju viši sadržaj polifenola i redukujućih šećera u poređenju sa ekstraktima dobijenim konvencionalnom metodom ekstrakcije. Optimalni uslovi ekstrakcije fitohemikalija iz crne ribizle i jagode uključivali su primenu kombinacije enzimskih preparata Viscozyme[®] L i Rohapect[®] MC u odnosu 2:1. Sadržaj ukupnih polifenola u ekstraktu crne ribizle dobijenom pod optimalnim uslovima bio je 26,90 mg GAE/g, dok je u ekstraktima dobijenim klasičnom ekstrakcijom bio najviše 12,72 mg GAE/g, a u ekstraktu jagode poboljšanje je bilo 19,25 mg GAE/g, u odnosu na 9,77 mg GAE/g.
 - Svi ekstrakti dobijeni enzimski potpomognutom ekstrakcijom pod optimalnim uslovima su pokazali bolju prebiotsku aktivnost u odnosu na odgovarajuće vodene ili etanolne ekstrakte. Najveći PK_{OD} ekstrakta crne ribizle dobijenog pod optimalnim uslovima je postignut pri koncentraciji 0,025 mg GAE/mL i iznosio je 0,45, dok su ekstrakti dobijeni samo primenom rastvarača pri istoj koncentraciji pokazali vrednost PK_{OD} najviše 0,28. PK_{CFU} ovog ekstrakta na ko-kulturu *S. epidermidis* i *S. aureus* je bio najizraženiji pri koncentraciji od 0,05 mg GAE/mL, sa vrednošću od 12,30, za razliku od vodenog ekstrakta koji je postigao od 3,76. Ekstrakt jagode dobijen pod optimalnim uslovima je pokazao najveći PK_{OD} pri koncentraciji od 0,025 mg GAE/mL i iznosio 0,245 za monokulturu (dok je PK_{OD} konvencionalno dobijenih ekstrakata iznosio do 0,21) i PK_{CFU} od 5,68 za ko-kulturu (dok je PK_{CFU} vodenog ekstrakta iznosio do 3,28).

- U narednoj fazi istraživanja fokus je bio na proceni potencijala nusproizvoda industrijske prerade bobičastog voća kao izvora dermalnih prebiotika, a ovo su najvažniji naučni doprinosi:
 - Valorizacija tropova bobičastog voća (crne ribizle, jagode, maline i aronije) zaostalih nakon proizvodnje sokova u cilju dobijanja kozmetičkih sastojaka sa prebiotskim potencijalom izvršena je klasičnom ekstrakcijom primenom vode kao rastvarača.
 - Enzimski potpomognuta ekstrakcija je i u ovom slučaju poboljšala efikasnost ekstrakcije, ali su optimalni uslovi zavisili od vrste tropa. Optimalan odnos enzimskih preparata za trop crne ribizle bio je Pectinex® : Rohapect® MC = 1:2, za trop maline bio je Viscozyme® L : Rohapect® MC = 1:1, za trop jagode bio je Viscozyme® L : Rohapect® MC = 2:1 i za trop aronije bio je Pectinex® : Rohapect® MC = 2:1. Nakon optimizacije ekstrakcije sadržaj polifenola u ekstraktu tropa crne ribizle bio je 19,23 mg GAE/g (u ekstraktu bez enzima 11,26 mg GAE/g), u ekstraktu tropa maline bio je 13,37 mg GAE/g (u ekstraktu bez enzima 5,28 mg GAE/g), u ekstraktu tropa jagode 14,64 mg GAE/g (u ekstraktu bez enzima 5,39 mg GAE/g) i u ekstraktu tropa aronije bio je 21,53 mg GAE/g (u ekstraktu bez enzima 13,39 mg GAE/g).
 - Svi ekstrakti tropova bobičastog voća su pokazali bolju stimulaciju rasta monokultura *S. epidermidis* i inhibiciju *S. aureus* u poređenju sa vodenim i etanolnim ekstraktima bobičastog voća (crne ribizle i jagode). Uticaj ekstrakata na ko-kulturu ovih bakterija je bio najvidljiviji u slučaju tropa maline, pri koncentraciji 0,05-0,08 mg GAE/mL, čija je vrednost PK_{CFU} bila najviše 2,85. Što se tiče ekstrakata dobijenih enzimski potpomognutom ekstrakcijom, kao najpotentniji kožni prebiotik istakao se ekstrakt tropa maline. Optimalna koncentracija ovog ekstrakata bila je u opsegu 0,025-0,05 mg GAE/mL u slučaju delovanja na monokulturu *S. epidermidis* i *S. aureus*, dajući vrednost PK_{OD} do 0,597. Optimalna koncentracija za primenu na ko-kulturu ovih bakterija bila je 0,025-0,05 mg GAE/mL sa prosečnom vrednošću PK_{CFU} od 7,20.
- U sledećoj fazi istraživanja su najpotentniji ekstrakti (crne ribizle i tropa maline) dodatno evaluirani korišćenjem *in vitro stratum corneum* modela kože koji mnogo bolje simulira uslove koji vladaju u površinskim slojevima kože, a došlo se do sledećih saznanja:
 - Pri ispitivanju uticaja na rast bakterija *S. epidermidis*, *S. aureus* i *C. acnes* u *stratum corneum* modelu oba ekstrakta su stimulisala rast *S. epidermidis* i inhibirala rast patogenih bakterija *S. aureus* i *C. acnes*, pri koncentraciji od 5 µg/mL. U odnosu na *S. aureus* ekstrakt tropa maline pokazao je nešto bolji dermalni prebiotski potencijal (vrednost PK_{CFU} do 18,05) nego ekstrakt crne ribizle (vrednost PK_{CFU} do 15,62).
 - Ekstrakti crne ribizle i tropa maline dobijeni pod optimalnim uslovima i primenjeni u koncentraciji od 5 µg/mL na ko-kulturu bakterije *S. epidermidis* i kliničkog izolata bakterije *S. aureus* na *stratum corneum* modelu u velikoj meri su stimulisali rast koagulaza negativne *S. epidermidis*, bez uticaja na patogenu bakteriju. Štaviše, odnos vijabilnih ćelija *S. epidermidis*/*S. aureus* bio je 41 u prisustvu ekstrakta crne ribizle i 22 u prisustvu ekstrakta tropa maline, dok je u uzorku bez dodatka ekstrakata ovaj odnos bio 0,23. Ovim je dodatno potvrđeno da dobijeni ekstrakti mogu uticati na sastav mikrobiote kože u korist željenih bakterija.
 - Na *stratum corneum* modelu kože ispitan je i uticaj oba ekstrakta i na uzorak zdrave mikrobiote kože, kao i na uzorak mikrobiote kože koja modelira sastav prisutan kod pacijenata sa atopijskim dermatitisom. Oba ekstrakta su značajno stimulisala rast koagulaza negativnih bakterija prisutnih u oba uzorka mikrobiote kože, pri čemu je optimalna koncentracija za ekstrakt crne ribizle bila 5 µg/mL, a za ekstrakt tropa maline 25 µg/mL. Na ovaj način je potvrđeno da je prebiotska aktivnost ekstrakata crne ribizle i tropa maline usmerena isključivo ka stimulaciji koagulaza negativnih bakterija, koje bi prirodnim mehanizmima odbrane mogle da suzbiju

patogen rast, čime se otvara mogućnost njihove primene u kozmetičkim proizvodima koji bi olakšali lečenje atopijskog dermatitisa.

- Eksperimenti difuzije antocijanina prisutnih u ekstraktu crne ribizle dobijenom enzimski potpomognutom ekstrakcijom pod optimalnim uslovima su pokazali da je hidrogel najpogodnija kozmetička formulacija za njihovu isporuku koja je određena isključivo molekulskom difuzijom. Koeficijenti difuzije cijanidin-3-rutinozida i cijanidin-3-glukozida kroz celulozno-acetatnu membranu bili su viši u poređenju sa koeficijentima difuzije delphinidin-3-rutinozida i delphinidin-3-glukozida. Kada je reč o difuziji trisaharida i tetrasaharida molekula GOS-a, najbolja formulacija bila je krem gel emulzija tipa u/v, pri čemu je difuzija ovih molekula zavisila od združenog delovanja molekulske difuzije i relaksacije polimera. Odsustvo transdermalne difuzije antocijanina iz ekstrakta crne ribizle i GOS molekula, je potvrdilo da bi nakon topikalne primene ovih potencijalnih kožnih prebiotika, oni ispoljili svoje aktivno dejstvo isključivo na površini kože.
- Istraživanja fokusirana na primenu prirodnih dubokih eutektičkih smeša kao rastvarača za ekstrakciju su dovela do ovih najvažnijih rezultata:
 - Prirodne duboke eutektičke smeše primenjene su kao rastvarači za izolaciju fitohemikalija iz crne ribizle i tropa maline u procesu konvencionalne i enzimski potpomognute ekstrakcije. Eutektičke smeše su se pokazale kao efikasniji rastvarač u poređenju sa vodom ili etanolom, pri čemu su se smeše na bazi betaina kao HBA i propilen glikola, glicerola i uree kao HBD izdvojile kao najbolje. Primenom enzimski potpomognute ekstrakcije pod optimalnim uslovima, najviši sadržaj polifenola crne ribizle i tropa maline postignut je primenom smeše betain-glicerol (1:2) i iznosio je 30,25 mg GAE/g i 16,36 mg GAE/g, redom.
 - Ekstrakti crne ribizle i tropa maline dobijeni enzimski potpomognutom ekstrakcijom i primenom eutektičkih smeša betain-propilen glikol ili betain-glicerol, promovisali su rast *S. epidermidis*, dok su inhibirali rast bakterija *S. aureus* i *C. acnes*, na *stratum corneum* modelu kože. Ekstrakti primenjeni u koncentraciji od 5 µg GAE/mL pokazali su značajno bolji prebiotski potencijal (vrednost PK crne ribizle do 37,5, a vrednost PK tropa maline do 24,5) u odnosu na ekstrakte koji su dobijeni primenom pufera i enzimskih preparata, usled združenog delovanja sastojaka koji izgrađuju eutektičke smeše i prisutnih fitohemikalija, ukazujući na mogućnost direktne primene dobijenih ekstrakata u proizvodima za topikalnu primenu.
- U cilju potpunijeg iskorišćenja sirovine, izvršena je valorizacija tropa crne ribizle zaostalog nakon izolacije fitohemikalija, ekstrakcijom pektinskih polisaharida rastvorljivih u kiselini i kalcijum vezanih pektinskih polisaharida. Obe frakcije imale su sličan stepen metil-esterifikacije (u proseku 50 %), između nisko i visoko metilovanih pektina, pri čemu je frakcija rastvorljiva u kiselinama imala značajno viši udeo galakturonske kiseline (72,3 %). Povoljna tehno-funkcionalna svojstva obe frakcije i njihov blagi dermalni prebiotski efekat, ukazuje na potencijalnu primenu ovih frakcija kao sastojaka (emulgatora) u kozmetičkim proizvodima.

6. LITERATURA

1. Musthaq, S.; Mazuy, A.; Jakus, J. The microbiome in dermatology. *Clin Dermatol.* **2018**, *36*, 390-398.
2. Dréno, B.; E. Berardesca, E.A.; Gontijo, G.; Sanchez Viera, M.; Xiang, L.F.; Martin, R.; Bieber, T. Microbiome in healthy skin, update for dermatologists. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* **2016**, *30*, 2038-2047.
3. Byrd, A.L.; Belkaid, Y.; Segre, J.A. The human skin microbiome. *Nat Rev Microbiol.* **2018**, *16*, 143-155.
4. Krutmann, J. Pre- and probiotics for human skin. *J Dermatol Sci.* **2009**, *54*, 1-5.
5. Simmering, R.; Breves, R. Prebiotic Cosmetics. In *Nutrition for Healthy Skin: Strategies for Clinical and Cosmetic Practice*, Krutmann, J., Humbert, P., Eds.; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, **2011**, 137-147.
6. Gibson, G.R.; Hutkins, R.; Sanders, M.E.; Prescott, S.L.; Reimer, R.A.; Salminen, S.J.; Scott, K.; Stanton, C.; Swanson, K.S.; Cani, P.D.; et al. Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* **2017**, *14*, 491-502.
7. Al-Ghazzewi, F.H.; Tester, R.F. Impact of prebiotics and probiotics on skin health. *Benef Microbes.* **2014**, *5*, 99-107.
8. Zillich, O.V.; Schweiggert-Weisz, U.; Eisner, P.; Kersch, M. Polyphenols as active ingredients for cosmetic products. *Int J Cosmetic Sci.* **2015**, *37*, 455-464.
9. Iqbal, A.; Schulz, P.; Rizvi, S.S.H. Valorization of bioactive compounds in fruit pomace from agro-fruit industries: Present Insights and future challenges. *Food Biosci.* **2021**, *44*, 101384.
10. Gil-Martín, E.; Forbes-Hernández, T.; Romero, A.; Cianciosi, D.; Giampieri, F.; Battino, M. Influence of the extraction method on the recovery of bioactive phenolic compounds from food industry by-products. *Food Chem.* **2022**, *378*, 131918.
11. Zhang, Q.-W.; Lin, L.-G.; Ye, W.-C. Techniques for extraction and isolation of natural products: a comprehensive review. *Chin Med.* **2018**, *13*, 1-26.
12. Gligor, O.; Mocan, A.; Moldovan, C.; Locatelli, M.; Crişan, G.; Ferreira, I.C.F.R. Enzyme-assisted extractions of polyphenols – A comprehensive review. *Trends Food Sci Technol.* **2019**, *88*, 302-315.
13. Nadar, S.S.; Rao, P.; Rathod, V.K. Enzyme assisted extraction of biomolecules as an approach to novel extraction technology: A review. *Food Res Int.* **2018**, *108*, 309-330.
14. O. V. Zillich, U.S.-W., K. Hasenkopf, P. Eisner, M. Kersch. Release and *in vitro* skin permeation of polyphenols from cosmetic emulsions. *Int J Cosmet Sci* **2013**, *35*, 491-501.
15. Woo, W.-M. Skin Structure and Biology. In *Imaging technologies and transdermal delivery in skin disorders*, Chenjie Xu, X.W., Manojit Pramanik, Ed.; **2019**; 1-14.
16. Hofmann, E.; Schwarz, A.; Fink, J.; Kamolz, L.-P.; Kotzbeck, P. Modelling the complexity of human skin *in vitro*. *Biomedicines.* **2023**, *11*, 794.
17. Moss, G.P.; Gullick, D.R.; Wilkinson, S.C. Skin structure and physiology. In *Predictive Methods in Percutaneous Absorption*, Moss, G.P., Gullick, D.R., Wilkinson, S.C., Eds.; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, **2015**; 1-24.
18. Honari, G. Skin structure and function. In *Sensitive Skin Syndrome*; 2017; 16–22.
19. Zouboulis, C.C. The skin as an endocrine organ. *Dermato-Endocrinol.* **2009**, *1*, 250-252.
20. Rähse, W. Scientific description of the skin. In *Cosmetic Creams*; **2019**; 103-129.
21. Menon, G.K. New insights into skin structure: Scratching the surface. *Adv Drug Deliv Rev.* **2002**, *54*, 3-17.

22. Niehues, H.; Rikken, G.; van Vlijmen-Willems, I.; Rodijk-Olthuis, D.; van Erp, P.; Zeeuwen, P.; Schalkwijk, J.; van den Bogaard, E. Identification of keratinocyte mitogens: implications for hyperproliferation in psoriasis and atopic dermatitis. *J Investig Dermatol Innov.* **2022**, *2*, 100066, 1-21.
23. Clayton, K.; Vallejo, A.F.; Davies, J.; Sirvent, S.; Polak, M.E. Langerhans cells—programmed by the epidermis. *Front Immunol.* **2017**, *8*, 1676, 1-14.
24. Knox, S.; O’Boyle, N.M. Skin lipids in health and disease: A review. *Chem Phys Lipids.* **2021**, *236*, 105055.
25. Šiler, S.M. *Aktivne materije u kozmetičkim proizvodima*; Tehnološko-metalurški fakultet: Beograd, 2004.
26. Chu, D.H. Development and structure of skin. in *Fitzpatrick's dermatology in general medicine*, Goldsmith, L.A., Katz, S.I., Gilchrest, B.A., Paller, A.S., Leffell, D.J., Wolff, K., Eds.; The McGraw-Hill Companies: New York, NY, **2012**.
27. McGrath, J.; Uitto, J. Structure and function of the skin. *Rook's textbook of dermatology* **2024**.
28. Baker, L.B. Physiology of sweat gland function: The roles of sweating and sweat composition in human health. *Temp.* **2019**, *6*, 211-259.
29. Grice, E.A.; Segre, J.A. The skin microbiome. *Nat Rev Microbiol.* **2011**, *9*, 244-253.
30. Marshall, J.S.; Warrington, R.; Watson, W.; Kim, H.L. An introduction to immunology and immunopathology. *Allergy, Asthma Clin Immunol.* **2018**, *14*, 49.
31. Lei, J.; Sun, L.; Huang, S.; Zhu, C.; Li, P.; He, J.; Mackey, V.; Coy, D.H.; He, Q. The antimicrobial peptides and their potential clinical applications. *Am J Transl Res.* **2019**, *1*, 3919-3931.
32. Uchida, Y.; Park, K. Stratum Corneum. In *Immunology of the Skin: Basic and Clinical Sciences in Skin Immune Responses*, Kabashima, K., Ed.; Springer Japan: Tokyo, **2016**, 15-30.
33. Chambers, E.; Vukomanivic-Stejic, M. Skin barrier immunity and ageing. *Immunol.* **2019**, *160*, 116-125.
34. Wollenberg, A.; Klein, E. Current aspects of innate and adaptive immunity in atopic dermatitis. *Clin Rev Allergy Immunol.* **2007**, *33*, 35-44.
35. Lunjani, N.; Ahearn-Ford, S.; Dube, F.S.; Hlela, C.; O’Mahony, L. Mechanisms of microbe-immune system dialogue within the skin. *Genes Immunity.* **2021**, *22*, 276-288.
36. Souto, E.B.; Fanguero, J.F.; Fernandes, A.R.; Cano, A.; Sanchez-Lopez, E.; Garcia, M.L.; Severino, P.; Paganelli, M.O.; Chaud, M.V.; Silva, A.M. Physicochemical and biopharmaceutical aspects influencing skin permeation and role of SLN and NLC for skin drug delivery. *Heliyon.* **2022**, *8*, e08938.
37. Brown, M.B.; Martin, G.P.; Jones, S.A.; Akomeah, F.K. Dermal and transdermal drug delivery systems: Current and future prospects. *Drug Deliv.* **2006**, *13*, 175-187.
38. Brunaugh, A.D.; Smyth, H.D.C.; Williams Iii, R.O. Topical and transdermal drug delivery. In *Essential pharmaceuticals*, Brunaugh, A.D., Smyth, H.D.C., Williams Iii, R.O., Eds.; Springer International Publishing: Cham, **2019**; 131-147.
39. Haque, T.; Talukder, M.M.U. Chemical Enhancer: A simplistic way to modulate barrier function of the stratum corneum. *Adv Pharm Bull.* **2018**, *8*, 169-179.
40. Bos, J.; Meinardi, M. The 500 Dalton rule for the skin penetration of chemical compounds and drugs. *Exp Dermatol.* **2000**, *9*, 165-169.
41. Luo, Z.; Liu, C.; Quan, P.; Yang, D.; Zhao, H.; Wan, X.; Fang, L. Mechanistic insights of the controlled release capacity of polar functional group in transdermal drug delivery system: the relationship of hydrogen bonding strength and controlled release capacity. *Acta Pharm Sin B.* **2020**, *10*, 928-945.
42. Prausnitz, M.R.; Langer, R. Transdermal drug delivery. *Nat Biotechnol.* **2008**, *26*, 1261-1268.

43. Ramadon, D.; McCrudden, M.; Courtenay, A.J.; Donnelly, R.F. Enhancement strategies for transdermal drug delivery systems: Current trends and applications. *Drug Deliv Transl Res.* **2022**, *12*, 758-791.
44. Manallack, D. The pKa distribution of drugs: Application to drug discovery. *Perspect Med Chem.* **2007**, *1*, 25-38.
45. Supe, S.; Takudage, P. Methods for evaluating penetration of drug into the skin: A review. *Skin Res Technol.* **2021**, *27*, 299-308.
46. Lunter, D.; Klang, V.; Eichner, A.; Savic, S.M.; Savic, S.; Lian, G.; Erdő, F. Progress in topical and transdermal drug delivery research — Focus on nanoformulations. *Pharm.* **2024**, *16*, 817.
47. Otto, A.; Du Plessis, J.; Wiechers, J.W. Formulation effects of topical emulsions on transdermal and dermal delivery. *Int J Cosmet Sci.* **2009**, *31*, 1-19.
48. Trucillo, P. Drug carriers: Classification, administration, release Profiles, and industrial approach. *Processes.* **2021**, *9*, 470.
49. Balać, I.; Bugarski, B.; Ćosić, I.; Dramićanin, M.; Đorđević, D.; Filipović, N.; Ignjatović, N.; Janačković, Đ.; Kojić, M.; et al. *Biomaterijali*; Institut tehničkih nauka srpske akademije nauka i umetnosti, Beograd. **2010**.
50. Chai, Q.; Jiao, Y.; Yu, X. Hydrogels for biomedical applications: Their characteristics and the mechanisms behind them. *Gels.* **2017**, *3*, 1-15.
51. Sander, M.; Sander, M.; Isaac-Renton, J.; Croxen, M. The cutaneous microbiome: Implications for dermatology practice. *J Cutan Med Surg.* **2019**, *23*, 436-441.
52. Skowron, K.; Bauza-Kaszewska, J.; Kraszewska, Z.; Wiktorczyk-Kapischke, N.; Grudlewska-Buda, K.; Kwiecińska-Piróg, J.; Wałęcka-Zacharska, E.; Radtke, L.; Gospodarek-Komkowska, E. Human skin microbiome: Impact of intrinsic and extrinsic factors on skin microbiota. *Microorganisms.* **2021**, *9*, 543.
53. Pistone, D.; Meroni, G.; Panelli, S.; D'Auria, E.; Acunzo, M.; Pasala, A.R.; Zuccotti, G.V.; Bandi, C.; Drago, L. A Journey on the skin microbiome: Pitfalls and opportunities. *Int J Mol Sci.* **2021**, *22*, 9846.
54. Smythe, P.; Wilkinson, H.N. The Skin Microbiome: Current Landscape and Future Opportunities. *International Journal of Molecular Sciences* **2023**, *24*, 3950.
55. Yamazaki, Y.; Nakamura, Y.; Núñez, G. Role of the microbiota in skin immunity and atopic dermatitis. *Allergol Int.* **2017**, *66*, 539-544.
56. Hadaway, L.C. Skin flora and infection. *Journal Infus Nurs.* **2003**, *26*, 44-48.
57. Claudel, J.-P.; Auffret, N.; Leccia, M.-T.; Poli, F.; Corvec, S.; Dréno, B. *Staphylococcus epidermidis*: A potential new player in the physiopathology of acne? *Dermatol.* **2019**, *235*, 287-294.
58. Yu, Y.; Dunaway, S.; Champer, J.; Kim, J.; Alikhan, A. Changing our microbiome: Probiotics in dermatology. *Br J Dermatol.* **2020**, *182*, 39-46.
59. Kong, H.H.; Segre, J.A. Skin microbiome: Looking back to move forward. *J Invest Dermatol.* **2012**, *132*, 933-939.
60. Yang, Y.; Qu, L.; Mijakovic, I.; Wei, Y. Advances in the human skin microbiota and its roles in cutaneous diseases. *Microb Cell Fact.* **2022**, *21*, 176.
61. Chen, Y.-L.; Kuan, W.-H.; Liu, C.-L. Comparative study of the composition of sweat from eccrine and apocrine sweat glands during exercise and in heat. *Int J Environ Res Public Health.* **2020**, *17*, 3377.
62. Namvar AE, B.S., Abbasi N, Ghehi GS, Farhadbakhtiarian S, Arezi P, Hosseini M, Baravati SZ, Jokar Z, Chermahin SG. . Clinical characteristics of *Staphylococcus epidermidis*: A systematic review. *GMS Hyg Infect Control.* **2014**, *9*.

63. Cogen, A.L.; Nizet, V.; Gallo, R.L. Skin microbiota: A source of disease or defence? *Br J Dermatol.* **2008**, *158*.
64. Christensen, G.J.M.; Brüggemann, H. Bacterial skin commensals and their role as host guardians. *Benef Microbes.* **2014**, *5*, 201-215.
65. Sanford, J.A.; Gallo, R.L. Functions of the skin microbiota in health and disease. *Semin Immunol.* **2013**, *25*, 370-377.
66. Severn, M.M.; Horswill, A.R. *Staphylococcus epidermidis* and its dual lifestyle in skin health and infection. *Nat Rev Microbiol.* **2023**, *21*, 97-111.
67. Wan, P.; Chen, J. A Calm, Dispassionate look at skin microbiota in atopic dermatitis: An integrative literature review. *Dermatol Ther.* **2020**, *10*, 53-61.
68. Gnanamani, A.; Hariharan, P.; Paul-Satyaseela, M. *Staphylococcus aureus*: Overview of bacteriology, clinical diseases, epidemiology, antibiotic resistance and therapeutic approach. In *Frontiers in <i>Staphylococcus aureus</i>*, Enany, S., Crotty Alexander, L.E., Eds.; IntechOpen: Rijeka, **2017**.
69. Fetsch, A. *Staphylococcus aureus*; Academic Press, **2017**.
70. Tam, K.; Torres Victor, J. *Staphylococcus aureus* secreted toxins and extracellular enzymes. *Microbiol. Spectr.* **2019**, *7*.
71. Fournière, M.; Latire, T.; Souak, D.; Feuilloley, M.G.J.; Bedoux, G. *Staphylococcus epidermidis* and *Cutibacterium acnes*: Two major sentinels of skin microbiota and the influence of cosmetics. *Microorganisms.* **2020**, *8*, 1752.
72. Flowers, L.; Grice, E.A. The skin microbiota: Balancing risk and reward. *Cell Host Microbe.* **2020**, *28*, 190-200.
73. Zeeuwen, P.; Schalkwijk, J. The skin microbiota. *The human microbiota and chronic disease: Dysbiosis as a cause of human pathology.* **2016**.
74. Zhu, Y.; Yu, X.; Cheng, G. Human skin bacterial microbiota homeostasis: A delicate balance between health and disease. *mLife.* **2023**, *2*, 107-120.
75. Demessant-Flavigny, A.-L.; Connétable, S.; Kerob, D.; Moreau, M.; Aguilar, L.; Wollenberg, A. Skin microbiome dysbiosis and the role of *Staphylococcus aureus* in atopic dermatitis in adults and children: A narrative review. *Journal Eur Acad Dermatol Venereol.* **2023**, *37*, 3-17.
76. Chen, P.; He, G.; Qian, J.; Zhan, Y.; Xiao, R. Potential role of the skin microbiota in Inflammatory skin diseases. *J Cosmet Dermatol.* **2021**, *20*, 400-409.
77. Atopic dermatitis. Available online: <https://www.pharmatutor.org/pharma-news/2020/new-oral-treatment-for-moderate-to-severe-atopic-dermatitis> (Accessed 2 April 2025).
78. Williams, M.R.; Gallo, R.L. The role of the skin microbiome in atopic dermatitis. *Curr Allergy Asthma Rep.* **2015**, *15*, 65.
79. Di Domenico, E.G.; Cavallo, I.; Capitanio, B.; Ascenzioni, F.; Pimpinelli, F.; Morrone, A.; Ensoli, F. *Staphylococcus aureus* and the cutaneous microbiota biofilms in the pathogenesis of atopic dermatitis. *Microorganisms.* **2019**, *7*, 301.
80. Murillo, N.; Raoult, D. Skin microbiota: Overview and role in the skin diseases acne vulgaris and rosacea. *Future Microbiol.* **2013**, *8*, 209-222.
81. Ramasamy, S.; Barnard, E.; Dawson, T.L., Jr; Li, H. The role of the skin microbiota in acne pathophysiology. *Br J Dermatol.* **2019**, *181*, 691-699.
82. Acne vulgaris. Available online: <https://acnetreatment-medication.blogspot.com/2018/11/acne-inflammation.html> (Accessed 2 April 2025).
83. Tanghetti, E. The role of inflammation in the pathology of acne 2013 *J Clin Aesthet Dermatol.* **2013**, *6*, 27-35.
84. Iannitti, T.; Palmieri, B. Therapeutical use of probiotic formulations in clinical practice. *Clin Nutr.* **2010**, *29*, 701-725.

85. Hill, C.; Guarner, F.; Reid, G.; Gibson, G.R.; Merenstein, D.J.; Pot, B.; Morelli, L.; Canani, R.B.; Flint, H.J.; Salminen, S.; et al. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* **2014**, *11*, 506-514.
86. Report of International Cooperation on Cosmetics Regulation. *Microbiome and cosmetics: Working definitions and microbiological assessment considerations.* **2022**.
87. Cinque, B.; La Torre, C.; Melchiorre, E.; Marchesani, G.; Zoccali, G.; Palumbo, P.; Di Marzio, L.; Masci, A.; Mosca, L.; Mastromarino, P.; et al. Use of probiotics for dermal applications. In *Probiotics: Biology, Genetics and Health Aspects*, Liong, M.-T., Ed.; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, **2011**, 221-241.
88. Nodake, Y.; Matsumoto, S.; Miura, R.; Honda, H.; Ishibashi, G.; Matsumoto, S.; Dekio, I.; Sakakibara, R. Pilot study on novel skin care method by augmentation with *Staphylococcus epidermidis*, an autologous skin microbe - A blinded randomized clinical trial. *J Dermatol Sci.* **2015**, *79*, 119-126.
89. Nakatsuji, T.; Chen, T.H.; Narala, S.; Chun, K.A.; Two, A.M.; Yun, T.; Shafiq, F.; Kotol, P.F.; Bouslimani, A.; Melnik, A.V.; et al. Antimicrobials from human skin commensal bacteria protect against *Staphylococcus aureus* and are deficient in atopic dermatitis. *Sci Transl Med.* **2017**, *9*, eaah4680.
90. Zheng, Y.; Hunt, R.L.; Villaruz, A.E.; Fisher, E.L.; Liu, R.; Liu, Q.; Cheung, G.Y.C.; Li, M.; Otto, M. Commensal *Staphylococcus epidermidis* contributes to skin barrier homeostasis by generating protective ceramides. *Cell Host Microbe.* **2022**, *30*, 301-313.
91. Yang, A.-J.; Marito, S.; Yang, J.-J.; Keshari, S.; Chew, C.-H.; Chen, C.-C.; Huang, C.-M. A microtube array membrane (MTAM) encapsulated live fermenting *Staphylococcus epidermidis* as a skin probiotic patch against *Cutibacterium acnes*. *Int J Mol Sci.* **2019**, *20*, 14.
92. Yu, X.; Chen, T.; Huang, N.; Jin, Y.; Yang, L. Skin commensal bacteria modulates the immune balance of mice to alleviate atopic dermatitis-induced damage. *Evid-Based Complementary Altern Med.* **2022**, 4731675.
93. Duarte, M.; Oliveira, A.L.; Oliveira, C.; Pintado, M.; Amaro, A.; Madureira, A.R. Current postbiotics in the cosmetic market—an update and development opportunities. *Appl Microbiol Biotechnol.* **2022**, *106*, 5879-5891.
94. La Fata, G.; Rastall, R.A.; Lacroix, C.; Harmsen, H.J.M.; Mohajeri, M.H.; Weber, P.; Steinert, R.E. Recent development of prebiotic research — Statement from an expert workshop. *Nutr.* **2017**, *9*, 1376.
95. Maguire, M.; Maguire, G. The role of microbiota, and probiotics and prebiotics in skin health. *Arch Derm Res.* **2017**, *309*, 411-421.
96. Report for the International cooperation on cosmetics regulation. *Microbiome and cosmetics: survey of products, ingredients, terminologies and regulatory approaches.* **2021**.
97. Cardoso, B.B.; Amorim, C.; Silvério, S.C.; Rodrigues, L.R. Novel and emerging prebiotics: Advances and opportunities. In *Advances in Food and Nutrition Research*, Toldrá, F., Ed.; Academic Press: **2021**; Volume 95, 41-95.
98. You, S.; Ma, Y.; Yan, B.; Pei, W.; Wu, Q.; Ding, C.; Huang, C. The promotion mechanism of prebiotics for probiotics: A review. *Front Nutr.* **2022**, *9*.
99. Ibrahim, O. Functional oligosaccharide: Chemicals structure, manufacturing, health benefits, applications and regulations. *J Food Chem Nanotechnol.* **2018**, *4*, 65-76.
100. Gao, X.; Wu, J.; Wu, D. Rational design of the beta-galactosidase from *Aspergillus oryzae* to improve galactooligosaccharide production. *Food Chem.* **2019**, *286*, 362-367.

101. Hong, K.-B.; Hong, Y.H.; Jung, E.Y.; Jo, K.; Suh, H.J. Changes in the diversity of human skin microbiota to cosmetic serum containing prebiotics: results from a randomized controlled trial. *J Pers Med.* **2020**, *10*, 91.
102. Torres, D.; Teixeira, M.; Rodrigues, L. Galacto-oligosaccharides: Production, properties, applications, and aignificance as prebiotics. *Compr Rev Food Sci Food Saf.* **2010**, 438-454.
103. Ni, D.; Xu, W.; Zhu, Y.; Zhang, W.; Zhang, T.; Guang, C.; Mu, W. Inulin and its enzymatic production by inulosucrase: Characteristics, structural features, molecular modifications and applications. *Biotechnol Adv.* **2019**, *37*, 306-318.
104. Di Lodovico, S.; Gasparri, F.; Di Campli, E.; Di Fermo, P.; D'Ercole, S.; Cellini, L.; Di Giulio, M. Prebiotic combinations effects on the colonization of staphylococcal skin strains. *Microorganisms* **2021**, *9*, 37.
105. Le Bourgot, C.; Meunier, C.; Gaio, E.; Murat, V.; Micheletto, M.; Tedesco, E.; Benetti, F. Effects of short chain fructo-oligosaccharides on selected skin bacteria. *Sci Rep.* **2022**, *12*, 9702.
106. Shao, L.; Li, T.; Yang, S.; Ma, L.; Cai, B.; Jia, Q.; Jiang, H.; Bai, T.; Li, Y. The prebiotic effects of fructooligosaccharides enhance the growth characteristics of *Staphylococcus epidermidis* and enhance the inhibition of *Staphylococcus aureus* biofilm formation. *Int J Cosmet Sci.* **2025**, *47*, 155-167.
107. Akiyama, H.; Oono, T.; Huh, W.K.; Yamasaki, O.; Akagi, Y.; Uemura, H.; Yamada, T.; Iwatsuki, K. Actions of gluco-oligosaccharide against *Staphylococcus aureus*. *J Derm.* **2002**, *29*, 580-586.
108. Li, M.; Fan, A.; Mao, J.; Soliman, N.; Shahani, K.; Morgan, A.; Boyd, T. The prebiotic effect of triple biotic technology on skin health. *J Cosmet Dermatol Sci Appl.* **2021**, *11*.
109. Bateni, E.; Tester, R.; Al-Ghazzewi, F.; Bateni, S.; Alvani, K.; Piggott, J. The use of konjac glucomannan hydrolysates (GMH) to improve the health of the skin and reduce acne vulgaris. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* **2013**, *2*, 10-14.
110. de Lima Cherubim, D.J.; Buzanello Martins, C.V.; Oliveira Fariña, L.; da Silva de Lucca, R.A. Polyphenols as natural antioxidants in cosmetics applications. *J Cosmet Derm.* **2020**, *19*, 33-37.
111. Corrêa, T.A.F.; Rogero, M.M.; Hassimotto, N.M.A.; Lajolo, F.M. The two-way polyphenols-microbiota interactions and their effects on obesity and related metabolic diseases. *Front Nutr.* **2019**, *6*.
112. Bockmuhl, D.; Hohne, H.-M.; Jassoy, C.; Schollyssek, R.; Waldmann-Laue, M.; Scholz, W.; Sattler, A. Prebiotically active plant extracts (US20060182708A1). **2006**.
113. Tito, A.; Carola, A.; Bertelli, G.; Rando, P.; Nohynek, L.; Oksman-Caldentey, K.M.; Richer, H.; Zappelli, C.; Colucci, M.G.; Apone, F. A *Rubus arcticus* derived ingredient stimulates immune defence and reduces inflammation in skin cells by promoting microbiota balance. *The Proceedings of the 25th IFSCC Conference 2019, Milan.* **2019**.
114. Faccini, I.; Arnese, A.; Cinzia, G.; Bettinelli, S.; Depta, G. Intercos prebiotic make-up: Self-preserving natural foundation that boosts the skin microbiota. *Proceedings of the 25th IFSCC Conference 2019, Milano* **2019**.
115. Claypool, j.; Imfeld, D.; Sfriso, R. Novel use of an epilobium fleischeri extract (WO2022063685A1). **2022**.
116. 幸子, 藤.; Fujita, S.; 藤田, 幸.; ▲高▼山, 和.; ▲高▼山, 和.; Takayama, K. Skin cleansing agent which improves resident skin bacteria balance (JP2017007984A). **2015**.
117. D'Arcangelo, S.; Fermo, P.D.; Diban, F.; Ferrone, V.; D'Ercole, S.; Giulio, M.D.; Lodovico, S.D. *Staphylococcus aureus*/*Staphylococcus epidermidis* from skin microbiota are balanced by Pomegranate peel extract: An eco-sustainable approach. *PloS One.* **2024**, *19*, 1-16.
118. Pesonen, T.; Sahramo, E.; Palmujoki, I.; Vääntinen, K.; Mäkinen, P.; Isohanni, T. Cosmetic use of nordic berry ingredients for supporting a healthy skin microbiome (EP4062901A1). **2022**.
119. Vermerris, W.; Nicholson, R. *Phenolic Compound Biochemistry*; Springer Dordrecht: **2008**.

120. Shahidi, F.; Hossain, A. Importance of insoluble-bound phenolics to the antioxidant potential is dictated by source material. *Antioxidants*. **2023**, *12*, 203.
121. Shahidi, F.; Yeo, J. Insoluble-bound phenolics in food. *Molecules*. **2016**, *21*, 1216.
122. Dias, M.C.; Pinto, D.C.G.A.; Silva, A.M.S. Plant flavonoids: Chemical characteristics and biological activity. *Molecules*. **2021**, *26*, 5377.
123. Abbas, M.; Saeed, F.; Anjum, F.M.; Afzaal, M.; Tufail, T.; Bashir, M.S.; Ishtiaq, A.; Hussain, S.; Suleria, H.A.R. Natural polyphenols: An overview. *Int J of Food Prop*. **2017**, *20*, 1689-1699.
124. Durazzo, A.; Lucarini, M.; Souto, E.B.; Cicala, C.; Caiazzo, E.; Izzo, A.A.; Novellino, E.; Santini, A. Polyphenols: A concise overview on the chemistry, occurrence, and human health. *Phytother Res*. **2019**, *33*, 2221-2243.
125. Chen, S.; Wang, X.; Cheng, Y.; Gao, H.; Chen, X. A review of classification, biosynthesis, biological activities and potential applications of flavonoids. *Molecules*. **2023**, *28*, 4982.
126. Castañeda-Ovando, A.; Pacheco-Hernández, M.d.L.; Páez-Hernández, M.E.; Rodríguez, J.A.; Galán-Vidal, C.A. Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chem*. **2009**, *113*, 859-871.
127. Ramawat, K.G.; Mérillon, J.-M. *Natural Products. Phytochemistry, Botany and Metabolism of Alkaloids, Phenolics and Terpenes.*; Springer Berlin: Heidelberg. **2013**.
128. Houghton, A.; Appelhagen, I.; Martin, C. Natural blues: Structure meets function in anthocyanins. *Plants*. **2021**, *10*, 726.
129. Huang, S.; Wang, G.; Lin, H.; Xiong, Y.; Liu, X.; Li, H. Preparation and dynamic response properties of colorimetric indicator films containing pH-sensitive anthocyanins. *Sensors Actuator Rep*. **2021**, *3*, 100049.
130. Li, W.; Chen, H.; Xu, B.; Wang, Y.; Zhang, C.; Cao, Y.; Xing, X. Research progress on classification, sources and functions of dietary polyphenols for prevention and treatment of chronic diseases. *J Future Foods*. **2023**, *3*, 289-305.
131. Chung, K.-T.; Wong, T.Y.; Wei, C.-I.; Huang, Y.-W.; Lin, Y. Tannins and human health: A review. *Crit Rev Food Sci Nutr*. **1998**, *38*, 421-464.
132. Lang, Y.; Gao, N.; Zang, Z.; Meng, X.; Lin, Y.; Yang, S.; Yang, Y.; Jin, Z.; Li, B. Classification and antioxidant assays of polyphenols: A review. *J Future Foods*. **2024**, *4*, 193-204.
133. Kotha, R.R.; Tareq, F.S.; Yildiz, E.; Luthria, D.L. Oxidative stress and antioxidants — A critical review on *in vitro* antioxidant assays. *Antioxidants*. **2022**, *11*, 2388.
134. Papuc, C.; Goran, G.V.; Predescu, C.N.; Nicorescu, V.; Stefan, G. Plant polyphenols as antioxidant and antibacterial agents for shelf-life extension of meat and meat products: Classification, structures, sources, and action mechanisms. *Compr Rev Food Sci Food Saf*. **2017**, *16*, 1243-1268.
135. Félix, R.; Valentão, P.; Andrade, P.B.; Félix, C.; Novais, S.C.; Lemos, M.F.L. Evaluating the *in vitro* potential of natural extracts to protect lipids from oxidative damage. *Antioxidants*. **2020**, *9*, 231.
136. Zheng, Y.; Sun, J.; Luo, Z.; Li, Y.; Huang, Y. Emerging mechanisms of lipid peroxidation in regulated cell death and its physiological implications. *Cell Death Dis*. **2024**, *15*, 859.
137. Saxena, R.; Batra, J. Arthritis as a disease of aging and changes in antioxidant status. In *Aging (Second Edition)*, Preedy, V.R., Patel, V.B., Eds.; Academic Press: **2020**; 83-94.
138. Valgimigli, L. Lipid peroxidation and antioxidant protection. *Biomolecules*. **2023**, *13*, 1291.
139. Leopoldini, M.; Russo, N.; Toscano, M. The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants. *Food Chem*. **2011**, *125*, 288-306.
140. Costa, M.; Sezgin-Bayindir, Z.; Losada-Barreiro, S.; Paiva-Martins, F.; Saso, L.; Bravo-Díaz, C. Polyphenols as antioxidants for extending food shelf-life and in the prevention of health diseases: Encapsulation and interfacial phenomena. *Biomedicines*. **2021**, *9*, 1909.

141. Kato, M.; Tani, T.; Terahara, N.; Tsuda, T. The anthocyanin delphinidin 3-rutinoside stimulates glucagon-like peptide-1 secretion in murine glutag cell line via the Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II pathway. *PLoS One*. **2015**, *10*, e0126157.
142. Kuwabara, K.; Sakurai, Y.; Sanuki, H.; Morimoto, C.; Li, Y.; Miyake, Y.; Kanaori, K.; Tajima, K. Application of a stopped-flow EPR method for the detection of short-lived flavonoid semiquinone radicals produced by oxidation using ¹⁵N-labeled nitrosodisulfonate radical (Fremy's salt). *Appl Magn Reson*. **2018**, *49*, 911-924.
143. Lojek, A.; Denev, P.; Ciz, M.; Vasicek, O.; Kratchanova, M. The effects of biologically active substances in medicinal plants on the metabolic activity of neutrophils. *Phytochem Rev*. **2014**, *13*, 499-510.
144. Saiko, P.; Szakmary, A.; Jaeger, W.; Szekeres, T. Resveratrol and its analogs: Defense against cancer, coronary disease and neurodegenerative maladies or just a fad? *Mutat Res Rev Mutat Res*. **2008**, *658*, 68-94.
145. Patra, A.; Abdullah, S.; Pradhan, R.C. Review on the extraction of bioactive compounds and characterization of fruit industry by-products. *Bioresour Bioprocess*. **2022**, *9*, 14.
146. Lajoie, L.; Fabiano-Tixier, A.-S.; Chemat, F. Water as green solvent: Methods of solubilisation and extraction of natural products — past, present and future solutions. *Pharm*. **2022**, *15*, 1507.
147. Aktaş, H.; Kurek, M.A. Deep eutectic solvents for the extraction of polyphenols from food plants. *Food Chem*. **2024**, *444*, 138629.
148. Hansen, B.B.; Spittle, S.; Chen, B.; Poe, D.; Zhang, Y.; Klein, J.M.; Horton, A.; Adhikari, L.; Zelovich, T.; Doherty, B.W.; et al. Deep eutectic solvents: A review of fundamentals and applications. *Chem Rev*. **2021**, *121*, 1232-1285.
149. Ferreira, C.; Sarraguça, M. A comprehensive review on deep eutectic solvents and its use to extract bioactive compounds of pharmaceutical interest. *Pharm*. **2024**, *17*, 124.
150. El Achkar, T.; Greige-Gerges, H.; Fourmentin, S. Basics and properties of deep eutectic solvents: A review. *Environ Chem Lett*. **2021**, *19*, 3397-3408.
151. Bashir, I.; Dar, A.H.; Dash, K.K.; Pandey, V.K.; Fayaz, U.; Shams, R.; Srivastava, S.; Singh, R. Deep eutectic solvents for extraction of functional components from plant-based products: A promising approach. *Sustain Chem Pharm*. **2023**, *33*, 101102.
152. Rente, D.; Cvjetko Bubalo, M.; Panić, M.; Paiva, A.; Caprin, B.; Radojčić Redovniković, I.; Duarte, A.R.C. Review of deep eutectic systems from laboratory to industry, taking the application in the cosmetics industry as an example. *J Clean Prod*. **2022**, *380*, 135147.
153. Szopa, D.; Wróbel, P.; Witek-Krowiak, A. Enhancing polyphenol extraction efficiency: A systematic review on the optimization strategies with natural deep eutectic solvents. *J Mol Liq*. **2024**, *404*, 124902.
154. Wawoczny, A.; Gillner, D. The most potent natural pharmaceuticals, cosmetics, and food ingredients isolated from plants with deep eutectic solvents. *J Agric Food Chem*. **2023**, *71*, 10877-10900.
155. Brglez Mojzer, E.; Knez Hrnčič, M.; Škerget, M.; Knez, Ž.; Bren, U. Polyphenols: Extraction methods, antioxidative action, bioavailability and anticarcinogenic effects. *Molecules*. **2016**, *21*, 901.
156. Mungwari, C.P.; King'ondy, C.K.; Sigauke, P.; Obadele, B.A. Conventional and modern techniques for bioactive compounds recovery from plants: Review. *Scie Afr*. **2025**, *27*, e02509.
157. Ivanović, M.; Islamčević Razboršek, M.; Kolar, M. Innovative extraction techniques using deep eutectic solvents and analytical methods for the isolation and characterization of natural bioactive compounds from plant material. *Plants*. **2020**, *9*, 1428.
158. Zhang, B.; Gao, Y.; Zhang, L.; Zhou, Y. The plant cell wall: Biosynthesis, construction, and functions. *J Integr Plant Biol*. **2021**, *63*, 251-272.

159. Ullah, A.; Rahman, L.; Yazdani, M.B.; Irfan, M.; Khan, W.S.; Rehman, A. Cell wall polysaccharides. In *Polysaccharides*; **2021**; 23-36.
160. Łubek-Nguyen, A.; Ziemichód, W.; Olech, M. Application of enzyme-assisted extraction for the recovery of natural bioactive compounds for nutraceutical and pharmaceutical applications. *Appl Sci.* **2022**, *12*, 3232.
161. Cell wall composition. Available online: <https://www.thoughtco.com/cell-wall-373613> (Accessed 2 April 2025).
162. Etale, A.; Onyianta, A.J.; Turner, S.R.; Eichhorn, S.J. Cellulose: A review of water interactions, applications in composites, and water treatment. *Chem Rev.* **2023**, *123*, 2016-2048.
163. Ciudad-Mulero, M.; Fernández-Ruiz, V.; Matallana-González, M.C.; Morales, P. Dietary fiber sources and human benefits: The case study of cereal and pseudocereals. In *Advances in Food and Nutrition Research*, Ferreira, I.C.F.R., Barros, L., Eds.; Academic Press: **2019**; 83-134.
164. Naas, A.; Pope, P. A mechanistic overview of ruminal fibre digestion. *Peer J Prepr.* **2019**, *7*.
165. Alencar, J.C.G.d.; Pinto, G.T.d.S.; Cerqueira e Silva, K.F.; Santos, J.M.S.; Hubinger, M.D.; Bicas, J.L.; Maróstica Junior, M.R.; Petkowicz, C.L.d.O.; Paulino, B.N. Pectin and pectic oligosaccharides (POS): Recent advances for extraction, production, and its prebiotic potential. *Trends Food Sci Technol.* **2025**, *155*, 104808.
166. Lara-Espinoza, C.; Carvajal-Millán, E.; Baladrán-Quintana, R.; López-Franco, Y.; Rascón-Chu, A. Pectin and pectin-based composite materials: Beyond food texture. *Molecules.* **2018**, *23*, 942.
167. Kastner, H.; Kern, K.; Wilde, R.; Berthold, A.; Einhorn-Stoll, U.; Drusch, S. Structure formation in sugar containing pectin gels – Influence of tartaric acid content (pH) and cooling rate on the gelation of high-methoxylated pectin. *Food Chem.* **2014**, *144*, 44-49.
168. Roman-Benn, A.; Contador, C.A.; Li, M.-W.; Lam, H.-M.; Ah-Hen, K.; Ulloa, P.E.; Ravanal, M.C. Pectin: An overview of sources, extraction and applications in food products, biomedical, pharmaceutical and environmental issues. *Food Chem Adv.* **2023**, *2*, 100192.
169. Streimikyte, P.; Viskelis, P.; Viskelis, J. Enzymes-assisted extraction of plants for sustainable and functional applications. *Int J Mol Sci.* **2022**, *23*, 2359.
170. Sinha, T.; Sharma, K.; Yazdani, S.S. Cellobiohydrolases. In *Glycoside Hydrolases*, Goyal, A., Sharma, K., Eds.; Academic Press: **2023**; 77-95.
171. Haertlé, T. Enzymes: Analysis and food processing. In *Encyclopedia of Food and Health*, Caballero, B., Finglas, P.M., Toldrá, F., Eds.; Academic Press: Oxford, **2016**; 524-531.
172. Juturu, V.; Wu, J.C. Microbial exo-xylanases: A mini review. *Appl Biochem Biotechnol* **2014**, *174*, 81-92.
173. Hugouvieux-Cotte-Pattat, N.; Condemine, G.; Shevchik, V.E. Bacterial pectate lyases, structural and functional diversity. *Enviro Microbiol Rep.* **2014**, *6*, 427-440.
174. Xu, Q.; Zhou, Y.; Wu, Y.; Jia, Q.; Gao, G.; Nie, F. Enzyme-assisted solvent extraction for extraction of blueberry anthocyanins and separation using resin adsorption combined with extraction technologies. *Int J Food Sci Technol.* **2016**, *51*, 2567-2573.
175. Nishad, J.; Saha, S.; Kaur, C. Enzyme- and ultrasound-assisted extractions of polyphenols from *Citrus sinensis* (cv. Malta) peel: A comparative study. *J Food Process Preserv.* **2019**, *43*, e14046.
176. Kitrytė, V.; Kraujalienė, V.; Šlunīūtė, V.; Pukalskas, A.; Venskutonis, P.R. Chokeberry pomace valorization into food ingredients by enzyme-assisted extraction: Process optimization and product characterization. *Food and Bioprod Process.* **2017**, *105*, 36-50.
177. Roda-Serrat, M.C.; Razi Parjikolaei, B.; Mohammadifakhr, M.; Martin, J.; Norddahl, B.; Errico, M. A case study for the extraction, purification, and co-pigmentation of anthocyanins from aronia melanocarpa juice pomace. *Foods.* **2022**, *11*, 3875.

178. Dinkova, R.; Heffels, P.; Shikov, V.; Weber, F.; Schieber, A.; Mihalev, K. Effect of enzyme-assisted extraction on the chilled storage stability of bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) anthocyanins in skin extracts and freshly pressed juices. *Food Res Int.* **2014**, *65*, 35-41.
179. Syrpas, M.; Valanciene, E.; Augustiniene, E.; Malys, N. Valorization of bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) pomace by enzyme-assisted extraction: process optimization and comparison with conventional solid-liquid extraction. *Antioxidants.* **2021**, *10*, 773.
180. Meini, M.-R.; Cabezudo, I.; Boschetti, C.E.; Romanini, D. Recovery of phenolic antioxidants from Syrah grape pomace through the optimization of an enzymatic extraction process. *Food Chem.* **2019**, *283*, 257-264.
181. Landbo, A.-K.; Meyer, A.S. Enzyme-assisted extraction of antioxidative phenols from black currant juice press residues (*Ribes nigrum*). *J Agric Food Chem.* **2001**, *49*, 3169-3177.
182. Ayuso, P.; Peñalver, R.; Quizhpe, J.; Rosell, M.d.l.Á.; Nieto, G. Broccoli, artichoke, carob and apple by-products as a source of soluble fiber: How it can be affected by enzymatic treatment with Pectinex[®] Ultra SP-L, Viscozyme[®] L and Celluclast[®] 1.5 L. *Foods* **2025**, *14*, 10.
183. Saad, N.; Louvet, F.; Tarrade, S.; Meudec, E.; Grenier, K.; Landolt, C.; Ouk, T.S.; Bressollier, P. enzyme-assisted extraction of bioactive compounds from raspberry (*Rubus idaeus* L.) pomace. *J Food Sci.* **2019**, *84*, 1371-1381.
184. Laroze, L.; Soto, C.; Zúñiga, M.E. Phenolic antioxidants extraction from raspberry wastes assisted by-enzymes. *Electron J Biotechnol.* **2010**, *13*.
185. Kitrytė, V.; Povilaitis, D.; Kraujalienė, V.; Šalniūtė, V.; Pukalskas, A.; Venskutonis, P.R. Fractionation of sea buckthorn pomace and seeds into valuable components by using high pressure and enzyme-assisted extraction methods. *LWT - Food Sci Technol.* **2017**, *85*, 534-538.
186. Domínguez-Rodríguez, G.; Marina, M.L.; Plaza, M. Enzyme-assisted extraction of bioactive non-extractable polyphenols from sweet cherry (*Prunus avium* L.) pomace. *Food Chem.* **2021**, *339*, 128086.
187. Pérez, M.; Dominguez-López, I.; Lamuela-Raventós, R.M. The chemistry behind the Folin-Ciocalteu method for the estimation of (poly)phenol content in food: Total phenolic intake in a mediterranean dietary pattern. *J Agric Food Chem.* **2023**, *71*, 17543-17553.
188. Milutinović, M.; Radovanović, N.; Čorović, M.; Šiler-Marinković, S.; Rajilić-Stojanović, M.; Dimitrijević-Branković, S. Optimisation of microwave-assisted extraction parameters for antioxidants from waste *Achillea millefolium* dust. *Ind Crops Prod.* **2015**, *77*, 333-341.
189. Mammen, D.; Daniel, M. A critical evaluation on the reliability of two aluminum chloride chelation methods for quantification of flavonoids. *Food Chem.* **2012**, *135*, 1365-1368.
190. Marjanovic, A.; Djedjibegovic, J.; Lugusic, A.; Sober, M.; Saso, L. Multivariate analysis of polyphenolic content and in vitro antioxidant capacity of wild and cultivated berries from Bosnia and Herzegovina. *Sci Rep* **2021**, *11*, 19259.
191. Granato, D.; Santos, J.S.; Maciel, L.G.; Nunes, D.S. Chemical perspective and criticism on selected analytical methods used to estimate the total content of phenolic compounds in food matrices. *TrAC Trends Anal Chem.* **2016**, *80*, 266-279.
192. Formagio, A.S.N.; Volobuff, C.R.F.; Santiago, M.; Cardoso, C.A.L.; Vieira, M.D.C.; Valdevina Pereira, Z. Evaluation of antioxidant activity, total flavonoids, tannins and phenolic compounds in psychotria leaf extracts. *Antioxidants.* **2014**, *3*, 745-757.
193. Boroja, T.; Mihailović, V.; Katanić, J.; Pan, S.P.; Nikles, S.; Imbimbo, P.; Monti, D.M.; Stanković, N.; Stanković, M.S.; Bauer, R. The biological activities of roots and aerial parts of *Alchemilla vulgaris* L. *S Afr J Bot.* **2018**, *116*, 175-184.
194. Willis, R.B.; Allen, P.R. Improved method for measuring hydrolyzable tannins using potassium iodate. *Analyst* **1998**, *123*, 435-439.

195. Rajilić-Stojanović, M.; Tanasković, S.J.; Ćorović, M.; Simović, M. Ugljeni hidrati. In *Biotehnološki praktikum*; Tehnološko-metalurški fakultet: Beograd, **2021**.
196. Munteanu, I.G.; Apetrei, C. Analytical methods used in determining antioxidant activity: A Review. *Int J Mol Sci.* **2021**, *22*, 3380.
197. Darwish, A.G.; Das, P.R.; Ismail, A.; Gajjar, P.; Balasubramani, S.P.; Sheikh, M.B.; Tsoleva, V.; Sherif, S.M.; El-Sharkawy, I. Untargeted metabolomics and antioxidant capacities of muscadine grape genotypes during berry development. *Antioxidants* **2021**, *10*, 914.
198. Petrovic, M.; Suznjevic, D.; Pastor, F.; Veljovic, M.; Pezo, L.; Antic, M.; Gorjanovic, S. Antioxidant capacity determination of complex samples and individual phenolics - multilateral approach. *Comb Chem High T Scr.* **2016**, *19*, 58-65.
199. Sun, T.; Tanumihardjo, S.A. An integrated approach to evaluate food antioxidant capacity. *J Food Sci.* **2007**, *72*, 159-165.
200. van der Krieken, D.A., Ederveen, T. H., van Hijum, S. A., Jansen, P. A., Melchers, W. J., Scheepers, P. T Zeeuwen, P. L. *In vitro* model for bacterial growth on human stratum corneum. *Acta Derm-Venereol.* **2016**, *96*, 873-879.
201. Fara, A.; Sabater, C.; Palacios, J.; Requena, T.; Montilla, A.; Zárata, G. Prebiotic galactooligosaccharides production from lactose and lactulose by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CRL450. *Food Funct.* **2020**, *11*, 5875-5886.
202. Bujak, T.; Zagórska-Dziok, M.; Nizioł-Łukaszewska, Z. Complexes of ectoine with the anionic surfactants as active ingredients of cleansing cosmetics with reduced irritating potential. *Molecules.* **2020**, *25*, 1433.
203. Blagojević, S.N.; Blagojević, S.M.; Pejić, N.D. Performance and efficiency of anionic dishwashing liquids with amphoteric and nonionic surfactants. *J Surfactants Deterg.* **2016**, *19*, 363-372.
204. 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. *Ind Eng Chem Res.* **2019**, *58*, 3640-3649.
205. Lagarto, A.; Vega, R.; Vega, Y.; Guerra, I.; González, R. Comparative study of red blood cell method in rat and calves blood as alternatives of Draize eye irritation test. *Toxicol in Vitro.* **2006**, *20*, 529-533.
206. Haq A, D.M., Goodyear B, Joshi V, Michniak-Kohn B Membrane properties for permeability testing: Skin versus synthetic membranes. *Int J Pharm* **2018**, *539*, 58-64.
207. Salamanca, C.H.; Barrera-Ocampo, A.; Lasso, J.C.; Camacho, N.; Yarce, C.J. Franz diffusion cell approach for pre-formulation characterisation of ketoprofen semi-solid dosage forms. *Pharm.* **2018**, *10*.
208. Peppas, N.A.; Sahlin, J.J. A simple equation for the description of solute release. III. Coupling of diffusion and relaxation. *Int J Pharm.* **1989**, *57*, 169-172.
209. Ćorović, M.; Milivojević, A.; Simović, M.; Banjanac, K.; Pjanović, R.; Bezbradica, D. Enzymatically derived oil-based L-ascorbyl esters: Synthesis, antioxidant properties and controlled release from cosmetic formulations. *Sustain Chemi Pharm.* **2020**, *15*, 100231.
210. Dash, S.; Murthy, P.N.; Nath, L.; Chowdhury, P. Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems. *Acta Pol Pharm.* **2010**, *67*, 217-223.
211. Megías-Pérez, R.; Ferreira-Lazarte, A.; Villamiel, M. Valorization of grape pomace as a renewable source of techno-functional and antioxidant pectins. *Antioxidants.* **2023**, *12*, 957.
212. Sabater, C.; Corzo, N.; Olano, A.; Montilla, A. Enzymatic extraction of pectin from artichoke (*Cynara scolymus* L.) by-products using Celluclast[®] 1.5L. *Carbohydr Polym.* **2018**, *190*, 43-49.

213. Bayar, N.; Friji, M.; Kammoun, R. Optimization of enzymatic extraction of pectin from *Opuntia ficus indica* cladodes after mucilage removal. *Food Chem.* **2018**, *241*, 127-134.
214. Fogarasi, M.; Socaciu, M.-I.; Sălăgean, C.-D.; Ranga, F.; Fărcaș, A.C.; Socaci, S.A.; Socaciu, C.; Țibulcă, D.; Fogarasi, S.; Semeniuc, C.A. Comparison of different extraction solvents for characterization of antioxidant potential and polyphenolic composition in *Boletus edulis* and *Cantharellus cibarius* mushrooms from Romania. *Molecules* **2021**, *26*, 7508.
215. Akiyama, H.; Oono, T.; Huh, W.K.; Yamasaki, O.; Akagi, Y.; Uemura, H.; Yamada, T.; Iwatsuki, K. Actions of gluco-oligosaccharide against *Staphylococcus aureus*. *J Dermatol* **2002**, *29*, 580-586.
216. Byrd, A.; Deming, C.; Cassidy, S., Harrison, O.; Ng, W.-I.; Conlan, S.; NISC Comparative Sequencing Program; Belkaid, Y.; Segre, J.; Kong, H. *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* strain diversity underlying pediatric atopic dermatitis. *Sci Transl Med.* **2017**, *9*, eaal4651.
217. Comito, N.; Nebus, J.; Spisak, K.; Thakrar, J.; Batchvarova, N. 2-week application of topical colloidal oatmeal gel cream supports the growth of skin commensal *Staphylococcus epidermidis* in subjects with mild-to-moderate atopic dermatitis. *J Am Acad Dermatol.* **2024**, *91*, AB99.
218. Georgescu, C.; Frum, A.; Virchea, L.-I.; Sumacheva, A.; Shamtsyan, M.; Gligor, F.-G.; Olah, N.K.; Mathe, E.; Mironescu, M. Geographic variability of berry phytochemicals with antioxidant and antimicrobial properties. *Molecules.* **2022**, *27*, 4986.
219. Tsuda, H.; Kunitake, H.; Kawasaki-Takaki, R.; Nishiyama, K.; Yamasaki, M.; Komatsu, H.; Yukizaki, C. Antioxidant activities and anti-cancer cell proliferation properties of natsuhaze (*Vaccinium oldhamii* miq.), shashanbo (*V. bracteatum* Thunb.) and blueberry cultivars. *Plants.* **2013**, *2*, 57-71.
220. Bunea, A.; Rugina, O.D.; Pinteă, A.; Sconța, Z.; Bunea, C.I.; Socaciu, C. Comparative polyphenolic content and antioxidant activities of some wild and cultivated blueberries from Romania. *Not Bot Horti Agrobo.* **2011**, *39*, 70-76.
221. Lapornik, B.; Prošek, M.; Golc Wondra, A. Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. *J Food Eng.* **2005**, *71*, 214-222.
222. Boeing, J.S.; Barizão, É.O.; e Silva, B.C.; Montanher, P.F.; de Cinque Almeida, V.; Visentainer, J.V. Evaluation of solvent effect on the extraction of phenolic compounds and antioxidant capacities from the berries: application of principal component analysis. *Chem Cent J.* **2014**, *8*, 48.
223. Abaza, L.; Ben Youssef, N.; Manai, H.; Mahjoub Haddada, F.; Methenni, K.; Zarrouk, M. Chétoui olive leaf extracts: influence of the solvent type on phenolics and antioxidant activities. *Grasas y Aceites.* **2011**, *62*, 96-104.
224. Musa, K.H.; Abdullah, A.; Jusoh, K.; Subramaniam, V. Antioxidant activity of pink-flesh guava (*Psidium guajava* l.): Effect of extraction techniques and solvents. *Food Anal Methods.* **2011**, *4*, 100-107.
225. Oreopoulou, A.; Tsimogiannis, D.; Oreopoulou, V. Extraction of polyphenols from aromatic and medicinal plants: An overview of the methods and the effect of extraction parameters. In *Polyphenols in Plants (Second Edition)*, Watson, R.R., Ed.; Academic Press: **2019**; 243-259.
226. Nohynek, L.J.; Alakomi, H.-L.; Kähkönen, M.P.; Heinonen, M.; Helander, I.M.; Oksman-Caldentey, K.-M.; Puupponen-Pimiä, R.H. Berry Phenolics: Antimicrobial Properties and mechanisms of action against severe human pathogens. *Nutr Cancer.* **2006**, *54*, 18-32.
227. Makarewicz, M.; Drożdż, I.; Tarko, T.; Duda-Chodak, A. The interactions between polyphenols and microorganisms, especially gut microbiota. *Antioxidants.* **2021**, *10*, 188.

228. Milutinović, M.; Dimitrijević-Branković, S.; Rajilić-Stojanović, M. Plant extracts rich in polyphenols as potent modulators in the growth of probiotic and pathogenic intestinal microorganisms. *Front Nutr.* **2021**, *8*.
229. Mashudin, M.; Hasham, R.; Cheng, K.K.; Leong, H.Y.; Othman, N.Z.; Shadan, N.H.; Ab Malik, S.; Mohd Hamzah, M.A.A. Prebiotic effects of extracts from pineapple and Curcuma xanthorrhiza rhizomes towards the growth of *Lacticaseibacillus paracasei*. *Food Biosci.* **2024**, *59*, 104045.
230. Sun M, D.Y., Cao X, Xiao L, Ding Q, Luo F, Huang P, Gao Y, Liu M, Zhao H. Effects of natural polyphenols on skin and hair health: A review. *Molecules.* **2022**, *27*, 7832.
231. Uthaibutra, V.; Kaewkod, T.; Prapawilai, P.; Pandith, H.; Tragoolpua, Y. Inhibition of skin pathogenic bacteria, antioxidant and anti-inflammatory activity of royal jelly from Northern Thailand. *Molecules* **2023**, *28*, 996.
232. Eiamthaworn, K.; Kaewkod, T.; Bovonsombut, S.; Tragoolpua, Y. Efficacy of cordyceps militaris extracts against some skin pathogenic bacteria and antioxidant activity. *J Fungi* **2022**, *8*, 327.
233. Policegoudra, R.S.; Chattopadhyay, P.; Aradhya, S.M.; Shivaswamy, R.; Singh, L.; Veer, V. Inhibitory effect of Tridax procumbens against human skin pathogens. *J Herb Med.* **2014**, *4*, 83-88.
234. Cheesman, M.J.; Alcorn, S.; Verma, V.; Cock, I.E. An assessment of the growth inhibition profiles of *Hamamelis virginiana* L. Extracts against *Streptococcus* and *Staphylococcus* spp. *J Tradit Complement Med.* **2021**, *11*, 457-465.
235. Traisaeng, S.; Herr, D.R.; Kao, H.-J.; Chuang, T.-H.; Huang, C.-M. A derivative of butyric acid, the fermentation metabolite of *Staphylococcus epidermidis*, inhibits the growth of a *Staphylococcus aureus* strain isolated from atopic dermatitis patients. *Toxins* **2019**, *11*, 311.
236. Paharik, A.; Parlet, C.; Chung, N.; Todd, D.; Rodriguez, E.; Dyke, M.V.; Cech, N.B.; Horswill, A. Coagulase-negative staphylococcal strain prevents *Staphylococcus aureus* colonization and skin infection by blocking quorum sensing. *Cell Host Microbe.* **2017**, *22*, 746-756.
237. Abdallah, E.M.; Al-Harbi, K.A. Phytochemical screening and antibacterial activity of crude aqueous and ethanol extracts of *Salvadora persica* L. stem (Miswak) from Saudi Arabia. *J Phytopharmacol.* **2015**, *4*, 243-247.
238. Krstić, T.; Suvajdžić, L.; Stojanović, S.; Velhner, M.; Milanov, D.; Bojić, G.; Ilić, N. Different antimicrobial effects of raspberry depending on the method of active components isolation. *Food and Feed Res* **2014**, *41*, 125-130.
239. Somchit, M.N.; Reezal, I.; Nur, I.E.; Mutalib, A.R. *In vitro* antimicrobial activity of ethanol and water extracts of *Cassia alata*. *J Ethnopharmacol.* **2003**, *84*, 1-4.
240. Jam, N.; Hajimohammadi, R.; Gharbani, P.; Mehrizad, A. Evaluation of antibacterial activity of aqueous, ethanolic and methanolic extracts of areca nut fruit on selected bacteria. *BioMed Res Int.* **2021**, *2021*, 6663399.
241. Peixoto, J.R.O.; Silva, G.C.; Costa, R.A.; de Sousa Fontenelle, J.r.L.; Vieira, G.H.F.; Filho, A.A.F.; Vieira, R.H.S.d.F. *In vitro* antibacterial effect of aqueous and ethanolic Moringa leaf extracts. *Asian Pac J Trop Med.* **2011**, *4*, 201-204.
242. Meremäe, K.; Raudsepp, P.; Rusaalepp, L.; Anton, D.; Bleive, U.; Roasto, M. *In vitro* antibacterial and antioxidative activity and polyphenolic profile of the extracts of chokeberry, blackcurrant, and rowan berries and their pomaces. *Foods.* **2024**, *13*, 421.
243. Liang, A.; Leonard, W.; Beasley, J.T.; Fang, Z.; Zhang, P.; Ranadheera, C.S. Anthocyanins-gut microbiota-health axis: A review. *Crit Rev Food Sci Nutr.* **2024**, *64*, 7563-7588.

244. Hidalgo, M.; Oruna-Concha, M.J.; Kolida, S.; Walton, G.E.; Kallithraka, S.; Spencer, J.P.E.; Gibson, G.R.; de Pascual-Teresa, S. Metabolism of anthocyanins by human gut microflora and their influence on gut bacterial growth. *J Agric Food Chem.* **2012**, *60*, 3882-3890.
245. Verediano, T.A.; Stampini Duarte Martino, H.; Dias Paes, M.C.; Tako, E. Effects of anthocyanin on intestinal health: A systematic review. *Nutr.* **2021**, *13*, 1331.
246. Paunović, S.; Mašković, P.; Milinković, M. Phytochemical and antimicrobial profile of black currant berries and leaves. *Acta Agric Serb.* **2022**, *27*, 25-29.
247. Wyżga, B.; Skóra, M.; Wybraniec, S.; Hąc-Wydro, K. Study on the effect of blackcurrant extract – based preservative on model membranes and pathogenic bacteria. *Arch Biochem Biophys.* **2023**, *750*, 109806.
248. Paunović, S.M.; Mašković, P.; Nikolić, M.; Miletić, R. Bioactive compounds and antimicrobial activity of black currant (*Ribes nigrum* L.) berries and leaves extract obtained by different soil management system. *Sci Hortic.* **2017**, *222*, 69-75.
249. Milala, J.; Piekarska-Radzik, L.; Sójka, M.; Klewicki, R.; Matysiak, B.; Klewicka, E. Rosa spp. extracts as a factor that limits the growth of *Staphylococcus* spp. bacteria, a good contaminant. *Molecules* **2021**, *26*, 4590.
250. Fitri, H.; Wiska, R.; Nabila, W.; Jihan Yandika. The inhibitory potential of strawberry (*Fragaria x ananassa*) extract against *Staphylococcus aureus*: Implications for dental caries prevention. *BioSci Med J Biomed Transl Res.* **2024**. 6180-6192.
251. Seleshe, S.; Lee Jong, S.; Lee, S.; Lee Hye, J.; Kim Ga, R.; Yeo, J.; Kim Jong, Y.; Kang Suk, N. Evaluation of antioxidant and antimicrobial activities of ethanol extracts of three kinds of strawberries. *Prev Nutr Food Sci.* **2017**, *22*, 203-210.
252. Struck, S.; Plaza, M.; Turner, C.; Rohm, H. Berry pomace – a review of processing and chemical analysis of its polyphenols. *Int J Food Sci Technol.* **2016**, *51*, 1305-1318.
253. Blejan, A.M.; Nour, V.; Păcularu-Burada, B.; Popescu, S.M. Wild bilberry, blackcurrant, and blackberry by-products as a source of nutritional and bioactive compounds. *Int J Food Prop.* **2023**, *26*, 1579-1595.
254. Kavela, E.T.A.; Szalóki-Dorkó, L.; Máté, M. The efficiency of selected green solvents and parameters for polyphenol extraction from chokeberry (*Aronia melanocarpa* (Michx)) pomace. *Foods.* **2023**, *12*, 3639.
255. Pukalskienė, M.; Pukalskas, A.; Dienaitė, L.; Revinytė, S.; Pereira, C.V.; Matias, A.A.; Venskutonis, P.R. Recovery of bioactive compounds from strawberry (*Fragaria x ananassa*) pomace by conventional and pressurized liquid extraction and assessment their bioactivity in human cell cultures. *Foods.* **2021**, *10*, 1780.
256. Yao, J.; Chen, J.; Yang, J.; Hao, Y.; Fan, Y.; Wang, C.; Li, N. Free, soluble-bound and insoluble-bound phenolics and their bioactivity in raspberry pomace. *LWT - Food Sci Technol.* **2021**, *135*, 109995.
257. Pieszka, M., P. Gogol, M. Pietras M. Pieszka Valuable components of dried pomaces of chokeberry, black currant, strawberry, apple and carrot as a source of natural antioxidants and nutraceuticals in the animal diet. *Ann Anim Sci.* **2015**, *15*, 475-491.
258. Pachołek, B., K. Krawczyk E. Żak. Potential use of dried fruit pomaces to create sensory properties and antioxidant activity of fruit teas. *Pol J Commod Sci.* **2014**, 77-84.
259. Pap, N.; Reshamwala, D.; Korpinen, R.; Kilpeläinen, P.; Fidelis, M.; Furtado, M.M.; Sant'Ana, A.S.; Wen, M.; Zhang, L.; Hellström, J.; et al. Toxicological and bioactivity evaluation of blackcurrant press cake, sea buckthorn leaves and bark from Scots pine and Norway spruce extracts under a green integrated approach. *Food Chem Toxicol.* **2021**, 153.
260. Jadhav, S.B.; Singhal, R.S. Laccase–gum Arabic conjugate for preparation of water-soluble oligomer of catechin with enhanced antioxidant activity. *Food Chem.* **2014**, *150*, 9-16.

261. Desentis-Mendoza, R.M.; Hernández-Sánchez, H.; Moreno, A.; Rojas del C, E.; Chel-Guerrero, L.; Tamariz, J.; Jaramillo-Flores, M.E. Enzymatic polymerization of phenolic compounds using laccase and tyrosinase from *Ustilago maydis*. *Biomacromolecules*. **2006**, *7*, 1845-1854.
262. Lin, M.-H.; Chang, F.-R.; Hua, M.-Y.; Wu, Y.-C.; Liu, S.-T. Inhibitory Effects of 1,2,3,4,6-Penta-O-Galloyl- β -D-Glucopyranose on biofilm formation by *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*. **2011**, *55*, 1021-1027.
263. Maisetta, G.; Batoni, G.; Caboni, P.; Esin, S.; Rinaldi, A.C.; Zucca, P. Tannin profile, antioxidant properties, and antimicrobial activity of extracts from two Mediterranean species of parasitic plant *Cytinus*. *BMC Complement Altern Med*. **2019**, *19*, 82.
264. Fujii, T.; Shinozaki, J.; Kajiura, T.; Iwasaki, K.; Fudou, R. A newly discovered *Anaerococcus* strain responsible for axillary odor and a new axillary odor inhibitor, pentagalloyl glucose. *FEMS Microbiol Ecol*. **2014**, *89*, 198-207.
265. Foodb. Galloyl glucose. Available online: <https://foodb.ca/compounds/FDB000233> (Accessed 2 April 2025)
266. Park, S.; Classen, A.; Gohou, H.M.; Maldonado, R.; Kretschmann, E.; Duvernay, C.; Kim, G.-J.; Ronholm, J. A new, reliable, and high-throughput strategy to screen bacteria for antagonistic activity against *Staphylococcus aureus*. *BMC Microbiol*. **2021**, *21*, 189.
267. Glatthardt, T.; Campos, J.C.d.M.; Chamon, R.C.; Coimbra, T.F.d.S.; Rocha, G.d.A.; Melo, M.A.F.d.; Parente, T.E.; Lobo, L.A.; Antunes, L.C.M.; Santos, K.R.N.d.; et al. Small molecules produced by commensal *Staphylococcus epidermidis* disrupt formation of biofilms by *Staphylococcus aureus*. *Appl Environ Microbiol*. **2020**, *86*, e02539-02519.
268. Cogen, A.L.; Yamasaki, K.; Sanchez, K.M.; Dorschner, R.A.; Lai, Y.; MacLeod, D.T.; Torpey, J.W.; Otto, M.; Nizet, V.; Kim, J.E.; et al. Selective antimicrobial action is provided by phenol-soluble modulins derived from *Staphylococcus epidermidis*, a normal resident of the skin. *J Invest Dermatol*. **2010**, *130*, 192-200.
269. Woo, T.E.; Sibley, C.D. The emerging utility of the cutaneous microbiome in the treatment of acne and atopic dermatitis. *J Am Acad Dermatol*. **2020**, *82*, 222-228.
270. Mäkinen, K.K.; Söderlång, E. A quantitative study of mannitol, sorbitol, xylitol, and xylose in wild berries and commercial fruits. *J Food Sci*. **1980**, *45*, 367-371.
271. Washüttl, J.; Riederer, P.; Bancher, E. A qualitative and quantitative study of sugar-alcohols in several foods. *J Food Sci*. **1973**, *38*, 1262-1263.
272. Anglenius, H.; Tiihonen, K. Evaluation of xylitol as an agent that controls the growth of skin microbes: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, and *Cutibacterium acnes*. *Korean J Microbiol*. **2020**, *56*, 54-58.
273. Spadoni Andreani, E.; Karboune, S.; Liu, L. Extraction and characterization of cell wall polysaccharides from cranberry (*Vaccinium macrocarpon* var. Stevens) pomace. *Carbohydr. Polym*. **2021**, *267*, 118212.
274. Zhang, W.; Xu, S.; Gao, M.; Peng, S.; Chen, L.; Lao, F.; Liao, X.; Wu, J. Profiling the water soluble pectin in clear red raspberry (*Rubus idaeus* L. cv. Heritage) juice: Impact of high hydrostatic pressure and high-temperature short-time processing on the pectin properties. *Food Hydrocoll*. **2022**, *125*, 107439.
275. Kosmala, M.; Kołodziejczyk, K.; Markowski, J.; Mieszczakowska, M.; Ginies, C.; Renard, C.M.G.C. Co-products of black-currant and apple juice production: Hydration properties and polysaccharide composition. *LWT - Food Sci Technol*. **2010**, *43*, 173-180.
276. Hilz, H.; Bakx, E.J.; Schols, H.A.; Voragen, A.G.J. Cell wall polysaccharides in black currants and bilberries—characterisation in berries, juice, and press cake. *Carbohydr. Polym*. **2005**, *59*, 477-488.

277. Hotchkiss, A.T.; Chau, H.K.; Strahan, G.D.; Nuñez, A.; Harron, A.; Simon, S.; White, A.K.; Dieng, S.; Heuberger, E.R.; Black, I.; et al. Structural characterization of strawberry pomace. *Heliyon*. 2024, 10, e29787.
278. Li, M.; Liu, Y.; Yang, G.; Sun, L.; Song, X.; Chen, Q.; Bao, Y.; Luo, T.; Wang, J. Microstructure, physicochemical properties, and adsorption capacity of deoiled red raspberry pomace and its total dietary fiber. *LWT - Food Sci Technol*. 2022, 153, 112478.
279. Novozymes. Cellic® CTec3 HS Available online: <https://www.novozymes.com/en/products/bioenergy/cellic-ctec3-hs> (Accessed 2 April 2025)
280. Novozymes. Pectinex® Ultra SP-L. Available online: <https://www.novozymes.com/en/products/juice-fruit-vegetables/vegetables/pectinex-ultra-sp-l> (Accessed 2 April 2025)
281. Novozymes. Viscozyme® L. Available online: <https://www.novozymes.com/en/products/juice-fruit-vegetables/olive-oil/viscozyme-l> (Accessed 2 April 2025)
282. Nuventure. Rohapect® MC Product Data Sheet. Available online: [https://nuventure.eu/content/uploads/docs/yeast-enzymes/abenzymes/ROHAPECTR%20MC%20Product%20Data%20Sheet%20Rev.%2000%20\(ID%202421\).pdf](https://nuventure.eu/content/uploads/docs/yeast-enzymes/abenzymes/ROHAPECTR%20MC%20Product%20Data%20Sheet%20Rev.%2000%20(ID%202421).pdf) (Accessed 2 April 2025)
283. Enzymes AB. Rohapect® Enzymes for fruit processing. Available online: https://www.abenzymes.com/media/2656/ab_enzymes_rohapect.pdf (Accessed 2 April 2025)
284. Hilz, H. Characterisation of cell wall polysaccharides in bilberries and black currants (PhD thesis). Wageningen University, Wageningen, The Netherlands, 2007.
285. Nguyen, C.L.; Nguyen, H.V.H. The quality of mulberry juice as affected by enzyme treatments. *Beverages*. 2018, 4, 41.
286. Jagelaviciute, J.; Basinskiene, L.; Cizeikiene, D.; Syrpas, M. Technological properties and composition of enzymatically modified cranberry pomace. *Foods*. 2022, 11, 2321.
287. Buchert, J.; Koponen, J.M.; Suutarinen, M.; Mustranta, A.; Lille, M.; Törrönen, R.; Poutanen, K. Effect of enzyme-aided pressing on anthocyanin yield and profiles in bilberry and blackcurrant juices. *J Sci Food Agric*. 2005, 85, 2548-2556.
288. Cacace, J.E.; Mazza, G. Mass transfer process during extraction of phenolic compounds from milled berries. *J Food Eng*. 2003, 59, 379-389.
289. Sun, Y.; Liu, D.; Chen, J.; Ye, X.; Yu, D. Effects of different factors of ultrasound treatment on the extraction yield of the all-trans- β -carotene from citrus peels. *Ultrason Sonochem*. 2011, 18, 243-249.
290. Álvarez, A.; Terreros, S.; Cocero, M.J.; Mato, R.B. Microwave pretreatment for the extraction of anthocyanins from saffron flowers: Assessment of product quality. *Antioxidants*. 2021, 10, 1054.
291. Zheng, B.; Yuan, Y.; Xiang, J.; Jin, W.; Johnson, J.B.; Li, Z.; Wang, C.; Luo, D. Green extraction of phenolic compounds from foxtail millet bran by ultrasonic-assisted deep eutectic solvent extraction: Optimization, comparison and bioactivities. *LWT - Food Sci Technol*. 2022, 154, 112740.
292. Ghandahari Yazdi, A.P.; Barzegar, M.; Sahari, M.A.; Ahmadi Gavlighi, H. Optimization of the enzyme-assisted aqueous extraction of phenolic compounds from pistachio green hull. *Food Sci Nutr*. 2019, 7, 356-366.
293. Granato, D.; Fidelis, M.; Haapakoski, M.; dos Santos Lima, A.; Viil, J.; Hellström, J.; Rätsep, R.; Kaldmäe, H.; Bleive, U.; Azevedo, L.; et al. Enzyme-assisted extraction of anthocyanins and other phenolic compounds from blackcurrant (*Ribes nigrum* L.) press cake: From processing to bioactivities. *Food Chem*. 2022, 391, 133240.
294. Wightman, J.D.; Wrolstad, R.E. Anthocyanin analysis as a measure of glycosidase activity in enzymes for juice processing. *J Food Sci*. 1995, 60, 862-867.

295. Versari, A.; Biesenbruch, S.; Barbanti, D.; Farnelle, P.J.; Galassi, S. Effects of pectolytic enzymes on selected phenolic compounds in strawberry and raspberry juices. *Food Res Int.* **1997**, *30*, 811-817.
296. Yuan, K.; Wu, G.; Li, X.; Zeng, Y.; Wen, X.; Liu, R.; Jiang, X.; Tian, L.; Sun, J.; Bai, W. Anthocyanins degradation mediated by β -glycosidase contributes to the color loss during alcoholic fermentation in a structure-dependent manner. *Food Res Int.* **2024**, *175*, 113732.
297. Barbagallo, R.N.; Palmeri, R.; Fabiano, S.; Rapisarda, P.; Spagna, G. Characteristic of β -glucosidase from Sicilian blood oranges in relation to anthocyanin degradation. *Enzyme Microb Technol.* **2007**, *41*, 570-575.
298. Erkanli, M.E.; El-Halabi, K.; Kim, J.R. Exploring the diversity of β -glucosidase: Classification, catalytic mechanism, molecular characteristics, kinetic models, and applications. *Enzyme Microb Technol.* **2024**, *173*, 110363.
299. Kim, J.K.; Yang, J.; Park, S.Y.; Yu, J.-H.; Kim, K.H. Cellulase recycling in high-solids enzymatic hydrolysis of pretreated empty fruit bunches. *Biotechnol Biofuels.* **2019**, *12*, 138.
300. Maharramova, S.; Nasrullayeva, G.; Qadimova, N.; Maharramova, M.; Maharramov, M. The influence of pre-treatment of grape, cherry, and strawberry pulp with enzyme preparations of pectinase and cellulase on some organic compounds amount in their extracts. *Methods Objects Chem Anal.* **2024**, *19*, 151-159.
301. Cerda, A.; Martínez, M.E.; Soto, C.; Poirrier, P.; Perez-Correa, J.R.; Vergara-Salinas, J.R.; Zúñiga, M.E. The enhancement of antioxidant compounds extracted from *Thymus vulgaris* using enzymes and the effect of extracting solvent. *Food Chem.* **2013**, *139*, 138-143.
302. Lachowicz, S.; Oszmiański, J.; Kolniak-Ostek, J. Influence of different pectinolytic enzymes on bioactive compound content, antioxidant potency, colour and turbidity of chokeberry juice. *Eur Food Res Technol.* **2018**, *244*, 1907-1920.
303. Kim, J.; Lee, Y.; Suh, H.-J.; Lee, H.-S.; Lee, C. Enzymatic extraction of anthocyanins from the pomace of aronia (*Aronia melanocarpa*). *Biosci Biotechnol Biochem.* **2024**, *88*, 639-647.
304. Zbrzeźniak, M.; Nordlund, E.; Mieszczakowska-Frąć, M.; Płocharski, W.; Konopacka, D. Quality of cloudy plum juice produced from fresh fruit of *Prunus Domestica* L. – The effect of cultivar and enzyme treatment. *J Hort Res.* **2015**, *23*, 83-94.
305. Mieszczakowska-Frąć, M.; Markowski, J.; Zbrzeźniak, M.; Płocharski, W. Impact of enzyme on quality of blackcurrant and plum juices. *LWT - Food Science and Technology* **2012**, *49*, 251-256.
306. Bagger-Jørgensen, R.; Meyer, A.S. Effects of different enzymatic pre-press maceration treatments on the release of phenols into blackcurrant juice. *Eur Food Res and Technol.* **2004**, *219*, 620-629.
307. Liu, X.; Le Bourvellec, C.; Renard, C.M.G.C. Interactions between cell wall polysaccharides and polyphenols: Effect of molecular internal structure. *Compr Rev in Food Sci. and Food Saf.* **2020**, *19*, 3574-3617.
308. Siemińska-Kuczer, A.; Szymańska-Chargot, M.; Zdunek, A. Recent advances in interactions between polyphenols and plant cell wall polysaccharides as studied using an adsorption technique. *Food Chem.* **2022**, *373*, 131487.
309. Phan, A.D.T.; Flanagan, B.M.; D'Arcy, B.R.; Gidley, M.J. Binding selectivity of dietary polyphenols to different plant cell wall components: Quantification and mechanism. *Food Chem.* **2017**, *233*, 216-227.
310. Sangthawan, P.A.S. Prebiotic activity and bioactive compounds of the enzymatically depolymerized Thailand-grown mangosteen aril. *J Food Res.* **2012**, *1*, 268-276.
311. Teixeira-Guedes, C.; Gomes-Dias, J.S.; Cunha, S.A.; Pintado, M.E.; Pereira, R.N.; Teixeira, J.A.; Rocha, C.M.R. Enzymatic approach for the extraction of bioactive fractions from red, green and brown seaweeds. *Food Bioprod Process.* **2023**, *138*, 25-39.

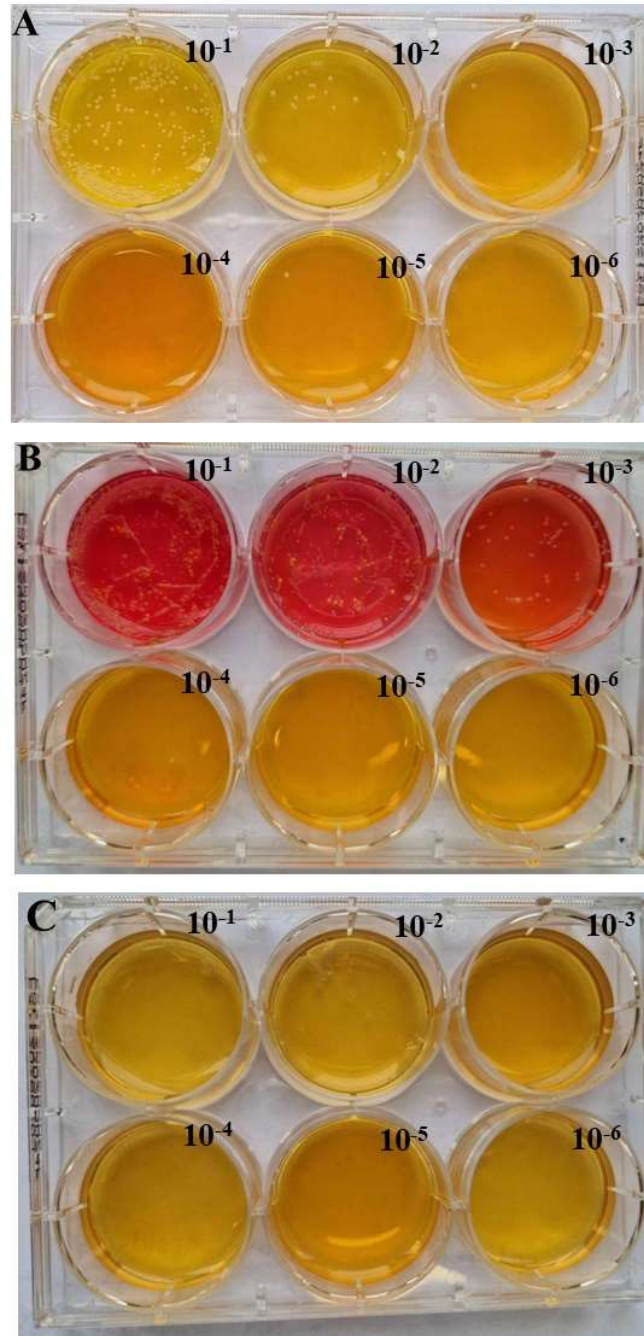
312. Song, H.; Zhang, Z.; Li, Y.; Zhang, Y.; Yang, L.; Wang, S.; He, Y.; Liu, J.; Zhu, D.; Liu, H. Effects of different enzyme extraction methods on the properties and prebiotic activity of soybean hull polysaccharides. *Heliyon*. **2022**, *8*, e11053.
313. Xie, Y.; Chen, J.; Xiao, A.; Liu, L. Antibacterial activity of polyphenols: Structure-activity relationship and influence of hyperglycemic condition. *Molecules*. 2017, *22*, 1913.
314. Barros, T.F.; Borges, J.S.; Silva, D.B.; Trentin, D.S. Glycosylated flavonoids have fewer antibacterial activity than corresponding aglycone: Is it true for antivirulence activity? *Rev Bras Farmacogn*. 2024, *34*, 910-926.
315. Dai, X.; Zhuang, J.; Wu, Y.; Wang, P.; Zhao, G.; Liu, Y.; Jiang, X.; Gao, L.; Xia, T. Identification of a flavonoid glucosyltransferase involved in 7-OH site glycosylation in tea plants (*Camellia sinensis*). *Sci Rep*. 2017, *7*, 5926.
316. Liu, X.; Lin, C.; Ma, X.; Tan, Y.; Wang, J.; Zeng, M. Functional characterization of a flavonoid glycosyltransferase in sweet orange (*Citrus sinensis*). *Fron Plant Sci*. 2018, *9*.
317. Offen, W.; Martinez-Fleites, C.; Yang, M.; Kiat-Lim, E.; Davis, B.G.; Tarling, C.A.; Ford, C.M.; Bowles, D.J.; Davies, G.J. Structure of a flavonoid glucosyltransferase reveals the basis for plant natural product modification. *EMBO J*. 2006, *25*, 1396-1405.
318. Clayton-Cuch, D.; Yu, L.; McDougal, D.; Burbidge, C.A.; Bruning, J.B.; Bradley, D.; Böttcher, C.; Bulone, V. Biochemical and in silico characterization of glycosyltransferases from red sweet cherry (*Prunus avium* L.) reveals their broad specificity toward phenolic substrates. *Food Chem: Mol Sci*. 2024, *8*, 100193.
319. Miyazawa, M.; Ando, H.; Okuno, Y.; Araki, H. Biotransformation of isoflavones by *Aspergillus niger*, as biocatalyst. *J Mol Catal B Enzym*. 2004, *27*, 91-95.
320. Uehara, Y.; Shimamura, Y.; Takemura, C.; Suzuki, S.; Masuda, S. Effects of cosmetic ingredients on growth and virulence factor expression in *Staphylococcus aureus*: A comparison between culture medium and in vitro skin model medium. *AIMS Microbiol*. 2025, *11*, 22-39.
321. Spittaels, K.-J.; Ongena, R.; Zouboulis, C.C.; Crabbé, A.; Coenye, T. *Cutibacterium acnes* phylotype I and II strains interact differently with human skin cells. *Front Cell Infect Microbiol*. 2020, *10*.
322. Dekio, I.; McDowell, A.; Sakamoto, M.; Tomida, S.; Ohkuma, M. Proposal of new combination, *Cutibacterium acnes* subsp. *elongatum* comb. nov., and emended descriptions of the genus *Cutibacterium*, *Cutibacterium acnes* subsp. *acnes* and *Cutibacterium acnes* subsp. *defendens*. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2019, *69*, 1087-1092.
323. Jensen, M.G.; Svraka, L.; Baez, E.; Lund, M.; Poehlein, A.; Brüggemann, H. Species- and strain-level diversity of *Corynebacteria* isolated from human facial skin. *BMC Microbiol*. 2023, *23*, 366.
324. Huang, R.Y.; Lee, C.N.; Moochhala, S. Circulating antibodies to skin bacteria detected by serological lateral flow immunoassays differentially correlated with bacterial abundance. *Front Microbiol*. 2021, *12*, 709562.
325. Farhan, M. The promising role of polyphenols in skin disorders. *Molecules*. 2024, *29*, 865.
326. Carolina Oliveira dos Santos, L.; Spagnol, C.M.; Guillot, A.J.; Melero, A.; Corrêa, M.A. Caffeic acid skin absorption: Delivery of microparticles to hair follicles. *Saudi Pharm J* 2019, *27*, 791-797.
327. Shi, B.; Leung, D.Y.M.; Taylor, P.A.; Li, H. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* colonization is associated with decreased skin commensal bacteria in atopic dermatitis. *J Invest Dermatol*. 2018, *138*, 1668-1671.
328. Severn, M.M.; Williams, M.R.; Shahbandi, A.; Bunch, Z.L.; Lyon, L.M.; Nguyen, A.; Zaramela, L.S.; Todd, D.A.; Zengler, K.; Cech, N.B.; et al. The ubiquitous human skin commensal *Staphylococcus hominis* protects against opportunistic pathogens. *mBio* 2022, *13*, e00930-00922.

329. Bier, K.; Schittek, B. Beneficial effects of coagulase-negative Staphylococci on Staphylococcus aureus skin colonization. *Exp Dermatol.* 2021, 30, 1442-1452.
330. Callejon, S.; Giraud, F.; Larue, F.; Buisson, A.; Mateos, L.; Grare, L.; Guyoux, A.; Perrier, E.; Ardiet, N.; Trompezinski, S. Impact of leave-on skin care products on the preservation of skin microbiome: An exploration of ecobiological approach. *Clin Cosmet Investig Dermatol.* 2023, 16, 2727-2735.
331. Janssens-Böcker, C.; Doberenz, C.; Monteiro, M.; de Oliveira Ferreira, M. Influence of Cosmetic Skincare Products with pH < 5 on the skin microbiome: A randomized clinical evaluation. *Dermatol Ther.* 2025, 15, 141-159.
332. Murphy, B.; Hoptroff, M.; Arnold, D.; Eccles, R.; Campbell-Lee, S. In-vivo impact of common cosmetic preservative systems in full formulation on the skin microbiome. *PLoS One.* 2021, 16, 1-13.
333. Iwase, T.; Uehara, Y.; Shinji, H.; Tajima, A.; Seo, H.; Takada, K.; Agata, T.; Mizunoe, Y. *Staphylococcus epidermidis* Esp inhibits *Staphylococcus aureus* biofilm formation and nasal colonization. *Nat.* 2010, 465, 346-349.
334. Chin, D.; Goncheva, M.I.; Flannagan, R.S.; Deecker, S.R.; Guariglia-Oropeza, V.; Ensminger, A.W.; Heinrichs, D.E. Coagulase-negative staphylococci release a purine analog that inhibits *Staphylococcus aureus* virulence. *Nat Commun.* 2021, 12, 1887.
335. Ahmad, K.; Win, T.; Jaffri, J.M.; Edueng, K.; Taher, M. Palm olein emulsion: A novel vehicle for topical drug delivery of betamethasone 17-valerate. *AAPS PharmSciTech.* 2018, 19, 371-383.
336. Ng, S.F.; Rouse, J.; Sanderson, D.; Eccleston, G. A comparative study of transmembrane diffusion and permeation of ibuprofen across synthetic membranes using franz diffusion cells. *Pharm.* 2010, 2, 209-223.
337. Wiechers, J.W.; Kelly, C.L.; Blease, T.G.; Dederen, J.C. Formulating for efficacy. *Int J Cosmet Sci* 2004, 26, 173-182.
338. Singh, R.P.; Gangadharappa, H.V.; Mruthunjaya, K. Phospholipids: Unique carriers for drug delivery systems. *J Drug Deliv Sci Technol.* 2017, 39, 166-179.
339. Pjanović, R.; Bošković-Vragolović, N.; Veljković-Giga, J.; Garić-Grulović, R.; Pejanović, S.; Bugarski, B. Diffusion of drugs from hydrogels and liposomes as drug carriers. *J Chem Technol Biotechnol.* 2010, 85, 693-968.
340. Marquele, F.D.; Oliveira, A.R.M.; Bonato, P.S.; Lara, M.G.; Fonseca, M.J.V. Propolis extract release evaluation from topical formulations by chemiluminescence and HPLC. *J Pharm Biomed Anal.* 2006, 41, 461-468.
341. Pravilović, R.; Balanč, B.; Djordjević, V.; Bošković-Vragolović, N.; Bugarski, B.; Pjanović, R. Diffusion of polyphenols from alginate, alginate/chitosan, and alginate/inulin particles. *J Food Process Eng* 2019, 42, e13043.
342. R. Dyja, A.J. The effect of additives on release and *in vitro* skin retention of flavonoids from emulsion and gel semisolid formulations. *Int J Cosmet Sci* 2017, 39, 442-449.
343. Arct, J.; Oborska, A.; Mojski, M.; Binkowska, A.; Świdzikowska, B. Common cosmetic hydrophilic ingredients as penetration modifiers of flavonoids. *Int J Cosmet Sci* 2002, 24, 357-366.
344. Sangiovanni, E.; Di Lorenzo, C.; Piazza, S.; Manzoni, Y.; Brunelli, C.; Fumagalli, M.; Magnavacca, A.; Martinelli, G.; Colombo, F.; Casiraghi, A.; et al. *Vitis vinifera* L. leaf extract inhibits *in vitro* mediators of inflammation and oxidative stress involved in inflammatory-based skin diseases. *Antioxidants.* 2019, 8, 134.
345. Rodrigues, L.A.; Cardeira, M.; Leonardo, I.C.; Gaspar, F.B.; Radojčić Redovniković, I.; Duarte, A.R.C.; Paiva, A.; Matias, A.A. Deep eutectic systems from betaine and polyols – Physicochemical and toxicological properties. *J Mol Liq.* 2021, 335, 116201.

346. SpecialChem. Betaine. Available online: <https://cosmetics.specialchem.com/ingredients/betaine> (Accessed 2 April 2025).
347. SpecialChem. Glycerol. Available online: <https://cosmetics.specialchem.com/ingredients/glycerin> (Accessed 2 April 2025).
348. Special Chem. Propylene glycol. Available online: <https://cosmetics.specialchem.com/ingredients/propylene-glycol> (Accessed 2 April 2025).
349. Special Chem. Sorbitol. Available online: <https://cosmetics.specialchem.com/ingredients/sorbitol> (Accessed 2 April 2025).
350. Special Chem. Glucose. Available online: <https://cosmetics.specialchem.com/ingredients/glucose> (Accessed 2 April 2025).
351. Special Chem. Urea. Available online: <https://cosmetics.specialchem.com/inci-ingredients/urea> (Accessed 2 April 2025).
352. Special Chem. Citric acid. Available online: <https://cosmetics.specialchem.com/inci-ingredients/citric-acid> (Accessed 2 April 2025).
353. Punzo, A.; Porru, E.; Silla, A.; Simoni, P.; Galletti, P.; Roda, A.; Tagliavini, E.; Samori, C.; Caliceti, C. Grape pomace for topical application: Green NaDES sustainable extraction, skin permeation studies, antioxidant and anti-inflammatory activities characterization in 3D human keratinocytes. *Biomolecules* **2021**, *11*, 1181.
354. García-Roldán, A.; Piriou, L.; Jauregi, P. Natural deep eutectic solvents as a green extraction of polyphenols from spent coffee ground with enhanced bioactivities. *Front Plant Sci.* **2023**, *13*.
355. Lazović, M.; Jović, M.; Petrović, M.; Dimkić, I.; Gašić, U.; Milojković Opsenica, D.; Ristivojević, P.; Trifković, J. Potential application of green extracts rich in phenolics for innovative functional foods: natural deep eutectic solvents as media for isolation of biocompounds from berries. *Food Funct.* **2024**, *15*, 4122-4139.
356. Meng, Z.; Zhao, J.; Duan, H.; Guan, Y.; Zhao, L. Green and efficient extraction of four bioactive flavonoids from Pollen Typhae by ultrasound-assisted deep eutectic solvents extraction. *J Pharm Biomed Anal.* **2018**, *161*, 246-253.
357. Aguilar, N.; Bol-Arreba, A.; Atilhan, M.; Aparicio, S. Theoretical insights into flavonol solubilization by deep eutectic solvents. *ACS Food Sci Technol.* **2023**, *3*, 1931-1947.
358. Rashid, R.; Mohd Wani, S.; Manzoor, S.; Masoodi, F.A.; Masarat Dar, M. Green extraction of bioactive compounds from apple pomace by ultrasound assisted natural deep eutectic solvent extraction: Optimisation, comparison and bioactivity. *Food Chem.* **2023**, *398*, 133871.
359. Bi, Y.; Chi, X.; Zhang, R.; Lu, Y.; Wang, Z.; Dong, Q.; Ding, C.; Yang, R.; Jiang, L. Highly efficient extraction of mulberry anthocyanins in deep eutectic solvents: Insights of degradation kinetics and stability evaluation. *Innova Food Sci Emerg Technol.* **2020**, *66*, 102512.
360. Bosiljkov, T.; Dujmić, F.; Cvjetko Bubalo, M.; Hribar, J.; Vidrih, R.; Brnčić, M.; Zlatic, E.; Radojčić Redovniković, I.; Jokić, S. Natural deep eutectic solvents and ultrasound-assisted extraction: Green approaches for extraction of wine lees anthocyanins. *Food Bioprod Process.* **2017**, *102*, 195-203.
361. Panić, M.; Gunjević, V.; Cravotto, G.; Radojčić Redovniković, I. Enabling technologies for the extraction of grape-pomace anthocyanins using natural deep eutectic solvents in up-to-half-litre batches extraction of grape-pomace anthocyanins using NADES. *Food Chem.* **2019**, *300*, 125185.
362. Palos-Hernández, A.; Gutiérrez Fernández, M.Y.; Escudra Burrieza, J.; Pérez-Iglesias, J.L.; González-Paramás, A.M. Obtaining green extracts rich in phenolic compounds from underexploited food by-products using natural deep eutectic solvents. Opportunities and challenges. *Sustain Chem Pharm.* **2022**, *29*, 100773.
363. Kovač, M.J.; Jokić, S.; Jerković, I.; Molnar, M. Optimization of deep eutectic solvent extraction of phenolic acids and tannins from *Alchemilla vulgaris* L. *Plants* **2022**, *11*, 474.

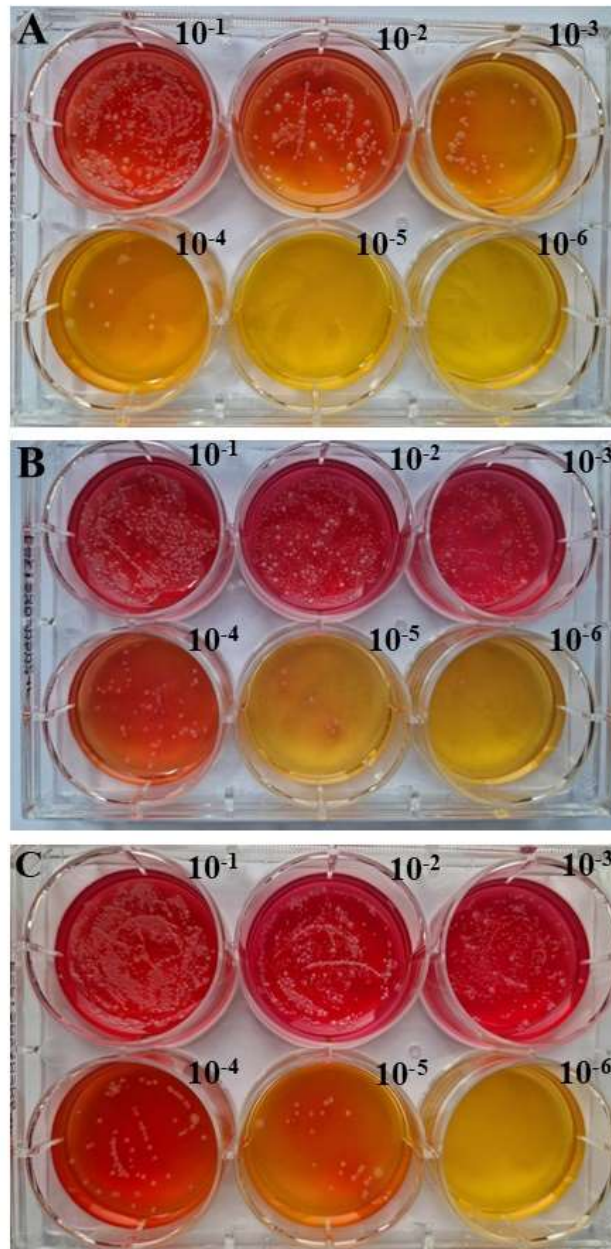
364. Xia, B.; Yan, D.; Bai, Y.; Xie, J.; Cao, Y.; Liao, D.; Lin, L. Determination of phenolic acids in *Prunella vulgaris* L.: A safe and green extraction method using alcohol-based deep eutectic solvents. *Anal Methods*. **2015**, *7*, 9354-9364.
365. Duan, L.; Dou, L.-L.; Guo, L.; Li, P.; Liu, E.H. Comprehensive evaluation of deep eutectic solvents in extraction of bioactive natural products. *ACS Sustain Chem Eng*. **2016**, *4*, 2405-2411.
366. Arnodo, D.; Maffei, E.; Marra, F.; Nejrotti, S.; Prandi, C. Combination of enzymes and deep eutectic solvents as powerful toolbox for organic synthesis. *Molecules*. **2023**, *28*, 516.
367. Guo, J.; Zhao, N.; Zhao, Y.; Jin, H.; Sun, G.; Yu, J.; Zhang, H.; Yu, M.; Yang, D.; Liang, Z. Effect of deep eutectic solvents on the activity and stability of cellulases and pectinases. *ACS Omega* **2023**, *8*, 45678-45686.
368. Marito, S.; Keshari, S.; Huang, C.-M. PEG-8 Laurate fermentation of *Staphylococcus epidermidis* reduces the required dose of clindamycin against *Cutibacterium acnes*. *Int J Mo lSci*. **2020**, *21*, 5103.
369. Inthalaeng, N.; Dugmore, T.I.J.; Matharu, A.S. Production of hydrogels from microwave-assisted hydrothermal fractionation of blackcurrant pomace. *Gels*. **2023**, *9*, 674.
370. Alba, K.; MacNaughtan, W.; Laws, A.P.; Foster, T.J.; Campbell, G.M.; Kontogiorgos, V. Fractionation and characterisation of dietary fibre from blackcurrant pomace. *Food Hydrocoll*. **2018**, *81*, 398-408.
371. Xiang, T.; Yang, R.; Li, L.; Lin, H.; Kai, G. Research progress and application of pectin: A review. *J Food Sci*. **2024**, *89*, 6985-7007.
372. Special Chem. Pektin. Available online: <https://cosmetics.specialchem.com/ingredients/pectin> ((Accessed 2 April 2025).
373. ISO 29621: Risk assessment and identification of microbiologically low-risk products in cosmetics. Available online: <https://ecomundo.eu/en/blog/understanding-low-risk-cosmetics-iso-29621-guide> (Accessed 2 April 2025).
374. Trudsoe, J.E.; Olsen, H.B. Personal care compositions with acidified pectins (EP2819641A2). **2013**.
375. Yu, Y.; Lu, P.; Yang, Y.; Ji, H.; Zhou, H.; Chen, S.; Qiu, Y.; Chen, H. Differences in physicochemical properties of pectin extracted from pomelo peel with different extraction techniques. *Sci Rep*. **2024**, *14*, 9182.
376. Willats, W.; Knox, J.P.; Mikkelsen, J.D. Pectin: new insights into an old polymer are starting to gel. *Trends Food Sci Technol*. **2006**, *17*, 97-104.
377. Muñoz-Almagro, N.; Ruiz-Torrallba, A.; Méndez-Albiñana, P.; Guerra-Hernández, E.; García-Villanova, B.; Moreno, R.; Villamiel, M.; Montilla, A. Berry fruits as source of pectin: Conventional and non-conventional extraction techniques. *Int J Biol Macromol* **2021**, *186*, 962-974.
378. Konrade, D.; Gaidukovs, S.; Vilaplana, F.; Sivan, P. pectin from fruit- and berry-juice production by-products: determination of physicochemical, antioxidant and rheological properties. *Foods*. **2023**, *12*, 1615.
379. Koziół, A.; Środa-Pomianek, K.; Górniak, A.; Wikiera, A.; Cyprych, K.; Malik, M. Structural determination of pectins by spectroscopy methods. *Coat*. **2022**, *12*, 546.
380. Sharma, P.; Osama, K.; Gaur, V.K.; Farooqui, A.; Varjani, S.; Younis, K. Sustainable utilization of Citrus limetta peel for obtaining pectin and its application in cookies as a fat replacer. *J Food Sci Technol*. **2023**, *60*, 975-986.
381. de Moura, F.A.; Macagnan, F.T.; dos Santos, L.R.; Bizzani, M.; de Oliveira Petkowicz, C.L.; da Silva, L.P. Characterization and physicochemical properties of pectins extracted from agroindustrial by-products. *J Food Sci Technol*. **2017**, *54*, 3111-3117.

Prilog 1



Slika P1. Broj koagulaza negativne bakterije *S. epidermidis* i koagulaza pozitivne bakterije *S. aureus* bez dodatka ekstrakta (A), sa dodatkom ekstrakta crne ribizle dobijenog enzimski potpomognutom ekstrakcijom pri koncentraciji od 5 μg GAE/mL (B) i 100 μg GAE/mL (C). Crvene kolonije potiču od koagulaza negativne bakterije, dok žute kolonije potiču od koagulaza pozitivne bakterije. Brojevi 10^{-1} - 10^{-6} se odnose na odgovarajuće razblaženje.

Prilog 2



Slika P2. Rast mikrobioma zdrave kože na manitol slanom agaru bez dodatka ekstrakta (A) i sa dodatkom ekstrakta crne ribizle pri koncentraciji od 5 μg GAE/mL (B) i ekstrakta tropa maline pri koncentraciji od 25 μg GAE/mL (C) koji su dobijeni enzimski potpomognutom ekstrakcijom. Crvene kolonije potiču od koagulaza negativnih bakterija, dok žute kolonije koje potiču od koagulaza pozitivnih bakterija nisu detektovane. Brojevi 10^{-1} - 10^{-6} se odnose na odgovarajuće razblaženje.

Biografija autora

Anja I. Petrov Ivanković rođena je 29. marta 1994. godine u Pirotu, gde je završila Osnovnu školu „8. septembar“, a zatim prirodno-matematički smer „Pete beogradske gimnazije“ sa odličnim uspehom. Osnovne akademske studije na Tehnološko-metalurškom fakultetu Univerziteta u Beogradu upisala je 2013. godine na studijskom programu Biohemijско inženjerstvo i biotehnologija koje je završila 2017. godine sa prosečnom ocenom 9,35. Master akademske studije na istom fakultetu upisala je 2017. godine na studijskom programu Hemijско inženjerstvo (obrazovni profil Farmaceutско inženjerstvo) i završila 2018. godine sa prosečnom ocenom 10,00. Tokom osnovnih i master akademskih studija bila je stipendista Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije. Doktorske akademske studije na Katedri za biohemijско inženjerstvo i biotehnologiju upisala je 2018. godine. Od marta 2019. godine zaposlena je u Inovacionom centru Tehnološko-metalurškog fakulteta kao istraživač-pripravnik, a od 2022. kao istraživač saradnik. Bila je angažovana i u nastavi, u izvođenju eksperimentalnih vežbi iz predmeta Opšta hemija 2 i Biotehnološki praktikum 1. Od 2022. godine angažovana je na projektu u okviru Programa IDEJE (PrintPrEnzy, 7750109). Dodatno stručno usavršavanje stekla je tokom istraživačkih poseta Medicinskom centru Univerziteta Radbad u Nijemgenu (Holandija) i Institutu za nauku o hrani (Madrid, Španija) u okviru projekta koji finansira program Horizon Europe 2021-2027 (TwinPrebioEnz, 101060130).

Koautor je osam radova u međunarodnim časopisima (jednog rada u M21a, pet radova u M21 i dva rada u M22 kategoriji), jednog rada u nacionalnom časopisu međunarodnog značaja (M24), jednog saopštenja sa međunarodnih konferencija štampanog u celosti (M33) i četrnaest saopštenja sa međunarodnih konferencija štampanih u sažetku (M34). Ukupan broj citata naučnih radova iznosi 40, a Hiršov indeks je $h = 4$.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Ања Петров Иванковић

Број индекса 4002/2018

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Ензимски потпомогнута производња пребиотика за топикалну примену и одређивање њихових структурних и функционалних својстава

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица.

Потпис аутора

У Београду, 14.04.2025.

Петров Иванковић

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Ања Петров Иванковић

Број индекса 4002/2018

Студијски програм Биохемијско инжењерство и биотехнологија

Наслов рада Ензимски потпомогнута производња пребиотика за топикалну примену и одређивање њихових структурних и функционалних својстава

Ментори проф. др Дејан Безбрадица и др Марија Ћоровић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањена у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис аутора

У Београду, 14.04.2025.


Ања Петров Иванковић

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Ензимски потпомогнута производња пребиотика за топикалну примену и одређивање њихових структурних и функционалних својстава

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.
Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, 14.04.2025.



1. Ауторство. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. Ауторство – некомерцијално – без прерада. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. Ауторство – без прерада. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. Ауторство – делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.

ОЦЕНА ИЗВЕШТАЈА О ПРОВЕРИ ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

На основу Правилника о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду и налаза у извештају из програма iThenticate којим је извршена провера оригиналности докторске дисертације „Ензимски потпомогнута производња пребиотика за топикалну примену и одређивање њихових структурних и функционалних својстава”, аутора **Ање Петров Иванковић, мастер инж. технологије**, констатујемо да утврђено подударање текста износи 9%. Овај степен подударности претежно је последица употребљених личних имена, библиографских података о коришћеној литератури, детаљног описа примењених аналитичких техника, као и претходно публикованих резултата докторандових истраживања, који су проистекли из њене дисертације што је у складу са чланом 9. Правилника.

На основу свега изнетог, а у складу са чланом 8. став 2. Правилника о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду, изјављујемо да извештај указује на оригиналност докторске дисертације, те се прописани поступак припреме за њену одбрану може наставити.

20. 5. 2025. године

Ментори

D. Bezbradić

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

M. Čorović

Др Марија Ћоровић, виши научни сарадник
Универзитет у Београду,
Технолошко-металуршки факултет