

Факултет ТЕХНОЛОШКО-
МЕТАЛУШКИ

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ

35/371

Веће научних области техничких наука

(Број захтева)

(Назив већа научне области коме се захтев
упућује)

11.01.2022.

(Датум)

ЗАХТЕВ

за давање сагласности на одлуку о прихватању теме докторске дисертације
и о одређивању ментора

Молимо да, сходно члану 47. ст. 5. тач. 3. Статута Универзитета у Београду ("Гласник Универзитета", број 186/15-пречишћени текст и 189/16), дате сагласност на одлуку о прихватању теме докторске дисертације:

Ензимски потпомогнута производња пребиотика за топикалну примену и
одређивање њихових структурних и функционалних својстава

(пун назив предложене теме докторске дисертације)

НАУЧНА ОБЛАСТ ТЕХНОЛОШКО ИНЖЕЊЕРСТВО

ПОДАЦИ О КАНДИДАТУ:

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

Ања (Иван) Петров

2. Претходно образовање (назив и седиште факултета, студијски програм):

Универзитет у Београду,

Технолошко-металуршки факултет, Мастер студије, Мастер инжењер технологије

3. Година завршетка
претходног нивоа студија: 2018.

4. Година уписа на докторске студије: 2018.

5. Назив студијског програма
докторских студија:

Биохемијско инжењерство и биотехнологија

ПОДАЦИ О МЕНТОРУ :

Име и презиме ментора: др Дејан Безбрадица

Звање: редовни професор

Списак радова који квалификују ментора за вођење докторске дисертације:

Списак радова који квалификују ментора за вођење докторске дисертације:

1. Milivojević A., Ćorović A., Carević M., Banjanac K., Vujisić Lj., Veličković D., **Bezbradica D.** (2017) Highly efficient enzymatic acetylation of flavonoids: Development of solvent-free process and kinetic evaluation. *Biochemical Engineering Journal* 128: 106-115. (ISSN: 1369-703X; IF=2,892)
2. Milisavljević A., Stojanović M., Carević M., Mihailović M., Veličković D., Milosavić N., **Bezbradica D.** (2014) Lipase-Catalyzed Esterification of Phloridzin: Acyl Donor Effect on Enzymatic Affinity and Antioxidant Properties of Esters. *Industrial and Engineering Chemistry Research* 53: 16644-16651. (ISSN: 0888-5885; IF=2,587)
3. Trbojević Ivić J., Milosavić N., Dimitrijević A., Gavrović Jankulović M., **Bezbradica D.**, Kolarski D., Veličković D. (2017) Synthesis of medium-chain length capsinoids from coconut oil catalyzed by *Candida rugosa* lipases. *Food Chemistry* 218: 505-508. (ISSN: 0308-8146; IF=4,529)
4. Milivojević A., Ćorović M., Simović M., Banjanac K., Blagojević S., Pjanović R., **Bezbradica D.** (2019) Novel Approach for Flavonoid Esters Production: Statistically Optimized Enzymatic Synthesis Using Natural Oils and Application in Cosmetics. *Industrial & Engineering Chemistry Research* 58: 3640-3649. (IF(2018)=3.375) (ISSN: 0888-5885; IF=3,375).
5. Milivojević A., Ćorović M., Simović M., Banjanac K., **Bezbradica D.** (2020) Flavonoid esters synthesis using novel biocatalytic systems - CAL B immobilized onto LifeTech™ ECR supports. *Biochemical Engineering Journal* 163: 107748 (ISSN: 1369-703X; IF=3,475).

ДЕКАН ФАКУЛТЕТА

Проф.дрПетарУскоковћ

- Прилог
1. Одлука Наставно-научног већа о прихватању теме и одређивању ментора
 2. Извештај Комисије о оцени научне заснованости теме докторске дисертације

Напомена: Факултет доставља Универзитету захтев са прилозима у електронској форми и у једном писаном примерку за архиву Универзитета

На основу чл. 40. став 3. Закона о високом образовању, чл. 112. став 3. Статута Универзитета у Београду, чл. 88. став 3. Статута ТМФ-а и чл.43. Правилника о докторским студијама ТМФ-а на седници Наставно-научног већа Технолошко-металуршког факултета од 23.12.2021. године, донета је

О Д Л У К А

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

Прихвата се Реферат Комисије за оцену подобности теме и кандидата и одобрава израда докторске дисертације **Ање Петров**, број индекса 4002/2018, под називом: **„Ензимски потпомогнута производња пребиотика за топикалну примену и одређивање њихових структурних и функционалних својстава“**.

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

За ментора се одређује др Дејан Безбрадица, редовни професор Универзитета у Београду, Технолошко-металуршки факултет.

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

Д Е К А Н

Проф. др Петар Ускоковић

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ

Предмет: Подобност теме и кандидата Ање Петров за израду докторске дисертације

Одлуком 35/297 бр. од 18.11.2021. године, именовани смо за чланове Комисије за оцену подобности теме и кандидата Ање Петров за израду докторске дисертације и научне заснованости теме „Ензимски потпомогнута производња пребиотика за топикалну примену и одређивање њихових структурних и функционалних својстава“.

На основу материјала приложеног уз Захтев кандидата, Комисија подноси следећи

РЕФЕРАТ

1. Подаци о кандидату

1.1. Биографски подаци

Ања Петров, мастер инжењер технологије, рођена је 29.03.1994. године у Пироту, где је завршила основну школу. Школовање је наставила у Београду, где је завршила природно-математички смер Пете београдске гимназије са одличним успехом. Основне академске студије на Технолошко-металуршком факултету Универзитета у Београду, студијски програм Биохемијско инжењерство и биотехнологија, уписала је 2013. године, а завршила 2017. године са просечном оценом 9,33 и оценом 10 на завршном раду под називом „Одређивање физиолошких својстава два нова соја *Bacillus aryabhattai* врсте“. Мастер академске студије, студијски програм Хемијско инжењерство и изборно подручје Фармацеутско инжењерство, на истом факултету, започела је 2017. године, а завршила 2018. године са просечном оценом 10,00. Завршни мастер рад под називом „*In vitro* анализа трансдермалне дифузије естара флавоноида“ одбранила је са оценом 10 и тиме стекла звање мастер инжењер технологије – мастер хемијски инжењер. Докторске академске студије је уписала школске 2018/2019. године на Технолошко-металуршком факултету Универзитета у Београду, студијски програм Биохемијско инжењерство и биотехнологија, под менторством проф. др Дејана Безбрадице.

Током основних и мастер академских студија Ања Петров је била стипендиста Министарства просвете, науке и технолошког развоја и награђена је дипломом Технолошко-металуршког факултета за успех у студирању „Панта С. Тутунџић“.

1.2. Стечено научноистраживачко искуство

Ања Петров је положила све испите предвиђене планом и програмом докторских академских студија, као и завршни испит са темом „Пребиотици и пробиотици за козметику“. Списак положених испита, остварених ЕСПБ бодова и оцена приказани су у табели која следи:

Предмет	Оцена	ЕСПБ
Одабрана поглавља математичке анализе	10	5
Хемијска кинетика	9	5
Аналогије феномена преноса	10	5
Одабрана поглавља биохемије - витамини	10	5
Биоактивне материје у козметичким производима	10	4
Инжењерство ћелије	10	5
Одабрани микробиолошки процеси у заштити животне средине	10	4
Санитарна микробиологија	10	4
Имбилисани биокатализатори: технике имобилизације, биореактори и примена	10	6
Феномени преноса у биолошким системима	10	5
Одабрана поглавља технологије микробне биомасе	10	5
Енглески језик	10	
Завршни испит	10	30
Просечна оцена / Укупно бодова	9,92	83

Изабрана је у звање истраживач приправник 07.03.2019. године, а од 15.03.2019. године је запослена у Иновационом центру Технолошко-металуршког факултета у Београду на пројекту Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије под називом „Развој нових инкапсулационих и ензимских технологија за производњу биокатализатора и биолошки активних компонената хране у циљу повећања њене конкурентности, квалитета и безбедности“ (ИИИ 46010).

Од 2018. године је била ангажована у настави у извођењу експерименталних вежби из предмета Општа хемија 2 (школске 2018/2019 године) и Биотехнолошки практикум 1 (школске 2019/2020; 2020/2021; 2021/2022 године). Помагала је у експерименталном раду и обради резултата неколико мастер и завршних радова студената на Катери за биохемијско инжењерство и биотехнологију.

У оквиру научно-истраживачког рада Ања Петров се бавила истраживањима у области пребиотика, пробиотика и дифузије биоактивних компоненти. На основу досадашњих резултата ових истраживања проистекао је рад у националном часопису међународног значаја (М24), саопштење са међународног скупа штампано у целини (М33) и саопштење са међународног скупа штампано у изводу (М34), док су у припреми два рада за публикавање у међународним часописима.

Списак објављених научних радова и саопштења:

Рад у националном часопису међународног значаја (М24):

1. Veljković M., Modi A., **Petrov A.**, Ćorović M., Milivojević A., Banjanac K., Simović M., Bezbradica D.: *Enzymatic synthesis of fructo-oligosaccharides using Pectinex® Ultra SP-L: A study of experimental conditions*, - Food and Feed Research, Vol 48, No 2, 2021 (in press).

Саопштење са међународног скупа штампано у целини (M33):

1. Veljković M., **Petrov, A.**, Simović, M., Banjanac, K., Mitrušić, A., Katić, K., Marinković A.: *Development of fructosyltransferase nanobiocatalyst systems for application in synthesis of bioactive fructo-oligosaccharides*, - Proceedings of the 7th International Congress of Engineering, Environment and Materials in Process Industry, Jahorina, 2021., pp. 314-325.

Саопштење са међународног скупа штампано у изводу (M34):

1. **Petrov, A.**, Ćorović, M., Milivojević A., Skenderija J., Vukočić A., Pjanović R., Bezbradica D.: *Effect of galacto-oligosaccharides on Staphylococcus epidermidis growth and examination of their diffusion from cosmetic formulations*, - Book of Abstracts of the 7th International Congress of Engineering, Environment and Materials in Process Industry, Jahorina, 2021., pp. 140.

1.3. Оцена подобности кандидата за рад на предложеној теми

На основу досадашњег рада и показаних резултата током последипломских студија, Ања Петров, мастер инжењер технологије, показала је склоност и изразиту способност за бављење научно-истраживачким радом. Истраживање на предложеној теми докторске дисертације укључује експериментални рад у области микробиологије, оптимизацију ензимских реакција и формулисање и карактеризацију козметичких производа, а кандидаткиња је стекла значајно искуство и вештине неопходне за ове експерименталне активности током израде завршног и мастер рада, као и при извођењу лабораторијских вежби на Катедри за биохемијско инжењерство и биотехнологију. У области истраживања била је коаутор једног рада у часопису међународног значаја (M24) и два саопштења са међународног скупа (M33 и M34). На основу свега наведеног, Комисија закључује да кандидат испуњава услове за рад на предложеној теми докторске дисертације.

2. Предмет и циљ истраживања

Предмет истраживања ове докторске дисертације је ензимска производња пребиотика намењених топикалној примени, испитивање њиховог утицаја на микробиоту коже и оптимизација примене у различитим козметичким формулацијама.

Кожа, највећи људски орган, је колонизирана различитим врстама микроорганизама који се заједничким именом називају микробиотом коже [1]. Интеракције између домаћина и његове микробиоте заснивају се на симбиотском односу захваљујући ефикасном деловању имунолошког система. Овај сложени однос обезбеђује контролисану микробиолошку равнотежу која је предуслов за очување здраве коже. Међутим, ендогени и екзогени утицаји којима је кожа константно изложена могу подстаћи прекомерни раст патогених врста и довести до дисбаланса састава дермалне микробиоте [2]. Недостатак компензационих механизма отвара могућност настанка запаљенских стања коже попут псоријазе, атопијског дерматитиса, акни и др. [3]. Досадашње лечење кожних обољења, насталих као последица прекомерне пролиферације бактерија, подразумева употребу

антибиотици који неселективно инхибирају бактеријски раст и смањују микробни диверзитет. Из тих разлога, као нов и перспективан приступ сузбијања инфекција јавља се идеја о локалној примени козметичких формулација са пребиотским активним састојцима у циљу поновног успостављања баланса микробиоте коже [4].

Пребиотици, према најновијој дефиницији, представљају супstrate које микроорганизми селективно користе обезбеђујући благотворне ефекте на људско здравље. Њихов механизам деловања укључује инхибицију размножавања штетних, уз истовремено очување и/или стимулацију размножавања корисних микроорганизама. Појам пребиотика се првенствено односио на угљене хидрате попут галакто- и фрукто-олигосахарида, али нова истраживања указују да се може проширити и на друге класе једињења, попут полифенола [5,6]. Галакто- и фрукто-олигосахариди спадају у групу функционалних олигосахарида са потврђеним пребиотским утицајем на цревну микробиоту. Најчешће коришћене методе њиховог добијања заснивају се на ензимски катализованим процесима у којима се добијају производи различитог састава (степен полимеризације и врсте хемисјких веза) у зависности од реакционих услова и врсте примењеног ензима [7]. Њихово пребиотско дејство огледа се у стимулацији раста бифидобактерија и сузбијању патогеног раста чиме показују благотворне ефекте на људско здравље. Најновија научна истраживања указују да конзумација поменутих врста олигосахарида може убрзати лечење кожных обољења попут atopијског дерматитиса. С друге стране, њиховатопијална примена и утицај на састав микробиоте коже у козметичким формулацијама још увек нису детаљно истражени [6,7].

Полифеноли представљају разноврсну групу фитохемикалија које настају као производи секундарног метаболизма виших биљака, а њихови главни извори су (бобичасто) воће, поврће, лековито биље и кора дрвета попут бора, храста и цимета. Често се примењују у храни, козметичким и фармацеутским производима због биокомпатибилности и снажног антиоксидативног дејства [8]. Могу се јавити у слободном, естерификованом или нерастворно-везаном облику, у зависности од тога да ли су слободна или ковалентно везана за друге молекуле као што су масне киселине (растворни естри) или нерастворни макромолекули. Нерастворно-везани полифеноли су ковалентно везани за супстанце ћелијског зида, укључујући пектин, целулозу и структурне протеине. С обзиром на то да је заступљеност нерастворно-везаних полифенола знатно већа од слободних, а у циљу повећања садржаја укупних полифенола, неопходно је да буду ослобођени из ћелијског зида биљака. Најчешће коришћене методе за екстракцију нерастворно-везаних полифенола су кисела и алкална хидролиза. Међутим, недостатак ових метода је то што могу довести до деградације или структурних промена у полифенолима или захтевају више корака што сам поступак чини сложенијим. Стога, бољи и ефикаснији метод за екстракцију нерастворно-везаних полифенола представља ензимски потпомогнута екстракција. Генерално, ензими (целулазе, хемицелулазе, пектиназе, амилазе, глуканазе и естеразе) разграђују угљене хидрате (целулозу, хемицелулозу, пектин и глукан) који улазе у састав ћелијског зида биљака или естарске везе између угљенохидратног ланца и фенолних једињења, чиме побољшавају продор молекула растварача и олакшавају екстракцију нерастворно-везаних фенола [9].

Циљ ове докторске дисертације је развој ефикасних ензимских поступака за производњу дермалних пребиотика за топијалну примену. Почетна фаза истраживања биће посвећена одабиру дермалних пребиотика одређивањем пребиотске активности потврђених пребиотика, попут галакто- и фрукто-олигосахарида, и биљних екстраката богатих

полифенолним једињењима. Пребиотска активност ће у овим прелиминарним експериментима бити одређена праћењем утицаја потенцијалних пребиотика на раст чистих култура три бактерије - *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus* и *Cutibacterium acnes*. *S. aureus* и *C. acnes* су доминантни кожни патогени са способношћу да производе факторе вируленције који погоршавају дерматолошко стање атопијског дерматитиса, односно акни [10,11]. С друге стране, *S. epidermidis* је најчешћи члан нормалне микробиоте коже и сматра се микроорганизмом корисним за здравље коже, јер производи ензиме и антимикробне пептиде који могу спречити колонизацију наведених патогена [12]. На тај начин директно помаже у сузбијању поменутих кожных обољења. Одабир потенцијалних пребиотика биће заснован на процени способности анализираних једињења и смеша да стимулишу раст *S. epidermidis* и инхибирају раст *S. aureus* и/или *C. acnes* праћењем утицаја додатака потенцијалних пребиотика у течну хранљиву подлогу на раст поменутих бактерија методом индиректног бројања колонија на чврстим хранљивим подлогама. У другој фази истраживања, након избора биљних екстраката са пребиотским дејством, експерименти ће бити усмерени ка оптимизацији ензимски потпомогнуте екстракције. Утицај кључних експерименталних фактора (температура, концентрација и врста органског растварача, концентрација и врста ензима и време ензимске хидролизе) на екстракцију полифенола ће бити испитан и екстракција ће бити оптимизована применом статистичких метода планирања експеримената и методе одзивних површина (RSM) [13]. За разградњу ћелијског зида биће коришћени ензимски препарати Pectinex Ultra SP-L и Viscozyme L са израженом пектинолитичком активношћу и Cellic CTec3 HS који има целулолитичку и хемицелулолитичку активност. Детектовање полифенола у добијеним екстрактима биће извршено на два начина: одређивањем концентрације укупних полифенола, флавоноида и антоцијана спектрофотометријским методама и њиховим раздвајањем и праћењем појединачних компонената помоћу реверзно-фазне течне хроматографије високих перформанси (RP-HPLC) са UV детекцијом. Такође, биће праћена антиоксидативна активност екстраката применом неколико спектрофотометријских метода (DPPH, FRAP, ABTS метода). Трећа фаза истраживања биће посвећена установљивању корелације између пребиотске активности и хемијске структуре пребиотика. Фракционисање екстракта биће изведено помоћу мембранских сепарација (ултрафилтрација и нанофилтрација) и семи-препаративне RP-HPLC. Фракције за које буде утврђено да поседују најјаче пребиотско дејство ће бити структурно окарактерисане применом течне хроматографије високих перформанси спрегнуте са тандем масеном спектрометријом (HPLC-MS/MS) и нуклеарно-магнетно-резонантне (NMR) спектроскопије. У завршној фази докторске дисертације биће оптимизована примена одабраних пребиотика у козметичким производима. У том циљу, биће испитана могућност њиховог инкорпорирања у различите козметичке формулације и праћена брзина дифузије у стандардној Францовой ћелији [14]. Први део истраживања биће изведен са целулоза- ацетатном мембраном да би се идентификовале разлике у дифузионим профилима различитих једињења, као и разлике у профилима добијених дифузијом пребиотских једињења из различитих формулација. У другом делу ће дифузија карактеристичних топијалних пребиотика из најпогоднијих козметичких препарата бити испитана у систему са синтетском мембраном која представља модел систем за трансдермални пренос масе. Ови експерименти ће омогућити да се утврди да ли најперспективнији пребиотици путем трансдермалног преноса могу пенетрирати у дубље слојеве коже или остају у

површинским слојевима, а самим тим и да се процени ефикасност њихове примене у козметичким производима и евентуални нежељени ефекти [14,15].

Последњих година објављени су резултати бројних истраживања која се, из различитих аспеката, баве проблематиком дермалних пребиотика. У даљем тексту наведени су само најважнији који представљају основу за истраживања у оквиру ове докторске дисертације:

- [1] Dréno B., Araviiskaia E., Berardesca E., Gontijo G., Sanchez Viera M., Xiang L.F., Martin R., Bieber T.: *Microbiome in healthy skin, update for dermatologists*, - Journal of Dermatological Science, Vol 30, No 12, 2016, pp. 2038-2047.
- [2] Grice E., Segre J.: *The skin microbiome*, - Nature Reviews Microbiology, Vol 9, No 4, 2011, pp. 244-253.
- [3] Musthaq S., Mazuy A., Jakus J.: *The microbiome in dermatology*, - Clinics in Dermatology, vol 36, No 3, 2018, pp. 390-398.
- [4] Krutmann J.: *Pre- and probiotics for human skin*, - Journal of Dermatological Science, Vol 54, No 1, 2009, pp. 1-5.
- [5] Al-Ghazzewi F.H., Tester R.F.: *Impact of prebiotics and probiotics on skin health*, - Beneficial Microbes, Vol 5, No 2, 2014, pp. 99-107.
- [6] Nazzaro F., Fratianni F., De Feo V., Battistelli A., Da Cruz A.G., Coppola R.: *Polyphenols, the New Frontiers of Prebiotics*, - Advances in Food and Nutrition Research, Vol 94, 2020, pp. 35-89.
- [7] Di Lodovico S., Gasparri F., Di Campli E., Di Campli E., Di Fermo P., Cellini L., Di Giulio M.: *Prebiotic combinations effects on the colonization of staphylococcal skin strains*, - Microorganisms, Vol 9, No 1, 2021, pp. 1-15.
- [8] Zillich O.V., Schweiggert-Weisz U., Eisner P., Kersch M.: *Polyphenols as Active Ingredients for Cosmetic Products*, - International Journal of Cosmetic Science, Vol 37, No 5, 2015, pp. 455-464.
- [9] Shahidi F., Yeo J.D.: *Insoluble-Bound Phenolics in Food*, - Molecules, Vol 21, No 9, 2016, 1216.
- [10] 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, Vol 7, No 9, 2019, 301.
- [11] 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?*, - Dermatology, Vol 235, No 4, 2019, pp. 287-294.
- [12] Yu Y., Dunaway S., Champer J., Kim J., Alikhan A.: *Changing our microbiome: probiotics in dermatology*, - British Journal of Dermatology, Vol 182, No 1, 2020, pp. 39-46.
- [13] Landbo A.K., Meyer A.S.: *Enzyme-assisted extraction of antioxidative phenols from black currant juice press residues (Ribes nigrum)*, - Journal of Agricultural and Food Chemistry, Vol 49, No 7, 2001, pp. 3169-3177.
- [14] Brunaugh A., Smyth H., Williams R. III: *Topical and Transdermal Drug Delivery*, - Essential Pharmaceutics, 2019, pp. 131-147.
- [15] Bartosova L., Bajgar J.: *Transdermal Drug Delivery In Vitro Using Diffusion Cells*, - Current Medicinal Chemistry, Vol 19, No 27, 2012, pp. 4671-4677.

3. Полазне хипотезе

Нова дефиниција пребиотика из 2017. године према којој је пребиотик „супстрат који селективно користе микроорганизми домаћина у његову корист“ је прва која укључује и пребиотике који делују на микробиоту коже. Прегледом актуелне научне периодике може се установити да расте интересовање научне јавности за пребиотике коже. Проучавањем састава микробиоте коже и утицаја микроорганизма на здравље и интегритет коже установљено је да поједини показују патогено дејство, па је повећана концентрација ових бактерија карактеристична за одређена дерматолошка обољења и поремећаје. Поједине бактерије, као што је *S. epidermidis*, показују пробиотско дејство па се могу примењивати као пробиотици у лечењу акни и атопијског дерматитиса, а новија истраживања су доказала да неколико једињења (галакто-олигосахариди, инулин, ксилитол и биљни полифеноли) селективно стимулишу раст ове бактерије при топикалној примени, па се могу сматрати дермалним пребиотикима. Изучавање пребиотског дејства полифенола биљног порекла је нарочито пропульзивна област због великог броја биљака које могу бити извор ове врсте физиолошке активности

Технолошки процеси за производњу пребиотика за топикалну примену се још налазе у фази развоја па се значајна унапређења могу постићи применом знања и техника из области биохемијског инжењерства. Екстракција потенцијалних пребиотика из биљног материјала је у неколико претходних истраживања оптимизована са аспекта састава растварача, температуре екстракције и врсте екстракције, а постоје и публикације у којима је установљен позитиван утицај додатка ензима у току екстракције на ефикасност екстракције полифенола. Ипак, ензимски потпомогнуте екстракције нису довољно оптимизоване за селективну екстракцију која би омогућила достизање високих концентрација полифенола у екстракту уз што виши степен чистоће. Најважнија препрека бржем развоју нових дермалних пребиотика је недостатак поузданих *in vitro* метода за праћење пребиотске активности добијених екстраката које би омогућиле бржу идентификацију најпотентнијих екстраката и смањење обима експерименталног рада при оптимизацији. Примена ових метода у спрези са инструменталном анализом екстраката може да омогући и идентификацију компонената биљног екстракта које имају пребиотску активност. Такође, примена дермалних пребиотика и њихова карактеризација као биоактивних компоненти у козметичким формулацијама није детаљно испитана.

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

- Микробиота људске коже значајно утиче на одржавање нормалне функције коже, а дисбаланси микробиоте су карактеристични за поједина кожна обољења и поремећаје. Пребиотици, једињења која селективно стимулишу раст бактерија које имају позитиван утицај на кожу, зато могу бити погодне активне супстанце препарата за превенцију или лечење ових обољења. Биљни екстракти који садрже полифенолна једињења су препознати као добар извор потенцијалних дермалних пребиотика, а доказивање њихове активности и идентификација компонената екстракта одговорних за пребиотско дејство представљају актуелне теме истраживања. У почетном делу истраживања у овој дисертацији биће развијене нове *in vitro* методе за одређивање дермалне пребиотске активности које ће бити искоришћене за одабир биљака које су најбољи потенцијални извор пребиотика. За детекцију пребиотске активности ће у прелиминарној фази бити праћен утицај пребиотика у основну хранљиву подлогу на раст чистих култура нормалног члана

микробиоте коже *S. epidermidis* и кожных патогена *S. aureus* и *C. acnes*. У другој фази, ради финалне потврде пребиотске активности, биће анализиран утицај изабраних кандидата на раст мешовите културе ове три бактерије, а за анализу састава мешовите културе биће примењена денатуришућа градијентна гел електрофореза (DGGE). Одабрани узорци биће испитани и применом савремене - qPCR (квантитативна ланчана реакција полимеразе за детекцију живих ћелија) методе која омогућава прецизно квантификовање броја живих ћелија појединачних микробних врста у мешовитим културама. Применом ових метода биће истражена хипотеза да постоје биљне компоненте које селективно стимулишу раст пробиотских а инхибирају раст патогених бактерија микробиоте коже.

- Друга хипотеза је да постоји корелација између хемијске структуре биљних полифенола и пребиотске активности. Идентификовање компонената које показују пребиотску активност биће изведено у две етапе. У првој ће бити, праћене промене концентрације компонената биљног екстракта у току ферментације пробиотикакоже *S. epidermidis* реверзно-фазном течном хроматографијом високих перформанси (RP-HPLC). Ово ће омогућити да се идентификују делови хроматографског профила у којима долази до највећих промена током микробиолошких тестова. У наредној етапи биће изведено фракционисање биљних екстраката применом семи-препаративне RP-HPLC, а изоловане фракције биће примењене у микробиолошким тестовима да би се идентификовале фракције које имају највећу пребиотску активност. Карактеризација једињења која поседују пребиотску активност биће изведена савременим инструменталним методама ради расветљавања корелације између хемијске структуре и пребиотске активности.
- Екстракција полифенолних једињења из биљног материјала може значајно унапредити применом ензима који катализују разградњу структурних полимера који улазе у састав биљних ћелија и омогућавају да се екстракција одвија у условима који су прихватљивији за примену у прехранбеној индустрији и козметици. Ензимски потпомогунта екстракција је примењивана за добијање биљних екстраката са потенцијалним пребиотским дејством, али недостаје детаљна оптимизација реакционих услова. У оквиру ове дисертације ензимски потпомогнута екстракција биће оптимизована применом статистичког планирања експеримената и методе одзивних површина. Биће анализирано више ензима који катализују хидролизу структурних компоненти ћелијског зида (целулазе, хемицелулазе, пектиназе, лаказе) и експерименталних фактора (температура, концентрација ензима, концентрација органског растварача), а одзивне величине биће концентрација укупних полифенола, и антиоксидативна активност екстраката и концентрација једињења чија пребиотска активност је потврђена микробиолошким тестовима. Као потенцијално погодни, еколошки прихватљиви и биокомпатибилни системи за екстракцију полифенолних једињења из одабраних биљака, биће тестирани и еутектички растварачи на бази холин хлорида и јабучне киселине, фруктозе или урее. Ефикасност ових смеша као медијума за екстракцију потенцијалних дермалних пребиотика биће испитана и у поступцима потпомогнутим деловањем ултразвука и микроталаса.
- Финални циљ дисертације је постизање значајног доприноса у развоју технолошког процеса производње нових дермалних пребиотика. У циљу избора оптималног начина концентровања и пречишћавања екстракта биће анализирани и

оптимизоване методе упаравања под сниженим притиском, ултрафилтрације, нанофилтрације и реверзно-фазне хроматографије. Посебан акценат биће стављен и на испитивање примене пречишћених дермалних пребиотика у различитим козметичким формулацијама па ће бити испитана могућност инкорпорације у различите врсте емулзија (класичне емулзије типа уље у води, вода у уљу и гел емулзије), као и инкапсулација у липозоме као системе за контролисано отпуштање. Након тога, биће испитана брзина отпуштања активних компоненти из различитих система, а на основу дифузионих експеримената изведених са целулозно-ацетатном мембраном, а касније и применом Strat-M® мембране која симулира трансдермални пренос, биће представљене криве отпуштања различитих биоактивних молекула и одређени ефективни коефицијенти дифузије применом одговарајућих модела.

4. Научне методе истраживања

Пребиотска активност биће одређена микробиолошким тестовима заснованим на одређивању броја бактерија методом индиректног бројања колонија на чврстим хранљивим подлогама у чистим културама представника микробиоте коже и применом DGGE и qPCR методе у мешовитим културама одабраних микроорганизама. Састав биљних екстраката током екстракције и микробиолошких тестова биће праћен применом RP-HPLC помоћу аналитичке C18 колоне при градијентном режиму рада, а као мобилне фазе биће коришћене смеше метанол и вода, или ацетонитрил и вода. Иста метода биће употребљена и у циљу изоловања и пречишћавања производа, и то применом семи-препаративне RP-HPLC са фракционим колектором. У оба случаја производи ће бити детектовани и квантификовани помоћу UV-VIS детектора. Ток ензимски потпомогнуте хидролизе биљног материјала биће праћен одређивањем садржаја укупних полифенола, као и концентрације антоцијана и флавоноида класичним спектрофотометријским методама. Карактеризација једињења која покажу пребиотску активност биће изведена помоћу течне хроматографије високих перформанси спрегнуте са тандем масеном спектроскопијом (HPLC-MS/MS) и NMR спектроскопија. За планирање експеримента, статистичку анализу и интерпретацију добијених резултата биће коришћен софтверски пакет Stat Ease Design Expert, као и програмски пакет MATLAB. У циљу одређивања антиоксидативне активности биљних екстраката, примењиваће се спектрофотометријске методе (DPPH, FRAP, ABTS). Дифузија биоактивних компоненти из козметичких формулација и липозома биће праћена коришћењем стандардне Францове ћелије и целулозно-ацетатне мембране у почетним експериментима, а касније и синтетске мембране Strat-M® која представља модел систем за трансдермални пренос масе.

5. Очекивани научни допринос

Очекује се да ће резултати до којих се дође у оквиру ове дисертације дати значајан научни допринос развоју технолошких поступака за добијање пребиотика коже. У оквиру истраживања може се очекивати неколико основних доприноса:

- Биће идентификоване супстанце са пребиотским дејством на микробиоту коже, што укључује неколико доприноса:

- биће развијене нове *in vitro* микробиолошке методе за детекцију пребиотика коже и одређивање пребиотске активности,
- биће детектовани биљни екстракти или олигосахариди који поседују дермалну пребиотску активност,
- биће идентификоване фракције биљних екстракта које поседују највећу пребиотску активност,
- применом метода за одређивање пребиотске активности и инструменталне анализе, биће идентификоване и окарактерисане компоненте биљног екстракта које поседују највећу пребиотску активност.
- Биће развијен нови технолошки поступак добијања биљних екстраката са пребиотским дејством на микробиоту коже, што укључује неколико доприноса:
 - биће идентификовани ензими који омогућавају ефикасну разградњу биљних ћелија и олакшану екстракцију једињења која поседују пребиотску активност,
 - биће одређени оптимални услови екстракције (температура, концентрација ензима, време, врста и концентрација органског растварача),
 - биће оптимизован састав еутектичких смеша као алтернативних растварача за екстракцију полифенолних једињења из одабараних биљака, као и услови саме екстракције, укључујући време и снагу примењених микроталаса или ултразвука,
 - биће развијене методе концентровања и пречишћавања биљног екстракта које омогућавају максималну активност пребиотског производа.
- Биће развијене козметичке формулације са инкорпорираним пребиотицима, што подразумева:
 - пребиотици ће бити инкорпорирани у класичне емулзије типа вода у уљу, уље у води и гел емулзије и емулзије типа вода у уљу на бази природних емулгатора и биће испитана стабилност добијених емулзија,
 - пребиотици ће бити инкапсулирани у липозоме чија је мембрана изграђена од различитих засићених и незасићених фосфолипида и биће извршена карактеризација добијених честица,
 - биће одређена брзина дифузије и анализирана ефикасност трансдермалног преноса пребиотика из наведених козметичких формулација,
 - биће изабран најпогоднији систем за контролисано отпуштање дермалних пребиотика из козметичких формулација.

Поред набројаног, резултати ове дисертације ће дати значајан научни допринос у проналажењу корелације између структуре пребиотика и њихове пребиотске активности.

6. План истраживања и структура рада

Циљеви истраживања ове докторске дисертације су унапређење метода за детекцију и квантификацију пребиотске активности дермалних пребиотика, развој ензимског поступка производње пребиотика намењених топикалној примени и инкорпорирање нових пребиотика у различите козметичке формулације. Током израде дисертације биће изведен одабир биљних екстраката и олигосахарида добијених ензимском катализом који могу да се примењују као пребиотици за микробиоту коже, биће оптимизована ензимски потпомогнута екстракција пребиотика из биљног материјала, биће изведено одређивање структуре и карактеризација пребиотика и оптимизовано концентровање и пречишћавање

биљних екстраката. Биће испитана дифузија пребиотика из козметичких формулација и липозома кроз мембрану која представља модел систем за трансдермални пренос ради избора оптималне формулације за њихову примену.

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

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

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

- Структуру људске коже и карактеристичну микробиоту коже,
- Пробиотике у козметици,
- Пребиотике у козметици,
- Ензимски потпомогнуте екстракције,
- Опис различитих козметичких формулација и система за контролисано отпуштање: емулзије, гел емулзије, липозоми - поделе и методе добијања.
- Моделе којима се описује дифузија активних компоненти из течних и получврстих форми.

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

- Хемикалије и материјали употребљени у раду,
- Методе за одређивање дермалне пребиотске активности,
- Услови екстракције пребиотика из биљног материјала,
- Инструменталне методе за одређивање структуре пребиотика,
- Добијање различитих врста емулзија,
- Добијање липозома,
- Дифузиони експерименти.

У поглављу *Резултати и дискусија* биће представљени и дискутовани резултати испитивања различитих олигосахарида и биљних екстраката богатих полифенолима као потенцијалних дермалних пребиотика, оптимизације ензимски потпомогнуте екстракције полифенолних једињења са пребиотским дејством на микробиоту коже из одабраних биљака и избора оптималне козметичке формулације из аспекта трансдермалног преноса масе, док ће резултати анализе пребиотске активности различитих фракција биљних екстраката бити дискутовани у спрези са резултатима инструменталне анализе у циљу проналажења корелације између хемијске структуре и пребиотске активности.

У *Закључку* ће резултати добијени у току истраживања бити сумирани уз стављање акцента на њихове научне доприносе, иновативност и будућу примену.

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

7. Закључак и предлог

На основу података о досадашњем раду и постигнутим резултатима, Комисија сматра да кандидат Ања Петров, мастер инжењер технологије, испуњава све услове за рад на предложеној докторској дисертацији. Комисија сматра да је тема докторске дисертације под насловом „Ензимски потпомогнута производња пребиотика за топикалну примену и одређивање њихових структурних и функционалних својстава“ научно заснована и да ће представљати значајан допринос у ужој научној области Биохемијско инжењерство и

биотехнологија, за коју је Технолошко-металуршки факултет Универзитета у Београду матична установа. Комисија предлаже Наставно-научном већу Технолошко-металуршког факултета Универзитета у Београду да кандидату Ањи Петров одобри израду ове докторске дисертације. За ментора докторске дисертације Комисија предлаже др Дејана Безбрадицу, редовног професора Технолошко-металуршког факултета Универзитета у Београду.

У Београду, 15.12.2021.

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ:

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

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

.....
Др Мирјана Рајилић-Стојановић
Доцент
Универзитет у Београду,
Технолошко-металуршки факултет

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

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