

UNIVERZITET U BEOGRADU
TEHNOLOŠKO-METALURŠKI FAKULTET
NASTAVNO-NAUČNOM VEĆU

Predmet: Referat o urađenoj doktorskoj disertaciji kandidata **Milice D. Milutinović**, dipl. inž. tehnologije.

Odlukom Nastavno-naučnog veća Tehnološko-metalurškog fakulteta br. 35/199 od 01.06.2017. godine, imenovani smo za članove Komisije za pregled, ocenu i odbranu doktorske disertacije kandidata Milice D. Milutinović, dipl. inž. tehnologije:

„ Iskorišćenje otpada iz prerade jagorčevine (*Primula veris*), rastavića (*Equisetum arvense*) i hajdučke trave (*Achillea millefolium*) za dobijanje biološki aktivnih polifenola”

Posle pregleda dostavljene disertacije i drugih pratećih materijala i razgovora sa kandidatom, Komisija je sačinila sledeći

R E F E R A T

1. UVOD

1.1. Hronologija odobravanja i izrade disertacije

- Školske 2010/2011. godine kandidat je upisala doktorske akademske studije na Tehnološko-metalurškom fakultetu, Univerziteta u Beogradu, na Katedri za biohemijsko inženjerstvo i biotehnologiju, pod mentorstvom dr Suzane Dimitrijević-Branković.
- 24.11.2016. je kandidat Milica Milutinović, dipl. inž. tehnologije predložila temu doktorske disertacije pod nazivom „Iskorišćenje otpada iz prerade jagorčevine (*Primula veris*), rastavića (*Equisetum arvense*) i hajdučke trave (*Achillea millefolium*) za dobijanje biološki aktivnih polifenola”, a Nastavno-naučno veće Tehnološko-metalurškog fakulteta, Univerziteta u Beogradu je usvojilo Komisiju za ocenu podobnosti teme i kandidata u sastavu: dr Suzana Dimitrijević-Branković, vanredni profesor Tehnološko-metalurškog fakulteta, Univerziteta u Beogradu, dr Slavica Šiler-Marinković, redovni profesor Tehnološko-metalurškog fakulteta, Univerziteta u Beogradu, dr Dušan Antonović, redovni profesor Tehnološko-metalurškog fakulteta, Univerziteta u Beogradu i dr Vesna Lazić, naučni saradnik Instituta za nuklearne nauke Vinča, Univerziteta u Beogradu.
- 23.02.2017. je na sednici Nastavno-naučnog veća Tehnološko-metalurškog fakulteta Univerziteta u Beogradu, na osnovu podnetog Referata Komisije, doneta je odluka br 35/31 o prihvatanju predloga teme doktorske disertacije Milice Milutinović, dipl. inž. tehnologije, pod nazivom „Iskorišćenje otpada iz prerade jagorčevine (*Primula veris*),

rastavića (*Equisetum arvense*) i hajdučke trave (*Achillea millefolium*) za dobijanje biološki aktivnih polifenola”. Za mentora doktorske disertacije imenovana je dr Suzana Dimitrijević-Branković, redovni profesor Tehnološko-metalurškog fakulteta, Univerziteta u Beogradu.

- 27.03.2017. je na sednici Veća naučnih oblasti tehničkih nauka Univerziteta u Beogradu data saglasnost na predlog teme doktorske disertacije Milice Milutinović, dipl. inž. tehnologije, pod nazivom „Iskorišćenje otpada iz prerade jagorčevine (*Primula veris*), rastavića (*Equisetum arvense*) i hajdučke trave (*Achillea millefolium*) za dobijanje biološki aktivnih polifenola”. Odluka nosi broj 61206-1205/2-17.
- 01.06.2017. je na sednici Nastavno-naučnog veća Tehnološko-metalurškog fakulteta, Univerziteta u Beogradu doneta odluka br 35/199 o imenovanju Komisije za ocenu i odbranu doktorske disertacije Milice Milutinović, dipl. inž. tehnologije, pod nazivom „Iskorišćenje otpada iz prerade jagorčevine (*Primula veris*), rastavića (*Equisetum arvense*) i hajdučke trave (*Achillea millefolium*) za dobijanje biološki aktivnih polifenola”, pred komisijom u istom sastavu.

NAPOMENA: Tokom doktorskih studija, Milica Milutinović je bila na jednom trudničkom i jednom porodiljskom bolovanju u periodu od 1.4.2015. do 18.7.2016. godine.

1.2. Naučna oblast disertacije

Istraživanja u okviru ove doktorske disertacije pripadaju naučnoj oblasti Tehnološko inženjerstvo, uža naučna oblast Biohemijsko inženjerstvo i biotehnologija, za koju je Tehnološko-metalurški fakultet Univerziteta u Beogradu matična ustanova.

Mentor ove doktorske disertacije, dr Suzana Dimitrijević-Branković, redovni profesor Tehnološko-metalurškog fakulteta, Univerziteta u Beogradu, koja je na osnovu objavljenih publikacija i iskustva kompetentna da rukovodi izradom ove doktorske disertacije.

1.3. Biografski podaci o kandidatu

Milica Milutinović (devojačko Rajilić), diplomirani inženjer tehnologije, je rođena 1983. godine u Bugojnu u Bosni i Hercegovini. Osnovnu školu i IX beogradsku gimnaziju je završila u Beogradu. Studije na Tehnološko-metalurškom fakultetu Univerziteta u Beogradu je upisala školske 2002/2003. godine. Diplomirala je na Katedri za biohemijsko inženjerstvo i biotehnologiju sa ocenom na diplomskom radu 10 (deset) i prosečnom ocenom u toku studija 9,33. Dobitnik je priznanja Srpskog hemijskog društva za ukupan izuzetan uspeh u toku studiranja. Doktorske akademske studije na Tehnološko-metalurškom fakultetu Univerziteta u Beogradu, na Katedri za biohemijsko inženjerstvo i biotehnologiju pod mentorstvom dr Suzane Dimitrijević-Branković upisala je školske 2010/2011. godine. Položila je sve ispite predviđene planom i programom doktorskih studija sa prosečnom ocenom 10, uključujući i završni ispit.

Od septembra 2009. do decembra 2010. je zaposlena kao istraživač pripravnik na Institutu za hemiju, tehnologiju i metalurgiju u okviru projekta Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja: Geološka i ekotoksikološka istraživanja u identifikaciji geopatogenih zona toksičnih elemenata i prirodne radioaktivnosti u akumulacijama vode za piće u Republici Srbiji

(ON 146021). Od 1. februara 2011. godine, zaposlena je kao istraživač pripravnik na Tehnološko-metalurškom fakultetu Univerziteta u Beogradu, na Katedri za biohemijsko inženjerstvo i biotehnologiju, u okviru projekta Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja: Primena biotehnoških metoda u održivom iskorišćenju nus-proizvoda agroindustrije (TR 31035) kojim rukovodi prof. dr Suzana Dimitrijević-Branković. U zvanje istraživač saradnik reizabrana je 6. jula 2017. godine.

Koautor je pet radova u međunarodnim časopisima (dva M21a, jedan M22 i dva M23), sedam saopštenja na međunarodnim skupovima (dva M33 i pet M34) i jednog rada u vodećem časopisu nacionalnog značaja (M51).

2. OPIS DISERTACIJE

2.1. Sadržaj disertacije

Doktorska disertacija Milice Milutinović, dipl. inž. tehnologije pod nazivom „Iskorišćenje otpada iz prerade jagorčevine (*Primula veris*), rastavića (*Equisetum arvense*) i hajdučke trave (*Achillea millefolium*) za dobijanje biološki aktivnih polifenola” je napisana na 201 strani, u okviru kojih se nalazi 7 poglavlja, 57 slika, 34 tabele (plus 5 tabela u prilogu) i 245 literaturna navoda. Doktorska disertacija sadrži poglavlja: Uvod, Teorijski deo, Ciljevi rada, Eksperimentalni deo, Rezultati i diskusija, Zaključak i Literatura. Na početku disertacije su dati izvodi na srpskom i engleskom jeziku. Disertacija sadrži Priloge i Biografiju. Po svojoj formi i sadržaju, podneti rad zadovoljava sve standarde Univerziteta u Beogradu za doktorsku disertaciju.

2.2. Kratak prikaz pojedinačnih poglavlja

U Uvodu doktorske disertacije je dat osvrt na oblast istraživanja, predmet i cilj rada, koji podrazumeva iskorišćenje otpadnih lekovitih biljaka za pripremu biološki aktivnih ekstrakata. Ukazano je na značaj iskorišćenja otpada dobijenog nakon prerade lekovitog bilja. Istaknut je značaj ekstrakcije polifenola sa antioksidativnim i antimikrobnim potencijalom. Navedene su najznačajnija lekovita svojstva biljaka koje su korišćene u doktorskoj disertaciji. Naveden je plan istraživanja i osnovni ciljevi ove doktorske disertacije.

Teorijski deo doktorske distertacije obuhvata četiri tematske celine. U prvom delu je opisan značaj upotrebe lekovitih biljaka, a ukazano je i na potencijal koji ima otpad dobijen preradom lekovitih biljaka za dobijanje različitih biološki aktivnih preparata. Zatim su navedene osnovne karakteristike lekovitih biljaka koje su korišćene u doktorskoj disertaciji, a dat je i pregled, do sada u literaturi zabeležene, biološke aktivnosti ekstrakata koji su dobijeni iz jagorčevine, hajdučke trave i rastavića. U drugom delu su obrađeni polifenoli i njihova antioksidativna, antimikrobna aktivnost, stimulacija rasta probiotika i inhibicija enzima acetilholinesteraze. Za svaku od navedenih aktivnost polifenola prikazan je i njihov mogući mehanizam dejstva. U trećem delu je dat prikaz najčešće korišćenih metoda ekstrakcije polifenola, sa posebnim osvrtom na mikrotalasnu ekstrakciju i faktore koji najviše utiču na ekstrakciju polifenola. U ovom delu je prikazana i fermentacija lekovitog bilja kao tehnika koja omogućava povećanje prinosa ili biološke aktivnosti ekstrakata, a navedeni su i primeri iz

literature u primeni fermentacija različitih biljnih materijala, čime je postignuto povećanje prinosa ekstrahovanih polifenola. Navedene su i osnovne karakteristike mikroorganizama koji su korišćeni u fermentaciji otpada od lekovitog bilja. U četvrtom poglavlju su opisani i principi planiranja i optimizacije procesa metodom odzivnih površina.

U poglavlju Ciljevi rada su navedeni svi ciljevi doktorske disertacije.

Eksperimentalni deo disertacije je podeljen na dva dela: Materijal i oprema i Metode. Materijal i oprema je obuhvatio sve korišćene materijale, mikroorganizme, mikrobiološke podloge, hemikalije i opremu. Metode su obuhvatile sve metode koje su korišćene u eksperimentalnom radu. Prvo su opisane metode za ekstrakciju polifenola iz lekovitih biljaka. Opisan je postupak mikrotalasne i klasične ekstrakcije polifenola, kao i postupak fermentacije hajdučke trave i rastavića. Zatim su navedene metode karakterizacije ekstrakata, odnosno metode kojima se određuje prinos ekstrakcije, sadržaj ukupnih polifenola i flavonoida. Navedene su metode pomoću kojih se određuje antioksidativna aktivnost, antimikrobna aktivnost ekstrakata, uticaj ekstrakata na rast probiotskih mikroorganizama i inhibicija aktivnosti enzima acetilholinesteraze (AChE), kao i metoda tečne hromatografije (HPLC metoda). Svi procesi mikrotalasne ekstrakcije i fermentacije su optimizovani primenom metode odzivnih površina u okviru softvera Design Expert, a plan eksperimenata je prikazan na kraju poglavlja Metoda.

Poglavlje Rezultati i diskusija obuhvata prikaz rezultata dobijenih u eksperimentalnom delu disertacije, njihovu analizu i diskusiju koja uključuje poređenje sa literaturnim podacima. Rezultati i diskusija se satoji od sledećih poglavlja: Optimizacija mikrotalane ekstrakcije polifenola iz otpadnih lekovitih biljaka, Biološka aktivnost ekstrakata jagorčevine, hajdučke trave i rastavića, Optimizacija uslova fermentacije hajdučke trave i rastavića. U okviru prve celine prikazana je optimizacija mikrotalasne ekstrakcije polifenola iz jagorčevine, hajdučke trave i rastavića. Prikazan je uticaj svih procesnih promenljivih (vremena ekstrakcije, koncentracije rastvarača, odnosa rastvarača prema masi uzorka i snage mikrotalasnog zračenja) na sadržaj polifenola u ekstraktima. Sadržaj polifenola i antioksidativna aktivnost ekstrakata dobijenih mikrotalasnom ekstrakcijom je poređen sa ekstraktima koji su dobijeni klasičnom metodom ekstrakcije i zaključeno je da je značajno povećanje sadržaja polifenola i antioksidativne aktivnosti postignuto mikrotalasnom ekstrakcijom polifenola iz hajdučke trave i rastavića, dok je sadržaj polifenola i antioksidativna aktivnost bila gotovo ista kod jagorčevine. Ispitana je i mogućnost uvećanja procesa u laboratorijskim uslovima i pokazano je da se održavanjem konstantnog odnosa snage mikrotalasnog zračenja i zapremine rastvarača može održati kvalitet dobijenog proizvoda. U drugom delu je prikazana biološka aktivnost ekstrakata, tj. antimikrobna aktivnost, stimulacija rasta probiotskih mikroorganizama i inhibicija aktivnosti enzima AChE. Pokazano je da ekstrakt hajdučke trave dobijen pod optimalnim uslovima primenom mikrotalasne ekstrakcije zadovoljava kriterijum po kom se svrstava u ekstrakte sa značajnom antimikrobnom aktivnošću. Ekstrakt hajdučke trave je pokazao antimikrobnu aktivnost prema svim testiranim Gram-pozitivnim bakterijama i jednoj Gram-negativnoj bakteriji, pri čemu su MIC vrednosti niže od vrednosti koje su zabeležene u literaturi. Osim toga, prvi put je pokazano da ekstrakt hajdučke trave stimuliše rast probiotskih mikroorganizama *L.*

rhamnosus i *S. boulardii*. Pri tome, koncentracije ekstrakta koje su dovoljne za stimulaciju rasta probiotskih mikroorganizama, deluju inhibitorno na rast nekih enteropatogena. Ekstrakt rastavića je pokazao antimikrobnu aktivnost prema svim testiranim Gram-pozitivnim bakterijama, pri čemu su MIC vrednosti niže vrednosti koje su zabeležene u literaturi, a takođe je stimulisao rast kvasca *S. boulardii*. Prvi put je ispitana antifungalna aktivnost ekstrakta jagorčevine. Ekstrakt jagorčevine je od svih testiranih ekstrakata najviše inhibirao rast fitopatogenih plesni i pokazao je najveću inhibiciju aktivnosti enzima AChE. U trećem delu je prikazana fermentacija hajdučke trave i rastavića korišćenjem bakterije *L. rhamnosus* i kvasca *S. boulardii*, sa ciljem povećanja sadržaja ukupnih polifenola u ekstraktima i povećanja biološke aktivnosti ekstrakata. Prikazani su optimalni uslovi za izvođenje fermentacije obe lekovite biljke. Takođe je prikazan uticaj svih procesnih promenljivih (vremena fermentacije, koncentracije inokuluma, koncentracije dodate hranljive podloge i odnosa tečne faze prema masi uzorka) na sadržaj polifenola u ekstraktima. Nakon fermentacije hajdučke trave bakterijom *L. rhamnosus* i kvascem *S. boulardii*, došlo je do povećanja sadržaja ukupnih polifenola u ekstraktima, antioksidativne, antimikrobne aktivnosti i inhibicije aktivnosti AChE. Fermentacijom rastavića bakterijom *L. rhamnosus* sadržaj ukupnih polifenola u ekstraktu se smanjio, ali se povećala antioksidativna i antimikrobna aktivnost ekstrakta. Fermentacijom rastavića kvascem *S. boulardii* sadržaj ukupnih polifenola u ekstraktu i antioksidativna aktivnost se povećala, ali je antimikrobna aktivnost ekstrakta ostala nepromenjena.

U poglavlju Zaključak su sumirani zaključci proistekli iz rada na ovoj doktorskoj disertaciji, kao i izvedeni generalni zaključak na osnovu svih sumiranih rezultata.

U poglavlju Literatura navedene su sve reference citirane u doktorskoj disertaciji.

3. OCENA DISERTACIJE

3.1. Savremenost i originalnost

Tematika kojom se ova teza bavi je savremena, a njeni rezultati mogu osim naučnog imati i praktičnu primenu. Na osnovu opsežnog pregleda najnovije naučne literature, istraživanja u okviru ove doktorske disertacije spadaju u veoma aktuelna i uklapaju se u svetske trendove što potvrđuje njihov značaj.

Poslednjih godina sve je veći broj naučnih radova i istraživanja koji se bave valorizacijom biljnog, poljoprivrednog otpada ili otpada dobijenog iz prehrambene industrije. Razlog tome je što takve otpadne sirovine u sebi sadrže značajne količine biološki aktivnih jedinjenja, pa je njihovo odlaganje na deponije sa ekološkog i ekonomskog stanovišta nepovoljno. One se mogu koristiti kao jeftina polazna sirovina za dobijanje drugih vrednih proizvoda, kao što su ekstrakti koji sadrže polifenole. U poslednje vreme se u ekstrakciji polifenola koriste moderne metode, kao što je mikrotalasna ekstrakcija, čijom se primenom značajno smanjuje vreme i količina upotrebljenog rastvarača, a povećava se prinos ekstrahovanih biološki aktivnih jedinjenja. Dobijeni ekstrakti koji sadrže polifenole su najčešće veoma potentni antioksidansi, koji bi mogli da se koriste kao dodaci prehrambenim i farmaceutskim proizvodima. Razlog za ovakvo iskorišćenje biljnog otpada je i što postoji povećana potražnja za

prirodnim antioksidanasima koji bi mogli da zamene sintetičke antioksidanse (kao što su butilhidroksitoluen i butilhidroksianizol), čijom razgradnjom nastaju toksične i kancerogene materije. Osim toga, usled velike potrošnje antibiotika, sve je veća rezistencija patogenih mikroorganizama na postojeće antibiotike, pa se podstiče ispitivanje antimikrobnog delovanja različitih biljnih ekstrakata u cilju pronalaženja novih antimikrobnih agenasa. Ispituje se i delovanje ekstrakata na probiotske mikroorganizme. Takođe, sve se više ispituju biljni ekstrakti kao inhibitori aktivnosti AChE, koji bi mogli da se koriste u lečenju Alchajmerove bolesti. U literaturi postoje podaci i o fermentaciji različitih biljnih materijala, što doprinosi povećanju prinosa i biološke aktivnosti ekstrahovanih polifenola.

U okviru doktorske disertacije Milice Milutinović pod nazivom „Iskorišćenje otpada iz prerade jagorčevine (*Primula veris*), rastavića (*Equisetum arvense*) i hajdučke trave (*Achillea millefolium*) za dobijanje biološki aktivnih polifenola”, prvi put je izvršena optimizacija uslova mikrotalasne ekstrakcije polifenola iz jagorčevine, hajdučke trave i rastavića. Takođe, prvi put je ispitan uticaj ekstrakata, koji su dobijeni pod optimalnim uslovima primenom mikrotalasne ekstrakcije, na rast probiotskih mikroorganizama. Osim toga, prvi put je ispitana mogućnost fermentacije hajdučke trave i rastavića sa ciljem povećanja biološke aktivnosti ekstrakata.

Na osnovu pregleda literature može se zaključiti da se istraživanja u okviru ove disertacije uklapaju u savremene pravce istraživanja i ukazuju na značaj i aktuelnost proučavane problematike.

3.2. Osvrt na referentnu i korišćenu literaturu

U okviru doktorske disertacije citirano je 245 literaturnih navoda, od kojih najveći broj čine najnoviji radovi objavljeni u časopisima međunarodnog značaja, koji su omogućili da se prikaže stanje u ispitivanoj naučnoj oblasti, kao i da se sagleda aktuelnost problematike. Savremena istraživanja objavljena u navedenim naučnim radovima su opisana, analizirana i prodiskutovana i izvedeni su zaključci koji su omogućili dobar uvid u oblast ekstrakcije i biološke aktivnosti ekstrakata bogatih polifenolima dobijenih iz otpadnih biljnih sirovina. Kandidat je pregledao obimnu literaturu vezanu za optimizaciju procesa mikrotalasne ekstrakcije polifenola, antioksidativnu, antimikrobnu aktivnost i stimulaciju rasta probiotskih mikroorganizama. Pregledana je i literatura vezana za primenu mikroorganizama u procesima fermentacije otpadnih biljaka sa ciljem povećanja prinosa i biološke aktivnosti polifenola.

Iz popisa literature koja je korišćena u istraživanju, kao i objavljenih radova kandidata može se uočiti da kandidat na adekvatnom nivou poznaje predmetnu oblast istraživanja, kao i aktuelno stanje istraživanja u ovoj oblasti u svetu.

3.3. Opis i adekvatnost primenjenih naučnih metoda

Prikazani rezultati u ovoj doktorskoj disertaciji su dobijeni primenom odgovarajućih eksperimentalnih tehnika i savremenih analitičkih instrumentalnih metoda iz literature u originalnom ili modifikovanom obliku, kao i adekvatnom analizom i obradom podataka.

U prvom delu rada je optimizovana metoda mikrotalasne ekstrakcije polifenola iz otpadnih lekovitih biljaka. U cilju definisanja efikasnosti optimizovane mikrotalasne ekstrakcije

izvedena je metoda klasične ekstrakcije polifenola. Praćen je prinos i sastav ekstrakata, određivanjem sadržaja ukupnih polifenola, sadržaja flavonoida i merenjem antioksidativne aktivnosti, primenom DPPH i FRAP metode. Razlika u sastavu ekstrakata dobijenih mikrotalasnom i klasičnom ekstrakcijom je utvrđena HPLC metodom. Optimizacija procesa mikrotalasne ekstrakcije polifenola, kao i statistička obrada podataka je urađena primenom metode odzivne površine uz pomoć softverskog paketa *Design Expert*.

U drugom delu rada je određena biološka aktivnost ekstrakata koji su dobijeni pod optimalnim uslovima primenom mikrotalasne ekstrakcije. Određena je antimikrobna aktivnost metodom difuzije u bunarčićima, a minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) su određene metodom mikrodilucije u mikrotitarskim pločama sa rezazurinom kao indikatorom ćelijskog rasta. Antifungalna aktivnost ekstrakata je određena metodom diluciju u agaru. Uticaj ekstrakata na rast probiotskih mikroorganizama je ispitan dodatkom ekstrakata u tečnu hranljivu podlogu. Na kraju je određena inhibicija aktivnosti AChE u prisustvu ekstrakata po modifikovanoj Elmanovoj metodi.

U trećem delu rada su optimizovani uslovi fermentacije hajdučke trave i rastavića korišćenjem dva probiotska mikroorganizma *L. rhamnosus* i *S. boulardii*, sa ciljem povećanja prinosa polifenola i povećanja biološke aktivnosti ekstrakata. Nakon fermentacije iz uzoraka su ekstrahovani polifenoli primenom optimizovane mikrotalasne ekstrakcije. U ekstraktima je određen sadržaj ukupnih polifenola, sadržaj flavonoida, praćena je antioksidativna, antimikrobna aktivnost i inhibicija AChE. Uslovi izvođenja procesa fermentacije su izvedeni primenom metode odzivne površine uz pomoć softverskog paketa *Design Expert*.

3.4. Primenljivost ostvarenih rezultata

Dobijeni rezultati mogu biti u potpunosti primenjivi u praksi. Kvalitet dobijenih ekstrakata nadmašuje onaj koji se dobija korišćenjem standardnih metoda ekstrakcije dok je vreme potrebno za dobijanja ekstrakata značajno smanjeno. Pored potvrđenog antioksidativnog i antimikrobnog dejstva, utvrđeno je da ekstrakti hajdučke trave i rastavića mogu stimulisati rast probiotskih mikroorganizana. Istovremeno, koncentracije ekstrakta koje su dovoljne za stimulaciju rasta probiotskih mikroorganizama, deluju inhibitorno na rast nekih enteropatogena. Ovo svojstvo ispitivanih biljnih ekstrakta se može iskoristiti za razvoj dijetetskih fitopreparata za ublažavanje gastrointestinalnih tegoba kod ljudi. Takođe, ovi ekstrakti se mogu koristiti kao biotici (stimulatori rasta) u procesima gajenja probiotskih kultura za povećanje njihovog broja. Pored toga, iskazana antifungalna svojstva pojedinih ekstrakta, posebno jagorčevine, daju mogućnost njihove primene u preparatima za zaštitu biljnih kultura od fitopatogena. Ekstrakt jagorčevine koji inhibira acetilholinesterazu bi se potencijalno mogao da koristi i u tretmanu Alchajmerove bolesti.

3.5. Ocena dostignutih sposobnosti kandidata za samostalni naučni rad

Kandidat Milica Milutinović je tokom izrade doktorske disertacije pokazala samostalnost, sistematičnost i stručnost u sagledavanju problema istraživanja, kao i kritičku analizu dobijenih rezultata. Prilikom izvođenja i realizacije eksperimenata, pokazala je da vlada naučnim i

istraživačkim metodama, kao i kreativnost u realizaciju, analizi i obradi dobijenih rezultata. Komisija smatra da kandidat poseduje sve kvalitete koji su neophodni za samostalan naučni rad.

4. OSTVARENI NAUČNI DOPRINOS

4.1. Prikaz ostvarenih naučnih doprinosa

Naučnim doprinosom rezultata ove teze može se smatrati sledeće:

- Razvijena je metoda mikrotalasne ekstrakcije polifenola iz otpadne jagorčevine, kojom se za kraće vreme postiže nešto viši prinos polifenolnih jedinjenja nego u ekstraktu koji je dobijen klasičnom metodom ekstrakcije. Optimalni uslovi mikrotalasne ekstrakcije kojima se ekstrahuje maksimalno polifenola iz jagorčevine ($130,73 \pm 3,51$ mg GAE/g) su: vreme trajanja ekstrakcije 80 sekundi, koncentracija etanola 49%, odnos rastvarač/čvrsta faza 35 ml/g i mikrotalasna snaga 170 W.
- Razvijene su metode mikrotalasne ekstrakcije polifenola iz otpadne hajdučke trave i rastavića, kojima se postiže značajno veći prinos polifenola za kraće vreme u odnosu na metodu klasične ekstrakcije.
- Određeni su optimalni uslovi mikrotalasne ekstrakcije kojima se ekstrahuje maksimalno polifenola iz hajdučke trave ($237,74 \pm 2,08$ mg GAE/g) su: vreme trajanja ekstrakcije 33 sekunde, koncentracija etanola 70%, odnos rastvarač/čvrsta faza 40 ml/g i mikrotalasna snaga 170 W.
- Određeni su optimalni uslovi mikrotalasne ekstrakcije kojima se ekstrahuje maksimalno polifenola iz rastavića ($161,57 \pm 1,24$ mg GAE/g) su: vreme trajanja ekstrakcije 81 sekunda, koncentracija etanola 54,5%, odnos rastvarač/čvrsta faza 45,4 ml/g i mikrotalasna snaga 170 W.
- Dobijeni ekstrakti su pokazali veću antioksidativnu aktivnost u poređenju sa literaturnim podacima. Određena je antioksidativna aktivnost dobijenih ekstrakata po dve validne metode (DPPH i FRAP). Vrednost inhibicije DPPH radikala za ekstrakt jagorčevine je iznosila $28,45 \pm 2,12\%$, za ekstrakt hajdučke trave $71,72 \pm 2,12\%$ i za ekstrakt rastavića $33,33 \pm 0,43\%$. Sposobnost redukcije gvožđa je za ekstrakt jagorčevine iznosila $0,895 \pm 0,037$ mmol/l, za ekstrakt hajdučke trave $2,023 \pm 0,015$ mmol/l i za ekstrakt rastavića $0,918 \pm 0,007$ mmol/l.
- Ispitana je i mogućnost uvećanja procesa u laboratorijskim uslovima i pokazano je da se održavanjem konstantnog odnosa snage mikrotalasnog zračenja i zapremine rastvarača može održati kvalitet dobijenog proizvoda.
- Dobijeni ekstrakti su pokazali veću antimikrobnu aktivnost u poređenju sa literaturnim podacima. MIC vrednosti ekstrakta hajdučke trave su bile u opsegu od 1,25 do 5,0 mg/ml, dok su MIC vrednosti ekstrakta rastavića bile u opsegu od 1,25 do 10 mg/ml. Ekstrakt jagorčevine je najviše inhibirao rast fitopatogena, a pri koncentraciji ekstrakta od 5 mg/ml se rast plesni smanjivao u opsegu od 55 do 100% u zavisnosti od testiranog mikroorganizma.

- Ispitana je stimulacija rasta dva probiotska mikroorganizma dodatkom biljnih ekstrakata u hranljivu podlogu. Najveću stimulaciju rasta *L. rhamnosus* i *S. boulardii* je pokazao ekstrakt hajdučke trave i to kada je dodat hranljivoj podlozi za rast *L. rhamnosus* u koncentraciji 1,0 mg/ml i 0,5 mg/ml za rast *S. boulardii*. Maksimalnu stimulaciju rasta ekstrakt rastavića, prema *S. boulardii*, je pokazao kada je dodat hranljivoj podlozi u koncentraciji od 2,5 mg/ml.
- Pokazano je da svi ekstrakti inhibiraju aktivnost enzima acetilholinesteraze, a najveću inhibiciju je pokazao ekstrakt jagorčevine, i to $63,23 \pm 5,83\%$ pri koncentraciji od 1 mg/ml..
- Optimizovani su uslovi fermentacije hajdučke trave i rastavića za dobijanje ekstrakata sa poboljšanim biološkim svojstvima.
- Pokazano je da se fermentacijom hajdučke trave probiotskim mikroorganizmima *L. rhamnosus* i *S. boulardii* povećava sadržaj ukupnih polifenolnih jedinjenja u ekstraktima. Nakon fermentacije bakterijom *L. rhamnosus* dobijeno je $332,30 \pm 6,96$ mg GAE/g ukupnih polifenola u ekstraktu, dok je nakon fermentacije kvascem *S. boulardii* dobijeno $289,50 \pm 7,13$ mg GAE/g ukupnih polifenola u ekstraktu. Dobijeni ekstrakti su pokazivali veću antioksidativnu i antimikrobnu aktivnost u poređenju sa nefermentisanim uzorkom.
- Pokazano je da se povećanje sadržaja ukupnih polifenola u ekstraktu nakon fermentacije rastavića postiže kada se rastavić fermentiše kvacem *S. boulardii*. Takođe je pokazano da iako je ekstrakt koji je dobijen fermentacijom bakterijom *L. rhamnosus* sadržao manje ukupnih polifenolnih jedinjenja, oba fermentisana ekstrakta su pokazala veću antioksidativnu aktivnost u poređenju sa nefermentisanim ekstraktom. Veću antimikrobnu aktivnost u odnosu na nefermentisan uzorak je pokazao ekstrakt koji je dobijen nakon fermentacije bakterijom *L. rhamnosus*.

4.2. Kritička analiza rezultata istraživanja

Istraživanja koja su izvedena u ovoj doktorskoj disertaciji koncipirana su na osnovu prethodno definisanih ciljeva i detaljne analize literature iz oblasti ekstrakcije i biološke aktivnosti polifenola. U disertaciji je delom primenjena metodologija istraživanja zastupljena u literaturi, a prvi put je primenjena i optimizovana metoda mikrotalasne ekstrakcije polifenola iz jagorčevine, hajdučke trave i rastavića. Dobijeni ekstrakti su pokazali antioksidativnu i antimikrobnu aktivnost veću od do sada zabeležene aktivnosti u literaturi. Prvi put je ispitan uticaj dobijenih ekstrakata na rast probiotskih mikroorganizama (*L. rhamnosus* i *S. boulardii*). Takođe, prvi put je ispitana mogućnost povećanja sadržaja i biološke aktivnosti polifenola, kada se biljke prvo fermentišu, a nakon toga se uzorci ekstrahuju primenom optimizovane mikrotalasne ekstrakcije.

Na osnovu dobijenih rezultata, a istovremenim sagledavanjem ciljeva i postavljenih hipoteza, može se konstatovati da prikazana istraživanja u potpunosti zadovoljavaju kriterijume jedne doktorske disertacije. Takođe, korišćene metode su u skladu sa savremenim metodama, a niz prvi put opisanih karakteristika dobijenih ekstrakata otvaraju mogućnosti za proširenje palate

već ustanovljene primene u farmaceutskoj i prehrambenoj industriji. Činjenica da se kao polazna sirovina koristi otpad dobijen tokom prerade lekovitog bilja ukazuje na to da se definisani procesi mogu koristiti kao segment održive i ekološki prihvatljive proizvodnje.

4.3. Verifikacija naučnih doprinosa

Kandidat Milica Milutinović je ostvarene rezultate istraživanja u okviru ove doktorske disertacije potvrdila objavljivanjem dva rada u međunarodnom časopisu izuzetnih vrednosti (M21a) i jednim radom u časopisu nacionalnog značaja.

Kategorija M21a:

1. **Milutinović, M.**, Radovanović, N., Rajilić-Stojanović, M., Šiler-Marinković, S., Dimitrijević, S., Dimitrijević-Branković, S.: Microwave-assisted extraction for the recovery of antioxidants from waste *Equisetum arvense*, *Industrial Crops and Products*, vol. 61, pp. 388-397, 2014 (**IF (2015) = 3,449**) (ISSN: 0926-6690)
2. **Milutinović, M.**, Radovanović, N., Ćorović, M., Šiler-Marinković, S., Rajilić-Stojanović, M., Dimitrijević-Branković, S.: Optimisation of microwave-assisted extraction parameters for antioxidants from waste *Achillea millefolium* dust, *Industrial Crops and Products*, vol. 77, pp. 333-341, 2015 (**IF (2015) = 3,449**), (ISSN: 0926-6690)

Kategorija M51:

3. **Milutinović, M.**, Radovanović, N., Dimitrijević, S., Šiler-Marinković, S., Rajilić-Stojanović, M.: Valorisation of medicinal plant waste — Production of polyphenolic antioxidant extracts from waste *Primula veris* L. *Ecologica*, vol. 22, pp. 19-24, 2015 (ISSN: 0354 – 3285)

Ostali naučni radovi kandidata

Kategorija M22:

1. Radovanović, L., Rogan, J., Poleti, D., **Milutinović, M.**, Rodić, M. V.: Polymeric zinc complexes with 2, 2'-dipyridylamine and different benzenepolycarboxylato ligands: Synthesis, structure, characterization and antimicrobial activity, *Polyhedron*, vol. 112, pp. 18-26, 2016 (**IF (2015) = 2,108**) (ISSN: 0277-5387)

Kategorija M23:

2. **Milutinović, M. D.**, Šiler-Marinković, S. S., Antonović, D. G., Mihajlovska, K. R., Pavlović, M. D., Dimitrijević-Branković, S. I. (2013).): Antioksidativna svojstva sušenih ekstrakata iz otpadne espresso kafe. *Hemijska industrija*, vol. 67(2), pp. 261-267, 2013 (**IF (2013) = 0,562**) (ISSN: 0367-598X)
3. Pavlović, M., Nikolić, I., **Milutinović, M.**, Dimitrijević-Branković, S., Šiler-Marinković, S., Antonović, D., (2015). Plant waste materials from restaurants as the adsorbents for dyes. *Hemijska industrija*, vol. 69(6), pp. 667-677, 2016 (**IF (2015) = 0,462**) (ISSN: 0367-598X)

Kategorija M33:

4. Mihajlovski K, Pavlović M., **Milutinović M.**, Šiler-Marinković S., Dimitrijević-Branković S.: Effect of fermentation by *Streptomyces* sp. on antioxidant properties of spent coffee extracts, 6th Central European Congress on Food – CEFood 2012, Novi Sad, Srbija, 23-26 maj 2012., 1035-1039, ISBN: 978-86-7994-027-8
5. Pavlović M. D., Buntić A. V., Šiler-Marinković S. S., Antonović D. G., **Milutinović M. D.**, Radovanović N. R., Dimitrijević Branković S. I.: Spent coffee grounds as adsorbents for pesticide paraquat removal from its aqueous solutions, International conference on civil, biological and environmental engineering (CBEE), Istanbul, Turska, 27-28 maj 2014., 60-65, ISBN: 978-93-82242-94-9

Kategorija M34:

6. Ranić M., Dimitrijević-Branković S. , Arsić A., Ivanović J., **Milutinović M.**, Šiler-Marinković S.: Fatty acid profiles of supercritical extracts of commercial espresso coffee and spent coffee, Annals of Nutrition and Metabolism, 11th European Nutrition Conference FENS, Madrid, Španija 26-29 oktobar 2011., vol 58, suppl 3, 102, DOI:10.1159/000334393
7. **Milutinović M.**, Šiler-Marinković S., Ranić M., Dimitrijević-Branković S.: Total polyphenols and antioxidative activity of water extracts of spent coffee, Annals of Nutrition and Metabolism, 11th European Nutrition Conference FENS, Madrid, Španija, 26-29 oktobar 2011., vol 58, suppl 3, 396-397, DOI:10.1159/000334393
8. **Milutinović M. D.**, Pavlović M. D., Šiler-Marinković S. S., Stojanović-Rajilić M. D., Dimitrijević-Branković S. I.: Fermentation of spent espresso coffee by *Hymenobacter psychrotolerans*, 8th International Conference of the Chemical Societies of the South-East European Countries - ICOSECS 8, Beograd, Srbija, 27-29 jun 2013., 245. ISBN: 978-86-7132-053-5
9. Ranić, M., **Milutinović, M.**, Ristić, A. K., Branković, S. D.: Optimization of microwave-assisted extraction of natural antioxidants from spent black coffee grounds by response surface methodology, Annals of Nutrition and Metabolism, 12th European Nutrition Conference (FENS) Berlin, Nemačka, 20–23 oktobar 2015., vol 67, suppl 1, 547, DOI: 10.1159/000440895
10. Radovanović, N., Miljković, M., Davidović, S., **Milutinović, M.**, Mihajlovski, K., Dimitrijević-Branković, S.: Agroindustrial waste as a substrate for cellulase production by *Paenibacillus chitinolyticus* CKS1, Knjiga sažetaka, Petnaesta konferencija mladih istraživača „Nauka i inženjerstvo novih materijala“, , Institut tehničkih nauka Srpske akademije nauka i umetnosti, Beograd, Srbija, 7-9 decembar 2016, ISBN 978-86-80321-32-5

5. ZAKLJUČAK I PREDLOG KOMISIJE

Na osnovu svega napred iznetog Komisija smatra da doktorska disertacija Milice Milutinović, dipl. inž. tehnologije, pod nazivom „Iskorišćenje otpada iz prerade jagorčevine (*Primula veris*), rastavića (*Equisetum arvense*) i hajdučke trave (*Achillea millefolium*) za dobijanje biološki aktivnih polifenola” predstavlja značajan i originalni naučni doprinos u oblasti Tehnološkog inženjerstva, uža oblast Biohemijsko inženjerstvo i biotehnologija, što je potvrđeno objavljivanjem radova u međunarodnim časopisima izuzetnih vrednosti i vodećim časopisima nacionalnog značaja.

Imajući u vidu kvalitet, obim i naučni doprinos ove doktorske disertacije, Komisija predlaže Nastavno-naučnom veću Tehnološko-metalurškog fakulteta Univerziteta u Beogradu da prihvati ovaj Referat i da ga zajedno sa podnetom disertacijom Milice Milutinović, dipl. inž. tehnologije izloži na uvid javnosti u zakonski predviđenom roku i uputi na konačno usvajanje Veću naučnih oblasti tehničkih nauka Univerziteta u Beogradu, te da nakon završetka ove procedure, pozove kandidata na usmenu odbranu disertacije.

U Beogradu, 05.09.2017.

ČLANOVI KOMISIJE:

.....
Prof. dr Suzana Dimitrijević-Branković, redovni profesor,
Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet

.....
Prof. dr Slavica Šiler-Marinković, redovni profesor,
Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet

.....
Prof. dr Dušan Antonović, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet

.....
Dr Vesna Lazić, naučni saradnik
Univerzitet u Beogradu, Institut za nuklearne nauke Vinča