

Univerzitet u Beogradu

Tehnološko-metalurški fakultet

Milica D. Milutinović

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

Doktorska disertacija

Beograd, 2017.

University of Belgrade

Faculty of Technology and Metallurgy

Milica D. Milutinović

Preparation of biologically active polyphenols by
utilising the primrose (*Primula veris*), the horsetail
(*Equisetum arvense*) and the yarrow (*Achillea
millefolium*) processing waste

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2017

MENTOR:

Dr Suzana Dimitrijević-Branković, redovni profesor,
Tehnološko-metalurški fakultet, Univerzitet u
Beogradu

ČLANOVI KOMISIJE:

Dr Slavica Šiler-Marinković, redovni profesor,
Tehnološko-metalurški fakultet, Univerzitet u
Beogradu

Dr Dušan Antonović, redovni profesor
Tehnološko-metalurški fakultet, Univerzitet u
Beogradu

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

DATUM ODBRANE:

ZAHVALNICA

Veliku zahvalnost dugujem svom mentoru, profesorki dr Suzani Dimitrijević-Branković, na velikoj pomoći i podršci tokom izrade ove doktorske disertacije.

Hvala profesorima dr Slavici Šiler-Marinković, dr Dušanu Antonoviću sa Tehnološko-metalurškog fakulteta i naučnom saradniku dr Vesni Lazić, sa Instituta za nuklearne nauke „Vinča”, na korisnim savetima i sugestijama tokom izrade i pisanja ove doktorske disertacije.

Neizmernu zahvalnost dugujem svojoj sestri Mirjani na velikoj podršci i savetima, ne samo u okviru izrade ove doktorske disertacije, nego i u životu.

Veliko hvala kolegicama Nedi Radovanović i dr Mariji Ćorović, sa Tehnološko-metalurškog fakulteta, na nesebičnoj pomoći u različitim fazama eksperimentalnog rada. Takođe, hvala kolegi dr Branislavu Nastasijeviću, istraživaču saradniku Instituta za nuklearne nauke „Vinča”, na pomoći prilikom realizacije određenih eksperimenata koji su deo ove doktorske disertacije.

Zahvaljujem se i kolegici Snežani Dimitrijević i Institutu za proučavanje lekovitog bilja “Dr Josif Pančić” na ustupljenim otpadnim sirovinama, dobijenim od lekovitih biljaka, koje su korišćene u okviru ove doktorske disertacije.

Svim prijateljima, kolegama, profesorima i tehničarkama sa Katedre za Biohemijско inženjerstvo i Biotehnologije Tehnološko-metalurškog fakulteta hvala na pomoći, svakodnevnoj podršci i druženju.

Veliku zahvalnost dugujem i svojoj porodici, mami Veri, tati Draganu, braći Marku i Milošu na svemu što su za mene činili, na pruženoj podršci i razumevanju. Zahvaljujem se i sestri Branki na podršci i čuvanju dece.

Na samom kraju neizmerno sam zahvalna mom Peđi i mojim dečacima Dušanu i Petru za ljubav koju mi pružaju svakoga dana!

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

REZIME

Predmet ove disertacije je iskorišćenje otpadnih sirovina koje su dobijene u procesu prerade jagorčevine (*Primula veris*), rastavića (*Equisetum arvense*) i hajdučke trave (*Achillea millefolium*) za dobijanje biološki aktivnih ekstrakata bogatih polifenolima. Najveći prinosi ukupnih polifenola u ekstraktima su postignuti primenom mikrotalasne ekstrakcije, a optimizacija procesa je izvedena primenom metode planiranog eksperimenta i matematičko-statističke obrade eksperimentalnih podataka, konkretno metode odzivnih površina (RSM), variranjem više procesnih promenljivih. U procesu mikrotalasne ekstrakcije je korišćen vodeni rastvor etanola, čime je omogućeno dobijanje ekstrakata koji se mogu primeniti u farmaceutskoj i prehrambenoj industriji. Primenom optimizovane mikrotalasne ekstrakcije najveći sadržaj ukupnih polifenola je dobijen iz hajdučke trave ($237,74 \pm 2,08$ mg GAE/g suve materije ekstrakta), zatim iz rastavića ($161,57 \pm 1,24$ mg GAE/g), a najmanji iz jagorčevine ($130,73 \pm 3,51$ mg GAE/g). Ekstrakti su pokazali antioksidativnu aktivnost izraženu preko inhibicije DPPH radikala i redukcije gvožđa, koja je bila u korelaciji sa sadržajem ukupnih polifenola u ekstraktima. Na osnovu sve tri optimizacije ekstrakcija može da se zaključi da se sadržaj ukupnih polifenola u ekstraktima povećavao kada je korišćena niža mikrotalasna snaga (170 W). Vreme trajanja ekstrakcija za dobijanje najvećeg sadržaja ukupnih polifenola za sve tri biljke je bilo manje od dva minuta, a najmanje kod hajdučke trave, 33 sekunde. Optimalna koncentracija etanola u ekstrakciji polifenola iz jagorčevine je iznosila 49%, dok je optimalan odnos rastvarača prema uzorku bio 35 ml/g. Optimalna koncentracija etanola u ekstrakciji polifenola iz hajdučke trave je iznosila 70%, a optimalan odnos rastvarača prema uzorku je iznosio 40 ml/g. U optimizaciji ekstrakcije polifenola iz rastavića optimalna koncentracija etanola je iznosila 54,5%, dok je optimalan odnos rastvarača prema uzorku bio 45,5 ml/g.

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.

Ispitane su i antimikrobna aktivnost dobijenih ekstrakata, kao i stimulacija rasta probiotskih mikroorganizama i inhibicija enzima acetilholinesteraze. Interesantno je da je ekstrakt hajdučke trave stimulisao rast probiotskih mikroorganizama, kvasca *Saccharomyces boulardii* i bakterije mlečno-kiselinskog vrenja *Lactobacillus rhamnosus*, dok u istoj koncentraciji pokazao antimikrobnu aktivnost prema patogenim bakterijama *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes* i *Pseudomonas aeruginosa*. Najveća stimulacija rasta *S. boulardii* je postignuta dodatkom ekstrakta hajdučke trave u hranljivu podlogu u koncentraciji od 0,5 miligrama suve materije ekstrakta po mililitru hranjive podloge ($9,62 \pm 0,04$ prema $7,20 \pm 0,19$ log CFU/ml), dok je najveća stimulacija rasta *L. rhamnosus* postignuta kada je ekstrakt dodat u hranljivu podlogu u koncentraciji od 1 mg/ml ($9,10 \pm 0,10$ prema $8,29 \pm 0,05$ log CFU/ml). Stimulaciju rasta *S. boulardii* je pokazao i ekstrakt rastavića, a najveće povećanje broja ćelija je postignuto kada je ekstrakt dodat hranljivoj podlozi u koncentraciji od 2,5 mg/ml ($8,04 \pm 0,06$ prema $6,85 \pm 0,07$ log CFU/ml). Ekstrakt rastavića je pokazao i antibakterijsku aktivnost prema svim testiranim Gram-pozitivnim bakterijama. Ekstrakt jagorčevine nije pokazao antimikrobnu aktivnost prema testiranim patogenim bakterijama i gljivici, a nije ni stimulisao rast probiotskih mikroorganizama. On je pokazao najbolju antifungalnu aktivnost među testiranim ekstraktim i inhibirao je rast *Aspergillus niger*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium verticillioides* i *Fusarium proliferatum*, a najveću inhibitornu aktivnost je pokazao prema *F. verticillioides*, koju je u potpunosti inhibirao kada je u hranljivu podlogu dodat u koncentraciji od 1 mg/ml. Slabiju inhibiciju rasta plesni je pokazao ekstrakt rastavića, koji je inhibirao rast svih testiranih *Fusarium* vrsta, dok je ekstrakt hajdučke trave inhibirao rast *F. graminearum*.

Najveću inhibiciju aktivnosti acetilholinesteraze je pokazala jagorčevina, zatim hajdučka trava, pa rastavić. Pri koncentraciji jagorčevine od 1 mg/ml inhibicija enzima je iznosila $63,23 \pm 5,83\%$. Inhibicija aktivnosti nije bila u korelaciji sa koncentracijom ukupnih polifenola u ekstraktima, s obzirom na to da je najveći sadržaj ukupnih polifenola bio u ekstraktu hajdučke trave, koji je pokazao najmanju inhibitornu aktivnost.

Na kraju je ispitan uticaj fermentacije polaznog biljnog materijala (hajdučke trave i rastavića) bakterijom *L. rhamnosus* i kvascem *S. boulardii* na sadržaj ukupnih polifenola u ekstraktima. Povećanje sadržaja ukupnih polifenola, antioksidativne i antimikrobne aktivnosti je postignuto fermentacijom hajdučke trave primenom oba

mikroorganizma. Fermentacijom rastavića, povećanje sadržaja ukupnih polifenola je postignuto samo kada je korišćen *S. boulardii*, ali je antioksidativna aktivnost poboljšana i kada je uzorak fermentisan korišćenjem bakterije *L. rhamnosus*. Antimikrobna aktivnost uzorka rastavića fermentisanim *S. boulardii* kvascem je ostala nepromenjena, dok je povećana kada je uzorak fermentisan probiotskom bakterijom *L. rhamnosus*.

Naučni doprinos ove disertacije se ogleda u tome što je pokazano da se otpad iz prerade lekovitih biljaka može iskoristiti za dobijanje ekstrakata sa različitim biološkim svojstvima, uz potencijalno korišćenje biotehnoloških postupaka za poboljšanje prinosa polifenola. 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. Optimizacijom mikrotalasne ekstrakcije definisani su uslovi za brzu proizvodnju biljnih ekstrakata poboljšane biološke aktivnosti u odnosu na klasičnu ekstrakciju. Niz prvi put opisanih karakteristika dobijenih ekstrakata otvaraju mogućnosti za proširenje palete 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.

Ključne reči: Otpadne lekovite biljke, optimizacija, mikrotalasna ekstrakcija, antioksidativna aktivnost, prebiotska aktivnost, antimikrobna aktivnost, inhibicija acetilholinesteraze, fermentacija

Naučna oblast: Tehnološko inženjerstvo

Uža naučna oblast: Biohemijsko inženjerstvo i biotehnologija

Preparation of biologically active polyphenols by utilising the primrose (*Primula veris*), the horsetail (*Equisetum arvense*) and the yarrow (*Achillea millefolium*) processing waste

ABSTRACT

The subject of this dissertation is the utilization of waste materials from the processing of primrose (*Primula veris*), horsetail (*Equisetum arvense*) and yarrow (*Achillea millefolium*) for obtaining biologically active and polyphenol-rich extracts. The highest total polyphenol content in the extracts was achieved using the microwave-assisted extraction, while the process optimization was carried out by applying the method of the planned experiment and mathematical-statistical processing of the experimental data - specifically the response surface methodology (RSM), by varying several process variables. In the microwave-assisted extraction process, an aqueous solution of ethanol was used which made possible to obtain the extracts, that could be used in the pharmaceutical and food industries. Using microwave-assisted extraction the highest total polyphenol content was obtained from yarrow (237.74 ± 2.08 mg GAE/g extract dry matter), followed by horsetail (161.57 ± 1.24 mg GAE/g), and the lowest was obtained from primrose (130.73 ± 3.51 mg GAE/g). The extracts exhibited antioxidant activity expressed through the inhibition of DPPH radicals and iron reduction which was in correlation with the total polyphenol content in the extracts. Based on all three extraction optimizations, it can be concluded that the total polyphenol content in extracts increased when low microwave power was used (170W). The extraction period for obtaining the highest total polyphenol content for all three plants lasted less than two minutes, while the fastest extraction procedure was for yarrow (33 seconds). The optimal ethanol concentration in the extraction of polyphenol from primrose was 49%, while the optimal solvent to solid ratio was 35 ml/g. The optimal ethanol concentration in the extraction of polyphenol from yarrow was 70%, while the optimal solvent to solid ratio was 40 ml/g. In the optimization of polyphenol extraction from horsetail, the optimal ethanol concentration was 54,5%, while the optimal solvent to solid ratio was 45,5 ml/g.

The possibility of process scale-up under laboratory conditions was also examined and the results showed that by maintaining the constant ratio of the microwave

power and the solvent volume, it is possible to maintain the quality of the obtained product.

The antimicrobial activity of the obtained extracts, as well as the stimulation of probiotic microorganisms growth and the inhibition of the acetylcholinesterase enzyme, were examined. It is interesting that the yarrow extract stimulated the growth of probiotic microorganisms, the yeast *Saccharomyces boulardii* and the lactic acid bacteria, *Lactobacillus rhamnosus*, while, at the same concentration, it showed antimicrobial activity against the pathogenic bacteria *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes* and *Pseudomonas aeruginosa*. The greatest stimulation of *S. boulardii* growth was achieved by adding the yarrow extract to the growth medium at the concentration of 0.5 milligrams of extract dry matter per milliliter of the nutrient broth (9.62 ± 0.04 compared to 7.20 ± 0.19 log CFU/ml), whereas the greatest stimulation of the *L. rhamnosus* growth was obtained when the extract was added to the growth medium at the concentration of 1 mg/ml (9.10 ± 0.10 compared to 8.29 ± 0.05 log CFU/ml). The horsetail extract also showed the stimulation of *S. boulardii* growth and the maximum increase in the number of cells was achieved when the extract was added to the growth medium at the concentration of 2.5 mg/ml (8.04 ± 0.06 compared to 6.85 ± 0.07 log CFU/ml). The same extract also exhibited antibacterial activity against all tested Gram-positive bacteria. The primrose extract did not show any antimicrobial activity against the tested pathogenic bacteria and yeast and it did not stimulate the growth of probiotic microorganisms. The greatest antifungal activity of the tested extracts was shown by the primrose extract and it inhibited the growth of *Aspergillus niger*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium verticillioides* and *Fusarium proliferatum* and the greatest inhibitory activity was exhibited against *F. verticillioides*, which it fully inhibited when the extract was added to the growth medium at the concentration of 1 mg/ml. A weaker inhibition of fungi growth was exhibited by the horsetail extract which inhibited the growth of all tested *Fusarium* types, while the yarrow extract inhibited the growth of *F. graminearum*.

The greatest inhibitory activity of acetylcholinesterase was exhibited by primrose, followed by yarrow and horsetail, respectively. At the concentration of 1 mg/ml, the primrose extract showed the greatest inhibition of the enzyme ($63.23 \pm 5.83\%$). Inhibitory activity was not correlated with the concentration of total polyphenols in extracts, given

that the highest total polyphenol content was in yarrow extract, which exhibited the lowest inhibitory activity.

Moreover, the influence of the fermentation of the plant material (yarrow and horsetail) with *L. rhamnosus* and *S. boulardii* on the total polyphenol content in extracts was examined. The total polyphenol content and the antioxidant and antimicrobial activity were increased when yarrow was fermented with both microorganisms. The increase in total polyphenol content, in the fermentation of horsetail, was achieved only when *S. boulardii* was used, but the antioxidant activity was also improved when the sample was fermented with *L. rhamnosus*. The antimicrobial activity of the sample fermented with *S. boulardii* remained unchanged while it was increased when the sample was fermented with the *L. rhamnosus*.

The scientific contribution of this thesis lies in the fact that it showed that the waste of medical plants could be used for obtaining extracts with different biological properties, with a potential use of biotechnological methods for improving the extraction yields. The quality of the obtained extracts exceeded the quality of extracts obtained by the standard extraction methods, while the time required for obtaining the extracts was significantly reduced. In addition to the confirmed antioxidant and antimicrobial effect, it was determined that yarrow and horsetail extracts can stimulate the growth of the probiotic microorganisms. At the same time, the extract concentrations that are enough for the growth stimulation of probiotic microorganisms inhibit the growth of some enteropathogens. This property of the examined herbal extracts could be used for the development of dietary phytoproducts for alleviating people's gastrointestinal disorders. Also, these extracts could be used as biotics (growth stimulators) in the processes of growing probiotic cultures for increasing their number. In addition, the exhibited antifungal properties of certain extracts, especially the primrose extracts, could be used in the products for the protection of herbal cultures from phytopathogens. The primrose extract which inhibits acetylcholinesterase could be potentially used for treating Alzheimer's disease. Optimization of the microwave-assisted extraction defined the conditions for rapid production of plant extracts of improved biological activity compared to the classical method of extraction. A series of properties of the obtained extracts, which were described for the first time, creates opportunities for expansion of the already established application in the pharmaceutical and food industries. The fact that the waste

obtained from the processing of medical plants is used as a starting material indicates that the defined processes could be used as a segment of sustainable and environmentally friendly production.

Keywords: waste medical plants, optimization, microwave extraction, antioxidant activity, prebiotic activity, antimicrobial activity, inhibition of acetylcholinesterase, fermentation

Scientific area: Technological engineering

Scientific discipline: Biochemical engineering and biotechnology

SADRŽAJ

1	UVOD.....	1
2	TEORIJSKI DEO	4
2.1	Lekovito bilje.....	4
2.1.1	Upotreba lekovitog bilja	4
2.1.2	Postupak prerade lekovitog bilja i generisani otpad	5
2.1.3	Morfološke i etnofarmakološke karakteristike odabranih biljnih vrsta	7
2.1.3.1	Jagorčevina (<i>Primula veris</i>).....	7
2.1.3.1.1	Hemijski sastav jagorčevine	8
2.1.3.1.2	Primena jagorčevine	8
2.1.3.1.3	Biološka aktivnost jagorčevine.....	8
2.1.3.2	Rastavić (<i>Equisetum arvense</i>).....	9
2.1.3.2.1	Hemijski sastav rastavića.....	10
2.1.3.2.2	Primena rastavića.....	12
2.1.3.2.3	Biološka aktivnost rastavića	13
2.1.3.3	Hajdučka trava (<i>Achillea millefolium</i>).....	14
2.1.3.3.1	Hemijski sastav hajdučke trave	15
2.1.3.3.2	Primena hajdučke trave.....	16
2.1.3.3.3	Biološka aktivnost hajdučke trave	16
2.2	Polifenoli.....	18
2.2.1	Biološka aktivnost polifenola	21
2.2.1.1	Antioksidativna aktivnost	21
2.2.1.1.1	Slobodni radikali.....	21
2.2.1.1.1.1	Vrste slobodnih radikala	21
2.2.1.1.1.2	Delovanje slobodnih radikala	22
2.2.1.1.2	Antioksidansi	23
2.2.1.1.2.1	Vrste antioksidanasa	24
2.2.1.1.2.2	Antioksidativna aktivnost polifenola.....	25
2.2.1.1.2.3	Sintetički antioksidansi.....	26
2.2.1.1.2.4	Prooksidativna aktivnost antioksidanasa	27

2.2.1.1.3	Metode za određivanje antioksidativne aktivnosti	28
2.2.1.2	Antimikrobna aktivnost	28
2.2.1.2.1	Veza antimikrobne aktivnosti i hemijske strukture polifenola	30
2.2.1.2.2	Mehanizam antimikrobnog dejstva polifenola	31
2.2.1.2.3	Metode za određivanje antimikrobne aktivnosti.....	32
2.2.1.3	Stimulacija rasta probiotskih mikroorganizama	33
2.2.1.3.1	Mehanizam delovanja	35
2.2.1.4	Inhibicija acetilholinesteraze	36
2.3	Ekstrakcija polifenola iz lekovitih biljaka	39
2.3.1	Mikrotalasna ekstrakcija polifenola.....	40
2.3.1.1	Mehanizam mikrotalasnog zagrevanja	40
2.3.1.2	Mehanizam mikrotalasne ekstrakcije	42
2.3.1.3	Faktori koji utiču na mikrotalasnju ekstrakciju	44
2.3.1.3.1	Izbor rastvarača.....	44
2.3.1.3.2	Vreme ekstrakcije	46
2.3.1.3.3	Mikrotalasna snaga i temperatura ekstrakcije.....	46
2.3.1.3.4	Veličina čestice uzorka	47
2.3.2	Fermentacija kao metod za poboljšanje biološkog dejstva ekstrakata lekovitog bilja	47
2.3.2.1	Bakterije roda <i>Lactobacillus</i>	49
2.3.2.1.1	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	50
2.3.2.2	Kvasci	50
2.3.2.2.1	<i>Saccharomyces boulardii</i>	51
2.4	Optimizacija procesnih promenljivih metodom odzivnih površina.....	52
3	CILJEVI RADA	56
4	EKSPERIMENTALNI DEO	57
4.1	Materijal i oprema.....	57
4.2	Metode	60
4.2.1	Priprema uzoraka	60
4.2.1.1	Priprema otpadnih lekovitih biljaka	60
4.2.2	Ekstrakcija polifenola	60
4.2.2.1	Mikrotalasna ekstrakcija polifenola iz otpadnog lekovitog bilja.....	60

4.2.2.2	Klasična metoda ekstrakcije polifenola iz otpadnog lekovitog bilja	60
4.2.3	Fermentacija otpadne hajdučke trave (<i>A. millefolium</i>) i rastavića (<i>E. arvense</i>) mikroorganizmima <i>L. rhamnosus</i> i <i>S. boulardii</i>	61
4.2.4	Uparavanje ekstrakta	61
4.2.5	Karakterizacija ekstrakata.....	61
4.2.5.1	Prinos ekstrakcije.....	61
4.2.5.2	Sadržaj ukupnih polifenola u ekstraktima	62
4.2.5.3	Sadržaj flavonoida u ekstraktima.....	63
4.2.5.4	Antioksidativna aktivnost	64
4.2.5.4.1	Određivanje antioksidativne aktivnosti ispitivanjem sposobnosti neutralizacije DPPH radikala.....	64
4.2.5.4.1.1	FRAP (eng. ferric reducing antioxidant power) metoda	65
4.2.5.5	Antimikrobna aktivnost	67
4.2.5.5.1	Metoda difuzije u bunarčićima	67
4.2.5.5.2	Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije mikrodilucionom metodom sa resazurinom kao indikatorom.....	68
4.2.5.5.3	Antifungalna aktivnost.....	69
4.2.5.6	Određivanje prebiotske aktivnosti biljnih ekstrakata	70
4.2.5.7	Inhibicija acetilholinesteraze	71
4.2.5.8	HPLC analiza biljnih ekstrakata	72
4.2.6	Optimizacija mikrotalasne ekstrakcije polifenola sa antioksidativnom aktivnošću iz otpadne jagorčevine (<i>P. veris</i>).....	72
4.2.7	Optimizacija mikrotalasne ekstrakcije polifenola, flavonoida sa antioksidativnom aktivnošću iz otpadne hajdučke trave (<i>A. millefolium</i>)....	73
4.2.7.1	Određivanje opsega vrednosti procesnih promenljivih	73
4.2.7.2	Optimizacija mikrotalasne ekstrakcije polifenola i flavonoida sa antioksidativnom aktivnošću iz otpadne hajdučke trave (<i>A. millefolium</i>)....	73
4.2.8	Optimizacija mikrotalasne ekstrakcije polifenola sa antioksidativnom aktivnošću iz otpadnog rastavića (<i>E. arvense</i>)	74
4.2.8.1	Određivanje opsega vrednosti procesnih promenljivih	74
4.2.8.2	Optimizacija mikrotalasne ekstrakcije polifenola sa antioksidativnom aktivnošću iz otpadnog rastavića (<i>E. arvense</i>)	75

4.2.9	Optimizacija uslova fermentacije otpadne hajdučke trave (<i>A. millefolium</i>) i rastavića (<i>E. arvense</i>) mikroorganizmima <i>L. rhamnosus</i> i <i>S. boulardii</i>	76
4.2.10	Ispitivanje mogućnosti uvećanja procesa	77
5	REZULTATI I DISKUSIJA	78
5.1	Optimizacija mikrotalasne ekstrakcije polifenola iz otpadnih lekovitih biljaka	78
5.1.1	Optimizacija mikrotalasne ekstrakcije polifenola iz otpadne jagorčevine (<i>P. veris</i>)	78
5.1.1.1.1	Uticaj procesnih parametara na prinos ekstrakcije	80
5.1.1.1.2	Uticaj procesnih promenljivih na sadržaj ukupnih polifenola u ekstraktima.....	82
5.1.1.1.3	Validacija modela	86
5.1.1.1.4	Poređenje mikrotalasne i klasične ekstrakcije	86
5.1.2	Optimizacija ekstrakcije polifenola i flavonoda sa antioksidativnom aktivnošću iz otpadne hajdučke trave (<i>A. millefolium</i>).....	89
5.1.2.1	Određivanje opsega procesnih promenljivih	89
5.1.2.2	Optimizacija mikrotalasne ekstrakcije polifenola i flavonoida sa antioksidativnom aktivnošću iz otpadne hajdučke trave (<i>A. millefolium</i>)....	90
5.1.2.2.1	Uticaj procesnih parametara na prinos ekstrakcije	93
5.1.2.2.2	Uticaj procesnih promenljivih na sadržaj ukupnih polifenola u ekstraktima.....	95
5.1.2.2.3	Uticaj procesnih promenljivih na sadržaj flavonoida u ekstraktima	98
5.1.2.2.4	Uticaj procesnih promenljivih na antioksidativnu aktivnost ekstrakata.....	100
5.1.2.2.5	Validacija modela	104
5.1.2.2.6	Poređenje mikrotalasne i klasične ekstrakcije	105
5.1.3	Optimizacija ekstrakcije polifenola i flavonoida iz otpadnog rastavića (<i>E. arvense</i>).....	107
5.1.3.1	Određivanje opsega procesnih promenljivih	108
5.1.3.2	Optimizacija mikrotalasne ekstrakcije polifenola i flavonoida sa antioksidativnom aktivnošću iz otpadnog rastavića (<i>E. arvense</i>).....	109
5.1.3.2.1	Uticaj procesnih parametara na prinos ekstrakcije	112

5.1.3.2.2	Uticaj procesnih promenljivih na sadržaj ukupnih polifenola u ekstraktima.....	114
5.1.3.2.3	Uticaj procesnih promenljivih na sadržaj flavonoida u ekstraktima	116
5.1.3.2.4	Uticaj procesnih promenljivih na antioksidativnu aktivnost ekstrakata	118
5.1.3.2.5	Validacija modela	123
5.1.3.2.6	Poređenje mikrotalasne i klasične ekstrakcije	123
5.1.3.3	Poređenje sadržaja biološki aktivnih jedinjenja i antioksidativne aktivnost dve šarže otpadnog rastavića	126
5.1.3.4	Ispitivanje mogućnosti uvećanja procesa	128
5.2	Biološka aktivnost ekstrakata jagorčevine, hajdučke trave i rastavića.....	131
5.2.1	Antimikrobna aktivnost	131
5.2.1.1	Antimikrobna aktivnost ekstrakta jagorčevine	131
5.2.1.2	Antimikrobna aktivnost ekstrakta hajdučke trave	134
5.2.1.3	Antimikrobna aktivnost ekstrakta rastavića.....	136
5.2.2	Stimulacija rasta probiotskih mikroorganizama (<i>L. rhamnosus</i> i <i>S. boulardii</i>) dodatkom biljnih ekstrakata u tečne hranljive podloge	137
5.2.2.1	Uticaj ekstrakta hajdučke trave i rastavića na rast probiotskih mikroorganizama (<i>L. rhamnosus</i> i <i>S. boulardii</i>).....	138
5.2.3	Inhibicija aktivnosti acetilholinesteraze	142
5.3	Optimizacija uslova fermentacije otpadne hajdučke trave i rastavića.....	145
5.3.1	Optimizacija uslova fermentacije hajdučke trave bakterijom <i>L. rhamnosus</i> i kvascem <i>S. boulardii</i>	145
5.3.1.1.1	Uticaj procesnih parametara na sadržaj ukupnih polifenola u ekstraktima	147
5.3.1.1.2	Validacija modela	153
5.3.1.1.3	Poređenje biološke aktivnosti fermentisanog i nefermentisanog ekstrakta	155
5.3.2	Optimizacija uslova fermentacije rastavića mikroorganizmima <i>L. rhamnosus</i> i <i>S. boulardii</i>	158
5.3.2.1.1	Uticaj procesnih parametara na sadržaj ukupnih polifenola u ekstraktima	161
5.3.2.1.2	Validacija modela	165
5.3.2.1.3	Poređenje biološke aktivnosti fermentisanog i nefermentisanog ekstrakta	165
6	ZAKLJUČAK.....	168
7	LITERATURA	173

1 UVOD

Lečenje lekovitim biljem je staro koliko i samo čovečanstvo, što potvrđuju brojna pisana dokumenta. Najstarija dokumenta datiraju od 5000 godina pre nove ere sa područja današnje Indije, iz grada Nagpura, a opisuju pripremu 12 preparata upotrebom preko 250 lekovitih biljaka (Petrovska, 2012). Pozitivan uticaj lekovitih biljaka na zdravlje čoveka se objašnjava prisustvom sekundarnih metabolita u biljkama, kao što su polifenoli, koji mogu ispoljavati različite biološke aktivnosti, kao što su antioksidativna, antimikrobna, i slično (Folashade et al., 2012). Svetska zdravstvena organizacija, WHO (eng. *World Health Organization*), procenjuje da od 65 do 80% svetske populacije koristi lekovito bilje kao primarni oblik zdravstvene zaštite (Palhares et al., 2015).

Preradom lekovitog bilja zaostaje otpad koji je bogat biološki aktivnim jedinjenjima i procenjuje se da se godišnje u Srbiji proizvede oko 100 tona ovakvog otpada (Stefanović, 2010). Ekonomski je isplativo iskorišćenje ovakvog otpada jer se on modifikuje u druge vredne proizvode, pri čemu polazni materijal ima nisku cenu koštanja. Jedna od tehnika kojom se valorizuje otpad od lekovitog bilja je ekstrakcija bioaktivnih jedinjenja, polifenola, konvencionalnim ili modernim tehnikama ekstrakcije. Polifenoli su sekundarni metaboliti prisutni u svim višim biljkama, koji pokazuju širok spektar bioloških aktivnosti, kao što su antioksidativna, antimikrobna, anti-inflamatorna, antifungalna, anti-alergena i druge, a smatra se da konzumiranje hrane bogate polifenolima može da smanji rizik od razvoja kardiovaskularnih bolesti, kancera i dijabetesa (Bravo, 1998). Jedan od razloga za ovakvo iskorišćenje biljnog otpada je i to što postoji povećana potražnja za prirodnim antioksidansima koji bi mogli da zamene potencijalno štetne sintetičke antioksidanse (kao što su butilhidroksitoluen i butilhidroksianizol). Sa druge strane velika potrošnja antibiotika je dovela do rezistencije patogenih mikroorganizama, što je podstaklo ispitivanje antimikrobnog delovanja različitih biljnih ekstrakata u cilju pronalaženja novih antimikrobnih agenasa (Farooqui et al., 2015; Mahesh & Satish, 2008).

Mikrotalasna ekstrakcija je u poslednje vreme dosta proučavana tehnika ekstrakcije polifenola iz različitih biljnih materijala. Primenom ove metode značajno se smanjuje vreme potrebno za ekstrakciju bioaktivnih jedinjenja i količina upotrebljenog rastvarača, u poređenju sa klasičnim metodama ekstrakcije (Dahmoune et al., 2013; Dahmoune et al., 2015; Veggi et al., 2012). Kao rastvarač je pogodno koristiti vodeni

rastvor etanola, čije su prednosti dobra selektivnost polifenola i netoksičnost, odnosno to je rastvarač koji ima GRAS (eng. *Generally recognized as safe*) status (FDA, 2012; Herrero et al., 2005). Tako dobijene ekstrakte je moguće inkorporirati u hranu sa ciljem povećanja stabilnosti i vrednosti ili se mogu koristiti u farmaceutskim formulacijama (Herrero et al., 2005).

Biološku aktivnost ekstrakata moguće je dodatno poboljšati fermentacijom biljnog materijala, čime se oslobađaju vezani polifenoli ili se konvertuju ili depolimerizuju polifenolna jedinjenja velike molekulske mase. Takođe, tokom fermentacije glikozilovani polifenoli se prevode u odgovarajuće aglikone, koji imaju veći antioksidativni potencijal (Hur et al., 2014; Wu et al., 2011). Stoga tehnološki postupak koji se bazira na mikrotalasnoj ekstrakciji prethodno fermentisanog otpadnog biološkog materijala ima potencijal da generiše proizvode izuzetne biološke i potencijalno komercijalne vrednosti.

Primula veris (jagorčevina), *Equisetum arvense* (rastavić) i *Achilea millefolium* (hajdučka trava) su deo naše i evropske tradicionalne medicine. U tradicionalnoj medicini koren jagorčevine se najviše koristi za razređenje gustog bronhijalnog sekreta i olakšavanje iskašljavanja (Aslam et al., 2014). Cvet se koristi za lečenje bubrežnih i mokraćno-urinarnih tegoba, migrene, nesanice, vrtoglavice, ubrzanog rada srca (Wichtl, 2004). U narodnoj medicini, rastavić se koristi kod urinarnih infekcija i oboljenja prostate, kod krvarenja nosa, čira na želucu, rana, reumatizma i osteoporoze (Čanadanović-Brunet et al., 2009; Sandhu et al., 2010). Hajdučka trava se u narodnoj medicini koristi za lečenje upalnih procesa, gastrointestinalnih poremećaja, za zarastanje rana i za lečenje glavobolje. Ulazi u sastav mnogih biljnih preparata koji se koriste za smanjenje povišenog krvnog pritiska (Akram, 2013; Lakshmi et al., 2011). Zahvaljujući prisustvu polifenola, sve tri lekovite biljke poseduju brojne biološke aktivnosti, kao što su antioksidativna, antimikrobna, citotoksična i anti-inflamatorna aktivnost (Başbülbül et al., 2008; Candan et al., 2003; Demir et al., 2014; Dias et al., 2013; Garcia et al., 2011; Lakshmi et al., 2011; Milovanović et al., 2007; Nagai et al., 2005; Radulović et al., 2006; Stojanović et al., 2005).

Predmet rada ove doktorske disertacije je iskorišćenje otpadnog materijala iz prerade jagorčevine, hajdučke trave i rastavića za dobijanje ekstrakata koji su bogati polifenolima. Otpad koji je korišćen u ovom radu predstavlja prah koji je dobijen nakon

mehaničke prerade lekovitog bilja, odnosno usitnjavanja i prosejavanja. U prvom delu rada su definisani optimalni uslovi za dobijanje ekstrakata sa visokim sadržajem ukupnih polifenola iz sve tri biljne vrste, primenom vodenih rastvora etanola i mikrotalasne ekstrakcije. Sastav dobijenih ekstrakata je praćen određivanjem sadržaja ukupnih polifenola i flavonoida, a efikasnost primenjene mikrotalasne ekstrakcije definisana je poređenjem sa klasičnom ekstrakcijom. Nakon toga je određena biološka aktivnost ekstrakata, antioksidativna aktivnost primenom DPPH i FRAP metode, antimikrobna aktivnost, mogućnost stimulacije rasta probiotskih mikroorganizama kao i inhibicija enzima acetilholinesteraze.

U radu je ispitana mogućnost dobijanja ekstrakata sa povećanim sadržajem ukupnih polifenola i povećanom biološkom aktivnošću, kada se otpadni materijal pre ekstrakcije fermentiše mikroorganizmima sa GRAS statusom i probiotskim karakteristikama, bakterijom *Lactobacillus rhamnosus* i kvascem *Saccharomyces boulardii*. U dobijenim ekstraktima je određen sadržaj ukupnih polifenola i flavonoida, kao i antioksidativna, antimikrobna aktivnost i inhibicija acetilholinesteraze.

Za optimizaciju procesa ekstrakcije bioaktivnih jedinjenja iz otpadnih lekovitih biljaka korišćeni su statistički planirani eksperimenti, konkretno metoda odzivnih površina i metoda željene funkcije u okviru *Design Expert* softvera.

2 TEORIJSKI DEO

2.1 Lekovito bilje

2.1.1 Upotreba lekovitog bilja

Prema definiciji Svetske zdravstvene organizacije u lekovito bilje spadaju biljne vrste čiji jedan ili više biljnih delova sadrže biološki aktivnu materiju koja se može koristiti u terapijske svrhe ili u svrhu hemijsko-farmaceutske sinteze (Stanković & Stanojeić, 2014). Upotreba lekovitog bilja u lečenju različitih oboljenja stara je koliko i samo čovečanstvo, što potvrđuju brojna pisana dokumenta (Petrovska, 2012). Fitoterapija je osnov tradicionalne (narodne) medicine svakog naroda, a oko 80% svetske populacije, naročito u zemljama u razvoju, upotrebljava lekovite biljke kao primarnu zdravstvenu zaštitu (Folashade et al., 2012). Pozitivan uticaj lekovitog bilja se objašnjava prisustvom bioaktivnih jedinjenja, sekundarnih metabolita u biljkama, koje mogu ispoljavati različite biološke aktivnosti, kao što su antimikrobne, antioksidativne, anti-inflamatorne, i slično. Mnoga jedinjenja koja su ekstrahovana iz biljaka i dalje imaju primenu u medicini, ili predstavljaju model za izradu velikog broja sintetičkih lekova sa poboljšanim farmakološkim dejstvom (Turudija Živanović, 2015). Primeri važnih sintetičkih lekova koji su dobijeni od prirodnih jedinjenja su morfin i kodein iz maka (*Papaver somniferum*), digoksin iz *Digitalis* spp., atropin iz velebilja (*Atropa belladonna*), vinblastin iz vinke (*Catharanthus roseus*), i slično. Procenjuje se da je oko 60% antitumorskih i anti-inflamatornih lekova na tržištu dobijeno na osnovu jedinjenja koja vode poreklo iz biljaka (Rates, 2001).

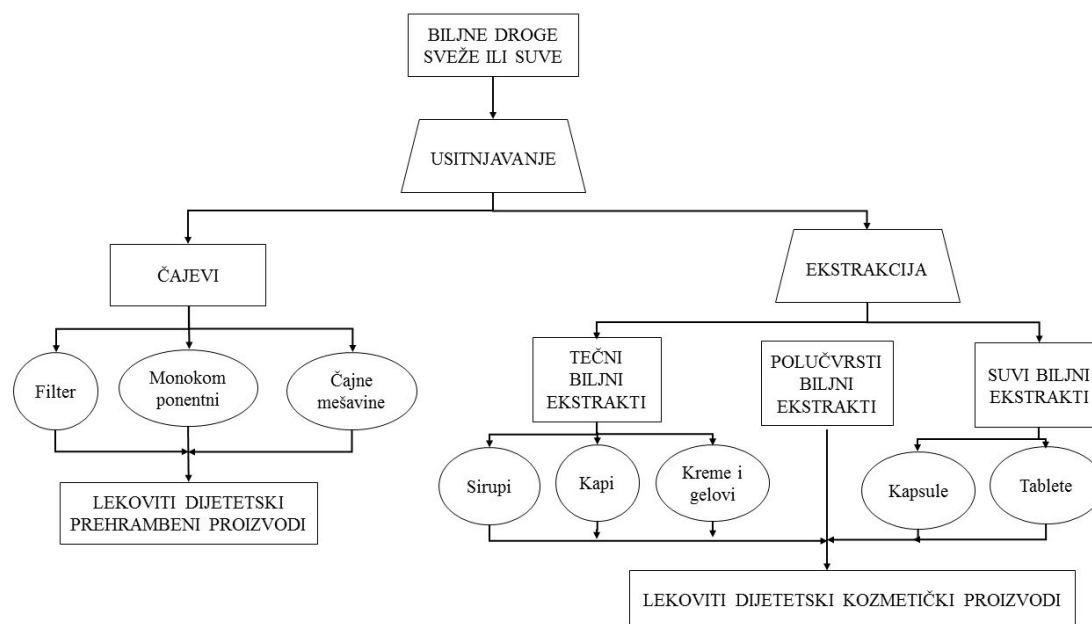
Najstariji pisani dokumenti o upotrebi lekovitog bilja u Srbiji su iz XVIII veka i zabeležio ih je Zaharije Orfelin u knjizi Veliki srpski travnik. Danas se u svetu upotrebljava oko 10.000 različitih biljnih vrsta, a u Srbiji postoji oko 700 vrsta sa lekovitim svojstvima od kojih se za komercijalnu upotrebu sakuplja oko 280 (Folashade et al., 2012; Radanović & Nastovski, 2002). Manji broj vrsta lekovog bilja se organizovano proizvodi, dok se ostale nalaze samonikle u prirodi, a i jedne i druge se koriste kao sirovina u farmaceutskoj, kozmetičkoj i prehrambenoj industriji. Od biljnih organa se koriste *herba*-nadzemni deo biljke u cvetu, *folium*—list, *flos*-cvet, *radix*-koren, *rhizoma*-rizom, *cortex*-kora, *fructus*-plod, *semen*-seme. Lekovito bilje se najčešće koristi preventivno, za terapiju oboljenja u početnim fazama bolesti ili kod blažih oblika bolesti,

dok se kod razvijenijih faza bolesti koristi kao dopunska terapija. Kod hroničnih stanja može da ima blagotvorno dejstvo, dok mali broj biljnih droga ima efekta kod akutnih stanja. Biljni lekovi deluju sporo i efekti su vidljivi posle 2 do 3 nedelje primene preparata (Folashade et al., 2012; Turudija Živanović, 2015).

2.1.2 Postupak prerade lekovitog bilja i generisani otpad

Postupci prerade lekovitog bilja prema tehnološkim operacijama su: sušenje, mehanička prerada (koja obuhvata usitnjavanje, prosejavanje i odvejavanje), destilacija i ekstrakcija različitim rastvaračima. Seckanjem i mlevenjem lekovitog bilja nastaje poluproizvod koji se dalje koristi u procesu izrade čajeva, čajnih mešavina ili u procesu ekstrakcije (slika 2.1) (Radanović & Nastovski, 2002; Turudija Živanović, 2015). Nakon ekstrakcije farmakološki i biološki aktivnih sastojaka iz biljnog materijala uz pomoć selektivnih rastvarača i primenom standardnih metoda dobijaju se tečni ekstrakti, polučvrsti (meki ekstrakti i oleorezine) ili ekstrakti čvrste konzistencije (suvi ekstrakti) (Vuleta et al., 2012).

Prerodom lekovitog bilja zaostaje otpad koji je bogat biološki aktivnim jedinjenjima. Procenjuje se da se godišnje u Srbiji proizvede oko 100 tona otpada od lekovitog bilja, od kojih su 20 tona proizvedene u Institutu za proučavanje lekovitog bilja „Dr Josif Pančić“ (Stefanović, 2010). Sa ekonomske strane, korišćenje ovakvog otpada je opravdano jer on može da se koristi kao jeftina sirovina za dobijanje drugih vrednih proizvoda. Jedna od tehnika kojim se valorizuje biljni otpad je ekstrakcija bioaktivnih jedinjenja klasičnim ili modernim tehnikama ekstrakcije i dobijanje proizvoda koja pokazuju različite biološke aktivnosti, kao što su antioksidativna i antimikrobna aktivnost. Jedan od razloga za ovakvo iskorišćenje biljnog otpada je i taj što postoji povećana potražnja za prirodnim antioksidansima koji bi mogli da zamene potencijalno štetne sintetičke antioksidanse (kao što su butilhidroksitoluen i butilhidroksianizol). Osim toga, antioksidansi štite biološke sisteme od slobodnih radikala, koji imaju ulogu u razvoju kardiovaskularnih bolesti, kancera, Alchajmerove i Parkinsonove bolesti. Istraživanja su usmerena ka dobijanju proizvoda sa antikancerogenom aktivnošću, jer je dokazano da jedinjenja koja se nalaze u biljkama, kao što su polifenoli, saponini, terpeni i glikoproteini, poseduju antikancerogena svojstva. Osim toga, otpad koji sadrži polifenole pokazuje i antimikrobna svojstva (Santana-Méridas et al., 2012).



Slika 2.1. Šematski prikaz dobijanja raznih farmaceutskih oblika lekovitih biljnih proizvoda kao i načini upotrebe (preuzeto i modifikovano iz (Turudija Živanović, 2015))

Najveći deo otpada koji nastaje tokom prerade lekovitog bilja čini neiskorišćeni deo biljke, koji je različit za svaku biljku i zavisi od lokalizacije bioaktivne komponente. Ovakav otpad ima relativno malu mogućnost iskorišćenja u odnosu na otpad dobijen prosejavanjem biljnog materijala nakon usitnjavanja, jer on predstavlja najfiniji prah dela biljke koji je bogat biološki aktivnim materijama. Otpadni prah nije pogodan za primenu u čajnim mešavinama jer prolazi kroz pore filter vrećica ili cediljki, ali po drugim karakteristikama je identičan lekovitom bilju koje nalazi primenu kod potrošača. Ova vrsta otpada predstavlja pogodnu polaznu sirovinu za ekstrakciju i mogućnost njene eksploatacije je ispitana u ovoj doktorskoj disertaciji. Posebnu vrstu otpada predstavlja biljni ostatak nakon ekstrakcije. Ovaj vlažan materijal je siromašan polazni materijal za dobijanje biološki aktivnih materija, ali takođe može naći primenu u biotehnologiji, na primer usled prisustva lignoceluloznog materijala biljni materijal zaostao nakon ekstrakcije je pogodna podloga za stimulaciju sinteze mikrobnih celulaza fermentacijom na čvrstom supstratu (Mihajlovski, 2016).

2.1.3 Morfološke i etnofarmakološke karakteristike odabranih biljnih vrsta

2.1.3.1 Jagorčevina (*Primula veris*)

Primula veris ili jagorčevina pripada porodici *Primulaceae*. Rod *Primula* obuhvata oko 500 vrsta koje rastu u zapadnoj i centralnoj Aziji (najviše na Himalajima) i Evropi, na sunčanim livadama i ispod osunčanih žbunova u brdskim i planinskim krajevima. (Aslam et al., 2014; Wichtl, 2004). To je zeljasta, niska prolećna biljka koja raste do visine od 20 cm, a cveta karakterističnim žutim cvetovima tokom ranog proleća. Iz kratkog, kosog rizoma izbija iznad same zemlje rozeta od nekoliko listova i drška na čijem se vrhu nalazi po nekoliko levkastih žutih cvetova (slika 2.2). Cvetna drška i naličje lista su dlakavi. Rizom je mrk, potpuno je obrastao mnogobrojnim, dugačkim, lomljivim, tankim korenjem svetlije boje.



Jagorčevina je svrstana u sledeće taksonomske kategorije:

Carstvo: *Plantae*

Razdeo: *Magnoliophyta*

Klasa: *Magnoliopsida*

Red: *Ericales*

Porodica: *Primulaceae*

Rod: *Primula*

Vrsta: *Primula veris* L.

Slika 2.2. Izgled biljne vrste *Primula veris* L. (preuzeto 25.07.2016. sa (<http://www.pfaf.org>))

Lekoviti deo biljke je osušen koren (*Primulae radix*) i cvet (*Primulae flos*) (preuzeto 25.07.2016. sa (<http://www.mocbilja.rs/>)).

2.1.3.1.1 *Hemijski sastav jagorčevine*

- Koren jagorčevine sadrži do 12% triterpenskih saponina (priverosaponin B-22 acetat, primulasaponin II i primulasaponin I), fenolne glikozide (primulaverin i primverin). Fenolni glikozidi se u toku sušenja enzimski razgrađuju, što biljnoj drogi daje karakterističnu aromu. Sadrži i *p*-kumarinsku i ruzmarinsku kiselinu.
- Cvet sadrži do 3% flavonoida (kvercetin, luteolin, kemferol, izoramnetin, apigenin i glikozide kvercetina, kemferola, izoramnetina i limocitrina), ferulinsku, *p*-kumarinsku i ruzmarinsku kiselinu i primulasaponin I i enzime;
- Sveže mlado lišće jagorčevine je bogato vitaminom C, a sadrži i saponin (primulasaponin I) (<http://www.mocbilja.rs/>; Karl et al., 1981; Morozowska & Wesołowska, 2004; Müller et al., 2006; Shostak et al., 2016; Wichtl, 2004).

2.1.3.1.2 *Primena jagorčevine*

U tradicionalnoj medicini koren jagorčevine se koristi za razređenje gustog bronhijalnog sekreta i olakšavanje iskašljavanja. Primulasaponin I deluje kao ekspektorans, iritirajući želudačnu sluznicu, što refleksno uzrokuje lučenje tečnosti u bronhijalni sekret i dovodi do smanjenja viskoznosti bronhijalne sluzi (Aslam et al., 2014). Takođe, pojačava se motorika cilija bronhijalnog epitela, pa je ekstrakt jagorčevine ujedno i sekretomotorik. Cvet jagorčevine se koristi za lečenje bubrežnih i mokraćno-urinarnih tegoba, jer deluje kao blag diuretik. Zatim se koristi za lečenje migrene, nesanice, vrtoglavice, ubrzanog rada srca, kod nervoze i vaskularnih poremećaja, kao sedativ i za tretiranje akni (Wichtl, 2004).

2.1.3.1.3 *Biološka aktivnost jagorčevine*

Ekstrakti jagorčevine poseduju antimikrobnu aktivnost. Dietiletarski ekstrakt inhibira rast *Enterococcus faecalis*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens* i *Bacillus sphaericus*, dok vodeni ekstrakti deluju na *Serratia marcescens*, ali ne inhibiraju rast *E. coli* (Başbülbül et al., 2008).

Ekstrakt jagorčevine pokazuje i antioksidativnu aktivnost. On neutrališe DPPH radikal, vezuje superoksid anjon radikal i redukuje jone gvožđa (Demir et al., 2014).

Kod osetljivih osoba može da izazove alergijske reakcije ili otežano varenje (Wichtl, 2004). U toku trudnoće i dojenja ne treba konzumirati jagorčevinu (Müller et al., 2006).

2.1.3.2 Rastavić (*Equisetum arvense*)

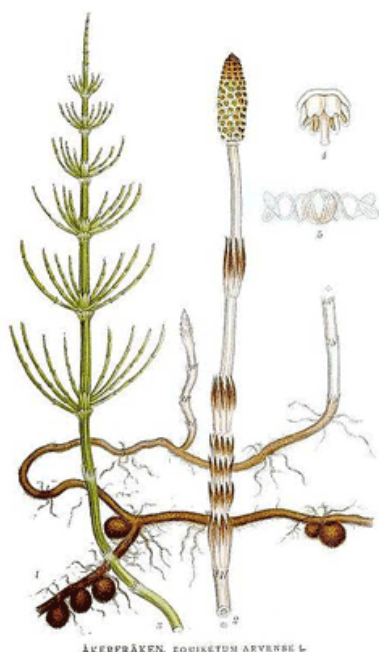
Rastavići su u karbonu bili dominantna grupa kopnenih biljaka. U to vreme dominirale su drvenaste forme, koje su dostizale visinu i do 30 m. Danas je rod *Equisetum* jedini živi predstavnik klase Sphenopsida (Husby, 2013; Kevin, 2012).

Rod *Equisetum* obuhvata dva podroda, *Equisetum* i *Hippochaete*. Rastavići pripadaju podrodu *Equisetum*, koji ima ukupno 8 vrsta, a podrod *Hippochaete* obuhvata 7 vrsta, među kojima su i najviši predstavnici roda *Equisetum*, *E. giganteum* i *E. myriochaetum* (8m) (Husby, 2013). Visina ostalih predstavnika roda *Equisetum* je od 0,2 do 1,5 m (Kevin, 2012).

Equisetum arvense, rastavić, je višegodišnja, korovska, zeljasta biljka koja raste na severnoj Zemljinoj hemisferi (Evropi, Severnoj i Srednjoj Americi i Japanu) (Nagai et al., 2005; Sandhu et al., 2010). Stari Grci su rastavić koristili za lečenje rana, a Rimljani su ga koristili u ishrani i kao lek (Sandhu et al., 2010). Ima snažno razvijen rizom koji prodire duboko u zemlju (i preko 2m) gde se snabdeva vodom i hranljivim materijama i zahvaljujući njemu može da preživi požar i sušu (Husby, 2013; Kevin, 2012). Rizom je člankovit i veoma razgranat, a bogat je hranljivim materijama (Kevin, 2012). Iz rizoma se razvijaju dve vrste stabljike, fertilna i sterilna (slika 2.3). Fertilna, plodna je braon boje, izrasta u proleće i visine je od 10 do 25 cm, prečnika od 3 do 5 mm. Ove stabljike ne vrše fotosintezu. Na vrhu nose sporofilne klasove (strobilus), gde se nalaze sporangije u kojima se razvijaju spore, pomoću kojih se biljka razmnožava (Kevin, 2012). Spore rastavića su zelene, sferične i imaju tanke zidove. Oko spora se nalaze elateri, strukture koje obmotavaju sporu kao kaiš, koje omogućavaju širenje i skupljanje spore u zavisnosti od vlage. Spora živi kratko i klija posle 24 sata od kad je oslobođena iz sporangija. Osim preko spora, rastavić može da se razmnožava i vegetativno (Husby, 2013). Nakon rasejavanja spora, fertilne stabljike venu, a razvijaju se sterilne zelene stabljike, koje se pršljenasto granaju (Kevin, 2012). Sterilne stabljike mogu da se sastoje od 20 segmenata koji su međusobno spojeni, a svaki segment ima set od uspravno raspoređenih, člankovitih grana. Listovi su jako mali, nalaze se uz samo stablo ili granu, na mestu

spajanja segmenata i zbog male veličine listova fotosintezu obavlja stablo (Sandhu et al., 2010). Sterilne stabljike su visine od 10 do 90 cm, prečnika od 2 do 5 mm (Kevin, 2012).

Rastavić raste u vlažnoj, kiseljoj zemlji (pH od 7 do 8) i za rast mu je neophodan silicijum (Husby, 2013; Kevin, 2012). Silicijum se akumulira u epidermisu i ćelijskom zidu biljke, stvarajući mrežu sa polimerima ćelijskog zida povećavajući njihovu krutost i stabilnost. On štiti rastavić od napada insekata i od bolesti koje izazivaju plesni (Husby, 2013).



Rastavić je svrstan u sledeće taksonomske kategorije:

Carstvo: *Plantae*

Razdeo: *Equisetophyta*

Klasa: *Sphenopsida*

Potklasa: *Equisetidae*

Red: *Equisetales*

Porodica: *Equisetaceae*

Rod: *Equisetum*

Vrsta: *Equisetum. arvense* L.

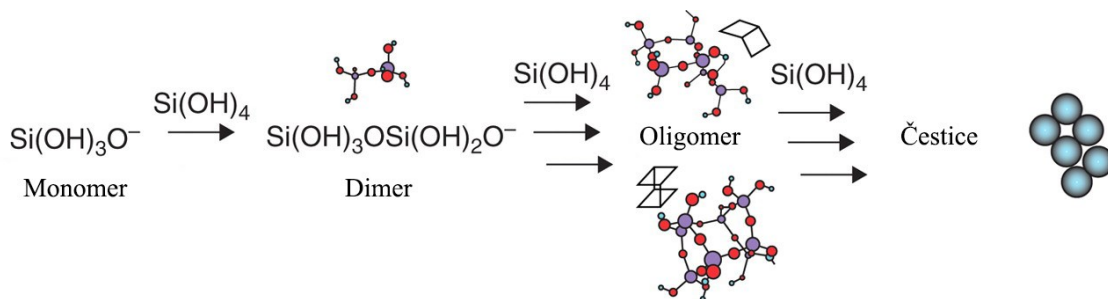
Slika 2.3. Izgled biljne vrste *Equisetum arvense* L. (preuzeto 25.07.2016. sa (<http://www.pfaf.org>))

Lekoviti deo rastavića je nadzemni deo, sterilni izdanak (<http://www.mocbilja.rs/>; Sandhu et al., 2010).

2.1.3.2.1 Hemijski sastav rastavića

- Od fenolnih kiselina sadrži: hidroksicimetne kiseline (hlorogensku, ferulinsku, kafeinsku, p-kumarinsku, cimetnu) i hidroksibenzojeve kiseline (vanilinsku, p-hidroksibenzojevu, protokatahuinsku, siringinsku) (Čanadanović-Brunet et al., 2009; Milovanović et al., 2007; Mimica-Dukic et al., 2008).
- Sterilne stabljike sadrže od 0,3 do 0,9% ukupnih flavonoida (Sandhu et al., 2010). Od flavonoida rastavić sadrži:

- Flavanon: naringenin;
- Flavone: apigenin, luteolin i njihove glukozide;
- Flavonole: kvercetin, kemferol i njihove glukozide, kao i dihidrokemferol (aromadendrin) i dihidrokvercetin (taksifolin) (Čanadanović-Brunet et al., 2009; Milovanović et al., 2007; Mimica-Dukic et al., 2008);
- Flavanol: epikatehin (Čanadanović-Brunet et al., 2009);
- Rastavić sadrži vitamine - karotene, vitamin B1, B2, B6, nikotinsku kiselinu, folnu kiselinu, pantotensku kiselinu, vitamin C (33 mg/100 g biljke), vitamin E (4,9 mg/100 g biljke) i vitamin K (Nagai et al., 2005);
- Sadrži makro i mikroelemente, Na, K, Ca, Mg, P, Fe, Zn, Cu, Mn, Si, Sr, Ti. Rastavić sadrži 1,8% kalijuma, koji je neophodan za regulisanje osmotskog pritiska u ćelijama. Bakar (0,22 mg/100 g biljke) i cink (1,1 mg/100 g jestivog dela biljke) su neophodni za aktiviranje superoksid dismutaze, koja deluje protiv reaktivnih kiseoničnih vrsta (Nagai et al., 2005; Sandhu et al., 2010). Tokom rasta rastavić akumulira značajne količine silicijuma, od 5 do 10 % (Bye et al., 2010). On je značajan za zaštitu, strukturu i fiziologiju rastavića. Silicijum se uzima iz zemljišta u obliku silicijumove kiseline, koja predstavlja rastvorljiv i osnovni oblik silicijuma koji koriste biljke. Kada je koncentracija silicijumove kiseline veća od 100-200 mg/kg dolazi do polimerizacije monomera i nastajanja stabilnih jezgara, koji rastu i dobijaju sferičan oblik, a zatim dolazi do povezivanja tih jezgara (slika 2.4). Silicijum prekriva celokupnu površinu ćelijskog zida epidermisa i debljina mu zavisi od dela biljke, pa je debljina sloja silicijuma u listovima od 0,2 do 1 μm , a u izdancima od 3 do 7 μm (Currie & Perry, 2007).



Slika 2.4. Polimerizacija monomera silicijumove kiseline (preuzeto i modifikovano iz (Currie & Perry, 2007))

- Sterilne stabljike rastavića sadrže sterole (holesterol, epiholestanol, 24-metilenholesterol, β -sitosterol - 60%, kampasterol - 32,9% , izofukosterol - 5,9%) (Do Monte et al., 2004; Mimica-Dukic et al., 2008).
- Sadrži alkaloide: nikotin, palustrin, palustrinin (Sandhu et al., 2010);
- Sterilne stabljike sadrže saponin ekvisetonin (Sandhu et al., 2010).

2.1.3.2.2 *Primena rastavića*

U narodnoj medicini rastavić se koristi kod urinarnih infekcija i oboljenja prostate, kod krvarenja nosa, čira na želucu, rana, reumatizma, osteoporoze, promrzlina, proširenih vena, gubitka kose, a sprečava i nagomilavanje masti na krvnim sudovima i koristi se i za tretiranje krtih noktiju (Čanadanović-Brunet et al., 2009; Sandhu et al., 2010). Izaziva koagulaciju krvi, a zbog sadržaja minerala se preporučuje anemičnim osobama. Za lečenje rana se koristi zbog visokog sadržaja silicijumove kiseline, koja jača i regeneriše vezivno tkivo i stimuliše iskorišćenje kalcijuma u telu (Sandhu et al., 2010). U kozmetici se ekstrakt rastavića koristi kao faktor protiv starenja kože („anti-aging“), kao sredstvo za hidrataciju, sredstvo protiv bora, protiv akni i kao antiperspirant. Koristi se u tonicima, šamponima i sapunima (Sandhu et al., 2010). Zbog velikog sadržaja silicijuma mogao bi da se koristi i u kozmetičkim preparatima koji stimulišu sintezu kolagena, jer silicijum i u malim koncentracijama (10 and 20 μ M) stimuliše sintezu kolagena u ćelijama fibroblasta (Reffitt et al., 2003). Deluje i kao blag diuretik, pa se koristi za smanjenje metaboličkih i hormonskih edema u menopauzi. Posедуje ovu aktivnost zahvaljujući ekvisetoninu, kalijumu, kalcijumu, magnezijumu, vitaminu C i kafenoj kiselini (Sandhu et al., 2010).

Pozitivan uticaj na zdravlje čoveka (jačanje kostiju, noktiju, kože) se pripisuje velikom sadržaju silicijuma. Bye i saradnici su ispitali odnos sadržaja silicijuma nakon pripremanja čaja i sadržaja ukupnog silicijuma koji se nalazi u biljci. Tokom pripremanja čaja, sadržaj silicijuma u rastvoru je bio od 5,9 do 10,2% od ukupnog sadržaja silicijuma u biljci, pa su ovi rezultati pokazali da je rastvorljivost silicijuma iz rastavića jako mala. Da bi se silicijum oslobodio iz biljke potrebno je biljku tretirati jakim kiselinama, pa sama ključala voda nije dovoljna. Takođe su ispitali mogućnost ekstrakcije silicijuma različitim organskim rastvaračima, ali su i ti rezultati pokazali da je rastvorljivost silicijuma iz rastavića jako mala (Bye et al., 2010).

Ukoliko se duže upotrebljava, rastavić može da bude i toksičan. Silikati izazivaju probleme sa varenjem, a alkaloidi, iako su prisutni u malim koncentracijama, usled duže upotrebe se nagomilavaju u organizmu, što može da dovede do glavobolje, prevremenog porođaja, gubitka apetita i nervnih poremećaja (Sandhu et al., 2010).

2.1.3.2.3 *Biološka aktivnost rastavića*

Rastavić se primenjuje kao antioksidans, istraživanja su pokazala da vodeni i etanolni ekstrakti fertile stabljike rastavića poseduju veliku sposobnost hvatanja superoksid anjona i hidroksil radikala (Nagai et al., 2005).

Rastavić pokazuje i antimikrobnu aktivnost. Etilacetatni, n-butanolni i vodeni ekstrakt rastavića su inhibirali rast *P. aeruginosa*, *S. aureus* i *B. cereus*, ali nisu pokazali antimikrobnu aktivnost prema *E. coli*. Međutim, u istom radu je pokazano da je minimalna inhibitorna koncentracija ekstrakta rastavića dosta visoka i da iznosi 25 mg/ml za *S. aureus*, 50 mg/ml za *P. aeruginosa* i 100 mg/ml za *B. cereus* (Čanadanović-Brunet et al., 2009). Druga istraživanja su pokazala da vodeno-etanolni ekstrakt i etarsko ulje rastavića inhibiraju rast *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *E. coli*, *S. enteritidis*, *K. pneumoniae*, *Candida albicans* i *Aspergillus niger* (Milovanović et al., 2007; Radulović et al., 2006). Vodeno-etanolni ekstrakt rastavića u koncentraciji 3% u potpunosti inhibira rast gljiva *Aspergillus carbonarius* i *Fusarium graminearum*, pod svim uslovima temperature i vlage koji odgovaraju uslovima skladištenja poljoprivrednih proizvoda, dok pod određenim uslovima inhibira i rast *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus westerdijkiae* i *Fusarium verticillioides*. Ove plesni mogu da kontaminiraju poljoprivredne proizvode i proizvedu mikotoksine (aflatoksine B1, B2, G1 i G2, ohratoksin A, fumonizin B1 i B2, deoksinivalenol i zearalenon) (Garcia et al., 2011).

Ekstrakt rastavića pokazuje i hepatoprotektivnu aktivnost, a najjaču aktivnost pokazuje luteolin i onitin iz metanolnog ekstrakta rastavića (Oh et al., 2004).

Vodeno-etanolni ekstrakt rastavića, u koncentracijama od 200 do 400 mg/kg, deluje umirujuće i pokazuje antikonvulzivni efekat. U istraživanju koje su Dos Santos i saradnici sprovedi na pacovima, pokazalo se da ekstrakt rastavića produžava san (izazvan barbituratima) kod životinja za 46 do 74%, a smanjuje se i broj i težina konvulzija, kao i broj životinja kod kojih su se razvijale konvulzije (Dos Santos et al., 2005).

Ekstrakt rastavića je testiran i na ćelijama leukemije miša L1210 i pokazao je da inhibira njihov rast za 99% (Dos Santos et al., 2005). Takođe je pokazao i citotoksični efekat prema ljudskim ćelijama leukemije U937. Ekstrakt je izazivao apoptozu ćelija i sprečavao je njihovu proliferaciju (Sandhu et al., 2010). Takođe su ekstrakti rastavića imali antiproliferativnu aktivnost humanih ćelijskih linija i to humanog kolorektalnog karcinoma HT-29, adenokarcinoma dojke (MCF-7) i karcinoma grlića materice (HeLa) (Četojević-Simin et al., 2010).

2.1.3.3 Hajdučka trava (*Achillea millefolium*)

Achillea millefolium je široko rasprostranjena, izuzetno lekovita, biljka. U narodu je poznata kao hajdučka trava, hajdučica ili stolisnik. Pripada porodici glavočika (*Asteraceae*) koja obuhvata više od 100 vrsta rasprostranjenih u Evropi, Severnoj Americi, južnoj Australiji i severnoj Aziji (Lakshmi et al., 2011). Hajdučka trava se koristi u tradicionalnoj i zvaničnoj medicini, kozmetici i homeopatiji. Rod je dobio ime po Ahilu, heroju Trojanskog rata koji je pomoću ove biljke zaustavio krvarenje i iscelio rane Heraklovom sinu Telefusu, dok je *millefolium* dobio od reči *mille* što znači hiljadu i *folium* što znači list (Benedek & Kopp, 2007). Hajdučka trava je višegodišnja aromatična zeljasta biljka, visine 20-100 cm, sa uspravnom čvrstom stabljikom. Listovi su ravnomerno raspoređeni duž stabljike i perasto su deljeni, a mogu da budu veličine od 5 do 20 cm. Glavice su u štitolikim cvastima sa prljavo belim centralnim i belim obodnim cvetovima (slika 2.5). Osim sa belim cvetovima, u planinskim krajevima može da se nađe hajdučka trava i sa ružičastim i svetlo ljubičastim cvetovima. Raste na toplim i sunčanim staništima, na livadama, poljima, uz puteve i na suvim osunčanim padinama. Aktivno raste u proleće, a cveta od juna do septembra. Vrlo se brzo širi i dobro podnosi sušu, pa može da se koristi u borbi protiv erozije zemljišta. Raste do nadmorske visine od 3500 m (Lakshmi et al., 2011).



Hajdučka trava je svrstana u sledeće taksonomske kategorije:

Carstvo: *Plantae*

Razdeo: *Magnoliophyta*

Klasa: *Magnoliopsida*

Potklasa: *Asteridae*

Red: *Asterales*

Porodica: *Asteraceae*

Rod: *Achillea*

Vrsta: *Achillea millefolium* L.

Slika 2.5. Izgled biljne vrste *Achillea millefolium* L. (preuzeto 18.08.2017. sa (<http://www.mountpispaharboretum.com>))

Lekoviti delovi biljke je nadzemni deo (*Millefolii herba*) (preuzeto 18.08.2017. sa (<http://www.mocbilja.rs/>)).

2.1.3.3.1 Hemijski sastav hajdučke trave

Raznolikost i složenost fitohemijskog sastava hajdučke trave objašnjava njenu široku primenu u fitoterapiji (Szymański et al., 2014). U hajdučkoj travi je zastupljeno više vrsta bioaktivnih jedinjenja, a ispitivanjem četrdeset komercijalno dostupnih uzoraka hajdučke trave se pokazalo da je sadržaj polifenola visok i da u proseku u hajdučkoj travi ima 0,60% flavonoida i 1,48% fenolnih kiselina (Benedek & Kopp, 2007). Glavne grupe hemijskih jedinjenja su:

- Fenolne kiseline, od kojih su najzastupljenije hlorogenska i 3,5-O-dikafeoilhinska kiselina (eng. *3,5-dicaffeoylquinic acid* 3,5-DCQA), a prisutni su i 1,3—DCQA, 1,4-DCQA, 3,4-DCQA;
- Flavonoidi, od kojih su najprisutniji apigenin-7-O-glukozid, luteolin-7-O-glukozid i rutin. U manjim koncentracijama su prisutni apigenin, luteolin, apigenin-4'-O-glukozid, luteolin-4'-O-glukozid (Benedek et al., 2007; Benetis et al., 2008; Vitalini et al., 2011; Wojdyło et al., 2007).

- Alkaloidi, betonicin, stahidrin i trigonelin;
- Kumarini, salicilna kiselina, seskviterpeni (ahilin i ahilicin), poliacetileni, triterpeni, tanini i steroli (Lakshmi et al., 2011).

2.1.3.3.2 *Primena hajdučke trave*

Hajdučka trava se u narodnoj medicini koristi za lečenje upalnih procesa, gastrointestinalnih poremećaja, za zarastanje rana i za lečenje glavobolje. Korisna je i u poremećaju krvarenja, pa se koristi za smanjenje modrica, zarastanje rana, zaustavljanje krvarenja iz nosa. Seskviterpen ahilin daje joj gorak ukus, pa se koristi za poboljšavanje apetita. Ulazi u sastav mnogih biljnih preparata koji se koriste za smanjenje povišenog krvnog pritiska. Pojačava proizvodnju žuči, pa se poboljšava emulgovanje masti, apsorpcija masti i liposolubilnih vitamina u crevima. Takođe je korisna kod stanja gripa i infekcija respiratornog trakta. Diuretik je i koristi se kod bubrežnih oboljenja kao što je kamen u bubregu. Primenjuje se i kod reumatoidnog artritisa i osteoartritisa. Pojačava delovanje drugih lekovitih biljaka i pomaže oslobađanju toksina iz organizma. Koristi se i za lečenje ekcema, psorijaze i kod menstrualnih tegoba (Akram, 2013; Lakshmi et al., 2011).

2.1.3.3.3 *Biološka aktivnost hajdučke trave*

Candan i saradnici su pokazali da etarsko ulje i metanolni ekstrakt hajdučke trave poseduju antioksidativnu aktivnost. U etarskom ulju je identifikovano 36 aktivnih komponenata, koje su pokazale jaku inhibiciju DPPH radikala, gde je IC_{50} vrednost (koncentracija ekstrakta koja je potrebna za neutralizaciju 50% početne koncentracije DPPH radikala), iznosila 1,56 $\mu\text{g/ml}$, dok IC_{50} vrednost vitamina C (askorbinske kiseline), potentnog antioksidansa iznosi 3,9 $\mu\text{g/ml}$, što ukazuje da je etarsko ulje hajdučke trave jači antioksidans. Metanolni ekstrakt je pokazao slabiju antioksidativnu aktivnost (IC_{50} je 45,6 $\mu\text{g/ml}$) (Candan et al., 2003).

Ekstrakt hajdučke trave poseduje i antimikrobnu aktivnost. On deluje na *Staphylococcus aureus* sa minimalnom inhibitornom koncentracijom (MIC) 10 mg/ml i na *Staphylococcus typhimurium* sa MIC 10 $\mu\text{g/ml}$ (Lakshmi et al., 2011). Ekstrakti hajdučke trave, dobijeni ekstrakcijom heksanom, etrom i metanolom (v:v:v=1:1:1), deluju antimikrobno i na *Escherichia coli*, *Klebsiela pneumoniae*, *Pseudomonas*

aeruginosa i *Salmonella enteritidis* (Stojanović et al., 2005). Hajdučka trava se koristi i kod gastrointestinalnih poremećaja, pa je važno napomenuti i da metanolni ekstrakt deluje i na *Helicobacter pylori* (MIC je 50 µg/ml), koja može da izazove gastritis i čir na želucu i dvanaestopalačnom crevu (Applequist & Moerman, 2011).

Zahvaljujući flavonoidima i azulenu, hajdučka trava poseduje anti-inflamatorno dejstvo. Koristi se za lečenje posekotina i rana, reumatizma i bolova u mišićima (Lakshmi et al., 2011). Deluje anti-inflamatorno inhibiranjem proteaza, uključujući neutrofilnu elastazu i matriks metaloproteinazu (Applequist & Moerman, 2011).

Hajdučka trava pokazuje i dobru antikancerogenu aktivnost. Zahvaljujući flavonoidima i seskviterpenima efikasno inhibira proliferaciju ćelija leukemije P388 miša (Lakshmi et al., 2011). Još jedna studija je pokazala da ekstrakt hajdučke trave izaziva antiproliferaciju humanih ćelijskih linija adenokarcinoma dojke (MCF-7), karcinoma grlića materice (HeLa) i epidermoidnog karcinoma (A431) (Csupor-Löffler et al., 2009). Citotoksični efekat je ispoljila i kada su korišćene humane ćelijske linije nesitnoćelijskog humanog karcinoma pluća (NCI-H460), kancera debelog creva (HCT-15), karcinoma grlića materice (HeLa) i hepatoma ćelije (HepG2) (Dias et al., 2013). Antiproliferativnu aktivnost pokazuje i prema humanim ćelijama karcinoma prostate (PC-3) (Huo et al., 2013).

Zbog prisustva kvercetina, luteolina i apigenina, hajdučka trava ima i antispazmolitičku aktivnost (Benedek & Kopp, 2007).

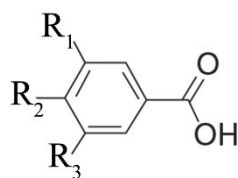
Uprkos brojnim lekovitim svojstvima, hajdučka trava može da izazove kontaktni dermatitis kod nekih ljudi. Aktivno jedinjenje je alfa-peroksiahifolid, seskviterpenoid, čija je koncentracija veća kod sveže biljke, u cvetovima je ima do 0,6%, a u listovima do 0,05%. Sušenjem se koncentracija smanjuje usled razgradnje jedinjenja (Applequist & Moerman, 2011).

2.2 Polifenoli

Polifenoli su sekundarni metaboliti prisutni u svim višim biljkama. Poznato je oko 8.000 različitih vrsta polifenola u biljkama (Bravo, 1998). Od njih potiče boja, senzorne karakteristike voća i povrća, a učestvuju i u rastu, reprodukciji i zaštiti biljaka od patogena. Pokazuju širok spektar bioloških aktivnosti - antioksidativnu, antimikrobnu, anti-inflamatornu, antifungalnu, anti-alergenu i druge, a smatra se da konzumiranje hrane bogate polifenolima može da smanji rizik od razvoja kardiovaskularnih bolesti, kancera, dijabetesa (Bravo, 1998).

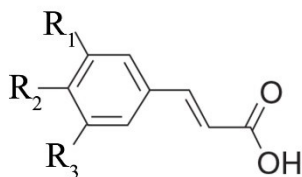
U svojoj strukturi imaju barem jedan fenol (aromatičan prsten sa hidroksilnom grupom) i prema broju fenolnih jedinica se dele na jednostavne fenole, u koje spadaju fenolne kiseline i polifenole, koji se dele na flavonoide, koji imaju dve fenolne jedinice, i tanine, koji imaju tri i više fenolnih jedinica (Ajila et al., 2011). U fenolne kiseline spadaju derivati hidroksibenzoeve i hidroksicimetne kiseline (slika 2.6) (Cuvelier et al., 1992).

Hidroksibenzoeve kiseline



Benzoeva: $R_1=R_2=R_3=H$
p-Hidroksibenzoeva: $R_2=OH, R_1=R_3=H$
Vanilinska: $R_2=OH, R_3=OCH_3, R_1=H$
Siringinska : $R_2=OH, R_1=R_3=OCH_3$
Protokatehinska : $R_2=R_3=OH, R_1=H$
Galna: $R_1=R_2=R_3=OH$

Hidroksicimetne kiseline

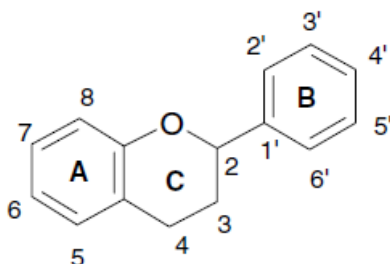


Cimetna: $R_1=R_2=R_3=H$
p-Kumarinska: $R_2=OH, R_1=R_3=H$
Ferulna: $R_2=OH, R_3=OCH_3, R_1=H$
Sinapinska: $R_1=R_3=OCH_3, R_2=OH$
Kafena: $R_2=R_3=OH, R_1=H$

Slika 2.6. Hemijska struktura fenolnih kiselina (preuzeto i modifikovano od (Cuvelier et al., 1992; El Gharras, 2009))

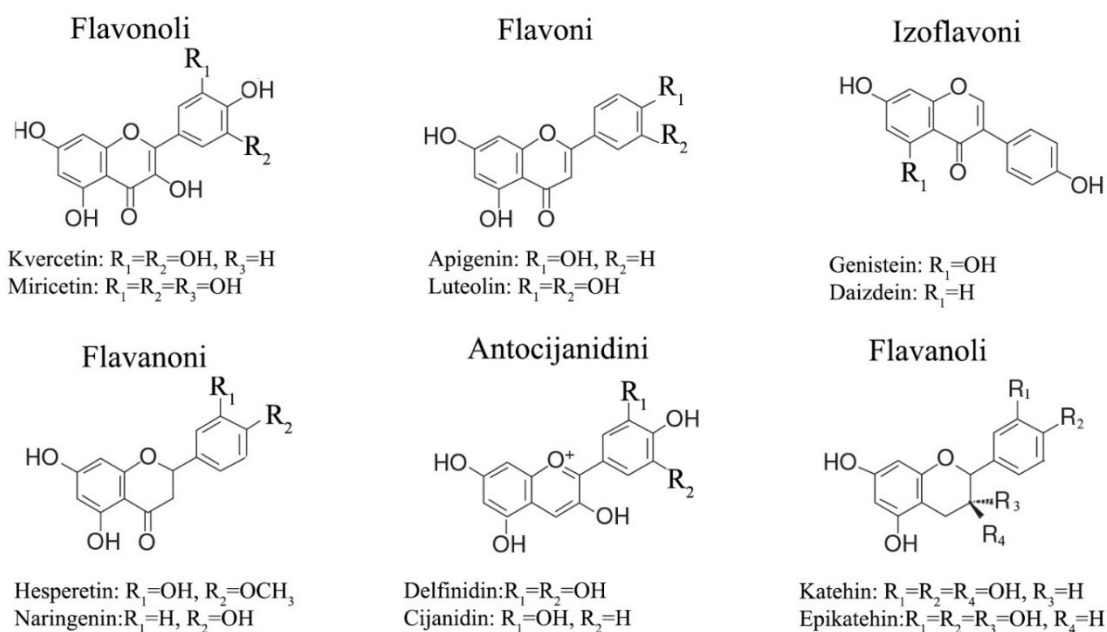
Uloga flavonoida u biljkama je dvojaka. Oni cveću daju atraktivnu boju, koja privlači biljne oprašivače, a u listovima imaju ulogu zaštitnika od patogena i UV-B zračenja (Cushnie & Lamb, 2005). Flavonoidi su jedinjenja male molekulske mase

izgrađeni od dva aromatična prstena (A i B) koji su povezani sa tri ugljenikova atoma koji čine heterocikličan prsten (C) (slika 2.7) (Balasundram et al., 2006).



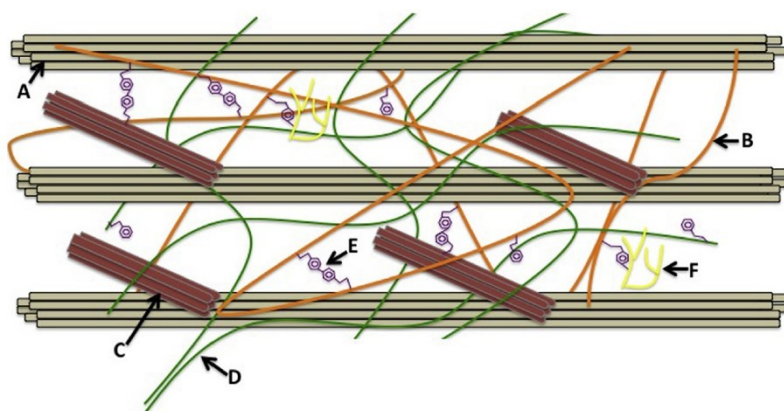
Slika 2.7. Hemijska struktura flavonoida (preuzeto i modificirano od (Balasundram et al., 2006))

Različitim derivatima na prstenu C nastaju osnovne klase flavonoida: flavonoli, flavoni, izoflavoni, flavanoni, antocijanidini i flavanoli (slika 2.8). U okviru svake klase flavonoida postoje različita jedinjenja koja se dobijaju supstitucijom na prstenu A i B. Te supstitucije su najčešće alkilovanje, glikozilacija, sulfonovanje ili acilovanje (Balasundram et al., 2006; Bravo, 1998).



Slika 2.8. Hemijska struktura flavonoida (preuzeto i modificirano od (Dai & Mumper, 2010; El Gharras, 2009))

Polifenoli u biljkama mogu da budu prisutni u dva oblika, kao slobodni i vezani polifenoli. Slobodni polifenoli se nalaze u biljnim vakuolama, dok su vezani polifenoli kovalentnim vezama povezani sa strukturnim komponentama ćelijskog zida biljke (slika 2.9) (Acosta-Estrada et al., 2014; Huynh et al., 2014). Konzumiranjem hrane koja sadrži polifenole, kao što je voće i povrće, smanjuje se rizik od nastanka mnogih hroničnih oboljenja. Međutim, zdravstvena korist polifenola zavisi od njihove apsorpcije i metabolizma u organizmu, koji sa druge strane zavise od strukture, stepena glikozilacije, molekulske mase i rastvorljivosti polifenola (Balasundram et al., 2006; Bravo, 1998). Slobodni, jednostavni polifenoli, kao što je kvercetin i fenolne kiseline se lakše apsorbuju u tankom crevu, za razliku od glikozida i vezanih polifenola, koji usled veće molekulske mase i kompleksnije strukture stižu do debelog creva gde podležu metabolizmu crevne mikrobiote i prevode se u jednostavnije molekule koji se kasnije apsorbuju (Huynh et al., 2014). Većim unosom vezanih polifenola smanjuje se rizik od nastanka raka debelog creva, a konzumiranjem hrane koja je bogata slobodnim polifenolima se postiže zdravstveno povoljno delovanje na ceo organizam jer se, na primer, sprečava oksidacija LDL holesterola i lipozoma (Acosta-Estrada et al., 2014).



Slika 2.9. Prikaz primarne strukture biljnog ćelijskog zida i veze između strukturnih komponenti i polifenola (preuzeto i modifikovano od (Acosta-Estrada et al., 2014))

*(A) celuloza, (B) hemiceluloza, (C) strukturni protein, (D) pektin. (E) polifenoli, (F) lignin

2.2.1 *Biološka aktivnost polifenola*

2.2.1.1 *Antioksidativna aktivnost*

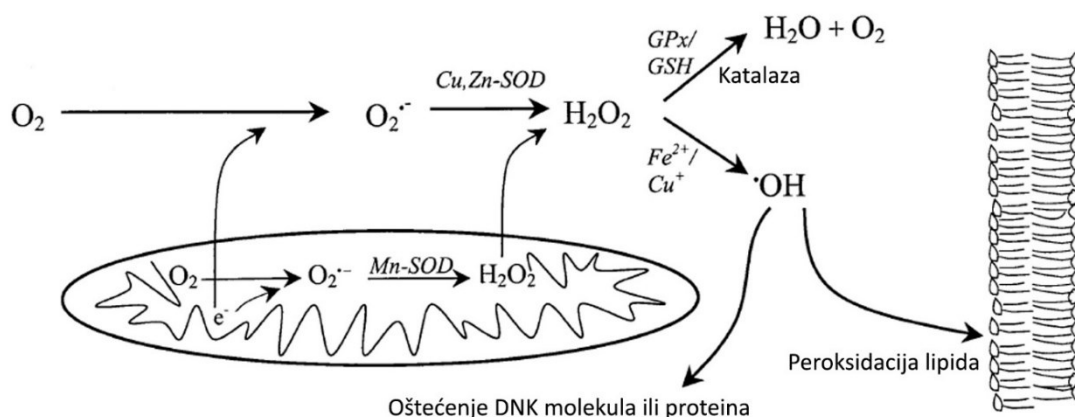
2.2.1.1.1 *Slobodni radikali*

Slobodni radikali su atomi, molekuli ili joni koji imaju jedan ili više nesparenih elektrona u spoljašnjoj orbitali, zbog čega su veoma nestabilni i visoko reaktivni prema drugim molekulima. Slobodni radikali mogu da se spare sa drugim slobodnim radikalom ili mogu da preuzmu ili daju svoj nespareni elektron drugom molekulu, koji tada postaje slobodan radikal (Halliwell, 1989). Stvarajući nove slobodne radikale, oni otpočinju lančanu reakciju, koja može da se zaustavi kada se slobodni radikali neutrališu antioksidansima (Halliwell, 2006; Percival, 1998). Slobodni radikali se konstantno proizvode u ćelijama tokom normalnih fizioloških aktivnosti. Oni nastaju kao posledica odbrane organizma od virusa i bakterija, u procesu disanja u mitohondrijama i u procesu detoksikacije organizma od otrovnih materija. Sa druge strane duvanski dim, zagađenja, pesticidi, preterano vežbanje i izloženost alergenima su spoljašnji faktori koji podstiču proizvodnju slobodnih radikala u organizmu (Percival, 1998). Slobodni radikali oštećuju lipide, nukleinske kiseline, proteine, šećere i enzime i tako oštećuju ćelije, pa dolazi do razvoja mnogih bolesti, kao što su kardiovaskularne bolesti, kancer, Alchajmerova, Parkinsonova bolest, inflamatorne bolesti, dijabetes, katarakta, multiplaskleroza, pankreatitis, ateroskleroza, artritis i druge (Carocho & Ferreira, 2013; Fang et al., 2002; Jacob, 1995; Percival, 1998).

2.2.1.1.1.1 *Vrste slobodnih radikala*

Slobodni radikali nastaju od kiseonika, azota, hlora i sumpora i tako nastaju reaktivne kiseonične vrste (eng. *Reactive oxygen species* ROS), reaktivne vrste azota (eng. *Reactive nitrogen species* RNS), reaktivne vrste hlora (eng. *Reactive chlorine species* RCS) i reaktivne vrste sumpora (eng. *Reactive sulphur species* RSS) (Fang et al., 2002). Reaktivne kiseonične vrste predstavljaju najznačajniju klasu slobodnih radikalskih vrsta u živim sistemima i obuhvataju superoksid anjon ($O_2^{\cdot-}$), hidroksil radikal ($\cdot OH$), peroksil radikal (RO_2^{\cdot}), alkoksil radikal (RO^{\cdot}) i hidroperoksil radikal (HO_2^{\cdot}), ali i neradikalske kiseonične forme, kao što su hipohlorna kiselina, singletni kiseonik i vodonik peroksid (Carocho & Ferreira, 2013; Halliwell, 2006).

Najreaktivniji slobodni radikali su hidroksil (vreme poluživota 1 ns) i alkoksil radikal (vreme poluživota 1 μ s) i oni veoma brzo napadaju molekule u okolnim ćelijama (Jacob, 1995). Od reaktivnih kiseoničnih vrsta, superoksid anjon se konstantno proizvodi u telu, u mitohondrijama u toku procesa disanja, a najviše se proizvodi tokom vežbanja i upalnih procesa. Od njega kasnije nastaju drugi slobodni radikali, kao što su vodonik peroksid i hidroksil radikal. Hidroksil radikal može da prouzrokuje mnoga oštećenja u ćelijama. On nastaje od vodonik peroksida u reakciji koja je katalizovana jonima metala (gvožđa ili bakra) i ova reakcija je poznata kao Fentonova reakcija (Nordberg & Arner, 2001). Vodonik peroksid nastaje redukcijom kiseonika acetilkoenzim-A oksidazom, a takođe može da nastane u metabolizmu glicina ili konverzijom superoksid anjona superoksid dismutazom (slika 2.10) (Fang et al., 2002).



Slika 2.10. Nastajanje slobodnih radikala i njihova neutralizacija enzimskim antioksidansima (preuzeto i modifikovano od (Nordberg & Arner, 2001))

Osim reaktivnih kiseoničnih vrsta, reaktivne azotove vrste su značajne za biološke sisteme. Azotmonoksidni radikal jedan od najzastupljenijih signalnih molekula u telu, služi kao neurotransmiter i kao posrednik u imunom odgovoru, kada ga aktiviraju makrofagi, a ima i važnu ulogu u kardiovaskularnom sistemu (Carocho & Ferreira, 2013; Halliwell, 2006).

2.2.1.1.1.2 Delovanje slobodnih radikala

Da bi zaštitilo ćelije i organe od slobodnih radikala, ljudsko telo je razvilo visoko sofisticirani, kompleksni sistem antioksidativne zaštite, koji uključuje antioksidanse endogenog i egzogenog porekla (Percival, 1998). Kada se u organizmu naruši balans između proizvodnje i neutralizacije slobodnih radikala antioksidansima, dolazi do

oksidativnog stresa i do oštećenja ćelija delovanjem slobodnih radikala na proteine, nukleinske kiseline i lipide (Carocho & Ferreira, 2013).

Slobodni radikali oštećuju DNK molekul cepanjem lanca DNK, modifikacijom baza, umrežavanjem proteina i DNK molekula (Carocho & Ferreira, 2013). Najšešće do oštećenja DNK dolazi delovanjem hidroksilnog radikala (Nordberg & Arner, 2001). Promene u DNK molekulu su, između ostalih, odgovorne za proces starenja, inflamatorne bolesti, bolesti jetre i nastanak kancera (Gate et al., 1999).

Delovanjem slobodnih radikala na aminokiseline nastaju manje aktivni, nefunkcionalni proteini ili denaturisani enzimi (Nordberg & Arner, 2001). Uzrok ovome je oksidacija specifičnih aminokiselina, cepanje peptida ili umrežavanje proteina zbog reakcije sa proizvodima lipidne peroksidacije. Hidroksil radikal je najreaktivniji radikal koji uzrokuje oksidativna oštećenja proteina (Carocho & Ferreira, 2013).

U mehanizmu lipidne peroksidacije slobodni radikali preuzimaju atom vodonika iz nezasićene masne kiseline. Polinezasićene masne kiseline su osetljivije na delovanje slobodnih radikala od zasićenih ili mononezasićenih, jer prisustvo više dvostrukih veza olakšava preuzimanje vodonika iz masne kiseline (Carocho & Ferreira, 2013). Intenzivna lipidna peroksidacija u biološkim membranama dovodi do gubitka fluidnosti, opadanja vrednosti membranskoga potencijala, povećanja permeabilnosti prema protonima i drugim jonima, što može da dovede do pucanja ćelije i do ispuštanja njenog sadržaja. Povećana lipidna peroksidacija povećava rizik za razvoj ateroskleroze i drugih upalnih bolesti (Štefan et al., 2007). Hidroksil radikal je jedan od glavnih slobodnih radikala koji izazivaju lipidnu peroksidaciju (Carocho & Ferreira, 2013).

2.2.1.1.2 *Antioksidansi*

Po definiciji Halivela i Guteridga, antioksidans je svaka supstanca, koja u malo koncentraciji na supstratu, koji je sklon oksidaciji, odlaže ili sprečava oksidaciju. Antioksidansi su supstance koje neutrališu slobodne radikale, ali u isto vreme ne postaju nestabilni, tako da nisu skloni daljoj oksidaciji. Antioksidansi deluju na više načina: inhibiraju nastajanje slobodnih lipidnih radikala, prekidaju propagaciju u autooksidativnim lančanim reakcijama, hvataju singletni kiseonik, deluju sinergistički sa drugim antioksidansima, vezuju metale prevodeći metal prooksidanse (bakar i gvožđe) u

stabilna jedinjenja i na kraju deluju kao inhibitori prooksidativnih enzima (Carocho & Ferreira, 2013).

2.2.1.1.2.1 Vrste antioksidanasa

Antioksidansi mogu biti endogenog i egzogenog porekla. U endogene antioksidanse, koje ljudsko telo samo sintetiše, spadaju enzimski i neenzimski antioksidansi. Enzimski antioksidansi su podeljeni u dve grupe: enzime primarne i sekundarne odbrane. U enzime primarne odbrane spadaju glutacion peroksidaza (GPx), katalaza (CAT) i superoksid dismutaza (SOD) (Carocho & Ferreira, 2013).

Superoksid dismutaza neutrališe višak superoksid anjona, pri čemu kao proizvod reakcije nastaje vodonik peroksid, koji je supstrat glutacion peroksidazi i katalazi. Glutacion peroksidaza, doniranjem dva elektrona, prevodi vodonik peroksid u vodu, dok katalaza konvertuje vodonik peroksid u vodu i molekulski kiseonik (Nordberg & Arner, 2001).

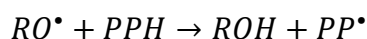
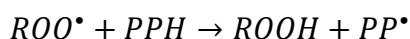
Enzimi sekundarne odbrane su glutacion reduktaza i glukozo-6-fosfat dehidrogenaza. Oni ne učestvuju direktno u hvatanju slobodnih radikala, već pomažu drugim endogenim antioksidansima (Carocho & Ferreira, 2013).

Neenzimski endogeni antioksidansi su vitamin A, enzimski kofaktori (koenzim Q10), glutacion, urinska kiselina i proteini koji vezuju metale (albumin, ceruloplazmin, metalotionein, feritin, mioglobin i transferin) (Jacob, 1995).

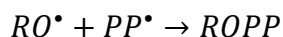
Uprkos svojoj izuzetnoj efikasnosti, endogeni sistem antioksidanasa nije dovoljan za neutralisanje slobodnih radikala, pa ih je potrebno uzimati preko hrane (egzogeni antioksidansi) (Carocho & Ferreira, 2013). U egzogene antioksidanse spadaju vitamin C, vitamin E, karotenoidi i polifenoli. Antioksidansi mogu biti rastvorni u vodi, kada štite citoplazmu ili krvnu plazmu, ili rastvorni u mastima, kada štite ćelijsku membranu od lipidne peroksidacije (Sies, 1997). Ovi antioksidansi su veoma bitni jer mogu da neutrališu hidroksil radikal, koji je veoma reaktivan i može da ošteti sve vrste molekula u organizmu, dovodeći tako do razvoja mnogih bolesti. Za razliku od drugih radikala, koje mogu da neutrališu enzimi, hidroksil radikal eliminišu samo neenzimski endogeni i egzogeni antioksidansi (Božin et al., 2013)

2.2.1.1.2.2 Antioksidativna aktivnost polifenola

Kao antioksidansi polifenoli deluju na slobodne radikale, doniranjem elektrona ili vodonikovog atoma, heliranjem metala koji katalizuju reakcije lipidne peroksidacije ili aktiviranjem antioksidativnih enzima. Princip delovanja polifenola je sledeći: polifenoli (PPH) doniraju vodonikov atom slobodnom radikal (ROO• ili RO•) i pri tome sami postaju radikali (fenoksil radikal PP•). Ovaj radikal je stabilan, pa se prekida lančana reakcija oksidacije.



Takođe, fenoksi radikal može da reaguje sa drugim radikalom i da ga na taj način neutrališe (Bravo, 1998).



Antioksidativna efikasnost polifenola zavisi od njihove hemijske strukture, pa tako antioksidativna aktivnost fenolnih kiselina zavisi od broja i položaja hidroksilnih grupa u odnosu na karboksilnu grupu. Monohidroksibenzojeve kiseline koje imaju hidroksilnu grupu u orto i para položaju u odnosu na karboksilnu grupu ne pokazuju antioksidativnu aktivnost, dok antioksidativna aktivnost postoji, kada je hidroksilna grupa u meta položaju u odnosu na karboksilnu. Povećanjem stepena hidroksilovanja antioksidativna aktivnost se povećava, ali opet zavisi od položaja hidroksilnih grupa u odnosu na karboksilnu grupu. Ukoliko su hidroksilne grupe u orto i meta položaju u odnosu na karboksilnu grupu, antioksidativna aktivnost je veća nego kada su hidroksilne grupe u meta i para položaju u odnosu na karboksilnu grupu (Rice-Evans et al., 1996).

U poređenju sa hidroksibenzojevim kiselinama, hidroksicimetne pokazuju veću antioksidativnu aktivnost, zbog prisustva dvostruke veze (CH=CH-COOH), pa se nakon predaje vodonika slobodnom radikal nastali fenoksil radikal lakše stabilizuje delokalizacijom elektrona. Kada se u hidroksicimetne kiseline uvede druga hidroksilna grupa (kafena kiselina) povećava se antioksidativna aktivnost u odnosu na monohidroksicimetnu kiselinu (*p*-kumarinska kiselina) (Rice-Evans et al., 1996). Takođe se antioksidativna aktivnost povećava uvođenjem metoksi grupe u orto položaju u odnosu na hidroksilnu grupu, pa je sinapinska kiselina jači antioksidans od ferulne, koja je jači antioksidans od *p*-kumarinske. Analogno je i kod hidroksibenzojevih kiselina, gde je

siringinska jači antioksidans od vanilinske, koja je jači antioksidans od *p*-hidroksibenzojeve (Cuvelier et al., 1992).

Flavonoidi su najmoćniji biljni antioksidansi i deluju kao redukujući agensi, donatori vodonika, hvatači singletnog kiseonika, hidroksil i peroksil radikala ili kao helatori metala, a mogu i da aktiviraju antioksidativne enzime i redukuju tokoferoksil radikale.

Flavonoidi spadaju u najpotentnije biljne antioksidanse, a sledeće strukturne karakteristike su povezane sa antioksidativnom aktivnošću:

- stepen hidroksilovanja i položaj hidroksilnih grupa, pa je antioksidativna aktivnost veća kada su hidroksilne grupe u orto položaju u prstenu B;
- prisustvom hidroksilne grupe u položajima 3', 4', 5' u B prstenu povećava se antioksidativna aktivnost, mada u nekim slučajevima takva jedinjenja mogu da deluju i kao prooksidansi;
- dvostruka veza između C2 i C3, konjugovana sa 4-okso grupom u C prstenu pojačava antioksidativnu aktivnost;
- dvostruka veza između C2 i C3 i hidroksilna grupa u položaju 3 povećavaju antioksidativnu aktivnost;
- supstitucijom hidroksilne grupe na B prstenu metoksilnom grupom se smanjuje antioksidativna aktivnost flavonoida (Balasundram et al., 2006; Bravo, 1998; Rice-Evans et al., 1996).

Takođe, antioksidativna aktivnost zavisi od stepena hidroksilovanja i prisustva šećera, pa su aglikoni jači antioksidansi od glikozida (Bravo, 1998)

2.2.1.1.2.3 Sintetički antioksidansi

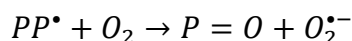
Nasuprot prirodnim antioksidansima, postoje sintetički antioksidansi koji se primenjuju u prehrambenoj industriji da bi sprečili oksidaciju, koja najčešće nastaje oksidacijom nezasićenih masnih kiselina i za posledicu ima neprijatan miris i ukus. U prehrambenoj industriji se najčešće koriste BHT (butilhidroksitoluen), BHA (butilhidroksianizol), PG (propilgalat) i TBHQ (tercijarni butilhidrohinon), čijom razgradnjom nastaju toksične i kancerogene materije, pa je povećano ispitivanje i korišćenje prirodnih antioksidanasa (Gülçin, 2012). Prednost prirodnih antioksidanasa u odnosu na sintetičke se ogleda u toleranciji, netoksičnosti i sigurnosti.

2.2.1.1.2.4 Prooksidativna aktivnost antioksidanasa

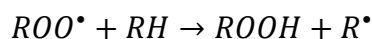
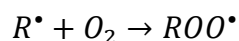
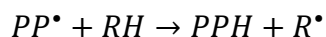
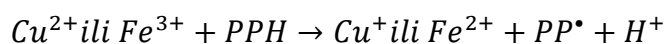
Iako antioksidansi igraju važnu ulogu u metaboličkim putevima i iako štite ćelije od štetnog delovanja slobodnih radikala, istraživanja su pokazala da pojedini antioksidansi mogu delovati i kao prooksidansi. Prooksidansi su definisani kao jedinjenja koja indukuju oksidativni stres, preko inhibicije antioksidativnih sistema ili formiranjem reaktivnih vrsta.

Vitamin C, u *in vitro* uslovima, ima prooksidativno dejstvo, redukujući gvožđe ili bakar (od Fe^{3+} do Fe^{2+} ili od Cu^{2+} do Cu^+), koji dalje redukuju vodonik peroksid do veoma reaktivnog hidroksil radikala. Međutim, pretpostavlja se da se u *in vivo* uslovima ovo ne dešava, jer transportni proteini feritin i transferin uspešno vezuju ove metale (Duarte & Lunec, 2005). Ukoliko se u organizmu nađu visoke koncentracije vitamina E i on može delovati kao prooksidans. Kada reaguje sa slobodnim radikalima vitamin E se transformiše u tokoferoksil radikal koga regeneriše vitamin C. Međutim, kada nema dovoljno vitamina C, tokoferoksil radikal će inicirati autooksidaciju linolne kiseline i na taj način delovati kao prooksidans. Iako nema dovoljno podataka, moguće je i da su karotenoidi potencijalni prooksidansi, koji ispoljavaju takvo dejstvo u prisustvu visokih koncentracija hidroksil radikala (Carocho & Ferreira, 2013).

Polifenoli (PPH) takođe mogu delovati kao prooksidansi i tada ne prekidaju lanac oksidacije, već u prisustvu kiseonika, reagujući sa drugim radikalima, proizvode hinone i superoksid anjon radikal kako je predstavljeno u reakciji:



Takođe i joni prelaznih metala (gvožđe i bakar) mogu da indukuju prooksidativnu aktivnost fenolnih antioksidanasa, što je prikazano u sledećim reakcijama (Dai & Mumper, 2010).



Uslovi koji utiču na autooksidaciju polifenola su visoka pH vrednost, visoka koncentracija jona prelaznih metala i prisustvo molekula kiseonika (Bravo, 1998; Dai & Mumper, 2010). Polifenoli male molekulske mase, koji se lako oksiduju, kao što su

kvercetin i galna kisleina, kao i flavonoli koji imaju slobodne hidroksilne grupe u položaju 5 i 7, poseduju prooksidativna svojstva, dok ih polifenoli velike molekulske mase, kao što su kondenzovani i hidrolizabilni tanini, nemaju (Dai & Mumper, 2010).

2.2.1.1.3 Metode za određivanje antioksidativne aktivnosti

Antioksidativna aktivnost uzorka (ekstrakta) zavisi od mnogih faktora, koji ne mogu potpuno da se odrede jednom metodom, pa je preporučeno korišćenje više metoda kojima se u obzir uzimaju različiti mehanizmi delovanja antioksidanasa (Li et al., 2008). Za određivanje antioksidativne aktivnosti uzoraka se najčešće koriste metode koje se zasnivaju na kolorimetrijskim merenjima, a prema mehanizmu delovanja se dele na metode koje se baziraju na neutralisanju različitih vrsta slobodnih radikala i na metode koje se baziraju na redukciji jona prelaznih metala (najčešće Fe^{3+} ili Cu^{2+}). U prvu grupu metoda spadaju DPPH (eng. *2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl*), ABTS (eng. *2,2'-azino-bis(3-ethylbenz-thiazoline-6-sulfonic acid)*), ORAC (eng. *oxygen radical absorbance capacity*) i TEAC (eng. *trolox equivalent antioxidant capacity*), dok u drugu grupu metoda spada FRAP (eng. *ferric reducing/antioxidant power*), CUPRAC (eng. *Cupric ion reducing antioxidant capacity*). Osim ove podele, metode za određivanja antioksidativne aktivnosti se dele i prema mehanizmu reakcije na: HAT (eng. *Hydrogen atom transfer*) i SET (eng. *Single electron transfer*) metode. HAT metode se zasnivaju na sposobnosti antioksidanasa da neutrališu slobodan radikal doniranjem vodonikovog atoma i u ove reakcije spada ORAC metoda. SET metode se zasnivaju na prenosu elektrona, kada dolazi do promene boje ukoliko dođe do redukcije oksidansa, pri čemu je koncentracija antioksidansa proporcionalna stepenu promene boje. U SET metode spadaju ABTS, FRAP i CUPRAC (Dai & Mumper, 2010), dok se DPPH metoda može odigrati prema oba mehanizma.

U ovoj doktorskoj disertaciji su korišćene dve metode za određivanje antioksidativne aktivnosti ekstrakata, DPPH i FRAP, koje su detaljnije objašnjene u odeljku Metode.

2.2.1.2 Antimikrobna aktivnost

Antibiotici su specifični proizvodi mikrobnog metabolizma koji imaju visoku fiziološku aktivnost prema određenim grupama mikroorganizama (bakterije, plesni,

protozoe, virusi). Pored prirodnih, dobijenih mikrobnom biosintezom, postoje sintetski i polusintetski antibiotici koji su dobijeni hemijskom modifikacijom antibiotika koji su dobijeni biohemijskim putem. Antibiotike proizvode mnogi organizmi, bakterije, gljive, alge, lišajevi, biljke i životinje, a industrijski se proizvode pomoću mikroorganizama (Makovec et al., 2014). Era antibiotika je počela sa otkrićem prvog antibiotika, penicilina, 1928. godine. Od tada su antibiotici spasili milione života, a uspešno su korišćeni i u lečenju i kontrolisanju širenja bakterijskih infekcija u Drugom svetskom ratu. Međutim, ubrzo se došlo do saznanja da bakterije imaju genetsku sposobnost da prenesu ili steknu otpornost na antibiotike, pa se vrlo brzo javila rezistencija na penicilin. Tada su otkriveni i razvijeni novi beta laktamski antibiotici, ali su se već 1962. u Velikoj Britaniji javili prvi meticilin rezistentni *Staphylococcus aureus* (MRSA) koji su postale rezistentne ne samo na penicilin, metacilin, već i na druge primenjene antibiotike (Ventola, 2015). Efikasno rešenje za produženje roka upotrebe antimikrobnih agenasa je strukturna modifikacija jedinjenja, na koje su mikroorganizmi stekli otpornost. Strukturna modifikacija se primenjuje kod antigljivičnih agenasa, kao što su azoli, antivirusnih sredstava, kao što su nenukleozidni inhibitori reverzne transkriptaze i različitih antibakterijskih agenasa uključujući beta laktamske antibiotike (Cushnie & Lamb, 2005).

Mehanizam delovanja antibiotika se ostvaruje na nekoliko načina i to: inhibicijom biosinteze ćelijskog zida (penicilini, cefalosporini, bacitracin, cikloserin), onemogućavanjem umrežavanja peptidoglukanskog sloja ćelijskog zida što dovodi do smrti ćelije, promenom permeabilnosti citoplazmatične membrane ili aktivnog transporta kroz citoplazmatičnu membranu (nistatin, polimiksini, amfotericin B), inhibicijom biosinteze proteina (hloramfenikol, streptomycin, eritromicini) ili putem inhibicije biosinteze ili metabolizma nukleinskih kiselina (rifampicin, novobiocin) (Makovec et al., 2014; Petrović et al., 2005). Najveći broj antibiotika proizvode mikroorganizmi. Od oko 12.000 otkrivenih antibiotika najviše ih proizvode aktinomicete, među kojima je samo iz roda *Streptomyces* izolovano čak 55% antibiotika.

S obzirom na to da rešenje problema multirezistencije bakterija još uvek nije pronađeno, sprovodi se sve veći broj ispitivanja novih antibakterijskih agenasa, pa se sve više ispituju biljni ekstrakti koji bi mogli da budu izvor antimikrobnih jedinjenja, koja bi našla primenu u humanoj i veterinarskoj medicini (Farooqui et al., 2015; Mahesh & Satish, 2008). Osim toga, jedinjenja prisutna u biljnim ekstraktima pored antimikrobne

poseduju i antioksidativnu aktivnost, što ih čini pogodnim za upotrebu u prehrambenoj industriji u cilju produžetka trajanja namirnica, odnosno sprečavanja ili usporavanja razvoja neželjenih mikroorganizama (Gyawali & Ibrahim, 2012). Uopšteno, biljni ekstrakti pokazuju veće antimikrobno dejstvo prema Gram-pozitivnim nego Gram-negativnim bakterijama, a aktivnost prema obe vrste bakterija može biti pokazatelj prisustva širokog spektra aktivnih jedinjenja u ekstraktu ili prisustva metaboličkog toksina (Hayek et al., 2013).

Antimikrobna aktivnost je dokazana za više od 1.340 biljnih vrsta, dok je iz njih izolovano preko 30.000 jedinjenja za koja je takođe dokazano da poseduju antimikrobnu aktivnost (Hayek et al., 2013). Biljni preparati, koji kao aktivnu supstancu sadrže flavonoide, su vekovima korišćeni za lečenje različitih oboljenja. Hipokrat je koristio propolis za lečenje rana i čireva, a njegova antimikrobna svojstva se pripisuju visokom sadržaju flavonoida, a posebno galanginu i pinocembrinu. U Kini se biljka *Scutellaria biacalensis* hiljadama godina koristila za lečenje inficiranih rana u ustima, a danas se zna da je flavonoid baikalein odgovoran za njeno antimikrobno dejstvo (Cushnie & Lamb, 2005). Glavne grupe jedinjenja koje su odgovorne za antimikrobnu aktivnost biljaka su sekundarni metaboliti, fenolne kiseline, flavonoidi, saponini, tanini, alkaloidi, terpeni, alifatični alkoholi, aldehidi, ketoni, kumarini i hinoni. U zavisnosti od njihove hemijske strukture dolazi do varijacije u jačini antimikrobne aktivnosti (Hayek et al., 2013; Nascimento et al., 2000). Takođe, jačina antimikrobne aktivnosti prirodnih jedinjenja zavisi od vremena branja biljke, faze razvoja i metode ekstrakcije aktivnih jedinjenja (Hayek et al., 2013).

Aktivne komponente u biljnim ekstraktima često deluju sinergistički, pa je inhibitorna aktivnost ekstrakta veća od aktivnosti izolovanih komponenata, što može biti posledica različitog mehanizma delovanja svake od aktivnih komponenata (Guil-Guerrero et al., 2016; Hayek et al., 2013).

2.2.1.2.1 *Veza antimikrobne aktivnosti i hemijske strukture polifenola*

Broj i položaj hidroksilnih grupa utiče na antimikrobnu aktivnost fenolnih jedinjenja i povećava se kada je povećan broj hidroksilnih grupa (Cowan, 1999). Prisustvo dve hidroksilne grupe u položajima 2' i 4' ili 2' i 6' na prstenu B ili u položaju 5 i 7 na prstenu A flavanona je veoma važno za antibakterijsku aktivnost prema MRSA.

Takođe, aktivnost se povećava supstitucijom u položaju 6 ili 8 alifatičnom grupom dugog lanca, kao što je lavandulil (5-metil-2-(1-metilenetil)heks-4-enil) i geranil (trans-3,7-dimetil-2,6-oktadienil). Dok prisustvo metoksi grupe značajno smanjuje antimikrobnu aktivnost flavonoida (Cushnie & Lamb, 2005). Ward i saradnici su ispitali antimikrobnu aktivnost halogenih derivata 3-metilenflavanona i zaključili da se supstitucijom na prstenu B povećava antimikrobna aktivnost, pa su 3'-hloro, 4'-hloro i 4'-bromo analozi dva puta efikasniji prema *S. aureus* i 4 puta efikasniji prema *E. faecalis* od 3-metilenflavanona. S druge strane, supstitucijom na prstenu A se smanjuje antimikrobna aktivnost (Ward et al., 1981).

2.2.1.2.2 *Mehanizam antimikrobnog dejstva polifenola*

Tačan mehanizam dejstva polifenolnih jedinjenja kao antimikrobnih agenasa nije u potpunosti razjašnjen. Jedno od mogućih objašnjenja bi bilo da polifenoli utiču na propustljivost citoplazmatične membrane ćelije, pa dolazi do gubitka molekula iz unutrašnjosti ćelije (Cushnie & Lamb, 2005; Hayek et al., 2013). Ispitivanjem uticaja flavonola galangina na *S. aureus*, zaključeno je da dolazi do gubitka kalijuma usled oštećenja ćelijske membrane, a kao posledica toga, broj ćelija *S. aureus* se smanjio za više od 60 puta (Cushnie & Lamb, 2005).

Drugi mogući mehanizam delovanja polifenolnih jedinjenja je interakcija sa membranskim proteinima, pri čemu se narušava struktura i funkcionalnost ćelije. Takođe, efekat polifenolnih jedinjenja zavisi od koncentracije, tako da pri malim koncentracijama oni utiču na aktivnost enzima, dok pri većim koncentracijama izazivaju denaturaciju proteina (Hayek et al., 2013). Pokazano je i da neki flavonoidi inhibiraju sintezu DNK molekula, a jedno moguće objašnjenje je bilo da je antibakterijsko dejstvo flavonoida posledica njihove inhibicije enzima DNK giraze. Međutim, pošto stepen antibakterijskog delovanja nije uvek bio u korelaciji sa inhibicijom enzima, pretpostavlja se da su i drugi mehanizmi delovanja odgovorni za antibakterijsko dejstvo (Cushnie & Lamb, 2005).

Proantocijanidini inhibiraju rast bakterija reagujući sa ćelijskom membranom, čineći je propustljivom, inhibirajući enzime ili vezujući esencijalne mikronutrijente, kao što su gvožđe i cink (Guil-Guerrero et al., 2016).

Fenolne kiseline deluju različito na Gram-pozitivne, Gram-negativne bakterije i gljivice. Na primer, u radu Cueva i saradnika je pokazano da je *C. albicans* osetljiva samo

na delovanje benzoeve i fenilpropionske kiseline, verovatno zbog građe ćelijskog zida, koji je izgrađen od glukana, hitina i proteina, i koji deluje kao barijera koja sprečava difuziju fenolnih kiselina. Gram-pozitivne bakterije su osetljivije na delovanje fenolnih kiselina, što je objašnjeno narušavanjem potencijala ćelijske membrane, čime se povećava njena propustljivost usled disocijacije fenolnih kiselina. Takođe, disocijacijom fenolnih kiselina se povećava koncentracija H^+ jona, što utiče na aktivnost ATPaze koja učestvuje u sintezi ATP molekula (Srikanta et al., 2007). Međutim, Gram-negativne bakterije imaju spoljašnju membranu koja onemogućava difuziju fenolnih kiselina, što ih čini otpornijim od Gram-pozitivnih bakterija (Cueva et al., 2010).

2.2.1.2.3 Metode za određivanje antimikrobne aktivnosti

Najčešće korišćene metode za određivanje antimikrobne aktivnosti biljnih ekstrakata ili čistih jedinjenja su difuzione ili dilucione metode (Balouiri et al., 2016).

Od difuzionih metoda najčešće se koriste metoda sa diskom i metoda sa bunarčićem. Obe metode podrazumevaju difuziju ekstrakta ili testiranog jedinjenja kroz čvrstu podlogu koja je inokulisana ispitivanim mikroorganizmom. Stepem inhibicije se određuje na osnovu prečnika zone inhibicije rasta ispitivanog mikroorganizma. Metoda sa diskom podrazumeva postavljanje diska od filter papira (prečnika oko 6 mm) na agar koji je inokulisan mikroorganizmom, pri čemu je disk natopljen testiranim ekstraktom u poznatoj koncentraciji. Metoda sa bunarčićima podrazumeva sipanje definisane zapremine ekstrakta poznate koncentracije u formirane bunarčiće (prečnika oko 6 mm) u agar koji je inokulisan mikroorganizmom (Balouiri et al., 2016). Nedostatak obe metode je što je moguće dobijanje lažno negativnih rezultata usled slabe difuzije polifenolnih jedinjenja kroz agar (Cushnie & Lamb, 2005).

Dilucione metode mogu biti mikro- ili makro- dilucione, u tečnoj ili čvrstoj hranljivoj podlozi. Agar diluciona metoda se često koristi za ispitivanje antifungalne aktivnosti, a podrazumeva mešanje različitih koncentracija ispitivanih ekstrakata sa istopljenim agarom, na koji se nakon očvršćavanja nanosi inokulum testiranog mikroorganizma (Balouiri et al., 2016). Stepem inhibicije se određuje poređenjem broja formiranih kolonija mikroorganizma na podlogama sa i bez ispitivane supstance ili ekstrakta.

Mikrodilucione metode u mikrotitarskim pločama se često koriste za određivanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIC). Ispitivani ekstrakt se dodaje tečnoj hranljivoj podlozi i pravi se serija dvostrukih razblaženja, a zatim se inokulira mikroorganizmom. MIC je najniža koncentracija ispitivanog ekstrakta, vidljiva golim okom, koja je u potpunosti sprečila rast mikroorganizma. Često se u metodi koriste indikatori ćelijskog rasta, kao što su MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijum bromid), XTT (2,3-bis-(2-metoksi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolium-5-karboksanilid) i rezazurin, koji menjaju boju u prisustvu ćelija, što olakšava očitavanje rezultata (Balouiri et al., 2016).

2.2.1.3 Stimulacija rasta probiotskih mikroorganizama

Mikrobiota ljudskog gastrointestinalnog trakta (GIT) predstavlja izuzetno složen ekosistem koji obuhvata oko 10^{14} bakterijskih ćelija, od kojih je najveći deo prisutan u debelom crevu. Najprisutnije su vrste koje pripadaju rodovima *Bifidobacterium*, *Eubacterium*, *Clostridium*, *Peptococcus*, *Peptostreptococcus* i *Ruminococcus*, a manje su prisutni rodovi *Escherichia*, *Enterobacter*, *Enterococcus*, *Klebsiella*, *Lactobacillus* i *Proteus* (Hervert-Hernandez & Goñi, 2011). Osim bakterija, deo crevne mikrobiote su i kvasci, koji čine manje od 0,1% mikrobiote. Najprisutnija je *Candida albicans*, ali su prisutni i *Torulopsis glabrata* i *Candida tropicalis* (Czerucka et al., 2007).

Kroz širok spektar metaboličkih i enzimskih aktivnosti crevna mikrobiota utiče na zdravlje i imuni sistem domaćina. Mikrobiota GIT-a štiti domaćina od patogenih mikroorganizama, učestvuje u modulaciji imunog odgovora, doprinosi varenju, sintetiše esencijalna jedinjenja poput vitamina i aminokiselina i svojom kompleksnom aktivnošću doprinose održanju zdravlja GIT-a ali i zdravlja uopšte (Rajilić-Stojanović, 2013). Povoljan sastav crevne mikrobiote je onaj u kom dominiraju „dobre“ (*Lactobacillus* i *Bifidobacterium*) u odnosu na „loše“ (*Fusobacterium*, *Clostridium* i *Eubacterium*) bakterije. Međutim, kao posledica različitih spoljašnjih i unutrašnjih faktora, godina, genetike, imunog sistema i načina ishrane, dolazi do varijacija u sastavu mikrobiote GIT-a, odnosno narušava se balans između dobrih i loših bakterija, što za posledicu ima razvoj različitih oblika gastrointestinalnih, ali i sistemskih poremećaja (Hervert-Hernandez & Goñi, 2011).

Upotrebom *probiotika*, „dobrih“ mikroorganizama, doprinosi se uspostavljanju balansa mikrobiote GIT-a, jer oni imaju mogućnost inhibicije širokog spektra patogeni i pozitivne stimulacije imunog odgovora (Hervert-Hernandez & Goñi, 2011). Po definiciji, probiotici su živi mikroorganizmi, koji imaju povoljne efekte na zdravlje domaćina kada su konzumirani u adekvatnoj količini. Do sada je ustanovljeno da većina probiotika pripada rodovima *Lactobacillus* i *Bifidobacterium*, ali postoje i vrste koje pripadaju drugim rodovima, uključujući *Saccharomyces*, *Enterococcus*, *Bacillus* i *Propionibacterium* (Burns & Rowland, 2000).

Ishrana direktno utiče na sastav i metabolizam crevne mikrobiote. Tako bakterije kao supstrat koriste nesvarene komponente hrane, odnosno one komponente koje nisu svarene delovanjem digestibilnih enzima i nisu apsorbirane u tankom crevu. Ovde u najvećoj meri spadaju ugljeni hidrati, proteini, kao i fitohemikalije, uglavnom polifenoli (Hervert-Hernandez & Goñi, 2011). Ukoliko selektivno stimulišu rast i/ili aktivnost jedne ili više vrsta bakterija u debelom crevu koja ima potencijal da poboljša zdravlje domaćina, nesvarene komponente hrane se definišu kao *prebiotici* (Burns & Rowland, 2000).

Da bi se procenio značaj i uticaj polifenola na ljudsko zdravlje, važno je i da se definiše dnevni unos polifenola, ali i da se uzme u obzir njihova biološka raspoloživost. Na primer, prosečan unos polifenola u Španiji je u opsegu od 2590 do 3016 mg/dan, od kojih je 48% dostupno u tankom crevu, 42% polifenola je dostupno u debelom crevu, a 10% je nedostupno i ostaje vezano za biljni matriks i nakon celokupnog procesa varenja. Polifenoli, koji nesvareni dospeju do debelog creva, podležu metabolizmu crevne mikrobiote, kojom mogu da se transformišu u jedinjenja većeg antioksidativnog potencijala ili da se produkuju metaboliti koji mogu da ostvare sistemski povoljan efekat za zdravlje domaćina (Hervert-Hernandez & Goñi, 2011).

U literaturi postoji veći broj primera pozitivnog uticaja polifenola na rast probiotskih mikroorganizama. U radu Alberto i saradnika je pokazano da galna kiselina i katehin prisutni u grožđu stimulišu rast *Lactobacillus hilgardii*, a zaključeno je da je povećan rast posledica mogućnosti bakterije da koristi polifenolna jedinjenja kao supstrat (Alberto et al., 2001). Takođe, antocijanini prisutni u bobičastom voću stimulišu rast probiotika, zahvaljujući enzimu β -glukozidazi, kog poseduju *Lactobacillus plantarum* IFPL722, *Lactobacillus casei* LC-01 i *Bifidobacterium lactis* BB-12, kojim se antocijanini prevode u jednostavnija polifenolna jedinjenja, koja imaju veću aktivnost i

dostupnija su probioticima (Burns & Rowland, 2000). U radu Jaquet i saradnika je pokazano da se broj *Bifidobacterium* spp povećao kod zdravih volontera nakon konzumiranja tri šoljice instant kafe dnevno u periodu od tri nedelje. Ovaj stimulišući efekat je verovatno posledica prisustva polifenolnih jedinjenja (hlorogenske kiseline), vlakana i alkaloida (Jaquet et al., 2009). U drugom radu je pokazano da vodeni ekstrakt dobijen iz otpada nara (POMx) značajno stimuliše rast *Bifidobacterium breve* NRRL B-41408 i *Bifidobacterium infantis* NRRL B-41661. Zaključeno je da se konzumiranjem nara koji je bogat taninima uspostavlja ravnoteža između „dobrih” i „loših” bakterija u intestinalnom traktu, pri čemu se poboljšava opšte zdravstveno stanje čoveka. Međutim, autori su naglasili da je interakcija između tanina i mikrobiote prisutne u crevima kompleksna, da zavisi od bakterijskih vrsta prisutnih u domaćinu, kao i od koncentracije i vrste drugih konzumiranih polifenolnih jedinjenja (Bialonska et al., 2009). Stimulišući efekat na rast *Lactobacillus reuteri*, *L. rhamnosus* i *B. lactis*, su pokazali i vodeni ekstrakti banane, jabuke i pomorandže, zahvaljujući prisustvu šećera, polifenola i kiselina. Vodeni ekstrakti belog luka i crnog bibera su u isto vreme stimulisali rast *L. reuteri* i inhibirali rast *E. coli* (Sutherland et al., 2009).

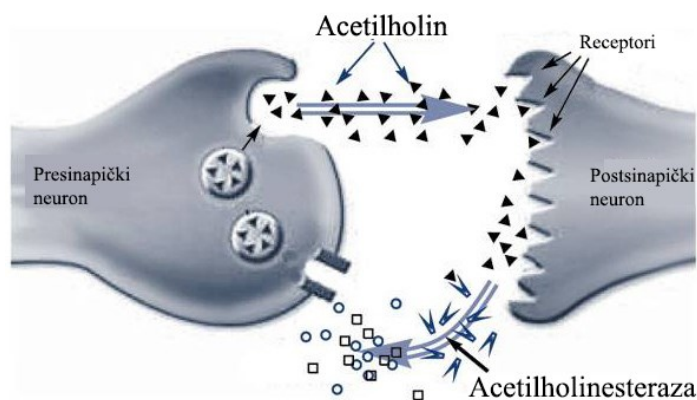
2.2.1.3.1 Mehanizam delovanja

Mehanizam delovanja polifenola kojim se stimuliše rast probiotskih mikroorganizama je različit. Sa jedne strane, neki mikroorganizmi mogu da koriste polifenole kao supstrat za rast. Na primer, bakterije mlečno-kiselinskog vrenja imaju sposobnost da razgradnjom taninske kiseline dobijaju energiju. Neki laktobacili, kao što je *L. plantarum* mogu da razgrade komplekse galne kiseline i glukoze, delovanjem enzima tanaze, a zatim se galna kiselina dekarboksiluje do pirogalola delovanjem enzima galat dekarboksilaze. Takođe, neki mikroorganizmi koriste i hidroksicimetne kiseline kao supstrat. Prvo se redukcijom dvostruke veze hidroksicimetne kiseline prevode u odgovarajuće hidroksifenilpropionske kiseline, koje se dalje dekarboksiluju do *p*-etilfenola (Hervert-Hernandez & Goñi, 2011). Takođe, flavan-3-oli stimulišu rast *Lactobacillus hilgarii*, što je najverovatnije posledica sposobnosti flavan-3-ola da vezuju gvožđe. Vezivanje gvožđa najviše utiče na rast aerobnih mikroorganizama, kojima je gvožđe neophodno za različite procese, kao što je formiranje hema i redukcija ribonukleotid prekursora molekula DNK. Sa druge strane, gvožđe nije presudno važno za

rast laktobacila, jer oni nemaju enzime kojima je kofaktor hem, a i ribonukleotid reduktaza, kojoj je neophodno gvožđe, je zamenjena enzimom koji kao kofaktor koristi adenzilkobalamin (Chung et al., 1998; Hervert-Hernandez & Goñi, 2011). Takođe, neki polifenoli pospešuju iskorišćenje nutrijenata, na primer glukoze (Hervert-Hernandez & Goñi, 2011).

2.2.1.4 Inhibicija acetilholinesteraze

Acetilholin (ACh) je neurotransmiter centralnog i perifernog nervnog sistema. On deluje na dve vrste receptora, nikotinske i muskarinske. Tokom neurotransmisije ACh se oslobađa u sinaptičku pukotinu i povezuje za holinergički receptor na postsinaptičkoj membrani prenoseći signal iz neurona. Acetilholinesteraza (AChE) je enzim koji je pričvršćen uglavnom za suđerast sloj finog vezivnog tkiva, koji ispunjava sinaptički prostor između presinaptičkog nervnog završetka i postsinaptičke membrane. Glavna uloga ovog enzima je razgradnja ACh, pri čemu se završava transmisija signala (slika 2.11). Dejstvom enzima osloboda se holin koji se ponovo preuzima od strane presinaptičkog neurona i koristi za ponovnu sintezu ACh kombinovanu sa acetil-CoA uz pomoć enzima holin acetiltransferaze. AChE je jedan od najefikasnijih poznatih enzima i jedan molekul acetilholinesteraze u toku jednog minuta može da hidrolizuje 6×10^5 molekula ACh (Đorđević et al., 2014).



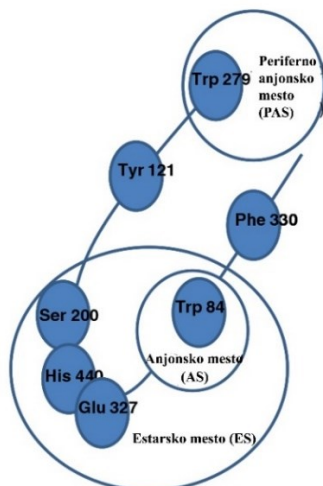
Slika 2.11. (preuzeto 15.05.2017. i modifikovano sa <http://peaknootropics.com>)

Inhibitori AChE se koriste u tretmanu brojnih neuromuskularnih bolesti i predstavljaju prvu generaciju lekova koji se koriste u tretmanu Alchajmerove bolesti (eng. *Alzheimer's disease*, AD). AD je najčešće neurodegenerativno oboljenje, koju karakteriše

klinička slika progresivne demencije, sa intelektualnim padom, poremećajima memorije i kognitivnih funkcija. U patogenezi neurodegenerativnih bolesti prepliću se genetski faktori i faktori spoljašnje sredine i sve više dokaza ukazuju na ulogu oksidativnog stresa, mitohondrijalnu disfunkciju, aktivaciju mikroglije i rezistenciju na insulin u patogenezi neurodegenerativnih bolesti, uključujući i AD (Jovanović, 2012). Da bi efikasno inhibirali AChE, aktivne komponente moraju reverzibilno da se vezuju za enzim, jer u slučaju ireverzibilnog vezivanja mogu dovesti do smrti. Neki sintetički lekovi koji se koriste za tretman AD, kao što su fizostigmin, takrin i donepezil, imaju neželjene efekte, kao što su oštećenje jetre ili izazivaju gastrointestinalne komplikacije. Zapravo, teško je dobiti jedinjenje koje će inhibirati aktivnost enzima u mozgu, a koje neće imati nikakav uticaj na druge organe ili na biohemijske procese u organizmu (Roseiro et al., 2012).

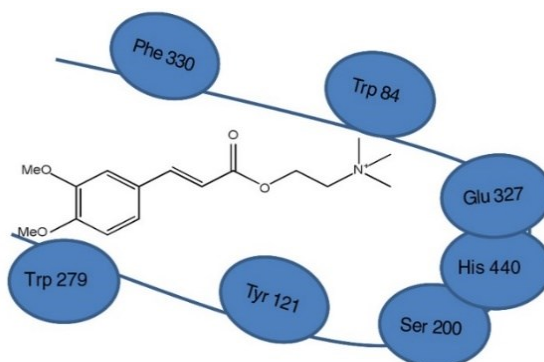
Tradicionalno se mnoge biljke koriste u lečenju demencije, iako nije potvrđeno koje su aktivne komponente i kakav je njihov metabolizam. Prvo jedinjenje koje je izolovano iz biljke, a koje uspešno inhibira AChE, je alkaloid galantamin. Uprkos tome što se njegovom upotrebom javljaju i sporedni efekti on se i dalje uspešno koristi u lečenju Achajmerove bolesti. Postoji veliki interes da se iz lekovitih biljaka izoluju nealkaloidna jedinjenja, uključujući polifenole, koji bi se potencijalno primenjivala u tretmanu Achajmerove bolesti. Međutim, nekada je inhibicija enzima posledica sinergističkog delovanja aktivnih jedinjenja u ekstraktima, pa je aktivnost ekstrakta veća nego aktivnost pojedinačnih jedinjenja. Pored polifenola u biljnim ekstraktima, terpeni i alkaloidi mogu inhibirati AChE (Roseiro et al., 2012).

Uriarte-Pueio i Calvo su predložili da flavonoidi koji inhibiraju aktivnost AChE mogu biti novi multipotentni lekovi za lečenje AD (Uriarte-Pueyo & I Calvo, 2011). Da bi se dizajnirali novi lekovi, potrebno je da se zna struktura aktivnog centra AChE, kako bi se razumeo mehanizam njihovog delovanja. Aktivni centar AChE se sastoji iz estarskog (ES) i anjonskog (AS) vezujućeg mesta. Estarsko mesto aktivnog centra se sastoji od tri aminokiseline, i to serina (Ser²⁰⁰), histidina (His⁴⁴⁰) i glutamina (Glu³²⁷). Za anjonsko mesto aktivnog centra se vezuje holin, a on se sastoji od triptofana (Trp⁸⁴), fenilalanina (Phe³³⁰) i glutamina (Glu¹⁹⁹). Pored ova dva vezujuća mesta, aktivni centar se sastoji i od perifernog vezujućeg mesta za anjone (PAS), koje se nalazi na ulasku u formirano udubljenje u kome je smešten aktivni centar enzima (slika 2.12) (Roseiro et al., 2012).



Slika 2.12. Raspored aminokiselina aktivnog centra AChE (preuzeto i modifikovano od (Roseiro et al., 2012))

Inhibicija aktivnosti AChE je posledica blokade aktivnog centra enzima polifenolima (slika 2.13). Preko svojih OH grupa flavonoidi formiraju veze sa PAS vezivnim mestom. Inhibicija zavisi od strukture flavonoida, pa prisustvo OH grupe u poziciji C3 na C prstenu je jako važna za povećanje inhibicije, dok se ona smanjuje ako je flavonoid glikozilovan ili ukoliko nema OH grupe, kao što je slučaj kod apigenina i luteilina. Međutim, ono što je važno naglasiti je da se struktura polifenolnih jedinjenja u organizmu menja (Roseiro et al., 2012). Aglikoni mogu da se apsorbuju u tankom crevu, ali se glikozidi prvo hidrolizuju do odgovarajućih aglikona i šećera delovanjem bakterijskih β -glukozidaza. Putem krvi, aglikoni se transportuju do jetre, gde se metabolišu do sulfata, glukuronida i/ ili se metiluju (Bravo, 1998).



Slika 2.13. Inhibicija AChE kafenom kiselinom (preuzeto od (Roseiro et al., 2012))

2.3 Ekstrakcija polifenola iz lekovitih biljaka

Upotreba lekovitih biljaka u prevenciji i lečenju različitih oboljenja stara je koliko i samo čovečanstvo, a poslednjih godina je širom sveta poraslo interesovanje za prirodnom medicinom (Mandal et al., 2007; Savić, 2014). Preradom biljnih droga primenom ekstrakcije, destilacije, ceđenja, prečišćavanja, koncentrisanja ili fermentacije dobijaju se biljni preparati. Najvažniju grupu biljnih preparata predstavljaju ekstrakti, koji se dobijaju primenom različitih metoda ekstrakcije, počev od jednostavnih do naprednih tehnika. Ekstrakcija predstavlja izdvajanje i koncentrisanje određenih sastojaka iz biljnih i životinjskih tkiva pomoću selektivnih rastvarača primenom standardnih procedura (Savić, 2014). Za razliku od sintetičkih lekova, koji uglavnom sadrže jednu aktivnu komponentu, biljni ekstrakti sadrže smešu aktivnih jedinjenja. Ova aktivna jedinjenja deluju sinergistički i imaju minimalna ili nikakva neželjena dejstva, dok upotreba sintetičkih lekova može da izazove neželjene sporedne efekte (Mandal et al., 2007). Postoji čitav niz tradicionalnih metoda (maceracija, digestija, perkolacija) i novijih postupaka koji se mogu primeniti za izradu ekstrakata iz lekovitog bilja. Izbor metode zavisi od strukture biljne sirovine, osobina aktivne supstance i tehnoloških mogućnosti (Savić, 2014). Tradicionalne tehnike ekstrakcije aktivnih jedinjenja iz biljnih materijala se zasnivaju na pravilnom izboru rastvarača, na mešanju smeše rastvarača i uzorka, na sobnoj ili povišenoj temperaturi. Iako se tradicionalnim tehnikama ekstrakcije postižu dobri prinosi polifenola, one obično zahtevaju više vremena za ekstrakciju, što može da dovede do razgradnje polifenola. Takođe i prisustvo svetlosti i kiseonika tokom ekstrakcije može da doprinese razgradnji ciljanih jedinjenja (Routray & Orsat, 2012). Zbog svega navedenog je postojala potreba za razvojem novih, efikasijih metoda ekstrakcije. Razvojem modernih metoda ekstrakcije smanjuje se vreme potrebno za ekstrakciju aktivnih jedinjenja, količina potrebnog rastvarača, a postiže se bolji prinos i kvalitet ekstrakta. Najčešće korišćene metode su superkritična ekstrakcija (eng. *Supercritical fluid extraction*, SFE), ekstrakcija rastvaračima na povišenom pritisku (eng. *Accelerated solvent extraction*, ASE), mikrotalasna ekstrakcija (eng. *Microwave assisted extraction*, MAE), ultrazvučna ekstrakcija (eng. *Ultrasound assisted extraction*, UAE) (Ajila et al., 2011).

Drugi način kojim bi mogao da se poveća sadržaj ili da se promeni sastav polifenola u ekstraktima je fermentacija lekovitog bilja. Fermentacijom se poboljšava

prinos polifenola uglavnom zbog oslobađanja vezanih polifenola, što je posledica razgradnje ćelijskog zida pomoću mikrobioloških enzima proizvedenih tokom fermentacije. Delovanjem ćelijskog metabolizma polifenoli se transformišu cepanjem prstena, glikozilovanjem, deglikozilovanjem, metilovanjem, glukuronizacijom, sulfokonjugacijom, što zavisi od soja mikroorganizma i uzorka koji se koristi za fermentaciju (Huynh et al., 2014).

2.3.1 Mikrotalasna ekstrakcija polifenola

2.3.1.1 Mehanizam mikrotalasnog zagrevanja

Zagrevanje pomoću mikrotalasa se zasniva na sposobnosti nekih tečnih i čvrstih supstanci da prevode elektromagnetno zračenje u toplotu. U elektromagnetnom spektru, oblast mikrotalasnog zračenja se nalazi između infracrvenog i radiotalasnog područja, što odgovara talasnim dužinama od 1 mm do 1 m, odnosno frekvencijama između 300 MHz i 300 GHz (Lidström et al., 2001; Mandal et al., 2007). Većinu frekvencija pokrivaju telekomunikacioni i radarski uređaji, a industrijske, laboratorijske i kućne mikrotalasne pećnice rade na frekvenciji od 2,45 GHz (talasna dužina 12,25 cm) (Mijin & Petrović, 2005). Mikrotalasi spadaju u nejonizujuće zračenje i oni ne izazivaju promene u strukturi molekula već samo njihovu rotaciju (Mandal et al., 2007)

Za razliku od klasičnog zagrevanja, kada se zagrevanje odigrava kondukcijom i konvekcijom toplote i kada dolazi do gubitka energije, kod mikrotalasnog zagrevanja nema gubitaka energije jer se elektromagnetno zračenje direktno prevodi u toplotu preko molekulskih interakcija materijala sa elektromagnetnim poljem (Veggi et al., 2012). Zagrevanje pomoću mikrotalasa se odigrava na dva načina, koja se obično odigravaju istovremeno:

- Dipolarnim mehanizmom, tj. kretanjem dipola u električnom polju. Dipoli su osetljivi na dejstvo spoljašnjeg električnog polja i pokušavaju da se usklade sa oscilovanjem polja. Međutim, rotacija dipola nije uvek dovoljno brza, pa dolazi do fazne razlike između polja i dipola. Fazna razlika dovodi do gubitka energije dipola usled trenja i sudaranja, što rezultira zagrevanjem (Lidström et al., 2001). Međutim, zagrevanje se dešava samo pri frekvenciji zračenja od 2,45 GHz. Pri višim frekvencijama polje osciluje velikom brzinom, pa dipoli ne mogu da isprate te promene, ne dolazi do kretanja, pa nema ni zagrevanja. Ako je frekvencija niža

od 2,45 GHz, dipoli idealno prate promene polja, pa opet nema zagrevanja (Mandal et al., 2007).

- Kondukcioni mehanizmom, tj kretanjem jona u električnom polju. Delovanjem električnog polja dolazi do kretanja jona i do gubitka energije usled sudaranja i prevođenja kinetičke energije u toplotu (Lidström et al., 2001). Kondukcioni mehanizam ima veći udeo u generisanju toplote od dipolarne rotacije pod dejstvom mikrotalasa (Mijin & Petrović, 2005).

Da bi došlo do zagrevanja, potrebno je da supstanca poseduje dipolni momenat ili naelektrisanje, dok su nepolarni molekuli inertni prema mikrotalasi (Mandal et al., 2007).

Sposobnost materijala da prevodi elektromagnetno zračenje u toplotu je posledica njegovih dielektričnih svojstava i izražava se tangensom (uglom) gubitka ($\tan \delta$). Tangens gubitka predstavlja odnos između dielektričnog gubitka (ϵ'') i dielektrične konstante (ϵ') (jednačina 2.1). Dielektrični gubitak predstavlja efikasnost kojom se apsorbovana energija prevodi u toplotu, a dielektrična konstanta predstavlja stepen polarizovanosti molekula u električnom polju (tabela 2.1).

$$\tan \delta = \frac{\epsilon''}{\epsilon'} \quad (2.1)$$

Interakcija rastvarača sa mikrotalasanim zračenjem zavise od dielektričnih svojstava rastvarača, koja zavise od temperature rastvarača i frekvencije primenjenog polja, kao i od viskoznosti rastvarača, koja je opet funkcija temperature (Mandal et al., 2007). U tabeli 2.1 su prikazane vrednosti dielektrične konstante za različite rastvarače. Iako etanol i metanol imaju niže dielektrične konstante, njihovo zagrevanje mikrotalasi će biti veće usled većeg tangensa gubitka (Mandal et al., 2007). Efekat zagrevanja mikrotalasi dosta zavisi i od prirode rastvarača i biljnog matriksa. U slučaju ekstrakcije termolabilnih jedinjenja koriste se nepolarni rastvarači koji se ne greju delovanjem mikrotalasa. Tada se greje samo biljni matriks, a bioaktivna supstanca se oslobađa u hladan rastvarač i na taj način se sprečava termalna razgradnja jedinjenja (Camel, 2000).

Tabela 2.1. Tangens gubitka, dielektrična konstanta, temperatura ključanja i viskoznost nekih rastvarača (Mandal et al., 2007; Veggi et al., 2012)

Rastvarač	Dielektrična konstanta, ^a (ϵ')	Tangens gubitka ($\tan \delta$) $\times 10^{-4}$	Temperatura ključanja, ^b ($^{\circ}\text{C}$)	Viskoznost, ^c (cP)
Aceton	20,7	5555	56	0,30
Acetonitril	37,5		82	
Etanol	24,3	2500	78	0,69
Heksan	1,89		69	0,30
Metanol	32,6	6400	65	0,54
2-Propanol	19,9	6700	82	0,30
Voda	78,3	1570	100	0,89
Etilacetat	6,02	5316	77	0,43

^a utvrđeno na 20 $^{\circ}\text{C}$

^b utvrđeno na 101,4 kPa

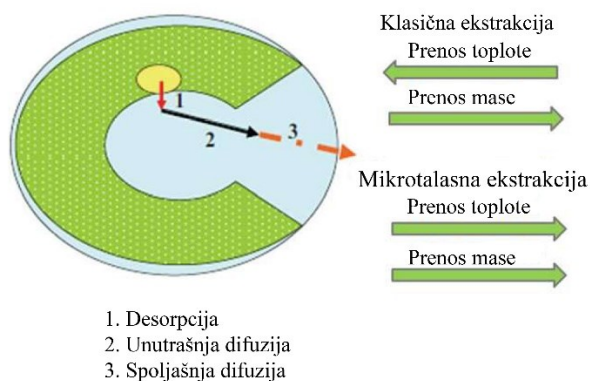
^c utvrđeno na 25 $^{\circ}\text{C}$

Postoje dve vrste komercijalno dostupnih mikrotalasnih ekstraktora: zatvoreni i otvoreni sistem. Kod zatvorenog sistema, gde se ekstrakcija izvodi pod kontrolisanim pritiskom i temperaturom, moguće je povećanjem pritiska sistema povisiti temperaturu ključanja rastvarača, a samim tim povećati efikasnost i brzinu ekstrakcije (Camel, 2000). Ovakvi sistemi su konstruisani tako da se istovremeno vrši ekstrakcija iz više uzoraka (Meda et al., 2005). Kod otvorenih sistema se ekstrakcija izvodi na atmosferskom pritisku, pa je maksimalna temperatura rastvarača temperatura ključanja na datom pritisku (Camel, 2000; Mandal et al., 2007). U slučaju ekstrakcije termolabilnih jedinjenja koriste se otvoreni sistemi, jer se u njima postiže niža temperatura u poređenju sa zatvorenim sistemima (Mandal et al., 2007). I pored postojanja otvorenih i zatvorenih mikrotalasnih ekstraktora, često se u laboratorijskim istraživanjima koriste mikrotalasne pećnice namenjene upotrebi u domaćinstvu.

2.3.1.2 *Mehanizam mikrotalasne ekstrakcije*

Mikrotalasna ekstrakcija (MAE) se u osnovi razlikuje od klasičnih metoda ekstrakcije jer se ekstrakcija javlja kao rezultat promena u strukturi biljnih ćelija, koje su uzrokovane elektromagnetnim talasima. Ubrzana ekstrakcija aktivnih jedinjenja i visok prinos MAE može biti rezultat sinergističkog delovanja prenosa mase i toplote koji deluju u istom smeru (slika 2.14). S druge strane, kod klasične ekstrakcije se prenos mase odigrava od unutrašnjosti ka spoljašnjosti uzorka, a prenos toplote od spoljašnjosti ka

unutrašnjosti. Pri klasičnom zagrevanju materije energija se prenosi konvekcijom i kondukcijom, dok se kod mikrotalasnog zagrevanja prenosi direktno kroz interakciju sa elektromagnetnim poljem, pa se usled generisanja toplote kroz čitavu zapreminu uzorka zagrevanje materijala odigrava uniformno i brzo (Veggi et al., 2012).

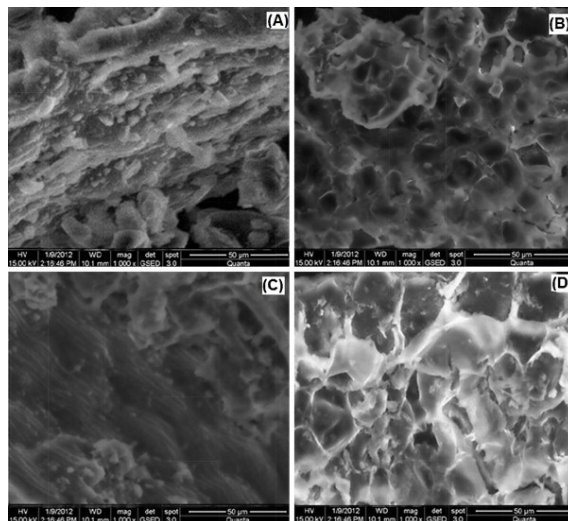


Slika 2.14. Mehanizam prenosa mase i toplote kod klasične ekstrakcije i MAE (preuzeto i modifikovano iz (Giorgi et al., 2009))

U toku procesa ekstrakcije aktivnih jedinjenja dešava se niz koraka, koji uključuju prodiranje rastvarača u biljni matriks difuzijom, rastvaranje aktivnih komponenata, njihov transport do površine biljnog matriksa i od površine biljnog matriksa do rastvarača i, na kraju, odvajanje rastvarača od biljnog materijala (Veggi et al., 2012).

Iako su uzorci koji se koriste u MAE osušeni biljni materijali, oni sadrže sitne mikrokopske tragove vode, koja usled delovanja mikrotalasnog zračenja isparava i proizvodi ogroman pritisak na ćelijski zid biljke, što izaziva pucanje zida i olakšava ekstrakciju aktivnih jedinjenja. Ako se u ekstrakciji koristi i rastvarač koji se brže zagreva (veliki tangens gubitka), dolazi i do hidrolize celuloze u jako kratkom vremenskom periodu (1 do 2 minuta), pa je olakšano prodiranje rastvarača u biljnu ćeliju i na taj način olakšana i ubrzana ekstrakcija aktivnih jedinjenja (Mandal et al., 2007). Snimanje biljnog materijala pre i nakon MAE skenirajućim elektronskim mikroskopom (SEM) se često koristi da bi se sagledao uticaj delovanja mikrotalasnog zračenja na morfologiju površine biljnog materijala. Dahmoune i saradnici su snimili izgled svežeg uzorka lista pistaća i izgled uzorka nakon MAE, ultrazvučne i klasične ekstrakcije rastvaračem (slika 2.15). Kao što se na slici može videti, mikrotalasi su nakon 60 sekundi izazvali promenu morfologije površine materijala, što su u manjoj meri učinili i ultrazvučni talasi nakon

delovanja od 15 minuta, dok je klasična ekstrakcija rastvaračem izazvala par ruptura na površini uzorka. Površina uzorka nakon MAE jasno ukazuje da su mikrotalasi odigrali važnu ulogu u razbijanju ćelijskih zidova i na taj način olakšali i ubrzali ekstrakciju aktivnih jedinjenja (Dahmoune et al., 2014).



Slika 2.15. Skenirajući elektronski mikrograf površine uzorka lista pistaća pre ekstrakcije (A), nakon ultrazvučne ekstrakcije (B), nakon klasične ekstrakcije rastvaračem (C) i nakon MAE (D) (preuzeto iz (Dahmoune et al., 2014))

2.3.1.3 Faktori koji utiču na mikrotalasnu ekstrakciju

Kako bi MAE bila što efikasnija potrebno je pravilno razmotriti faktore koji utiču na proces ekstrakcije i na osnovu toga optimizovati uslove. Najznačajniji faktori koji utiču na proces ekstrakcije su tip rastvarača i njegova zapremina, vreme ekstrakcije, temperatura ekstrakcije, mikrotalasna snaga i veličina čestice uzorka (Camel, 2000; Veggi et al., 2012).

2.3.1.3.1 Izbor rastvarača

Najvažniji faktor koji utiče na efikasnost MAE je izbor odgovarajućeg rastvarača (Routray & Orsat, 2012; Veggi et al., 2012). Izbor rastvarača zavisi, pre svega, od rastvorljivosti željene komponente u rastvaraču, od interakcije rastvarača i biljnog matriksa i od sposobnosti rastvarača da apsorbuje mikrotalasnu energiju i da je prevede u toplotu (Mandal et al., 2007). U principu, u MAE se koriste rastvarači koji imaju visoku selektivnost prema željenim jedinjenjima i koji imaju veliku sposobnost prevođenja

elektromagnetnog zračenja u toplotu (visok tangens gubitka). Ipak, za ekstrakciju termolabilnih jedinjenja se koriste rastvarači koji imaju nižu dielektričnu konstantu, tako da se osigura da ne dođe do pregrevanja i razgradnje rastvorka u trenutku kada se on oslobodi u rastvor. U MAE mogu da se koriste i polarni i nepolarni rastvarači. U slučaju polifenola, kojima u zavisnosti od strukture polarnost dosta varira, mogu da se koriste manje ili više polarni rastvarači. Manje polarni rastvarači se koriste za ekstrakciju flavonoid aglikona, a više polarni za ekstrakciju flavonoid glikozida i antocijana. U praksi se za MAE flavonoid aglikona i glikozida najčešće koriste smeša vode i etanola i smeša vode i metanola (Routray & Orsat, 2012). Prisustvo vode u rastvaraču je bitno jer čak i male količine vode mogu lako da prodru u biljnu ćeliju i da obezbede bolje zagrevanje biljnog materijala i na taj način poboljšaju prenos mase i ekstrakciju željenih jedinjenja (Mandal et al., 2007). U literaturi ima veći broj podataka o korišćenju smeše etanola i vode u MAE polifenola iz različitog biljnog materijala (Dahmoune et al., 2013; Dahmoune et al., 2015; Dahmoune et al., 2014; Li et al., 2011; Simić et al., 2016). Primena rastvarača sa GRAS statusom, kao što je etanol, je bitna jer omogućava korišćenje dobijenih ekstrakata u prehrambenim proizvodima i farmaceutskim formulacijama (FDA, 2012; Herrero et al., 2005).

Zapremina rastvarača je drugi važan faktor koji je potrebno optimizovati kod primene MAE. Potrebno je usaglasiti težnju da se poveća prinos ekstrakcije željenih jedinjenja, a da se istovremeno smanji upotreba rastvarača (Spigno & De Faveri, 2009). Zapremina rastvarača mora da bude dovoljna da obezbedi potpuno potapanje uzorka u toku celog procesa ekstrakcije, što je naročito važno kod uzoraka koji bubre u toku ekstrakcije. U klasičnim ekstrakcijama se prinos ekstrakcije povećava kada sepovećava zapremina rastvarača, jer se povećava gradijent koncentracije, što nije slučaj i sa MAE (Mandal et al., 2007; Spigno & De Faveri, 2009). Ukoliko je zapremina rastvarača prevelika, distribucija mikrotalasa neće biti ravnomerna, pa će i prinos željenih jedinjenja biti manji. Zapremina rastvarača, koja se koristi u MAE, zavisi od vrste biljnog materijala iz koga se ekstrahuju aktivna jedinjenja. Prasad i saradnici su za dobijanje ekstrakta sa maksimalnim sadržajem polifenola koristili 31,8 ml rastvarača po gramu uzorka (Prasad et al., 2011). Dahmoune i saradnici su optimizovali ekstrakciju polifenola iz različitih biljnih materijala, a optimalan odnos rastvarača prema uzorku je bio 28,1 ml/g za uzorak

listova pistaća, 28 ml/g za otpad od limuna i 32 ml/g za uzorak mirte (Dahmoune et al., 2013; Dahmoune et al., 2015; Dahmoune et al., 2014).

2.3.1.3.2 *Vreme ekstrakcije*

Drugi faktor koji je važno optimizovati je vreme MAE. Dužina trajanja MAE je dosta kraća u poređenju sa dužinom trajanja klasičnih ekstrakcija i uglavnom varira od nekoliko minuta do pola sata, mada je u literaturi zabeleženo i kraće vreme potrebno za maksimalnu ekstrakciju polifenola iz bljnog uzorka (Dahmoune et al., 2013; Dahmoune et al., 2015; Veggi et al., 2012). Vrlo je važno optimizovati vreme ekstrakcije, jer ono može da varira i u zavisnosti od dela biljke koji se koristi kao uzorak, a zavisi i od dielektričnih svojstava rastvarača. Kada se koriste rastvarači sa visokim dielektričnim svojstvima, kao što su metanol, etanol i voda, i ukoliko se produži vreme ekstrakcije može doći do pregrevanja sistema i do razgradnje termolabilnih jedinjenja (Veggi et al., 2012). U tom slučaju se ekstrakcija izvodi u kraćem vremenskom periodu, ali u više ciklusa i svaki put se koristi svež rastvarač, a ciklusi se ponavljaju dok se ne iscrpi biljna matrica (Veggi et al., 2012).

2.3.1.3.3 *Mikrotalasna snaga i temperatura ekstrakcije*

Mikrotalasna snaga i temperatura sistema su međusobno povezane jer visoka mikrotalasna snaga dovodi do povećanja temperature sistema (Veggi et al., 2012). Povećanjem temperature sistema se povećava prinos ekstrakcije, ali do određenog nivoa, dok se ne postigne optimalna temperatura ekstrakcije. Sa daljim povećanjem temperature dolazi do smanjenja prinosa aktivnih jedinjenja usled njihove termalne razgradnje (Routray & Orsat, 2012). Takođe, na višim temperaturama može da se dobije ekstrakt lošijeg kvaliteta, jer se biljna matrica brže razgrađuje, pa pored bioaktivnih jedinjenja mogu da se ekstrahuju i nečistoće. Povećanjem temperature sistema se menja i priroda rastvarača, odnosno smanjuje se njegova viskoznost i površinski napon, pa je olakšano njegovo prodiranje u biljnu matricu i rastvaranje aktivnih jedinjenja (Veggi et al., 2012).

Mikrotalasna snaga deluje kao pokretačka snaga ekstrakcije, jer omogućava lokalizovano zagrevanje u uzorku, razgradnju biljne matrice i olakšanu difuziju aktivnih jedinjenja. Stoga, mikrotalasna snaga pozitivno deluje na povećanje prinosa i ubrzavanje ekstrakcije. Sa druge strane mikrotalasna snaga može da smanji prinos ekstrakcije usled

razgradnje termolabilnih jedinjenja. Zbog svega navedenog je jako važno pravilno izabrati mikrotalasnu snagu, tako da se postigne željena temperatura za kraće vreme, a da se ne naruši kvalitet ekstrakta (Veggi et al., 2012).

U literaturi postoje podaci o primeni različite snage mikrotalasa kada se polifenoli ekstrahuju iz različitih biljnih materijala. Zhang i saradnici su optimizovali ekstrakciju polifenola iz semena lotosa i maksimalan sadržaj polifenola u ekstraktu postigli kada su u ekstrakciji primenili mikrotalasnu snagu od 400 W (Zhang et al., 2012). Dahmoune i saradnici su maksimalan sadržaj polifenola u ekstraktu dobili primenom mikrotalasnog snage od 500 W, dok se sa daljim povećanjem mikrotalasnog snage prinos polifenola smanjio (Dahmoune et al., 2014).

2.3.1.3.4 *Veličina čestice uzorka*

Veličina čestica biljnog uzorka može da ima značajan uticaj na efikasnost MAE. Korišćenjem sitnijih čestica uzorka povećava se kontaktna površina između rastvarača i biljnog uzorka, pa je omogućeno dublje prodiranje mikrotalasa u uzorak, što doprinosi povećanju efikasnosti ekstrakcije. Sa druge strane, ukoliko su čestice jako sitne nakon ekstrakcije je otežano razdvajanje rastvarača i uzorka i u tom slučaju se najčešće primenjuju filtracija i centrifugiranje (Mandal et al., 2007). Veličina čestice biljnog uzorka koji se koristi u MAE je obično u opsegu od 100 µm do 2 mm (Mandal et al., 2007; Veggi et al., 2012).

2.3.2 *Fermentacija kao metod za poboljšanje biološkog dejstva ekstrakata lekovitog bilja*

Fermentacija se od davnina koristi za produženje trajnosti i poboljšanje organoleptičkih i nutritivnih svojstava hrane. Tokom fermentacije dešavaju se biohemijske promene, koje za posledicu imaju lakšu svarljivost i bolju biološku aktivnost proizvoda (Shahidi & Yeo, 2016).

Fermentacija biljnog materijala može da se koristi i za poboljšanje biološke aktivnosti biljnih ekstrakata. Tokom fermentacije dolazi do povećanja sadržaja polifenola i antioksidativne aktivnosti ekstrakata, što može da bude posledica dva mehanizma. Prema prvom mehanizmu se tokom fermentacije razgrađuje ćelijski zid biljke i olakšava se oslobađanje vezanih polifenola, dok se u drugom predloženom mehanizmu konvertuju

ili depolimerizuju polifenolna jedinjenja visoke molekulske mase (Hur et al., 2014; Shahidi & Yeo, 2016). Tako se tokom fermentacije glikozilovani polifenoli prevode u odgovarajuće aglikone, pa se dobijaju ekstrakti koji pokazuju jaču antioksidativnu i antimikrobnu aktivnost (Wu et al., 2011). Fermentacijom se mogu osloboditi vezani polifenoli, koji takođe, prema literaturi, pokazuju veću antioksidativnu aktivnost u poređenju sa slobodnim polifenolima (Acosta-Estrada et al., 2014).

Faktori koji utiču na fermentaciju biljnog materijala su vrsta izabranog mikroorganizma, vreme fermentacije, temperatura, pH, sadržaj vode (Hur et al., 2014).

Tokom fermentacije mikroorganizmi proizvode enzime kojima razgrađuju ugljene hidrate, masti i proteine, tako da se makromolekuli u biljkama prevode u manje jedinice, koje mikroorganizam može da koristi kao izvor energije. Takođe, proizvode se i enzimi kao što su celulaze, hemicelulaze, pektinaze, amilaze i glukanaze koji su važni za oslobađanje vezanih-nerastvornih polifenola. Proizvodnja enzima zavisi od soja mikroorganizma koji se koristi u fermentacionom procesu. Najvažniji enzim je celulaza, kojim se razgrađuje celuloza, pa se olakšava ekstrakcija vezanih polifenola. Osim celulaze, enzimi važni za oslobađanje vezanih polifenola su hemicelulaze, pektinaze, amilaze i glukanaze. Nakon razgradnje ćelijskog zida, esteraze oslobađaju vezane polifenole tako što hidrolizuju estarsku vezu između fenolnih kiselina i komponenata ćelijskog zida. Njih proizvode *Lactobacillus lactis*, *L. rhamnosus*, *A. niger*, *Cryptococcus flavus* (Shahidi & Yeo, 2016).

U literaturi postoje brojni podaci o upotrebi fermentacionih postupaka u cilju povećanja sadržaja ukupnih polifenola u ekstraktima, što doprinosi povećanoj biološkoj aktivnosti ekstrakata. Fermentacijom *Graptopetalum paraguayense* bakterijom *L. plantarum* BCRC 10357 značajno se povećao sadržaj polifenola i flavonoida, što je uticalo i na povećanje antioksidativne aktivnosti fermentisanog uzorka, u poređenju sa nefermentisanim. (Wu et al., 2011). Wang i saradnici su pokazali da se kofermentacijom lišća guave kvascem *Saccharomyces cerevisiae* i plesnim *Monascus anka* značajno povećava sadržaj polifenola, a poboljšava se i antioksidativna i antimikrobna aktivnost (Wang et al., 2016). Fermentacijom bobica mirte bakterijom *L. plantarum*, tokom 48 časa na 30 °C, sadržaj ukupnih polifenola se povećao sa $135,49 \pm 2,35$ na $669,38 \pm 4,19$ mg GAE/g, dok se sadržaj flavonoida povećao sa $20,39 \pm 3,40$ na $113,30 \pm 2,60$ mg RE/g. Takođe, autori su u radu pokazali da se fermentacijom postigla veća inhibicija DPPH

radikala u poređenju sa sintetičkim antioksidansom BHT, koja je iznosila 81 ± 3 u odnosu na $76 \pm 1\%$ (Curiel et al., 2015). Međutim, važno je napomenuti da tokom fermentacije može da dođe i do degradacije polifenola, pa se u krajnjem proizvodu smanjuje i njihov sadržaj i antioksidativna aktivnost. Tokom spontane i kontrolisane fermentacije crnih maslina bakterijom *L. plantarum*, sadržaj polifenola se smanjio. Kod spontane fermentacije je smanjenje iznosilo 43%, dok je kod kontrolisane iznosilo 32%, što je uticalo na smanjenje antioksidativne aktivnosti (Othman et al., 2009).

2.3.2.1 *Bakterije roda Lactobacillus*

Bakterije mlečno-kiselinskog vrenja su Gram-pozitivne, koke ili štapići, nesporogene, fakultativno anaerobne, katalaza negativne bakterije kojima je krajnji produkt metabolizma ugljenih hidrata mlečna kiselina (Halász, 2009).

Među bakterijama mlečno-kiselinskog vrenja, rod *Lactobacillus* obuhvata veliki broj sojeva koje je Američka agencija za hranu i lekove (FDA) označila kao bezbedne za ljudsku upotrebu (GRAS) (Salveti et al., 2012). *Lactobacillus* je jedan od najvažnijih rodova koji se koristi kao starter kultura za fermentaciju prehrambenih proizvoda u industrijskoj proizvodnji i domaćinstvu (König & Fröhlich, 2009). Ovaj rod doprinosi konzervisanju proizvoda, jer se tokom metabolizma proizvodi mlečna kiselina koja je dobar konzervans (Baras et al., 2000; König & Fröhlich, 2009). Osim toga, koristi se i kao probiotik (Salveti et al., 2012). Rod obuhvata 174 vrste Gram pozitivnih, nepokretnih štapića, koji obično formiraju lance (König & Fröhlich, 2009).

Lactobacillus vrste imaju velike zahteve za nutrijentima, kao što su aminokiseline, peptidi, masne kiseline, vitamini, nukleinske kiseline, minerali, pa mogu inicirati spontanu fermentaciju u kompleksnim organskim supstratima, kao što su mlečni proizvodi, proizvodi od ribe i mesa, u pivu, vinu, sokovima od voća i povrća. Osim toga, normalna su mikrobiota u ustima, gastrointestinalnom i genitalnom traktu kod ljudi i životinja. Rastu na temperaturama od 2 do 53 °C i na pH od 3 do 8, a optimalna temperatura rasta im je od 30 do 40 °C i pH od 5,5 do 6,2. Tokom svog rasta proizvode mlečnu kiselinu, koja snižava pH sredine i sprečava razvoj neželjenih, patogenih mikroorganizama (Salveti et al., 2012).

Rod *Lactobacillus* se deli na osnovu tipa fermentacije ugljenih hidrata, pa postoje homofermentativni i heterofermentativni laktobacili. Homofermentativni

laktobacili razgrađuju šećere u Embden-Meyerhof-Parnas putu (glikoliza), kada se 1 mol heksoze konvertuje u 2 mola mlečne kiseline i pri tome nastaje minimalno 90% mlečne kiseline, a ostali proizvodi metabolizma su etanol, sirćetna, mravlja kiselina i drugi, koji utiču na aromu fermentisanih proizvoda. Heterofermentativni laktobacili razgrađuju glukozu fosfoketolaznim (pentoza-fosfatnim) putem, pri čemu nastaje smeša mlečne kiseline, CO₂ i acetata ili etanola (König & Fröhlich, 2009). Homofermentativni laktobacili su *L. acidophilus*, *L. delbrückii*, *L. helveticus*, *L. salivarius*. Heterofermentativni laktobacili su *L. brevis*, *L. buchneri*, *L. fermentum*, *L. reuteri*, *L. casei*, *L. curvatus*, *L. plantarum*, *L. sakei*, *L. rhamnosus* (Axelsson, 1998).

2.3.2.1.1 *Lactobacillus rhamnosus*

Jedan od najproučavanijih probiotskih sojeva je *Lactobacillus rhamnosus* GG (ATCC 53103), koji je izolovan iz humane crevne mikrobiote. Za *L. rhamnosus* GG je potvrđeno da stimulišu imuni odgovor, sprečavaju atopijske bolesti kod dece i smanjuju dužinu trajanja i ublažavaju simptome dijereje kod dece koja je izazvana rotavirusom (Salminen et al., 2002). *L. rhamnosus* proizvodi enzime koji su važni za razgradnju i oslobađanje vezanih polifenola, kao što su: celulaze, β-glukozidaze, amilaze, esteraze (Hur et al., 2014; Huynh et al., 2014).

2.3.2.2 *Kvasci*

Kvasci su eukariotski, jednoćelijski, heterotrofni mikroorganizmi klasifikovani u carstvo gljiva. Sa tehnološkog aspekta, najvažniji rod kvasca je *Saccharomyces*, a najznačajnija je vrsta *Saccharomyces cerevisiae*, koji ima široku primenu u industriji, u proizvodnji testa, fermentaciji piva i vina. Kvasci su fakultativno anaerobni mikroorganizmi, koji pod anaerobnim uslovima fermentišu šećere do etanola i CO₂, pri čemu je rast ćelija minimalan, dok u prisustvu kiseonika ne sintetišu alkohol, već svoju biomasu. Efekat da se proizvodnja etanola zaustavlja u prisustvu kiseonika se naziva Pasterov efekat. Međutim, ukoliko je koncentracija glukoze u hranljivoj podlozi veća od 3%, čak i u prisustvu kiseonika, glukoza će se fermentisati do etanola i ovaj efekat je poznat kao negativan Pasterov efekat ili Crabtree efekat, koji se javlja kod skoro svih kvasaca koji pripadaju rodu *Saccharomyces* (Walker, 1998)

Kvasci se klasifikuju u dve grupe (po Loderovoj): askosporogeni ili „pravi“ kvasci, u koje spadaju sa tehnološkog aspekta najznačajniji kvasci *Saccharomyces*, *Hansenula*, *Pichia*, *Debaromyces* i *Schizosaccharomyces* i anaskosporogeni, u koji spada krmni kvasac *Candida utilis* ali i patogeni *C. albicans* i *Cryptococcus neoformans* (Đorđević, 2013).

2.3.2.2.1 *Saccharomyces boulardii*

Najčešće korišćeni mikroorganizmi kao probiotici su bakterijske vrste koje pripadaju rodovima *Lactobacillus* i *Bifidobacterium*. Međutim, kvasac *Saccharomyces boulardii* (sinonim: *S. cerevisiae* var *boulardii*) se takođe uspešno primenjuje kao probiotik. Brojne kliničke studije su pokazale da je primena *S. boulardii* probiotika veoma uspešna u tretmanu dijareja koje su izazvane upotrebom antibiotika, kod dijareja koje se javljaju kod dece, kod lečenja crevnih infekcija koje su izazvane *Clostridium difficile*, *E. coli* i *C. albicans*. Zatim se koristi i u tretmanu Kronove bolesti, ulceroznog kolitisa i sindroma iritabilnog creva. Kao probiotik on stimuliše imuni odgovor, inhibira bakterijske toksine, deluje protiv crevnih patogena, smanjuje upale (Zanello et al., 2009). Postiže stabilnu koncentraciju u debelom crevu nakon tri dana od početka upotrebe, a nestaje posle 2-5 dana od prekida korišćenja (Czerucka et al., 2007)

S. boulardii je izolovao 1920. Henri Bulard iz voća liči u Indokini, a kao lek protiv dijareje se koristi od 1950. godine (Zanello et al., 2009). On je prvo izolovan kao posebna vrsta u okviru roda *Saccharomyces*, ali je na osnovu komparativne genomske hibridizacije i analize genoma utvrđeno da su *S. boulardii* i *S. cerevisiae* članovi iste vrste (Edwards-Ingram et al., 2007). Međutim, genetski, metabolički i fiziološki se *S. boulardii* znatno razlikuje od *S. cerevisiae*. Dok je za većinu sojeva *S. cerevisiae* optimalna temperatura rasta 30 °C, *S. boulardii* je termotolerantniji kvasac čija je optimalna temperatura rasta 37 °C, što je ujedno i fiziološka temperatura čoveka. Takođe, *S. boulardii* je otporniji od *S. cerevisiae*, pa može da raste u kiseloj sredini, odnosno preživljava simulirane uslove želuca, u kome je pH u opsegu od 1,5 do 3 (Czerucka et al., 2007). Čelijski zid *S. boulardii* je deblji od čelijskog zida *S. cerevisiae*, što može da doprinese većoj stabilnosti *S. boulardii* u različitim stresnim uslovima u GIT-u (Hudson et al., 2016). *S. boulardii* proizvodi enzime koji su važni za razgradnju i oslobađanje vezanih polifenola, kao što su: β -glukozidaze, amilaze, proteaze (Hur et al., 2014).

2.4 Optimizacija procesnih promenljivih metodom odzivnih površina

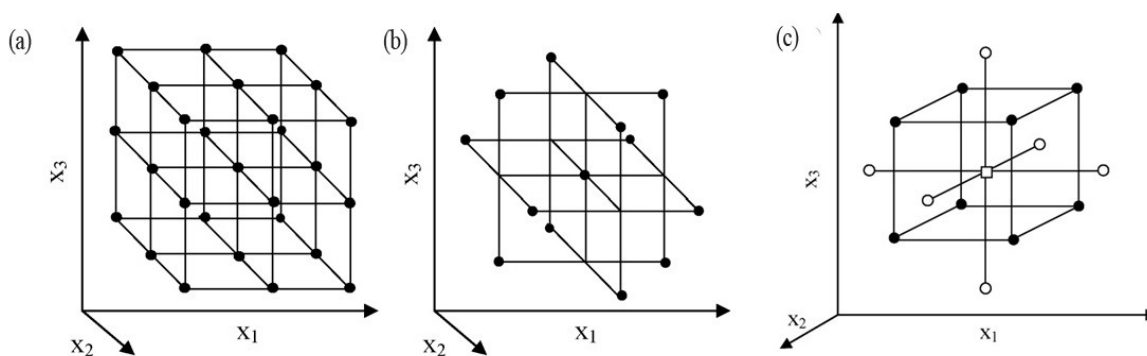
Metoda odzivnih površina (eng. *Response surface methodology*, RSM) spada u najčešće korišćene postupke za statističko planiranje eksperimenata. Ona predstavlja skup matematičkih i statističkih tehnika koja se koristi za poboljšanje i optimizaciju složenih procesa, na koje utiče više različitih promenljivih (Baş & Boyacı, 2007). Boks i Vilson (Box & Wilson, 1951) su je prvi opisali kao metodu koja omogućava procenu uticaja nekoliko različitih procesnih promenljivih (faktora, nezavisnih promenljivih) kao i uticaja njihovih interakcija na izlaznu promenljivu (odziv). Planiranjem eksperimenata se omogućava simultano variranje procesnih promenljivih i dobijanje velikog broja informacija o ispitivanom procesu uz relativno mali broj eksperimentalnih pokušaja, što je prednost RSM u odnosu na druge metode (Šljivić-Ivanović et al., 2013).

Osnovni koraci u primeni RSM kao tehnike optimizacije su:

- izbor procesnih promenljivih koje značajno utiču na proces,
- izbor eksperimentalnog dizajna i sprovođenja eksperimenata,
- aproksimacija eksperimentalnih podataka matematičkim modelom primenom matematičko-statističkih metoda,
- evaluacija modela,
- određivanje optimalnih vrednosti ispitivanih procesnih promenljivih i validacija modela (Bezerra et al., 2008).

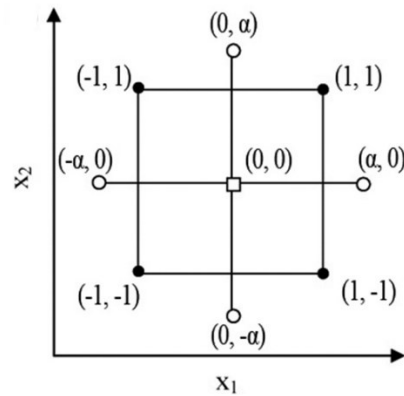
Identifikacija procesnih promenljivih koje značajno utiču na proces i određivanje njihovih opsega su značajni za optimizaciju, pa tako loše određeni opsezi u okviru kojih se variraju vrednosti procesnih promenljivih dovode do loše optimizacije (Baş & Boyacı, 2007).

Postoji niz različitih metoda planiranja eksperimenata, kao što su centralni kompozitni dizajn (CCD), kompletan faktorijalni dizajn, Box-Behnken dizajn, i slično (slika 2.16).



Slika 2.16. Eksperimentalni dizajn baziran na praćenju tri faktora u tri nivoa: a) kompletan faktorijalni dizajn, b) Box-Behnken dizajn, c) centralni kompozitni dizajn (CCD) (preuzeto i modifikovano iz (Bezerra et al., 2008))

Izbor odgovarajućeg modela zavisi od tipa istraživanja. Kada se proces aproksimira polinomom drugog reda najčešće se koristi centralni kompozitni dizajn (CCD), kada se uključuju u model i tačke koje se nalaze van eksperimentalnog prostora (kocke) koju formiraju ugaone tačke potpunog faktorijalnog dizajna sa tri promenljive (Del Castillo, 2007). Centralni kompozitni dizajn se sastoji iz punog faktorijalnog dizajna sa 2^k eksperimenata, aksijalnog (zvezdastog) dizajna sa $2k$ eksperimenata i ponavljanja u centralnoj tački, gde je k broj procesnih promenljivih. Aksijalne tačke se nalaze na rastojanju α ($\pm\alpha = \pm\sqrt{k}$) od centralne tačke. U CCD se procesne promenljive ispituju na pet nivoa: $-\alpha, -1, 0, +1$ i $+\alpha$ (slika 2.17). Ponavljanjem centralne tačke omogućava se procena čiste eksperimentalne greške.



Slika 2.17. Grafičko predstavljanje CCD sa 2 procesne promenljive X_1 i X_2 ($\alpha=1,41$) i kodiranim tačkama: (●) tačke faktorijalnog dizajna; (○) aksijalne tačke i (□) centralna tačka (preuzeto i modifikovano iz (Bezerra et al., 2008))

Ukupni broj eksperimentalnih ponavljanja kod CCD iznosi

$$N = 2^k + 2k + n_0$$

gde je N ukupan broj eksperimenata, k je broj promenljivih, a n_0 je broj ponavljanja u centralnoj tački.

Nakon izvedenih eksperimenata primenom RSM dobija se matematički model kojim se opisuje zavisnost izlaznih i ulaznih promenljivih. Polinomi drugog reda se koriste za opisivanje odabranih odziva kada je cilj da se pronade optimalno rešenje:

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \sum_{j=1}^k \beta_{jj} X_j^2 + \sum \sum_{i < j} \beta_{ij} X_i X_j \quad (2.2.)$$

Gde je Y odziv sistema, X_i i X_j su procesne promenljive, β_0 je regresioni koeficijent za odsečak, β_i je regresioni koeficijent za linearni efekat, β_{jj} je regresioni koeficijent za kvadratni efekat i β_{ij} je regresioni koeficijent za interakcioni efekat (Baş & Boyacı, 2007; Bezerra et al., 2008; Montgomery, 2008). Grafičkim prikazivanjem jednačina se dobijaju odzivne površine (trodimenzionalne) ili konturni dijagrami (dvodimenzionalni). Ovakav način prikazivanja odziva sistema omogućava lakše vizuelno uočavanje uticaja različitih ulaznih promenljivih, kao i njihovih odnosa na izlazne promenljive (Liyana-Pathirana & Shahidi, 2005). Kada se posmatra uticaj više procesnih promenljivih odzivne površine se prikazuju u zavisnosti od dve procesne promenljive, dok ostale promenljive imaju konstantne vrednosti (Bezerra et al., 2008).

Evaluacija modela se vrši primenom analize varijanse i tada se ocenjuje adekvatnost i statistička značajnost modela. Adekvatnost modela se tumači na osnovu koeficijenta determinacije, koeficijenta varijacije, nedostatka fitovanja i vrednosti adekvatne preciznosti. Koeficijent determinacije je mera odstupanja odzivne funkcije od eksperimentalno dobijenih rezultata i ukoliko se dobiju vrednosti bliske jedinici smatra se da postoji dobra korelacija između modelom predviđenih i eksperimentalno dobijenih rezultata. Koeficijent varijacije definiše reproduktivnost modela i ako je manji od 10%, može se smatrati da je model pouzdan i reproduktivan (Karazhiyan et al., 2011). Ukoliko je vrednost adekvatne preciznosti modela veća od 4 smatra se da je signal adekvatan (Arasi et al., 2016). Nedostatak fitovanja (eng. *Lack of Fit*) poredi rezidualnu grešku (grešku ostataka) sa „čistom“ eksperimentalnom greškom izračunatom iz replikacija u centralnoj tački i značajan nedostatak fitovanja ukazuje na neadekvatan model.

Za određivanje optimalnih vrednosti ispitivanih procesnih promenljivih primenjuje se metoda željene funkcije (eng. *Desirability function concept, D*). S obzirom na to da nemaju svi odzivi jednak značaj u optimizaciji, svakom od njih se dodeljuje prioritet, od kojeg će zavisiti i optimalne vrednosti parametara. Najmanje značajnom odzivu dodeljuje se vrednost prioriteta 1, a najznačajnijem 5 (Costa et al., 2011). Nakon definisanja optimalnih uslova izvodi se eksperiment, koji predstavlja validaciju modela i nakon validacije dobijeni rezultati se porede sa vrednostima izlaznih promenljivih koje je predvideo Desegn expert sa 95% intervalom predviđanja.

3 CILJEVI RADA

Cilj ovog rada je dobijanje bioaktivnih ekstrakata iz otpada dobijenog preradom lekovitog bilja primenom mikrotalasne ekstrakcije.

Specifični ciljevi se mogu podeliti na pet grupa:

- Optimizacija mikrotalasne ekstrakcije polifenola iz otpadnog lekovitog bilja (jagorčevine, hajdučke trave i rastavića) pomoću metode planiranog eksperimenta, odnosno statističke metode odzivne površine, uz pomoć *Design Expert* softvera. U dobijenim ekstraktima je određen sadržaj ukupnih polifenola, flavonoida i praćena je antioksidativna aktivnost, primenom dve metode, DPPH i FRAP. Mikrotalasna ekstrakcija je poređena sa klasičnom ekstrakcijom, u smislu vremena koje je potrebno za ekstrakciju, potrošnje rastvarača i prinosa bioaktivnih jedinjenja.
- Ispitivanje antimikrobne aktivnosti ekstrakata dobijenih iz otpadnih lekovitih biljaka pod optimalnim uslovima mikrotalasne ekstrakcije.
- Ispitivanje prebiotske aktivnosti ekstrakata dobijenih iz otpadnih lekovitih biljaka pod optimalnim uslovima mikrotalasne ekstrakcije.
- Ispitivanje inhibitorne aktivnosti enzima acetilholinesteraze ekstraktima dobijenim iz otpadnih lekovitih biljaka pod optimalnim uslovima mikrotalasne ekstrakcije.
- Optimizacija fermentacije otpadnog lekovitog bilja (jagorčevine, hajdučke trave i rastavića) pomoću metode planiranog eksperimenta, odnosno statističke metode odzivne površine, uz pomoć *Design Expert* softvera sa ciljem povećanja biološke aktivnosti i sadržaja ukupnih polifenola u ekstraktima u odnosu na ekstrakte dobijene pod optimalnim uslovima mikrotalasne ekstrakcije. Fermentacija je vršena mikroorganizmima sa GRAS statusom. U okviru ispitivanja biološke aktivnosti određen je sadržaj ukupnih polifenola, flavonoida, antioksidativna aktivnost (određivanjem DPPH i FRAP) kao i antimikrobna aktivnost i inhibicija acetilholinesteraze.

4 EKSPERIMENTALNI DEO

4.1 Materijal i oprema

U eksperimentima je korišćen sledeći materijal i oprema:

Materijal:

- Otpad dobijen preradom nadzemnog dela biljke hajdučke trave iz Instituta za proučavanje lekovitog bilja „Dr Josif Pančić”, Beograd, Srbija. Veličina čestica je bila u opsegu od 0,3 do 1,0 mm. U radu je korišćen otpad dobijen preradom biljke koja je brana 2013. godine.
- Otpad dobijen preradom nadzemnog dela biljke (sterilni izdanak) rastavića iz Instituta za proučavanje lekovitog bilja „Dr Josif Pančić”, Beograd, Srbija. Veličina čestica je bila u opsegu od 0,5 do 1,2 mm. U radu je korišćen otpad dobijen preradom biljke koja je brana 2012. i 2016. godine.
- Otpad dobijen preradom korena biljke jagorčevine, Institut za proučavanje lekovitog bilja „Dr Josif Pančić”, Beograd, Srbija. Veličina čestica je bila u opsegu od 1 do 5 mm. U radu je korišćen otpad dobijen preradom biljke koja je brana 2012. godine.

Mikrobiološke podloge:

- Agar, „Torlak“, Beograd, Srbija
- Kazein hidrolizat, „Torlak“, Beograd, Srbija
- Kvašćev ekstrakt, „Torlak“, Beograd, Srbija
- Mesni ekstrakt, „Torlak“, Beograd, Srbija
- Pepton, „Torlak“, Beograd, Srbija
- Trypton soja bujon (TSB), „Torlak“, Beograd, Srbija

Mikroorganizmi:

- Plesni: *Aspergillus niger*, *Fusarium proliferatum*, *Fusarium verticillioides* i *Fusarium graminearum*
- Patogeni indikatorski mikroorganizmi: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27833, *Listeria monocytogenes* IM 2000,

Candida albicans ATCC 10259, *Escherichia coli* ATCC 25922 i *Enterococcus faecalis* ATCC 29812

- Probiotski mikroorganizmi: *Lactobacillus rhamnosus* A71 i *Saccharomyces boulardii* (*Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* HANSEN CBS 5926)

Hemikalije i reagensi:

- 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH, $C_{18}H_{12}N_5O_6$), „Sigma -Aldrich“, Štajnhajm, Nemačka
- 2,4,6-tripiridil-s-triazin (TPTZ, $C_{18}H_{12}N_6$), „Sigma -Aldrich“, Štajnhajm, Nemačka
- 5,5'-ditio-bis- (2-nitrobenzoeva kiselina) (DTNB, $C_{14}H_8N_2O_8S_2$), „Sigma-Aldrich“, St. Louis, SAD
- Aluminiјum-hlorid ($AlCl_3$), „Sigma -Aldrich“, Štajnhajm, Nemačka
- Acetiltioholin-jodid ($C_7H_{16}NO_2I$), „Sigma-Aldrich“, St. Louis, SAD
- Acetilholinesteraza (AChE), „Sigma-Aldrich“, St. Louis, SAD
- Acetonitril, HPLC (C_2H_3N), „Sigma-Aldrich“, St. Louis, SAD
- Etanol 96% (C_2H_5OH), „Zorka farma“, Šabac, Srbija
- *Folin-Ciocalteu* reagens, „Merck“, Darmstadt, Nemačka
- Fosforna kiselina, HPLC (H_3PO_4), „Sigma-Aldrich“, St. Louis, SAD
- Galna kiselina ($C_7H_6O_5$), „Sigma -Aldrich“, Štajnhajm, Nemačka
- Glukoza ($C_6H_{12}O_6$), „Moss & Hemoss“, Beograd, Srbija
- Gvožđe-hlorid heksahidrat ($FeCl_3 \times 6H_2O$), „Amalytika, LTD“, Prag, Češka Republika
- Dikalijum-hidrogenfosfat (K_2HPO_4), „Superlab“, Beograd, Srbija
- Dinatriјum-hidrogenfosfat heptahidrat ($Na_2HPO_4 \times 7H_2O$), „Chemicals VWR“, Leuven, Belgija
- Hlorovodonična kiselina (HCl), „Zorka farma“, Šabac, Srbija
- Kvercetin ($C_{15}H_{10}O_7$), „Sigma -Aldrich“, Štajnhajm, Nemačka
- Magnezijum-sulfata heptahidrat ($MgSO_4 \times 7H_2O$), „Merck“, Darmstadt, Nemačka
- Mangan-sulfat tetrahidrat ($MgSO_4 \times H_2O$), „Moss & Hemoss“, Beograd, Srbija
- Metanol (CH_3OH), „Lach-Ner“, Neratovice, Češka Republika
- Natriјum-acetat trihidrat ($CH_3COONa \times 3H_2O$), „Zdravlje“, Leskovac, Srbija

- Natrijum-dodecilsulfat ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{SO}_4\text{Na}$), „Sigma-Aldrich“, St. Louis, SAD
- Natrijum-karbonat (Na_2CO_3), „Lach-Ner“, Neratovice, Češka Republika
- Natrijum-hidrogenfosfat monohidrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$), Merck-Alcaloid, Skopje, Makedonija
- Sirćetna kiselina ($\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$), „Lachema“, Brno, Češka Republika
- Triamonijum-citrat ($(\text{NH}_4)_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$), Chemicals VWR, Leuven, Belgija

Oprema:

- Analitička vaga (AJ100), „Mettler Toledo“, Švajcarska
- Autoklav, „Sutjeska“, Srbija
- Automatska mikropipeta (20 - 200 μl), „Brand“, Nemačka
- Automatska mikropipeta (100 - 1000 μl), „Huawei“, Kina
- Automatska mikropipeta (1000 – 5000 μl), „LLG“, Nemačka
- Centrifuga, „Sigma-Aldrich“, Nemačka
- HPLC, Dionex Ultimate 3000 Thermo Scientific, Waltham, USA
- Magnetna mešalica (Heidolph MR 3001), „Sigma -Aldrich“, Nemačka
- Mikroskop (Axio Imager A1), „Carl Zeiss MicroImaging GmbH.“, Nemačka
- Mikrotalasna peć (MC7849HS), „LG“, Južna Koreja
- Mikrotalasna peć (MWD321/WH), „WHIRLPOOL“, Kina
- pH metar, „InoLab pH 720“, Nemačka
- Tehnička vaga, „Mettler AJ100“, Švajcarska
- Turbidimetar (DEN-1B), „Grant instruments“, Engleska
- UV/Vis spektrofotometar ultrospec 3300 pro, „Amersham Bioscience“, Australija
- Vakuumpumpa (V-700), „Büchi“, Švajcarska
- Vakuumparivač, „Büchi“, Švajcarska
- Vazдушna tresilica (KS 4000 i control), „IKA“, Nemačka
- Vlagomer, „Kern“, Nemačka
- Vorteks, „IKA“, Nemačka

4.2 Metode

4.2.1 Priprema uzoraka

4.2.1.1 Priprema otpadnih lekovitih biljaka

Otpadne lekovite biljke (jagorčevina, hajdučka trava i rastavić) su dobijene iz proizvodnog pogona za preradu lekovitih biljaka iz Instituta za proučavanje lekovitog bilja „Dr Josif Pančić”, Beograd, Srbija. U biljnom materijalu je određen sadržaj vlage pomoću vlagomera i materijal je čuvan u mraku, na sobnoj temperaturi u papirnim kesama.

4.2.2 Ekstrakcija polifenola

4.2.2.1 Mikrotalasna ekstrakcija polifenola iz otpadnog lekovitog bilja

MAE bioaktivnih jedinjenja iz otpadnog lekovitog bilja je izvedena pomoću mikrotalasne pećnice. U erlenmajer od 250 ml je odmereno 3 g uzorka, a zatim je dodata i definisana količina rastvarača. Ekstrakcija je izvršena prema planiranom eksperimentu u kom su promenljive: vreme ekstrakcije, zapremina rastvarača, koncentracija rastvarača i snaga mikrotalasa. Nakon ekstrakcije je merena temperatura ekstrakta, a zatim je ekstrakt odvojen od biljnog materijala filtriranjem pomoću vakuum pumpe. Ekstrakt je čuvan u frižideru (4 °C) i korišćen za dalje analize.

4.2.2.2 Klasična metoda ekstrakcije polifenola iz otpadnog lekovitog bilja

Klasična ekstrakcija polifenola iz otpadnog lekovitog bilja je izvedena u cilju poređenja sa MAE. U erlenmajer je izmereno 30 g otpada dobijenog od lekovitog bilja i dodato 300 ml 70% vodenog rastvora etanola. Ekstrakcija je izvedena na sobnoj temperaturi, tokom 2 h, uz konstantno mešanje. Nakon ekstrakcije izvršeno je razdvajanje ekstrakta od taloga (centrifugiranjem u toku 10 min, 4500 obrtaja/minut). Dobijeni supernatant je odvojen, a talog je korišćen za reekstrakciju sa 150 ml 70% etanola, na sobnoj temperaturi u toku 2 h (Yen et al., 2005). Nakon reekstrakcije, ponovljen je postupak razdvajanja ekstrakta od taloga i dobijeni supernatant je dodat prethodnom. Ekstrakt je čuvan u frižideru (4 °C) i korišćen za dalje analize.

4.2.3 Fermentacija otpadne hajdučke trave (*A. millefolium*) i rastavića (*E. arvense*) mikroorganizmima *L. rhamnosus* i *S. boulardii*

Postupak priprema inokuluma za fermentaciju supstrata:

Kultura *L. rhamnosus* A71 je čuvana na MRS ploči na 5 °C, a za potrebe eksperimenta je aktivirana u MRS bujonu inkubacijom na 37 °C. Kultura *S. boulardii* (*Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* HANSEN CBS 5926) je čuvana na TSA ploči, a aktivirana je u TSB hranljivoj podlozi inkubacijom na 37 °C. Prekonoćne sveže kulture su se koristile za inokulacije supstrata.

Postupak fermentacije supstrata:

U erlenmajere od 100 ml je odmereno 3 g uzorka otpadnog rastavića ili hajdučke trave, a zatim je dodata definisana zapremina smeše hranljive podloge i vode (MRS podloga je dodata za rast *L. rhamnosus*, a TSB za rast *S. boulardii*). Fermentacija je vršena prema planiranom eksperimentu u kome su promenljive bile: vreme fermentacije, koncentracija inokuluma, koncentracije hranljive podloge i odnos tečne prema čvrstoj fazi. Kada je u fermentaciji korišćena bakterija *L. rhamnosus*, proces je izvođen na 37 °C, a kada je korišćen kvasac *S. boulardii* na 30 °C. Nakon fermentacije polifenoli su ekstrahovani prema optimalnim uslovima primenom MAE. Ekstrakt je odvojen filtriranjem pomoću vakuum pumpe i ekstrakt je čuvan u frižideru (4 °C) i korišćen za dalje analize.

4.2.4 Uparavanje ekstrakta

Da bi se dobili ekstrakti veće koncentracije, oni su uparavani u vakuum uparivaču na temperaturi 60 °C i pritisku 150 mbar. Nakon uparavanja u dobijenim koncentrovanim ekstraktima je određen sadržaj suve materije. Dobijeni ekstrakti su korišćeni u ispitivanju stimulacije rasta probiotskih kultura i inhibicije rasta patogenih kultura.

4.2.5 Karakterizacija ekstrakata

4.2.5.1 Prinos ekstrakcije

Prinos ekstrakcije je određen u odnosu na sadržaj suve materije u ekstraktima i sadržaj suve materije početnog uzorka, prema sledećoj formuli:

$$\text{Prinos ekstrakcije } \left(\frac{\text{mg}_{s.m.ekstrakta}}{\text{g}_{s.m.uzorka}} \right) = \frac{sm_e}{sm_u} \quad (4.1.)$$

sm_u – sadržaj suve materije u početnom uzorku (g)

sm_e – sadržaj suve materije u ekstraktu (mg).

Nakon određivanja prinosa ekstrakcije, svi uzorci su standardizovani razblaživanjem odgovarajućim rastvaračem do 1 mg s.m. ekstrakta/ml i čuvani su u frižideru na 4 °C.

4.2.5.2 Sadržaj ukupnih polifenola u ekstraktima

Sadržaj ukupnih polifenola u ekstraktima je određen prema modifikovanoj Folin-Ciocalteu metodi (Singleton & Rossi, 1965). Metoda se zasniva na redukovanju Folin-Ciocalteu reagensa (smeša fosfovolframove ($H_3PW_{12}O_{40}$) i fosfomolibdenske kiseline ($H_3PMO_{12}O_{40}$)) u blago alkalnim uslovima u prisustvu polifenolnih jedinjenja. Tada nastaje smeša volfram-oksida (W_8O_{23}) i molibden-oksida (Mo_8O_{23}), koja je intenzivne plave boje, a intenzitet se određuje spektrofotometrijski na 750 nm (Ajila et al., 2011).

Reagensi:

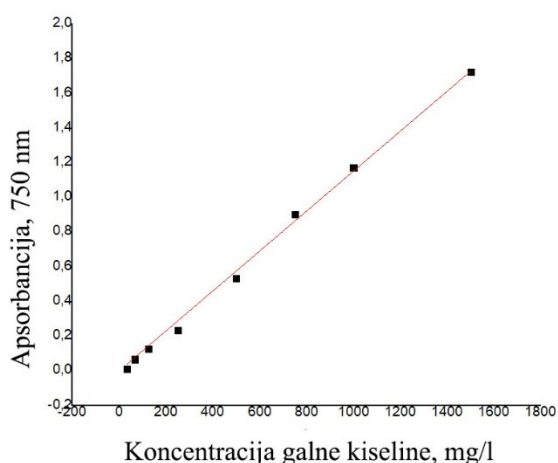
- 15% Na_2CO_3 : 15 g Na_2CO_3 je rastvoreno u 100 ml destilovane H_2O ;
- Folin-Ciocalteu reagens.

Postupak:

U 100 μ l uzorka koncentracije 1 mg s.m./ml je dodato 500 μ l Folin-Ciocalteu reagensa i 6 ml destilovane vode i smeša je snažno promućkana 1 min. Nakon toga je dodato 2 ml 15% rastvora Na_2CO_3 , smeša je promućkana još 30 s i rastvor je dopunjen do 10 ml destilovanom vodom. Nakon 2 h inkubacije u mraku, apsorbancija je merena na 750 nm na spektrofotometru. Slepa proba je pripremana istovremeno sa uzorcima, a umesto uzoraka je korišćen odgovarajući rastvarač. Rezultati su izračunati pomoću standardne prave i izraženi su kao miligrami ekvivalenta galne kiseline (eng. *Gallic acid equivalents*, GAE) po gramu suve materije ekstrakta.

Priprema standardne prave:

Za pripremu standardne prave korišćen je rastvor galne kiseline (od 1 do 1500 mg/l), koji je korišćen umesto uzorka u opisanoj Folin-Ciocalteu metodi. Iz određenih ekstinkcionih vrednosti konstruisana je prava, pomoću softvera OriginPro® v8.0 (slika 4.1).



Dobijena jednačina standardne prave je:

$$Y = 0,00115X \quad (4.2.)$$

$$R^2 = 0,9984$$

Y – apsorbancija uzorka (750nm)

X – koncentracija polifenola (mg GAE/l)

Slika 4.1. Standardna prava za određivanje sadržaja polifenola u ekstraktima

4.2.5.3 Sadržaj flavonoida u ekstraktima

Sadržaj flavonoida u ekstraktima je određen korišćenjem prethodno opisane metode (Meda et al., 2005). Za određivanje sadržaja flavonoida koristi se spektrofotometrijska metoda koja se zasniva na formiranju stabilnog kompleksa koji grade aluminijum hlorid ($AlCl_3$), C4 keto grupa i C3 ili C5 hidroksilna grupa flavona ili flavonola (Chang et al., 2002).

Reagensi:

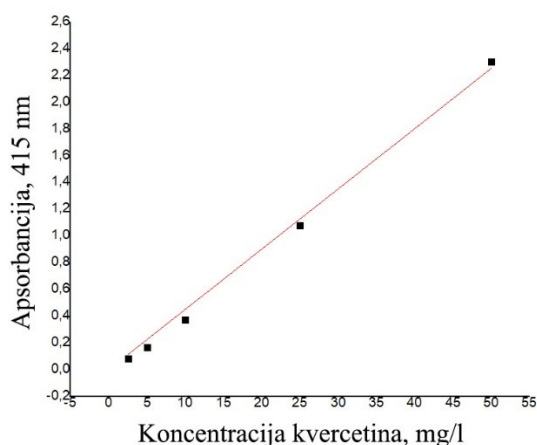
- 2% rastvor $AlCl_3$ u CH_3OH : 2 g $AlCl_3$ je rastvoreno u 100 ml CH_3OH .

Postupak:

U 1 ml ekstrakta koncentracije 1 mg s.m./ml je dodat 1 ml 2% rastvora $AlCl_3$ u metanolu i sadržaj je promućkan. Nakon 10 min inkubacije u mraku apsorbancija je merena na spektrofotometru na 415 nm uz slepu probu. Slepa proba je pripremljena istovremeno sa uzorcima, a sadržala je 1 ml ekstrakta i 1 ml metanola. Rezultati su izračunati pomoću standardne prave i izraženi su kao miligrami ekvivalenta kvercetina (eng. *Quercetin equivalents*, QE) po gramu suve materije ekstrakta (mg QE/g)

Priprema standardne prave:

Za pripremu standardne prave je korišćen rastvor kvercetina (od 2,5 do 50 mg/l) umesto uzoraka u opisanoj metodi za određivanje flavonoida. Za konstruisanje standardne prave iz očitanih ekstinkcionih vrednosti je korišćen softver OriginPro® v8.0 (slika 4.2).



Dobijena jednačina standardne prave je:

$$Y = 0,0451X \quad (4.3.)$$

$$R^2 = 0,9971$$

Y – apsorbancija uzorka (415 nm)

X – koncentracija flavonoida (mg QE/l)

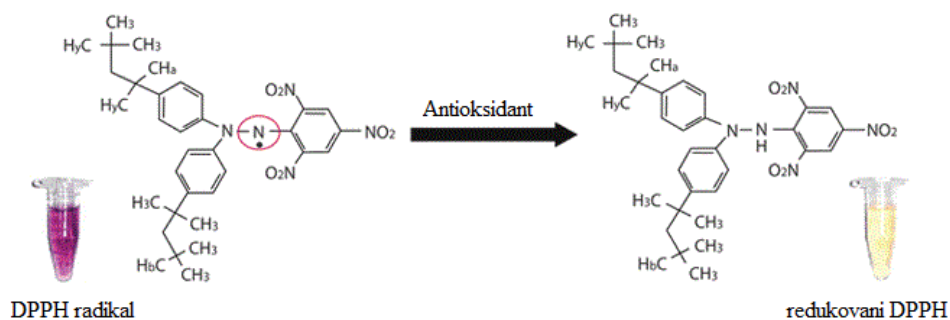
Slika 4.2. Standardna prava za određivanje sadržaja flavonoida u ekstraktima

4.2.5.4 *Antioksidativna aktivnost*

U ekstraktima je merena antioksidativna aktivnost korišćenjem dve metode: ispitivanjem sposobnosti neutralizacije DPPH radikala i FRAP metodom.

4.2.5.4.1 *Određivanje antioksidativne aktivnosti ispitivanjem sposobnosti neutralizacije DPPH radikala*

Sposobnost neutralizacije DPPH radikala je određena po prethodno opisanoj metodi (Lee et al., 1998). DPPH je stabilni azotni radikal, koji ima nesparen valentni elektron na jednom azotovom atomu (Sharma & Bhat, 2009). DPPH radikal se prilikom reakcije sa donorom vodonikovog atoma redukuje do DPPH-H što dovodi do promene boje iz ljubičaste u žutu (slika 4.3). Intenzitet promene boje se određuje spektrofotometrijski na 517 nm. Rezultati u ovoj metodi se izražavaju kao procenat inhibicije DPPH radikala, ili kao IC₅₀, što je koncentracija uzorka koja neutrališe 50 % DPPH radikala (Tirzitis & Bartosz, 2010).



Slika 4.3. Redukcija DPPH stabilnog radikala sa donatorom vodonikovog atoma do DPPH-H (preuzeto 15.07.2016. i modifikovano sa (<http://www.damocos.co.kr>))

Reagensi:

- 0,2 mM DPPH: 0,0078 g DPPH (M=349,32 g/mol) je rastvoreno u 100 ml CH₃OH;
- CH₃OH.

Postupak:

U 50 µl ekstrakta, kome je podešena koncentracija na 1 mg s.m./ml, dodato je 3,95 ml metanola i 1 ml 0,2 mM rastvora DPPH u metanolu. Sadržaj epruvete je snažno promućkan. Nakon 30 min inkubacije u mraku izmerena je apsorbancija na 517 nm uz čist methanol kao slepu probu. Uporedo je pripremljen i kontrolni uzorak, koji je umesto ekstrakta sadržao odgovarajući rastvarač.

Rezultati su izraženi kao procenti inhibicije, odnosno neutralizacije slobodnih DPPH radikala u odnosu na kontrolni uzorak i računati su prema sledećoj jednačini:

$$\text{Inhibicija} = \frac{A_K - A_U}{A_K} \times 100[\%] \quad (4.4.)$$

gde su A_K – apsorbancija kontrolnog uzorka i A_U – apsorbancija uzorka.

Vrednosti IC₅₀ (koncentracije uzorka koje su potrebne za inhibiciju 50% početne količine DPPH radikala) su dobijene na osnovu dijagrama zavisnosti inhibicije DPPH radikala od koncentracije suve materije u ekstraktu. U tim eksperimentima je koncentracija suve materije u ekstraktu bila u rasponu od 0,1 do 20 mg/ml. IC₅₀ vrednosti su potom izračunate korišćenjem softvera OriginPro® v8.0.

4.2.5.4.1.1 FRAP (eng. ferric reducing antioxidant power) metoda

FRAP metoda je izvedena prema standardnoj proceduri uz manje modifikacije (Szóllósi & Varga, 2002). FRAP metoda se zasniva na sposobnosti fenolnih supstanci rastvorenih u vodi da redukuju Fe³⁺ do Fe²⁺ u kiselj sredini (pH 3,6). Redukcijom

kompleksa gvožđe(III)-2,4,6-tripiridil-s-triazin [Fe^{3+} -TPTZ] nastaje kompleks gvožđe(II)-2,4,6-tripiridil-s-triazin [Fe^{2+} -TPTZ] koji je plavo obojen i čiji se apsorpcijski maksimum očitava na 593 nm.

Reagensi:

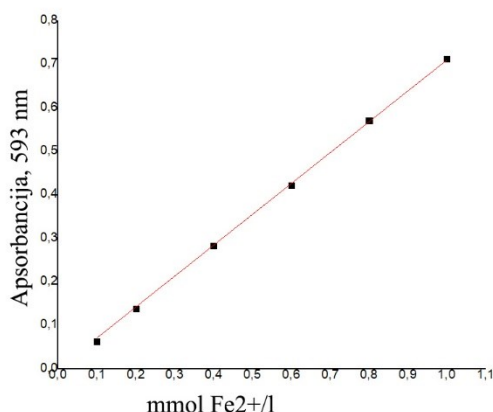
- Radni FRAP rastvor se sastojao od 300 mM acetatnog pufera (pH 3,6), 10 mM rastvora TPTZ u 40 mM HCl i 20 mM rastvora $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$, u odnosu 10:1:1 (v/v/v);
- 300 mM acetatni pufer (pH 3,6): 3,1 g $\text{CH}_3\text{COONa} \times 3\text{H}_2\text{O}$ 3,1 g natrijum-acetata trihidrata i 16 ml glacijalne sirćetne kiseline (CH_3COOH) je dopunjeno destilovanom vodom do 1l;
- 10 mM TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazin): 0,031 g TPTZ je rastvoreno u 10 ml 40 mM HCl;
- 40 mM HCl: 3.31 ml koncentrovane HCl dopunjeno je destilovanom vodom do 1 l;
- 20 mM $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$: 0,054 g $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ rastvoreno je u 10 ml destilovane vode.

Postupak:

U 150 μl ekstrakta, kome je podešena koncentracija na 1 mg s.m./ml, dodato je 4,5 ml radnog FRAP rastvora (koji je uvek pripreman svež). Kao slepa proba korišćen je FRAP rastvor. Nakon 5 min inkubacije u mraku apsorbanacija je merena na 593 nm. Rezultati su računati pomoću standardne prave i izražavani kao koncentracija Fe^{2+} mmol/l.

Priprema standardne prave:

Za pripremu standardne prave korišćen je rastvor gvožđe(II)-sulfata (FeSO_4 od 0,2 do 1 mmol/l), koji je u opisanoj metodi korišćen umesto uzorka. Na osnovu ekstinkcionih vrednosti konstruisan je grafik pomoću softvera OriginPro® v8.0 (slika 4.4).



Dobijena jednačina standardne prave je:

$$Y = 0,7095X \quad (4.5.)$$

$$R^2 = 0,9999$$

Y – apsorbancija uzorka (593 nm)

X – koncentracija Fe²⁺ (mmol

Fe²⁺/l)

Slika 4.4. Standardna prava za određivanje antioksidativne aktivnosti ekstrakta korišćenjem FRAP metode

4.2.5.5 Antimikrobna aktivnost

Antimikrobna aktivnost biljnih ekstrakata je određivana metodom difuzije u bunarčićima, a minimalna inhibitorna koncentracija je određena mikrodilucionom tehnikom sa rezazurinom, kao indikatorom ćelijskog rasta. Antifungalna aktivnost biljnih ekstrakata je određivana metodom dilucije u agaru.

4.2.5.5.1 Metoda difuzije u bunarčićima

Antimikrobna aktivnost ekstrakata iz otpadnog lekovitog bilja je rađena sa patogenim sojevima iz mikrobiološke laboratorije Tehnološko-metalurškog fakulteta u Beogradu: *Staphilococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27833, *Listeria monocytogenes* IM 2000, *Candida albicans* ATCC 10259, *Escherichia coli* ATCC 25922 i *Enterococcus faecalis* ATCC 29812.

Reagensi:

TSA hranljiva podloga: 30 g gotove tripton soja podloge se rastvori u 1 l destilovane vode, doda se 6 g kvašćevog ekstrakta (tako da krajnja koncentracija bude 0,6%) i 16 g agara. Podloga je kuvana 15 min, a zatim je sterilisana u autoklavu 30 min na 120 °C.

Soft TSA: 30 g gotove podloge se rastvori u 1 l destilovane vode, doda se 6 g kvašćevog ekstrakta (tako da krajnja koncentracija bude 0,6%) i 6 g agara. Podloga je kuvana 15 min, a zatim je sterilisana u autoklavu 30 min na 120 °C.

Postupak:

Prekonočne kulture testiranih mikroorganizama se razblaže do 10^8 CFU/ml (turbidimetrijskom metodom je broj ćelija standardizovan na 0,5 McFarlanda, što odgovara broju $1,5 \times 10^8$ CFU/ml) i 0,2 ml razblaženog inokuluma se dodaje u 6 ml soft agara. Ovim se prelije sterilna tripton soja agarna podloga (TSA) na koju su postavljeni prstenovi prečnika 6 mm. Nakon stezanja soft agara izvade se prstenovi i u formirane bunarčice se sipa 50 µl ekstrakta koncentracije 100 mg/ml. Ploče se ostave na sobnoj temperaturi 30 min da bi se omogućilo difundovanje ekstrakta, nakon čega se inkubiraju 24 h na 37 °C. Antimikrobna aktivnost se izražava kao prečnik zone inhibicije, koji se meri u milimetrima, uključujući i prečnik bunarčica.

4.2.5.5.2 Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije mikrodilucionom metodom sa resazurinom kao indikatorom

Za određivanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) biljnih ekstrakata korišćena je mikrodiluciona metoda, sa resazurinom kao indikatorom ćelijskog rasta. Metoda se zasniva na promeni boje iz ljubičaste u roze ili bezbojnu. Promena boje se dešava jer resazurin, koji je ljubičasto obojen, redukuje ćelije do resorufina, koji je roze boje. Dalje se resorufin može da redukuje do hidroresorufina koji je bezbojan. Svaka promena boje iz ljubičaste u roze ili bezbojnu ocenjuje se kao pozitivna i indikacija je postojanja mikrobnog rasta. Najniža koncentracija pri kojoj nije došlo do promene boje se uzima za MIC vrednost (Gahlaut & Chhillar, 2013; Sarker et al., 2007).

Reagensi:

- Resazurin rastvor: 270 mg resazurina se rastvori u 40 ml destilovane vode i profiltrira kroz 0,45 µm membranski filter;
- TSB hranljiva podloga: 30 g gotove podloge se rastvori u 1 l destilovane vode, dodaje se 6 g kvašćevog ekstrakta (tako da krajnja koncentracija bude 0,6%). Ukoliko se pravi agar, podlozi se dodaje 16 g agara. Podloga je kuvana 15 min, a zatim je sterilisana u autoklavu 30 min na 120 °C.

Postupak:

U sve bunarčice mikrotitarske ploče je sipano 100 µl hranljive podloge (TSB), a nakon toga je u prvu kolonu dodato 100 µl biljnog ekstrakta koncentracije 20 mg s.m./ml. Serija dvostrukih razblaženja je postignuta prenošenjem 100 µl smeše podloge i ekstrakta

u sledeću kolonu, tako da krajnja zapremina u svakom bunarčiću bude 100 µl. Napravljeno je 8 serija razblaženja tako da je koncentracija biljnog ekstrakta varirala u opsegu od 0,16 do 20 mg s.m./ml. Nakon toga je dodato 10 µl bakterijske suspenzije, tako da krajnja koncentracija bude 5×10^6 CFU/ml. Od prekonoćnih kultura ispitivanih sojeva bakterija uzgajanih na hranljivoj podlozi, napravljene su bakterijske suspenzije i turbidimetrijskom metodom je broj ćelija standardizovan na 0,5 McFarlanda, što odgovara broju $1,5 \times 10^8$ CFU/ml. Nakon toga je dodato 10 µl rastvora resazurina. Paralelno sa uzorcima su pripremane i kontrole. Pozitivna kontrola sadržala je 100 µl TSB podloge, 10 µl resazurina i 10 µl bakterijske suspenzije, a negativna kontrola je sadržala 50 µl TSB podloge, 50 µl ekstrakta, 10 µl resazurina i 10 µl TSB podloge, umesto bakterijske suspenzije. Mikrotitarske ploče su inkubirane 24 h na 37 °C. Nakon završene inkubacije utvrđena je minimalna inhibitorna koncentracija, vizuelno na osnovu boje. Svaka promena boje iz ljubičaste u roze ili bezbojnu ocenjena je kao pozitivna. Najniža koncentracija pri kojoj nije došlo do promene boje je uzeta za MIC vrednost.

4.2.5.5.3 Antifungalna aktivnost

Antifungalna aktivnost biljnih ekstrakata je ispitivana na fitopatogenim plesnima *Aspergillus niger* i tri vrste iz roda *Fusarium*: *F. proliferatum*, *F. verticillioides* i *F. graminearum*. Korišćena je metoda dilucije u agaru, a antifungalna aktivnost je određivana na osnovu zone inhibicije, u odnosu na kontrolni netretirani uzorak (Sanit, 2016).

Reagensi:

- ISP hranljiva podloga: 5 g hidrolizata kazeina i 3 g kvašćevog ekstrakta je rastvoreno u 1 l destilovane vode i dodato je 16 g agara. Podloga je prvo kuvana 15 min, a zatim je sterilisana u autoklavu 30 min na 120 °C.

Postupak:

U sterilisan i otopljeni ISP agar dodate su različite zapremine ispitivanih ekstrakata, da bi se postigle finalne koncentracije u agaru u opsegu od 0,25 do 5,0 mg s.m./ml. Nakon homogenizacije i očvršćavanja podloge naneto je 5 µL suspenzije ispitivanih spora plesni u koncentraciji od 10^5 spora/ml (u fiziološkom rastvoru). Broj spora je određen brojanjem spora na mikroskopu u Neubaerovoj komori za brojanje spora.

Nakon inkubacije na temperaturi od 28°C, 48 h, određivana je inhibicija rasta na osnovu merenja zone rasta plesni u odnosu na kontrolni uzorak (bez inhibitora) prema formuli:

$$\text{Inhibicija} = \frac{R_K - R_U}{R_K} \times 100 [\%] \quad (4.6.)$$

Gde je R_K prečnik zone rasta izraslih plesni na kontrolnoj Petri šolji i R_U prečnik zone rasta izraslih plesni na Petri šolji sa ispitivanim ekstraktom.

4.2.5.6 *Određivanje prebiotske aktivnosti biljnih ekstrakata*

Uticaj dodatka biljnih ekstrakata na rast probiotskih mikroorganizama *L. rhamnosus* i *S. boulardii* je ispitan u tečnoj hranljivoj podlozi. Prebiotska aktivnost je određena na osnovu razlike u broju izraslih kolonija na Petri šoljama koje su sadržale biljni ekstrakt i kontrolnim, koje su sadržale samo odgovarajuću hranljivu podlogu.

Reagensi:

- MRS hranljiva podloga: U 1 l destilovane vode se rastvori 10 g peptona, 10 g mesnog ekstrakta, 5 g kvašćevog ekstrakta, 20 g glukoze, 2 g K_2HPO_4 , 5 g CH_3COONa , 2 g $(NH_4)_3C_6H_5O_7$ i 5 ml rastvora soli. Rastvor soli se priprema rastvaranjem 5,75 g $MgSO_4 \times 7H_2O$ i 1,06 g $MnSO_4 \times H_2O$ u 50 ml destilovane vode. Ukoliko se pravi agar, na 1 l podloge se doda 16 g agara. Podloga je kuvana 15 min, a zatim je sterilisana u autoklavu 30 min na 120 °C.
- TSB hranljiva podloga: 30 g gotove podloge se rastvori u 1 l destilovane vode, doda se 6 g kvašćevog ekstrakta (tako da krajnja koncentracija bude 0,6%). Ukoliko se pravi agar, podlozi se doda 16 g agara. Podloga je kuvana 15 min, a zatim je sterilisana u autoklavu 30 min na 120 °C.

Postupak:

U 2 ml sveže i sterilisane MRS i TSB hranljive podloge su dodati ekstrakti lekovitih biljaka, tako da njihova krajnja koncentracija bude u opsegu od 0,5 do 5 mg/ml. Prekonoćne kulture testiranih mikroorganizama su razblažene do 10^8 CFU/ml (turbidimetrijskom metodom je broj ćelija standardizovan na 0,5 McFarlanda, što odgovara broju $1,5 \times 10^8$ CFU/ml i) i podloge su inokulisane tako da krajnja koncentracija bude 5×10^6 CFU/ml. Uzorci su inkubirani 24 h na 37 °C. Paralelno sa uzorcima je inkubirana i kontrola, koja nije sadržala biljni ekstrakt. Nakon inkubacije je napravljena serija razblaženja i u sterilnu Petri šolju je otpipetiran 1 ml odgovarajućeg razblaženja koji je preliven sa 10 ml sterilisane i otopljene MRS podloge za *L. rhamnosus*

i TSA podloge za *S. boulardii*. Šolje su inkubirane na 37 °C, 24 h, nakon čega je određivan uticaj biljnih ekstrakata na rast oba mikroorganizma brojanjem izraslih kolonija na uzorcima koji su sadržali biljni ekstrakt u odnosu na kontrolni uzorak bez ekstrakta. Svi eksperimenti su urađeni u triplikatu.

4.2.5.7 *Inhibicija acetilholinesteraze*

Inhibicija acetilholinesteraze (AChE) je određena na osnovu prethodno opisane Elmanove procedure (Ellman et al., 1961).

Reagensi:

- 50 mM fosfatni pufer, pH 8: 0,40 g NaH₂PO₄×H₂O i 12,61 g Na₂HPO₄×7H₂O se rastvori u 1 l destilovane vode;
- Acetiltioholin-jodid: 217 mg je rastvoreno u 10 ml destilovane vode;
- DTNB (5,5'-ditio-bis- (2-nitrobenzoeva kiselina)): 39,6 mg DTNB i 15 mg NaHCO₃ je rastvoreno u 10 ml 50 mM fosfatnog pufera pH 8;
- 10 mM SDS (natrijum-dodecilsulfat CH₃(CH₂)₁₁SO₄Na): 28,8 mg SDS je rastvoreno u 10 ml destilovane vode;
- Enzim AChE aktivnosti od 2 do 2,5 IU/ml: 1,17 mg enzima AChE ukupne aktivnosti 425,94 IU/mg je rastvoreno dejonizovanom vodom.

Postupak:

U 545 µl 50 mM fosfatnog pufera pH 8 je dodato 65 µl ispitivanog biljnog ekstrakta tako da krajnja koncentracija bude 10, 100, 500 i 1000 µg/ml i tome je dodato 10 µl enzima (aktivnosti od 2 do 2,5 IU/ml), tako da je krajnja koncentracija enzima bude 0,03 – 0,038 IU/ml. Smeša je inkubirana na 37 °C 20 min. Nakon toga je dodato 20 µl DTNB i 10 µl supstrata (acetiltioholin-jodida) i smeša je inkubirana još 8 min. Reakcija je zaustavljena dodatkom 50 µl 10 mM SDS.

Smeša supstrata (acetiltioholin-jodida) i reagensa za bojenje 5,5'-ditio-bis- (2-nitrobenzoeva kiselina, DTNB se dodaje enzimu, nakon čega nastaje žuto obojeni proizvod 5-tio-2-nitrobenzoata, koji je formiran u reakciji tioholina (proizvod enzimske hidrolize acetiltioholin-jodida) i DTNB, čija se apsorbancija meri spektrofotometrijski na 412 nm. Procenat inhibicije AChE se izračunava prema sledećoj jednačini:

$$\text{Inhibicija} = \frac{A_K - A_U}{A_K - A_S} \times 100 [\%] \quad (4.7.)$$

Gde su A_K apsorbanacija kontrole, A_U apsorbanacija uzorka i A_S apsorbanacija slepe probe. Slepa proba je pripremljena prema istoj proceduri kao i uzorak od 620 μl fosfatnog pufera, 20 μl DTNB i 10 μl acetiltioholin-jodida, dok je kontrola sadržala 610 μl fosfatnog pufera, 10 μl enzima AChE i 20 μl acetiltioholin-jodida, takođe prema istoj proceduri. Svi eksperimenti su urađeni u triplikatu.

4.2.5.8 HPLC analiza biljnih ekstrakata

Analiza biljnih ekstrakata, dobijenih nakon klasične i MAE, je izvršena tečnom hromatografijom pod visokim pritiskom (eng. *High Performance Liquid Chromatography*, HPLC), po metodi Vitalini i saradnika (Vitalini et al., 2016). Svi uzorci su pre analize profiltrirani kroz 0,22 μm membranski filter. Za hromatografsko razdvajanje je korišćena Hypersil gold C18 kolona, 150 mm \times 4,6 mm, 5 μm . Injektirano je 20 μl , a hromatogrami su snimljeni na talasnoj dužini od 310 i 350 nm. Kao mobilna faza korišćen je sistem rastvarača: A – 0,1% fosforna kiselina u vodi i B – 0,1% fosforna kiselina u acetonitrilu, pri protoku od 1 ml/min. Linearni gradijent je započet sa 10% B do 60% B u 60. min.

4.2.6 Optimizacija mikrotalasne ekstrakcije polifenola sa antioksidativnom aktivnošću iz otpadne jagorčevine (*P. veris*).

Za optimizaciju ekstrakcije polifenola iz otpadne jagorčevine korišćen je centralni kompozitni dizajn (CCD). Pregledom literature su izabrani parametri koji utiču na MAE polifenola iz otpadne jagorčevine (Dahmoune et al., 2013). Izabrane procesne promenljive su bile: vreme ekstrakcije (A), koncentracija etanola (B), odnos rastvarača i suve materije uzorka (odnos rastvarač/čvrsta faza) (C) i snaga mikrotalasa (D) (tabela 4.1). Ispitan je njihov uticaj na dva izlaza: prinos ekstrakcije (Y_1) i sadržaj ukupnih polifenola u ekstraktu (Y_2). Procesne promenljive vreme ekstrakcije, koncentracija etanola i odnos rastvarač/čvrsta faza su bile definisane kao kontinualne promenljive sa pet vrednosti, dok je snaga mikrotalasa bila definisana kao diskretna promenljiva sa dve vrednosti. Planirani eksperiment se sastojao od 34 eksperimentalne tačke (16 faktorijalnih, 12 aksijalnih i 6 centralnih) (tabela P-1.1).

Tabela 4.1. Stvarne i kodirane vrednosti procesnih promenljivih

Procesna promenljiva	Granične vrednosti				
	-1	0	+1	Aksijalne (- α)	Aksijalne (+ α)
A: Vreme ekstrakcije (s)	60	120	180	19	221
B: Koncentracija etanola (%)	20	45	70	3	87
C: Odnos rastvarač/čvrsta faza (ml/g)	20	35	50	10	60
D: Snaga mikrotalasa (W)	170		340		

Dobijeni rezultati su analizirani pomoću softvera *Design expert* i modelovani su jednačinom drugog reda

$$Y = \alpha_0 + \sum_{i=1}^4 \alpha_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^3 \sum_{j=i+1}^4 \alpha_{ij} X_i X_j \quad (4.8.)$$

Gde je Y zavisna promenljiva, odnosno izlaz, α_0 konstanta, α_i linearni koeficijent, α_{ii} kvadratni koeficijent i α_{ij} koeficijent interakcije, a X_i i X_j su procesne promenljive. Iz dobijene jednačine su eliminisani članovi koji statistički nisu bili značajni ($p \geq 0,050$) i dobijen je redukovani oblik jednačine.

4.2.7 Optimizacija mikrotalasnne ekstrakcije polifenola, flavonoida sa antioksidativnom aktivnošću iz otpadne hajdučke trave (A. millefolium)

4.2.7.1 Određivanje opsega vrednosti procesnih promenljivih

Da bi se definisali opsezi u okviru kojih su varirane vrednosti procesnih promenljivih, koji su dalje korišćeni za optimizaciju procesa ekstrakcije polifenola iz otpadne hajdučke trave, izvedeni su eksperimenti u kojima se ispitivao uticaj jednog faktora na sadržaj polifenola u ekstraktu, vrednosti tog parametra su varirane, dok su vrednosti ostalih faktora bile konstantne. Te konstantne vrednosti za vreme ekstrakcije, koncentraciju etanola, odnos rastvarač/čvrsta faza i snagu mikrotalasa, su iznosile 60 s, 50%, 30 ml/g i 170 W.

4.2.7.2 Optimizacija mikrotalasnne ekstrakcije polifenola i flavonoida sa antioksidativnom aktivnošću iz otpadne hajdučke trave (A. millefolium)

Za optimizaciju ekstrakcije polifenola i flavonoida iz otpadne hajdučke trave korišćen je centralni kompozitni dizajn (CCD). Na osnovu rezultata eksperimenta u kom

su pojedinačno varirane promenljive izabrani su opsezi procesnih promenljivih (tabela 4.2): vreme ekstrakcije (A), koncentracija etanola (B), odnos rastvarača i suve materije uzorka (odnos rastvarač/čvrsta faza) (C) i snaga mikrotalasa (D). Ispitan je njihov uticaj na pet izlaza: prinos ekstrakcije (Y_1), sadržaj ukupnih polifenola u ekstraktu (Y_2), sadržaj flavonoida u ekstraktu (Y_3), neutralizacija DPPH radikala (Y_4) i FRAP aktivnost ekstrakta (Y_5). Procesne promenljive vreme ekstrakcije, koncentracija etanola i odnos rastvarač/čvrsta faza su bile definisane kao kontinualne promenljive sa pet vrednosti, dok je snaga mikrotalasa bila definisana kao diskretna promenljiva sa dve vrednosti. Planirani eksperiment se sastojao od 34 eksperimentalne tačke (16 faktorijalnih, 12 aksijalnih i 6 centralnih) (tabela P-1.2).

Tabela 4.2. Stvarne i kodirane vrednosti procesnih promenljivih

Procesna promenljiva	Granične vrednosti				
	-1	0	+1	Aksijalne ($-\alpha$)	Aksijalne ($+\alpha$)
A: Vreme ekstrakcije (s)	20	30	40	13	47
B: Koncentracija etanola (%)	60	70	80	53	87
C: Odnos rastvarač/čvrsta faza (ml/g)	20	30	40	13	47
D: Snaga mikrotalasa (W)	170		340		

Dobijeni rezultati su analizirani pomoću softvera *Design expert* i modelovani su jednačinom drugog reda:

$$Y = \alpha_0 + \sum_{i=1}^4 \alpha_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^3 \sum_{j=i+1}^4 \alpha_{ij} X_i X_j \quad (4.9.)$$

gde je Y zavisna promenljiva, odnosno izlaz, α_0 konstanta, α_i linearni koeficijent, α_{ii} kvadratni koeficijent i α_{ij} koeficijent interakcije, a X_i i X_j su procesne promenljive. Iz dobijene jednačine su eliminisani članovi koji statistički nisu bili značajni ($p \geq 0,050$) i dobijen je redukovani oblik jednačine.

4.2.8 Optimizacija mikrotalasnne ekstrakcije polifenola sa antioksidativnom aktivnošću iz otpadnog rastavića (*E. arvense*)

4.2.8.1 Određivanje opsega vrednosti procesnih promenljivih

Kao i kod optimizacije ekstrakcije polifenola iz otpadne hajdučke trave, i u ovom delu eksperimenta, pre optimizacije ekstrakcije polifenola iz otpadnog rastavića, izvedeni

su eksperimenti čiji je cilj bio određivanje opsega vrednosti procesnih promenljivih. Ti opsezi su naknadno korišćeni za optimizaciju ekstrakcije polifenola i dobijanje ekstrakta sa maksimalnim sadržajem polifenola, koji pokazuje maksimalnu antioksidativnu aktivnost. Varirane su vrednosti jednog faktora, dok su ostali faktori imali konstantnu vrednost. Praćena je koncentracija polifenola u ekstraktima. Konstantne vrednosti vremena ekstrakcije, koncentracije etanola, odnos rastvarač/čvrsta faza i snage mikrotalasa su iznosile 60 s, 50%, 30 ml/g i 170 W.

4.2.8.2 Optimizacija mikrotalassne ekstrakcije polifenola sa antioksidativnom aktivnošću iz otpadnog rastavića (*E. arvense*)

Za optimizaciju ekstrakcije bioaktivnih jedinjenja iz otpadnog rastavića korišćen je centralni kompozitni dizajn (CCD). Na osnovu preliminarnih eksperimenata izabrani su opsezi procesnih promenljivih (tabela 4.3): vreme ekstrakcije (A), koncentracija etanola (B), odnos rastvarača i suve materije uzorka (odnos rastvarač/čvrsta faza) (C) i snaga mikrotalasa (D). Ispitan je njihov uticaj na četiri izlaza: prinos ekstrakcije (Y_1), sadržaj ukupnih polifenola u ekstraktu (Y_2), neutralizacija DPPH radikala (Y_3) i FRAP aktivnost ekstrakta (Y_4). Procesne promenljive vreme ekstrakcije, koncentracija etanola i odnos rastvarač/čvrsta faza su bile definisane kao kontinualne promenljive sa pet vrednosti, dok je snaga mikrotalasa bila definisana kao diskretna promenljiva sa dve vrednosti. Planirani eksperiment se sastojao od 34 eksperimentalne tačke (16 faktorijalnih, 12 aksijalnih i 6 centralnih) (tabela P-1.3).

Tabela 4.3. Stvarne i kodirane vrednosti procesnih promenljivih

Procesna promenljiva	Granične vrednosti				
	-1	0	+1	Aksijalne (- α)	Aksijalne (+ α)
A: Vreme ekstrakcije (s)	60	90	120	40	140
B: Koncentracija etanola (%)	50	60	70	43	77
C: Odnos rastvarač/čvrsta faza (ml/g)	30	40	50	23	57
D: Snaga mikrotalasa (W)	170		340		

Dobijeni rezultati su analizirani pomoću softvera *Design expert* i modelovani su jednačinom drugog reda:

$$Y = \alpha_0 + \sum_{i=1}^4 \alpha_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^3 \sum_{j=i+1}^4 \alpha_{ij} X_i X_j \quad (4.10.)$$

gde je Y zavisna promenljiva, odnosno izlaz, α_0 konstanta, α_i linearni koeficijent, α_{ii} kvadratni koeficijent i α_{ij} koeficijent interakcije, a X_i i X_j su procesne promenljive. Iz dobijene jednačine su eliminisani članovi koji statistički nisu bili značajni ($p \geq 0,050$) i dobijen je redukovani oblik jednačine.

4.2.9 Optimizacija uslova fermentacije otpadne hajdučke trave (*A. millefolium*) i rastavića (*E. arvense*) mikroorganizmima *L. rhamnosus* i *S. boulardii*

Za optimizaciju uslova fermentacije otpadne hajdučke trave i otpadnog rastavića korišćen je centralni kompozitni dizajn (CCD). Na osnovu preliminarnih eksperimenata izabrani su opsezi procesnih promenljivih (tabela 4.4): vremena fermentacije (A), koncentracije inokuluma (B), koncentracije podloge (C) i odnosa tečne i čvrste faze (D). Ispitan je njihov uticaj na jedan izlaz: sadržaj ukupnih polifenola u ekstraktu (Y_1). Sve procesne promenljive su bile definisane kao kontinualne promenljive sa pet vrednosti. Planirani eksperiment se sastojao od 19 eksperimentalnih tačaka (8 faktorijalnih, 8 aksijalnih i 3 centralne) (tabela P-1.3).

Tabela 4.4. Stvarne i kodirane vrednosti procesnih promenljivih

Procesna promenljiva	Granične vrednosti				
	-1	0	+1	Aksijalne (- α)	Aksijalne (+ α)
A: Vreme fermentacije (h)	22	48	74	4,3	91,7
B: Koncentracija inokuluma (%)	5	7,5	10	3,3	11,7
C: Koncentracija podloge (%)	20	50	80	0	100
D: Odnos tečne i čvrste faze (ml/g)	1,0	1,5	2,0	0,7	2,3

Dobijeni rezultati su analizirani pomoću softvera *Design expert* i modelovani su jednačinom drugog reda:

$$Y = \alpha_0 + \sum_{i=1}^4 \alpha_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^3 \sum_{j=i+1}^4 \alpha_{ij} X_i X_j \quad (4.11.)$$

gde je Y zavisna promenljiva, odnosno izlaz, α_0 konstanta, α_i linearni koeficijent, α_{ii} kvadratni koeficijent i α_{ij} koeficijent interakcije, a X_i i X_j su procesne promenljive. Iz dobijene jednačine su eliminisani članovi koji statistički nisu bili značajni ($p \geq 0,050$) i dobijen je redukovani oblik jednačine.

4.2.10 Ispitivanje mogućnosti uvećanja procesa

Prilikom uvećanja procesa za svaku otpadnu lekovitu biljku konstantnim je održavano vreme ekstrakcije, odnos rastvarač/čvrsta faza i odnos snage mikrotalasnog zračenja prema zapremini rastvarača, koji su dobijeni nakon optimizacije procesa mikrotalsne ekstrakcije (Petigny et al., 2014). U eksperimentu je povećavana snaga mikrotalasnog zračenja, zapremina upotrebljenog rastvarača i početna masa uzorka. Ispitivane su tri mikrotalasne snage, i to 160, 350 i 500 W. Nakon ekstrakcije ekstrakt je odvajan od lekovite biljke filtracijom. U ekstraktima rastavića i hajdučke trave, koji su dobijeni na različitim mikrotalasnim snagama, su određivani sadržaj ukupnih polifenola, flavonoida i antioksidativna aktivnost, dok je u ekstraktu jagorčevine određen sadržaj ukupnih polifenola i antioksidativna aktivnost.

5 REZULTATI I DISKUSIJA

5.1 Optimizacija mikrotalasne ekstrakcije polifenola iz otpadnih lekovitih biljaka

5.1.1 Optimizacija mikrotalasne ekstrakcije polifenola iz otpadne jagorčevine (*P. veris*)

Na osnovu pregleda literature ustanovljeno je da je za ekstrakciju polifenola iz otpadne jagorčevine MAE efikasnija od klasičnih metoda ekstrakcije (Ballard et al., 2010; Bouras et al., 2015; Du et al., 2009).

Da bi se utvrdili optimalni uslovi za izvođenje MAE i dobijanje ekstrakta sa maksimalnim sadržajem polifenola i antioksidativnom aktivnošću iz otpadne jagorčevine, korišćena je metoda odzivnih površina (RSM) i centralni kompozitni dizajn (CCD). Na osnovu literaturnih podataka izabrane su četiri procesne promenljive koje utiču na MAE polifenola iz otpadnih biljaka (Ahmad & Langrish, 2012; Li et al., 2012; Wu et al., 2012). To su: vreme ekstrakcije (A), koncentracija etanola (B), odnos rastvarač/čvrsta faza uzorka (C) i snaga mikrotalasa (D). Praćeni su sledeći odzivi sistema: prinos ekstrakcije (Y_1) i sadržaj ukupnih polifenola u ekstraktima (Y_2) (tabela P-1.1).

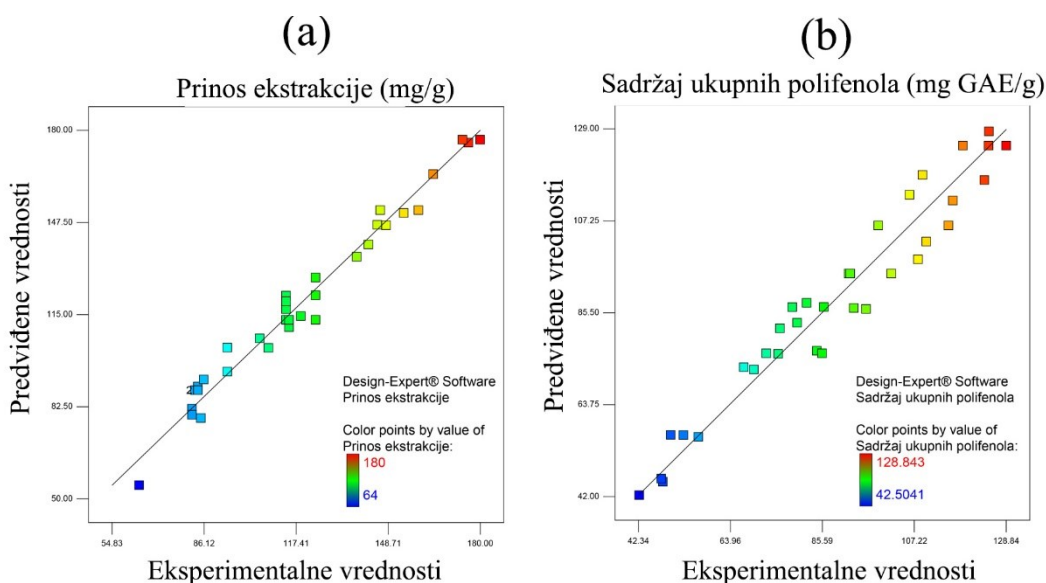
Analizom varijanse (ANOVA) je ocenjena adekvatnost i statistička značajnost modela (tabela 5.1). Adekvatnost modela se tumači na osnovu koeficijenta determinacije (R^2), koji je mera odstupanja odzivne funkcije od eksperimentalno dobijenih rezultata. Vrednost koeficijenta determinacije za matematički model prinosa ekstrakcije je iznosio 0,976, a za jednačinu kojom je modelovan sadržaj ukupnih polifenola u ekstraktima 0,943, što pokazuje da postoji dobra korelacija između modelom predviđenih i eksperimentalno dobijenih rezultata (tabela 5.1, slika 5.1). Koeficijent varijacije definiše reproduktivnost modela i ako je manji od 10%, može se smatrati da je model pouzdan i reproduktivan (Karazhiyan et al., 2011). Koeficijent varijacije oba modela je manji od 10% što ukazuje da su modeli pouzdani i precizni. Vrednost adekvatne preciznosti modela je veća od 4, što ukazuje da je signal adekvatan (Arasi et al., 2016). Nedostatak fitovanja (eng. *Lack of Fit*) poredi rezidualnu grešku (grešku ostataka) sa „čistom“ eksperimentalnom greškom izračunatom iz replikacija u centralnoj tački. Značajan nedostatak fitovanja ukazuje na neadekvatan model, a u ovom slučaju nedostatak fitovanja nije značajan za oba modela tako da se oni mogu smatrati adekvatnim.

Tabela 5.1. Analiza varijanse (ANOVA) modela dobijenih primenom višestruke regresione analize

Odziv	R^2	p -vrednost	F -vrednost	Koeficijent varijacije (%)	p -vrednost nedostatka fitovanja	Aдекватna preciznost
Y ₁	0,976	< 0,0001	180,99	4,57	0,2508	49,50
Y ₂	0,943	< 0,0001	44,12	7,92	0,2976	22,61

Y₁: prinos ekstrakcije (mg s.m. ekstrakta/g s.m. uzorka);

Y₂: sadržaj ukupnih polifenola u ekstraktu (mg GAE/g s.m. ekstrakta).



Slika 5.1. Slaganje eksperimentalno dobijenih i modelom predviđenih vrednosti odziva u eksperimentalnom dizajnu MAE antioksidanasa iz otpadne jagorčevine: prinos ekstrakcije (a), sadržaj ukupnih polifenola (b).

Ocena značajnosti uticaja procesnih promenljivih (vremena ekstrakcije, koncentracije etanola, odnosa rastvarač/čvrsta faza uzorka i snage mikrotalasa) u kvadratnom i linearnom obliku i njihove interakcije na odzive, na osnovu ANOVA statistike, data je u tabeli 5.2, a efekat odgovarajućih faktora je prikazan u daljem tekstu prilikom analize ponašanja svakog od odziva redom. Važno je napomenuti da je prilikom analize korišćena „backward“ regresija, pomoću koje su iz modela eliminisani članovi koji nisu značajno uticali na odziv ($p \geq 0,0500$).

Tabela 5.2. p vrednosti dobijene analizom varijanse (ANOVA) procesnih promenljivih u eksperimentalnom dizajnu MAE antioksidanasa iz otpadne jagorčevine

Faktor	p^* -vrednost Prob > F	
	Y ₁	Y ₂
A	< 0,0001	< 0,0001
B	≥ 0,0500	< 0,0001
C	0,0009	≥ 0,0500
D	< 0,0001	< 0,0001
AB	≥ 0,0500	0,0346
AC	< 0,0001	0,0296
AD	≥ 0,0500	≥ 0,0500
BC	0,0003	< 0,0001
BD	≥ 0,0500	≥ 0,0500
CD	≥ 0,0500	≥ 0,0500
A ²	≥ 0,0500	< 0,0001
B ²	< 0,0001	< 0,0001
C ²	≥ 0,0500	0,0001

A: vreme ekstrakcije (s);

B: koncentracija etanola (%);

C: odnos rastvarač/čvrsta faza uzorka (ml/g);

Y₁: prinos ekstrakcije (mg s.m. ekstrakta/g s.m. uzorka);

Y₂: sadržaj ukupnih polifenola u ekstraktu (mg GAE/g s.m. ekstrakta);

* $p < 0,01$ veoma značajno; $0,01 \leq p < 0,05$ značajno; $p \geq 0,05$ nije značajno

5.1.1.1.1 Uticaj procesnih parametara na prinos ekstrakcije

Primenom višestruke regresione analize dobijena je zavisnost između prinosa ekstrakcije i četiri nezavisne promenljive (vreme ekstrakcije, koncentracija etanola, odnos rastvarač/čvrsta faza uzorka i snaga mikrotalasa), koja se mogu aproksimirati polinomom drugog reda:

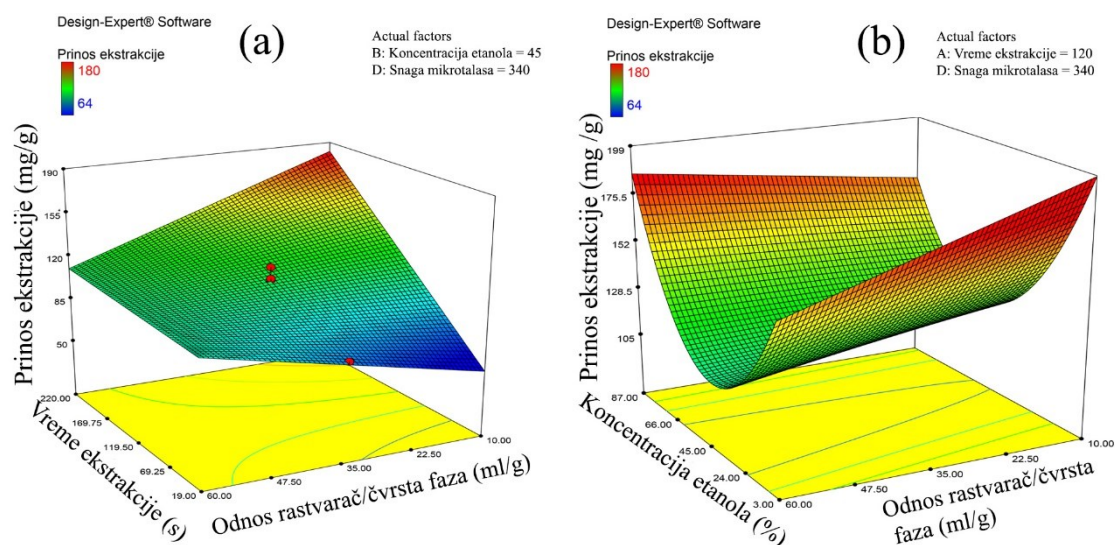
$$Y_1 = 100,73 + 19,91A - 3,89C + 12,41D - 10,69AC + 5,56BC + 22,45B^2 \quad (5.1.)$$

gde je Y₁ (prinos ekstrakcije) odziv, a procesne promenljive su A (vreme ekstrakcije), B (koncentracija etanola), C (odnos rastvarač/čvrsta faza uzorka) i D (snaga mikrotalasa).

Prinos ekstrakcije je u eksperimentima varirao u opsegu od 64 do 180 mg s.m.ekstrakta/g s.m. uzorka (tabela P-1.1). Višestruka regresiona analiza podataka ukazuje na to da su tri linearna člana (vreme ekstrakcije, odnos rastvarača/čvrsta faza i snaga mikrotalasa), dva interaktivna člana (AC i BC) i jedan kvadratni član (B²) statistički značajno uticali na prinos ekstrakcije ($p < 0,05$, tabela 5.2). Prema jednačini zavisnosti

prinos ekstrakcije od procesnih promenljivih (jednačina 5.1), negativan uticaj na prinos ekstrakcije su imali odnos rastvarač/čvrsta faza, dok su vreme ekstrakcije i mikrotalasna snaga imali pozitivan uticaj na prinos ekstrakcije. Pozitivan predznak kvadratnog člana koncentracije etanola ukazuje na postojanje minimuma funkcije.

Prinos ekstrakcije se povećavao kada je povećavana mikrotalasna snaga i vreme ekstrakcije i kada je smanjivana zapremine upotrebljenog rastvarača i koncentracija etanola (slika 5.2).



Slika 5.2. Odzivne površine međusobnih uticaja: vremena ekstrakcije i odnosa rastvarač/čvrsta faza (AC) pri koncentraciji etanola od 45% (a), koncentracije etanola i odnosa rastvarač/čvrsta faza (BC) pri vremenu ekstrakcije od 120 s (b) na prinos ekstrakcije (Y_1). Snaga mikrotalasa je 340 W.

Maksimalan prinos ekstrakcije je postignut kada se uzorak duže izlagao delovanju mikrotalasnog zračenja veće snage uz primenu manje zapremine upotrebljenog rastvarača. Tako je maksimalan prinos ekstrakcije u izvedenom setu eksperimenata postignut za 220 s ekstrakcije pri mikrotalasnoj snazi od 340 W i odnosu rastvarač/čvrsta faza uzorka od 10 ml/g. Ovakav uticaj procesnih promenljivih na prinos ekstrakcije se može objasniti na sledeći način: Tokom MAE rastvarači apsorbuju mikrotalasnu energiju i transformišu je u toplotnu. Ova transformacija je posledica dipolarne polarizacije i kondukcije (Mijin & Petrović, 2005). Takođe, delovanjem elektromagnetnih talasa dolazi

do promena u ćelijskom zidu biljaka, jer usled isparavanja vode u biljnoj ćeliji dolazi do naglog povećanja temperature i pritiska i do pucanja ćelijskih zidova. Tada se olakšava prodiranje rastvarača u unutrašnjost biljnog matriksa i na taj način se poboljšava ekstrakcija (Mandal et al., 2007). Takođe, sa povećanjem mikrotalasne snage povećava se i temperatura rastvarača, što dovodi do povećanja njegove difuzivnosti i smanjenja viskoznosti, što sve pozitivno utiče na ekstrakciju (Hemwimon et al., 2007). Primenom veće snage mikrotalasnog zračenja se povećava prinos ekstrakcije, što je u skladu sa literaturnim podacima (Karabegović et al., 2013; Pavlović et al., 2013). Takođe, može se primetiti i da se povećanjem zapremine rastvarača u odnosu na masu uzorka smanjio prinos ekstrakcije. Generalno u klasičnim ekstrakcijama se prinos ekstrakcije povećava kada se povećava zapremina rastvarača, što nije slučaj sa MAE. Veća zapremina rastvarača može više da apsorbuje mikrotalasnú energiju, tako da u manjoj meri dođe do bubrenja i pucanja biljnih ćelija, što sve dovodi do smanjenja prinosa ekstrakcije (Dhobi et al., 2009).

5.1.1.1.2 *Uticaj procesnih promenljivih na sadržaj ukupnih polifenola u ekstraktima*

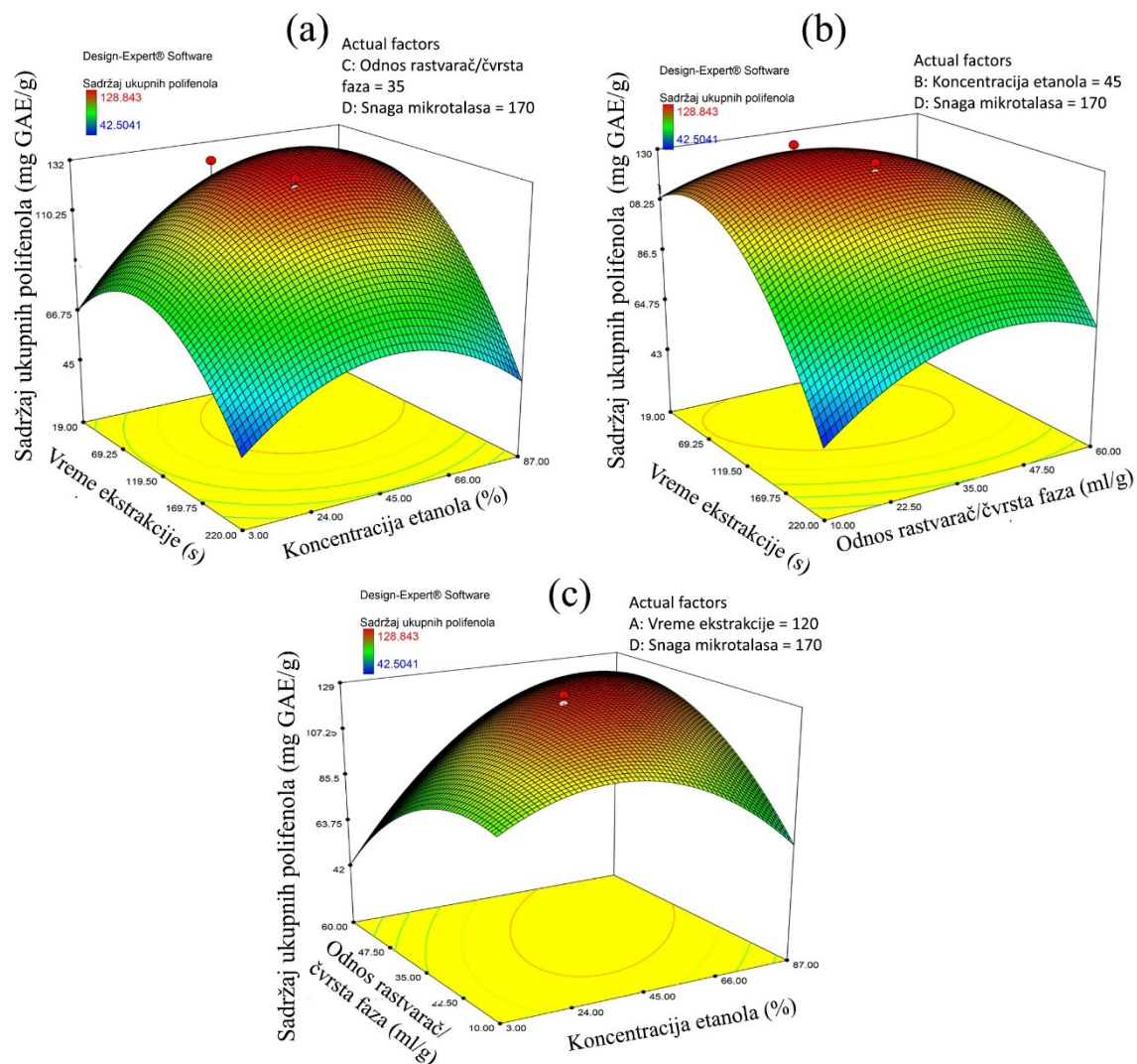
Primenom višestruke regresione analize dobijena je zavisnost između sadržaja ukupnih polifenola u ekstraktima i četiri nezavisne promenljive (vreme ekstrakcije, koncentracija etanola, odnos rastvarač/čvrsta faza uzorka i snaga mikrotalasa), koja se može aproksimirati polinomom drugog reda:

$$Y_2 = 109,89 - 13,16A + 7,63B - 15,13D - 3,93AB + 4,06AC + 9,21BC - 10,71A^2 - 9,13B^2 - 6,67C^2 \quad (5.2.)$$

gde je Y_2 (sadržaj ukupnih polifenola u ekstraktu) odziv, a promenljive su A (vreme ekstrakcije), B (koncentracija etanola), C (odnos rastvarač/čvrsta faza uzorka) i D (snaga mikrotalasa).

Sadržaj ukupnih polifenola u ekstraktima, koji su dobijeni pod različitim eksperimentalnim uslovima, se kretao u opsegu od 42,50 do 128,84 mg GAE/g g s.m. ekstrakta (tabela P-1.1). Višestruka regresiona analiza podataka ukazuje na to da su tri linerna člana (A, B i D), tri kvadratna člana (A^2 , B^2 i C^2) i tri interaktivna člana (AB, AC i BC) bili statistički značajni ($p < 0,05$, tabela 5.2). Prema jednačini zavisnosti sadržaja ukupnih polifenola u ekstraktima od promenljivih (jednačina 5.2), negativan uticaj na odziv su imali vreme ekstrakcije i snaga mikrotalasa, dok je koncentracija etanola imala

pozitivan uticaj na sadržaj ukupnih polifenola u ekstraktima. Negativan predznak kvadratnih članova A^2 , B^2 i C^2 ukazuju na postojanje maksimuma funkcije. Sadržaj ukupnih polifenola u ekstraktima je rastao kada je vreme ekstrakcije povećavano do 80 s, koncentracija etanola do 60% i odnos rastvarač/čvrsta faza do 41 ml/g (slika 5.3).



Slika 5.3. Odzivne površine međusobnih uticaja: vremena ekstrakcije i koncentracije etanola (AB) pri odnosu rastvarača i čvrste faze od 35 ml/g (a), vremena ekstrakcije i odnosa rastvarač/čvrsta faza (AC) pri koncentraciji etanola od 45% (b), koncentracije etanola i odnosa rastvarač/čvrsta faza (BC) pri vremenu ekstrakcije od 120 s (c), na saržaj ukupnih polifenola (Y_2). Snaga mikrotalasa je 170 W.

Značajan uticaj na sadržaj polifenola u ekstraktu je imala mikrotalasna snaga ($p < 0,0001$). Maksimalan sadržaj polifenola u ekstraktu je postignut kada je u ekstrakciji korišćena manja snaga (170 W). Povećanjem mikrotalasne snage povećava se i temperatura sistema, tako da se povećava i difuzivnost rastvarača, a smanjuje se njegova viskoznost. Ovo za posledicu ima povećanu ekstrakciju drugih jedinjenja iz otpadne jagorčevine, zbog čega se relativan sadržaj polifenola u ekstraktu smanjuje. Važno je napomenuti da je izmerena količina polifenola u ekstraktima izražena po gramu suve materije ekstrakta i da su optimizovani uslovi MAE za dobijanje ekstrakata koji su pretežno sastavljeni od polifenola.

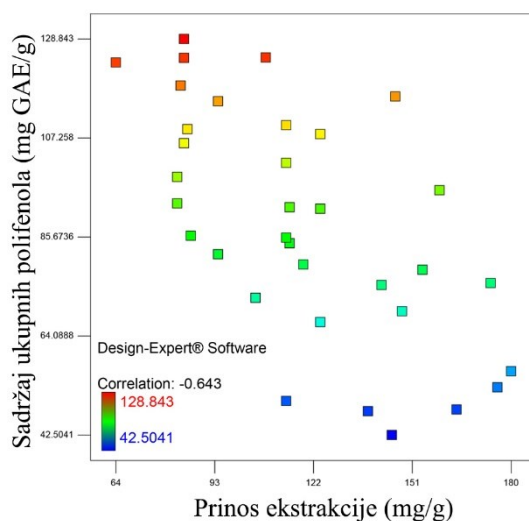
Vreme potrebno za ekstrakciju polifenola, se značajno smanjuje primenom MAE, u poređenju sa klasičnim metodama. Prema rezultatima, vreme koje je potrebno da bi se postigao maksimalan sadržaj ukupnih polifenola u ekstraktu je samo 80 s (slika 5.3a, b). Dužim izlaganjem uzorka mikrotalasnom zračenju, sadržaj polifenola u ekstraktima se smanjivao, najverovatnije zato što je na ovaj način stimulisana ekstrakcija i ostalih komponenata iz jagorčevine i tako smanjen relativan sadržaj polifenola u ekstraktima, što je u skladu sa literaturnim podacima (Ramić et al., 2014).

Koncentracija etanola je, takođe, imala statistički značajan uticaj na ekstrakciju polifenola iz otpadne jagorčevine ($p < 0,0001$). Polifenoli su polarna jedinjenja dobro rastvorljiva u polarnim rastvaračima. Prednost etanola u odnosu na druge polarne rastvarače je njegova netoksičnost u malim koncentracijama, tj. činjenica da ima GRAS status, zbog čega je moguće etanolne ekstrakte dalje primenjivati u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji (Wang & Weller, 2006). Prinos polifenola u ekstraktu se može povećati povećanjem polarnosti rastvarača, što se postiže dodatkom vode. U prisustvu vode dolazi do bubrenja biljnih ćelija, pa je ekstrakcija olakšana i povećava se apsorpcija energije, jer se dodatkom vode povećava dielektrična konstanta rastvarača. Sa druge strane dodatak vode smanjuje tangens gubitka, koji predstavlja sposobnost rastvarača da prevodi elektromagnetnu energiju u toplotu, pa to može negativno da utiče na ekstrakciju polifenola (Hemwimon et al., 2007). Na osnovu svega navedenog, može se zaključiti da postoji optimalna koncentracija etanola za MAE polifenola. Rezultati eksperimenta pokazuju da je povećanjem koncentracije etanola do 60% sadržaj ukupnih polifenola u ekstraktima rastao, dok je daljim povećanjem koncentracije etanola došlo do pada sadržaja polifenola (slika 5.3a, c). Dobijeni rezultati su u skladu sa literaturnim podacima

za MAE polifenola iz drugih biljnih vrsta (Ilaiyaraja et al., 2015; Prasad et al., 2011; Wu et al., 2012).

Što se tiče uticaja odnosa rastvarač/čvrsta faza na sadržaj ukupnih polifenola u ekstraktu, linearni član nije imao statistički značajan uticaj, ali su kvadratni član i interakcija sa vremenom ekstrakcije i koncentracijom etanola bili statistički značajni ($p < 0,05$). Povećanjem zapremine rastvarača prema masi uzorka do 41 ml/g, sadržaj polifenola je rastao, dok je daljim povećanjem ovog faktora došlo do smanjenja sadržaja polifenola u ekstraktu (slika 5.3b, c). Veća zapremina rastvarača može da dovede do većeg bubrenja biljnih ćelija i do efikasnije ekstrakcije polifenola, međutim, prevelika zapremina rastvarača apsorbuje mikrotalasnu energiju, tako da se smanjuje apsorpcija energije od strane biljnog materijala, što dovodi do smanjene ekstrakcije polifenola (Prakash Maran et al., 2013).

Interesantno je da je sadržaj ukupnih polifenola u ekstraktima obrnuto srazmeran prinosu ekstrakcije (slika 5.4), što ukazuje na to da su uslovi koji favorizuju dobijanje ekstrakta sa visokim prinosom neselektivni za polifenole, odnosno da se maksimalni sadržaj ukupnih polifenola u ekstraktu dobija primenom uslova ekstrakcije kojima se postiže manji prinos ekstrakcije. Dobijanje što čistijeg ekstrakta je važno sa komercijalne tačke gledišta, jer veća čistoća ekstrakta daje veću vrednost proizvodu (Spigno & De Faveri, 2009).



Slika 5.4. Korelacija između sadržaja ukupnih polifenola i prinosa ekstrakcije.

5.1.1.1.3 Validacija modela

Primenom metode željene funkcije (eng. *Desirability function*) definisani su optimalni uslovi ekstrakcije za dobijanje ekstrakta sa maksimalnim sadržajem ukupnih polifenola u ekstraktu. Postupkom numeričke optimizacije dobijeni su sledeći uslovi MAE: vreme trajanja ekstrakcije je 80 s, koncentracija rastvarača je 49%, a odnos rastvarač/čvrsta faza je 35 ml/g i mikrotalasna snaga je 170 W. Pri navedenim uslovima Design expert je predvideo vrednosti izlaznih promenljivih. Predviđeni prinos ekstrakcije je iznosio 66,72 mg/g, a 95% interval predviđanja (PI) je od 60,05 do 73,39 mg/g. Predviđeni sadržaj ukupnih polifenola u ekstraktu je 129,42 mg GAE/g, a 95% interval predviđanja (PI) je od 116,48 do 142,36 mg GAE/g. Izvođenjem ekstrakcije pod optimalnim uslovima dobijene su sledeće vrednosti izlaznih promenljivih: prinos ekstrakcije je $73,0 \pm 1,73$ mg/g, sadržaj ukupnih polifenola u ekstraktu je $130,73 \pm 3,51$ mg GAE/g. Dobijene vrednosti izlaznih promenljivih se uklapaju u 95% interval predviđanja, pa se može zaključiti da su modeli adekvatni i pouzdani.

5.1.1.1.4 Poređenje mikrotalasne i klasične ekstrakcije

Cilj primene novih metoda ekstrakcije, kao što je MAE, je povećanje efikasnosti ekstrakcije željenih jedinjenja. U poređenju dve ekstrakcione tehnike, efikasnijom se smatra ona tehnika koja omogućava smanjenu količinu upotrebljenog rastvarača, smanjeno vreme ekstrakcije, manje troškove koji su potrebni za dobijanja ekstrakta i povećanje prinosa bioaktivnog jedinjenja. Primenom MAE se smanjuje zagađenje životne sredine, jer se smanjuje potrošnja energije i do 70%, a i sami sistemi za MAE su kompaktniji i čine oko 20% od veličine klasičnih sistema za ekstrakciju (Veggi et al., 2012). U radu Filly i saradnika je pokazano da se mikrotalasnom ekstrakcijom etarskih ulja smanjuje potrošnja energije sa 4,5 kWh po gramu etarskog ulja, koliko se potroši u procesu hidrodestilacije, na 0,25 kWh/g etarskog ulja. Autori su pokazali i da se smanjuje i produkcija ugljen-dioksida koji se oslobađa u atmosferu sa 3600 g CO₂/g etarskog ulja, koliko se potroši u procesu hidrodestilacije, na 200 g CO₂/g etarskog ulja (Filly et al., 2014). Važno je uzeti u obzir i nedostatke MAE, a to su mogućnost pregrevanja sistema i razgradnje termolabilnih jedinjenja (Veggi et al., 2012). Klasična ekstrakcija, ukoliko se izvodi na sobnoj temperaturi, nije povezana sa sličnim gubicima energije kao u procesu hidrodestilacije etarskih ulja. Ipak treba imati u vidu i ostale parametre poput vremena

ekstrakcije i utroška rastvarača dok primat svakako treba dati kvalitetu dobijenog ekstrakta.

Klasična ekstrakcija izvedena je u 70% etanolu pri odnosu 15 ml/g na sobnoj temperaturi u trajanju od 4h uz konstantno mešanje. Rezultati pokazuju sličnu, iako neznatno veću količinu ukupnih polifenola u MAE u poređenju sa ekstraktom dobijenim klasičnom ekstrakcijom. Međutim, antioksidativna aktivnost ekstrakta dobijenog klasičnom ekstrakcijom je bila nešto veća od antioksidativne aktivnosti MAE ekstrakta (tabela 5.3), što je najverovatnije posledica ekstrakcije različitih vrsta polifenolnih jedinjenja primenom različitih metoda ekstrakcije.

Što se tiče uslova pod kojim se izvodi ekstrakcija, niža koncentracija etanola naizgled ukazuje na prednost MAE u odnosu na klasičnu ekstrakciju. Ipak treba imati u vidu da je za MAE potrebno relativno više rastvarača (odnos rastvarač/čvrsto je 35 ml/g za MAE naspram 15 ml/g za klasičnu ekstrakciju). Ovo ukazuje da je sa ekološke i ekonomske strane povoljnija klasična ekstrakcija u odnosu na MAE. Iako MAE zahteva četiri puta veću zapreminu rastvarača, treba imati na umu da ovaj problem može da se prevaziđe ponovnom upotrebom rastvarača nakon ekstrakcije. Naime, nakon ekstrakcije je moguće upariti rastvarač, čime bi se koncentrovao ekstrakt, a rastvarač ponovo mogao da koristi za ekstrakciju polifenola iz otpadne jagorčevine (John et al., 2006; Khiari et al., 2009). U ovom radu utvrđeno je da se koncentracisanjem uzoraka do konstantne koncentracije od 33 mg/ml dobija otpareni rastvarač koji sadrži 53,4% etanola. Ovo ukazuje da se otpareni rastvarač uz malo razblaženje može koristiti u sledećem ciklusu MAE. Ipak treba imati u vidu da je prednost MAE značajno kraće vreme koje je potrebno za dobijanje ekstrakta sa sličnim sadržajem ukupnih polifenola i antioksidativnom aktivnošću kao u ekstraktu dobijenom klasičnom ekstrakcijom.

Tabela 5.3. Poređenje MAE sa klasičnom ekstrakcijom

Metoda ekstrakcije	A	B	C	D	Y ₁	Y ₂	Y ₃	Y ₄
MAE	80	49	35	170	73,0 ± 1,73 ^a	130,73 ± 3,51 ^a	28,45 ± 2,12 ^a	0,895 ± 0,037 ^a
Klasična ekstrakcija	14400	70	15	-	231,5 ± 2,3 ^b	123,07 ± 5,86 ^a	32,41 ± 2,30 ^a	0,987 ± 0,007 ^a

A: vreme ekstrakcije (s);

B: koncentracija etanola (%);

C: odnos rastvarač/čvrsta faza (ml/g);

D: mikrotalasna snaga (W);

Y₁: prinos ekstrakcije (mg s.m. ekstrakta/g s.m. uzorka);

Y₂: sadržaj ukupnih polifenola u ekstraktu (mg GAE/g s.m. ekstrakta);

Y₃: inhibicija DPPH radikala (%);

Y₄: FRAP (mmol Fe²⁺/l).

* Vrednosti označene različitim slovnim oznakom (a, b) unutar pojedinih kolona se značajno razlikuju ($p = 0,01$).

Dobijeni rezultati su u skladu sa drugim radovima koji porede MAE u odnosu na klasične tehnike, pri ekstrakciji polifenola i drugih bioaktivnih jedinjenja iz biljaka (Krishnan & Rajan, 2016; Li et al., 2012; Shang et al., 2016). Švarc-Gajić i saradnici su optimizovali MAE polifenola iz ruzmarina, a zatim su poredili efikasnost ekstrakcije sa ultrazvučnom ekstrakcijom i ekstrakcijom po Soxhlet-u. Ekstrakti dobijeni mikrotalasnom ekstrakcijom i ekstrakcijom po Soxhlet-u su imali sličan prinos polifenola, dok je ekstrakt dobijen ultrazvučnom ekstrakcijom imao skoro duplo manji prinos. Uzimajući u obzir potrošnju rastvarača, dužinu trajanja procesa ekstrakcije i sadržaj polifenola u ekstraktima prednost su dali MAE (Švarc-Gajić et al., 2013). Dahmoune i saradnici su optimizovali MAE polifenola iz otpada od limuna, otpada od pistaća i mirte i poredili su dobijene prinose polifenola u ekstraktima sa prinosisima polifenola u ekstraktima koji su dobijeni klasičnom i ultrazvučnom ekstrakcijom. Dobijen prinos polifenola u ekstraktima koji su dobijeni različitim ekstrakcionim tehnikama se statistički nije razlikovao, međutim, vreme ekstrakcije i količina rastvarača je bila niža u MAE, pa se ona smatra efikasnijom (Dahmoune et al., 2013; Dahmoune et al., 2015; Dahmoune et al., 2014).

U literaturi postoji jako malo podataka o ekstrakciji polifenola iz jagorčevine, dok ne postoje podaci o izolovanju polifenola primenom MAE. Demir i saradnici su ekstrahovali polifenole iz *Primula vulgaris* i kao rastvarače su koristili vodu i 50% vodeni rastvor etanola. Sadržaj ukupnih polifenola u ekstraktima je bio 89,6 mg GAE/g ekstrakta

kada je u ekstrakciji korišćena voda kao rastvarač i 122,8 mg GAE/g ekstrakta kada je u ekstrakciji korišćen 50% rastvor etanola. Antioksidativna aktivnost dobijenih ekstrakata, izražena preko inhibicije DPPH radikala (u koncentraciji ekstrakta od 45 µg/ml) je iznosila 43,0 za vodeni i 39,4, za etanolni ekstrakt (Demir et al., 2014). Tunde i saradnici su ekstrahovali polifenole 70% etanolom iz cvetova jagorčevine. Sadržaj ukupnih polifenola je iznosio 5,35 mg GAE/g uzorka kada je odnos rastvarača prema masi uzorka bio 10:1 i 6,13 mg GAE/g uzorka kada je odnos rastvarača prema masi uzorka bio 20:1. Kada se sadržaj ukupnih polifenola u MAE ekstraktu koji je dobijen u ovom radu izrazi tako da se dobije sadržaj ukupnih polifenola po gramu uzorka, on iznosi $9,55 \pm 0,47$ mg GAE/g s.m. uzorka, što takođe potvrđuje da je MAE efikasnija od prethodno navedene ekstrakcije (Tünde; et al., 2015).

5.1.2 Optimizacija ekstrakcije polifenola i flavonoda sa antioksidativnom aktivnošću iz otpadne hajdučke trave (*A. millefolium*)

5.1.2.1 Određivanje opsega procesnih promenljivih

Pre optimizacije ekstrakcije polifenola iz otpadne hajdučke trave određen je opseg u okviru kojih su varirane vrednosti procesnih promenljivih koje utiču na MAE polifenola (tabela 5.4). Pravilno izabran opseg promenljivih je jako važan za uspešnu optimizaciju procesa.

Tabela 5.4. Uticaj procesnih promenljivih na sadržaj ukupnih polifenola u ekstraktima dobijenim iz otpadne hajdučke trave

Koncentracija etanola ¹ (%)	SUP (mg GAE/g)	Vreme ekstrakcije ² (s)	SUP (mg GAE/g)	Odnos rastvarač/čvrsta faza ³ (ml/g)	SUP (mg GAE/g)	Snaga mikrotalasna ⁴ (W)	SUP (mg GAE/g)
0	139,67	30	204,44	10	178,60	170	202,48
20	170,25	60	200,17	20	182,42	340	190,21
50	199,12	90	181,82	30	202,96	510	154,55
70	206,69	120	171,91	40	191,74		
96	102,48	180	163,64	50	182,64		
				60	180,99		

¹vreme ekstrakcije 60 s, odnos rastvarač/čvrsta faza 30 ml/g, mikrotalasna snaga 170 W

²koncentracija etanola 50%, odnos rastvarač/čvrsta faza 30 ml/g i mikrotalasna snaga 170 W

³vreme ekstrakcije 60 s, koncentracija etanola 50%, mikrotalasna snaga 170 W

⁴vreme ekstrakcije 60 s, koncentracija etanola 50%, odnos rastvarač/čvrsta faza 30 ml/g

SUP: sadržaj ukupnih polifenola

Na osnovu dobijenih vrednosti sadržaja ukupnih polifenola u ekstraktima izabrani su opsezi procesnih promenljivih koji su korišćeni za optimizaciju ekstrakcije polifenola iz otpadne hajdučke trave. Imajući u vidu da je sadržaj polifenola u ekstraktima bio najveći u delu testiranih opsega odabrani su opsezi u okviru kojih će se detaljno ispitati uticaj svakog od pojedinačnih parametara, ali i njihove međusobne interakcije na kvalitet ekstrakta. Odabrane vrednosti opsega su iznosile za vreme ekstrakcije 20 do 40 s, za koncentraciju etanola 60 do 80% i za odnos rastvarač/čvrsta faza 20 do 40 ml/g. Vrednosti ove tri promenljive su bile kontinualne, dok je snaga mikrotalasna imala dve diskretne vrednosti, 170 i 340 W.

5.1.2.2 Optimizacija mikrotalasne ekstrakcije polifenola i flavonoida sa antioksidativnom aktivnošću iz otpadne hajdučke trave (*A. millefolium*)

Da bi se utvrdili optimalni uslovi za izođenje MAE i dobijanje ekstrakta sa maksimalnim sadržajem polifenola i antioksidativnom aktivnošću iz otpadne hajdučke trave, korišćena je metoda odzivnih površina (RSM) i centralni kompozitni dizajn (CCD). Praćen je uticaj četiri procesne promenljive (vreme ekstrakcije (A), koncentracija etanola (B), odnos rastvarač/čvrsta faza uzorka (C), snaga mikrotalasa (D)) na pet odziva sistema (prinos ekstrakcije (Y_1), sadržaj ukupnih polifenola u ekstraktima (Y_2), sadržaj flavonoida u ekstraktima (Y_3), inhibicija DPPH radikala (Y_4) i FRAP (Y_5) (tabela P-1.2).

Analizom varijanse (ANOVA) je ocenjena adekvatnost i statistička značajnost svih modela (tabela 5.5). Vrednost koeficijenta determinacije (R^2) za matematički model prinosa ekstrakcije je iznosio 0,913, za jednačinu kojom je modelovan sadržaj ukupnih polifenola 0,908, za model sadržaja flavonoida 0,906, za model neutralizacije DPPH 0,892 i za matematički model FRAP aktivnosti ekstrakta 0,903. Koeficijent determinacije predstavlja meru odstupanja odzivne funkcije od eksperimentalno dobijenih rezultata, pa stoga može da se zaključi da postoji dobra korelacija između eksperimentalno dobijenih i predviđenih rezultata (tabela 5.5, slika 5.5). Koeficijent varijacije svih modela je manji od 10% što ukazuje da su modeli pouzdani i precizni. Vrednost adekvatne preciznosti svih modela je veća od 4, što ukazuje da je signal adekvatan. Nedostatak fitovanja (eng. *Lack of Fit*) poredi rezidualnu grešku (grešku ostataka) sa „čistom“ eksperimentalnom greškom izračunatom iz replikacija u centralnoj tački. Značajan nedostatak fitovanja

ukazuje na neadekvatan model, a pošto nedostatak fitovanja nije značajan za sve modele, modeli se mogu smatrati adekvatnim.

Tabela 5.5. Analiza varijanse (ANOVA) modela dobijenih primenom višestruke regresione analize

Odziv	R^2	p -vrednost	F -vrednost	Koeficijent varijacije (%)	p -vrednost nedostatka fitovanja	Adekvatna preciznost
Y ₁	0,913	< 0,0001	27,97	9,75	0,2154	21,74
Y ₂	0,908	< 0,0001	19,80	3,78	0,1109	19,32
Y ₃	0,906	< 0,0001	22,26	4,59	0,1970	16,01
Y ₄	0,892	< 0,0001	30,75	5,43	0,2647	21,72
Y ₅	0,903	< 0,0001	29,13	5,87	0,0705	21,27

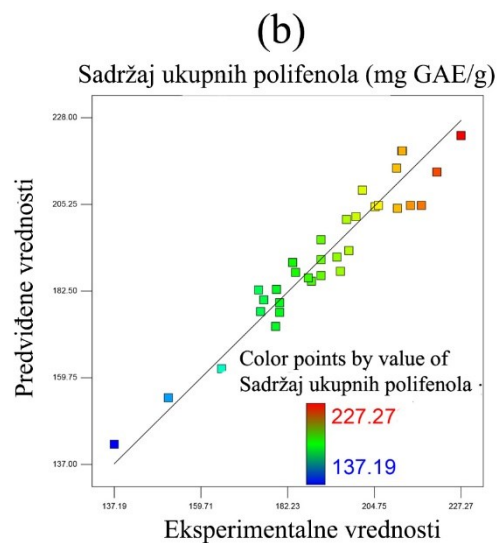
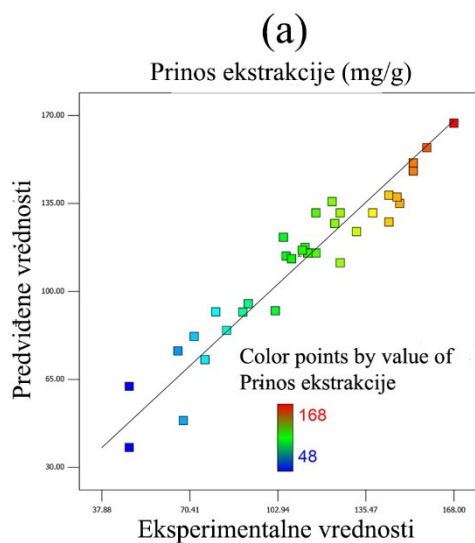
Y₁: prinos ekstrakcije (mg s.m. ekstrakta/g s.m. uzorka);

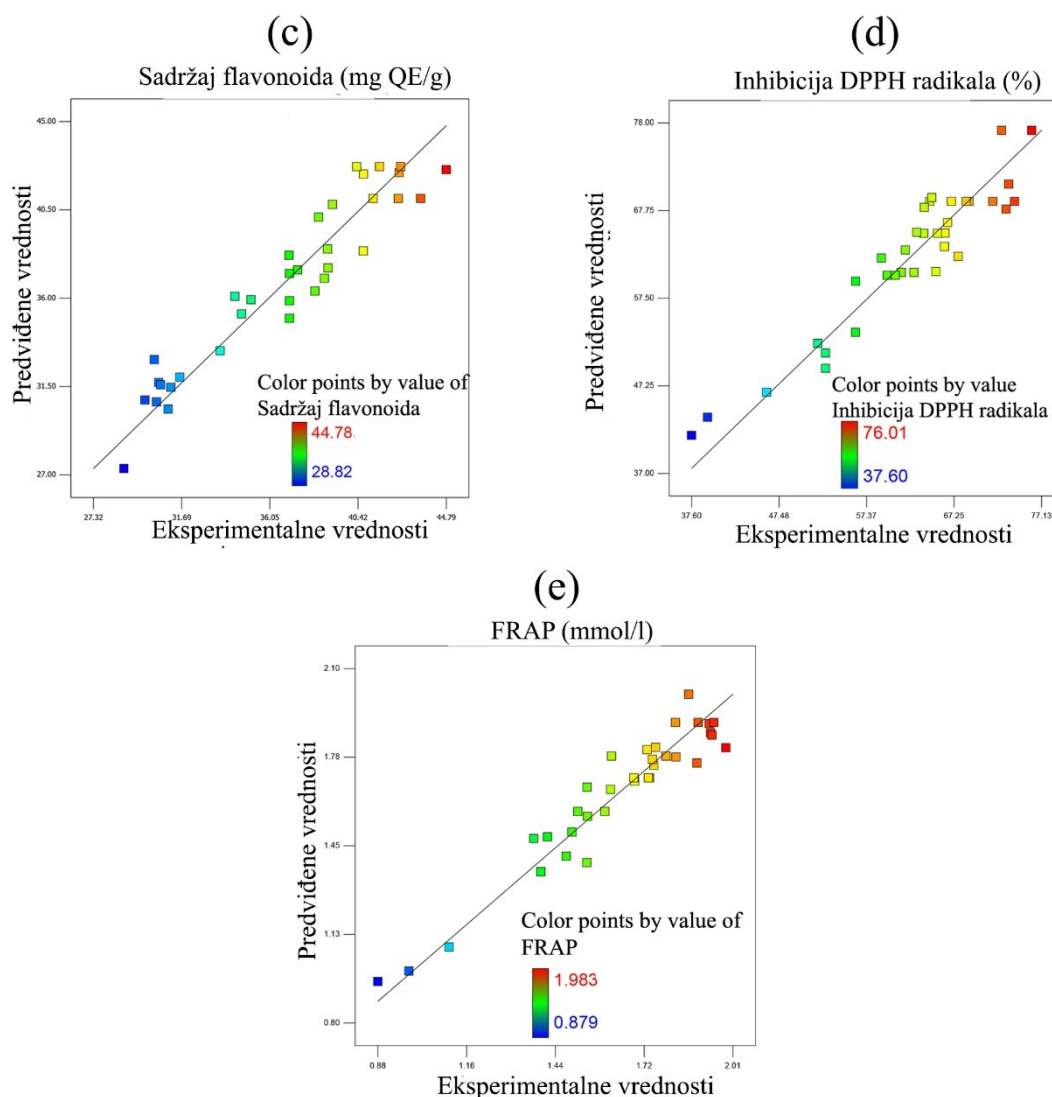
Y₂: sadržaj ukupnih polifenola u ekstraktu (mg GAE/g s.m. ekstrakta);

Y₃: sadržaj flavonoida u ekstraktu (mg QE/g s.m. ekstrakta);

Y₄: inhibicija DPPH radikala (%);

Y₅: FRAP (mmol Fe²⁺/l).





Slika 5.5. Slaganje eksperimentalno dobijenih i modelom predviđenih vrednosti odziva u eksperimentalnom dizajnu MAE antioksidanasa iz otpadne hajdučke trave: prinos ekstrakcije (a), sadržaj ukupnih polifenola (b), sadržaj flavonoida (c), DPPH (d), FRAP (e).

Ocena značajnosti uticaja procesnih promenljivih (vremena ekstrakcije, koncentracije etanola, odnosa rastvarač/čvrsta faza uzorka i snage mikrotalasa) na odzive, na osnovu ANOVA statistike, data je u tabeli 5.6, a efekat odgovarajućih faktora je prikazan u daljem tekstu prilikom analize ponašanja svakog od odziva redom. Važno je napomenuti da je prilikom analize korišćena „backward“ regresija, pomoću koje su iz modela eliminisani članovi koji nisu statistički značajno uticali na odziv ($p \geq 0,0500$).

Tabela 5.6. p vrednosti dobijene analizom varijanse (ANOVA) procesnih promenljivih u eksperimentalnom dizajnu MAE antioksidanasa iz otpadne hajdučke trave

Faktor	p^* -vrednost Prob > F				
	Y ₁	Y ₂	Y ₃	Y ₄	Y ₅
A	< 0,0001	≥ 0,0500	0,0312	0,0330	≥ 0,0500
B	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
C	0,0044	< 0,0001	0,0002	< 0,0001	< 0,0001
D	0,0003	< 0,0001	0,0101	≥ 0,0500	< 0,0001
AB	≥ 0,0500	0,0097	0,0006	≥ 0,0500	≥ 0,0500
AC	0,0067	0,0379	≥ 0,0500	≥ 0,0500	≥ 0,0500
AD	≥ 0,0500	0,0306	0,0007	≥ 0,0500	≥ 0,0500
BC	≥ 0,0500	0,0012	0,0044	< 0,0001	0,0034
BD	0,0005	0,0014	≥ 0,0500	0,0002	< 0,0001
CD	0,0196	≥ 0,0500	≥ 0,0500	≥ 0,0500	≥ 0,0500
A ²	0,0148	< 0,0001	< 0,0001	0,0035	0,0412
B ²	0,0015	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
C ²	≥ 0,0500	0,0116	0,0123	≥ 0,0500	0,0460

A: vreme ekstrakcije (s);

B: koncentracija etanola (%);

C: odnos rastvarač/čvrsta faza uzorka (ml/g);

D: snaga mikrotalasa (W);

Y₁: prinos ekstrakcije (mg/g);

Y₂: sadržaj ukupnih polifenola u ekstraktu (mg GAE/g s.m. ekstrakta);

Y₃: sadržaj flavonoida u ekstraktu (mg QE/g s.m. ekstrakta);

Y₄: inhibicija DPPH radikala (%);

Y₅: FRAP (mmol Fe²⁺/l).

* $p < 0,01$ veoma značajno; $0,01 \leq p < 0,05$ značajno; $p \geq 0,05$ nije značajno.

5.1.2.2.1 Uticaj procesnih parametara na prinos ekstrakcije

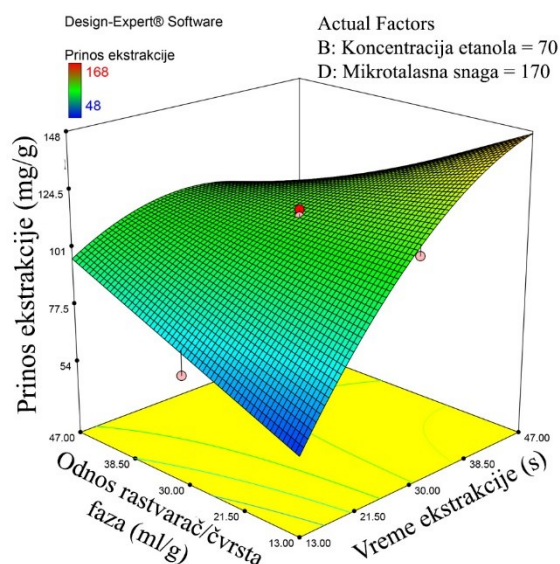
Primenom višestruke regresione analize dobijena je zavisnost između prinosa ekstrakcije i četiri nezavisne promenljive (vreme ekstrakcije, koncentracija etanola, odnos rastvarač/čvrsta faza uzorka i snaga mikrotalasa), koje se mogu aproksimirati polinomom drugog reda:

$$Y_1 = 123,22 + 13,45A - 24,32B - 6,58C + 8,00D - 8,13AC + 8,38BD - 5,24CD - 5,78A^2 - 7,90B^2 \quad (5.3.)$$

gde je Y₁ (prinos ekstrakcije) odziv, a promenljive su A (vreme ekstrakcije), B (koncentracija etanola), C (odnos rastvarač/čvrsta faza uzorka) i D (snaga mikrotalasa).

Prinos ekstrakcije je bio u opsegu od 48 do 168 mg/g (tabela P-1.2). Višestruka regresiona analiza podataka ukazuje na to da su svi linearni članovi bili statistički značajni ($p < 0,05$), a među njima najveći uticaj na prinos ekstrakcije su imali vreme ekstrakcije i

koncentracija etanola ($p < 0,0001$). Takođe, uticaj interakcija AC, BD, CD, kao i kvadratnih članova A^2 i B^2 je bio statistički značajan ($p < 0,05$, tabela 5.6). Prema jednačini zavisnosti prinosa ekstrakcije od promenljivih (jednačina 5.3), negativan uticaj na prinos ekstrakcije su imali koncentracija etanola i odnos rastvarača prema čvrstoj fazi uzorka, dok su pozitivan efekat imali vreme ekstrakcije i mikrotalasna snaga. Negativan predznak kvadratnih članova A^2 i B^2 ukazuje na postojanje maksimuma funkcije. Međusobni uticaj vremena ekstrakcije i odnosa rastvarač/čvrsta faza je prikazan na slici 5.6, sa koje se vidi da se maksimalni prinos ekstrakcije postiže povećanjem vremena ekstrakcije pri najnižoj vrednosti odnosa rastvarača prema čvrstoj fazi uzorka. Tako je maksimalni prinos ekstrakcije postignut za 47 s ekstrakcije na 340 W, pri odnosu rastvarača/čvrsta faza uzorka od 13 ml/g.



Slika 5.6. Odzivna površina međusobnih uticaja: vremena ekstrakcije i odnosa rastvarač/čvrsta faza (AC) pri koncentraciji etanola od 70% na prinos ekstrakcije (Y_1). Snaga mikrotalasa je 340 W.

Dobijeni rezultati su u skladu sa rezultatima koji su dobijeni u optimizaciji ekstrakcije polifenola iz otpadne jagorčevine. U principu, primena veće snage mikrotalasa u toku dužeg vremena doprinosi većem prinosu ekstrakcije. Takođe, kada se koristi veća snaga, sistem se brže zagreva. Temperatura sistema u eksperimentima se kretala u opsegu od 29 do 40 °C kada je mikrotalasna snaga od 170 W primenjena u ekstrakciji, dok je bila

od 32 do 55 °C, kada je u ekperimentima korišćena snaga od 340 W. Zagrevanjem sistema, a samim tim i rastvarača, smanjuje se njegova viskoznost i povećava difuzivnost, pa je prodiranje rastvarača u biljni materijal olakšano i ekstrakcija je efikasnija. Osim toga, kada se biljni materijal zagreva, voda u ćelijama isparava, stvara se veliki pritisak i ćelije pucaju, pa je i na taj način stimulirana ekstrakcija. Prinos ekstrakcije se povećavao i smanjenjem odnosa rastvarač/čvrsta faza. Generalno u klasičnim ekstraktijama se prinos ekstrakcije povećava povećanjem zapremine rastvarača, što nije slučaj sa MAE. Veća zapremina rastvarača može više da apsorbira elektromagnetnu energiju, smanjuje se apsorpcija od strane biljnog materijala, tako da ne dolazi do bubrenja i pucanja biljnih ćelija, što sve doprinosi smanjenju prinosa ekstrakcije (Dhobi et al., 2009).

5.1.2.2.2 *Uticao procesnih promenljivih na sadržaj ukupnih polifenola u ekstraktima*

Primenom višestruke regresione analize dobijena je zavisnost između sadržaja ukupnih polifenola u ekstraktima i četiri nezavisne promenljive (vreme ekstrakcije, koncentracija etanola, odnos rastvarač/čvrsta faza uzorka i snaga mikrotalasa), koja se može aproksimirati polinomom drugog reda:

$$Y_2 = 212,11 - 7,23B + 9,48C - 7,15D - 5,15AB + 4,02AC - 3,22AD + 6,76BC - 5,10BD - 9,47A^2 - 10,51B^2 - 4,21C^2 \quad (5.4)$$

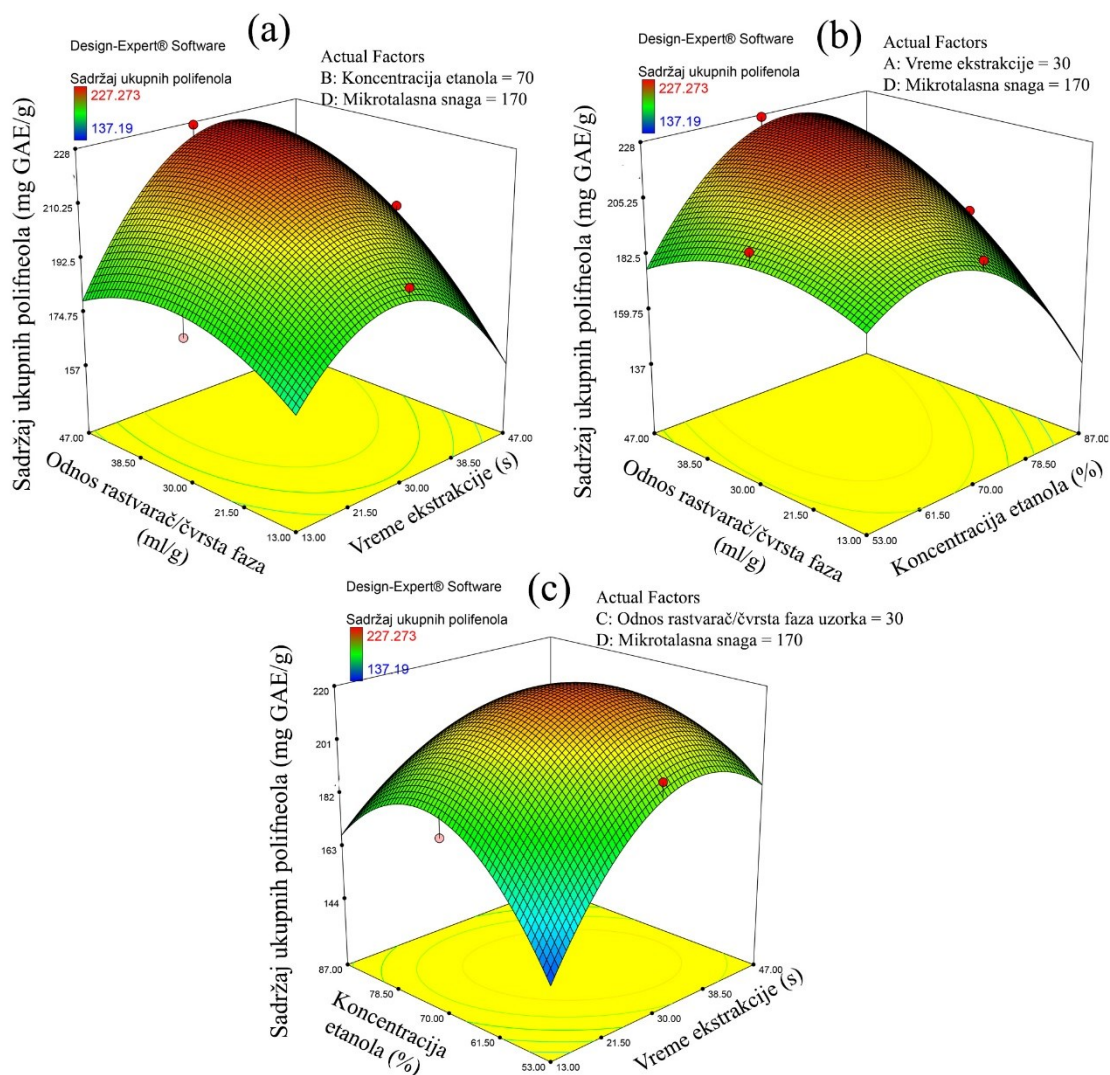
gde je Y_2 (sadržaj ukupnih polifenola u ekstraktu) odziv, a promenljive su A (vreme ekstrakcije), B (koncentracija etanola), C (odnos rastvarač/čvrsta faza uzorka) i D (snaga mikrotalasa).

Sadržaj ukupnih polifenola u ekstraktima je bio u opsegu od 137,19 do 227,27 mg GAE/g s.m. ekstrakta (tabela P-1.2). Statistički značajan uticaj ($p < 0,05$) na sadržaj polifenola u ekstraktima su imali tri linearna faktora (B, C, D), tri kvadratna (A^2 , B^2 , C^2) i pet interaktivnih faktora (AB, AC, AD, BC, BD) (tabela 5.6). Prema jednačini zavisnosti sadržaja ukupnih polifenola u ekstraktima i procesnih promenljivih (jednačina 5.4), negativan uticaj na odziv su imali mikrotalasa snaga i koncentracija etanola, dok je odnos rastvarač/čvrsta faza imalo pozitivan uticaj. Negativan predznak kvadratnih članova A^2 , B^2 , C^2 ukazuje na postojanje maksimuma funkcije. Sadržaj ukupnih polifenola se povećavao kada je vreme ekstrakcije povećavano do 36 s, koncentracija etanola do 73% i odnos rastvarač/čvrsta faza do 44 ml/g, pri korišćenju niže mikrotalasa snage (slika 5.7).

Najveći uticaj na sadržaj polifenola u ekstraktu je imao odnos rastvarač/čvrsta faza ($p < 0,0001$). Povećanjem zapremine rastvarača prema masi uzorka do 44 ml/g, sadržaj polifenola je rastao, dok je daljim povećanjem ovog faktora došlo do smanjenja sadržaja polifenola u ekstraktu (slika 5.7a, b). Kada se u MAE koristi veća zapremina rastvarača, ona može da dovede do bubrenja ćelija i do efikasnije ekstrakcije. Međutim, ukoliko se zapremina rastvarača toliko poveća da elektromagnetno zračenje većim delom apsorbuje rastvarač, a apsorpcija od strane biljnog materijala je zanemarljiva, biljna matrica se ne zagreva, pa se smanjuje efikasnost ekstrakcije polifenola.

Statistički značajan uticaj na ekstrakciju polifenola iz otpadne hajdučke trave je imala i mikrotalasna snaga ($p < 0,0001$). Maksimalan sadržaj polifenola u ekstraktu je postignut kada je u ekstrakciji korišćena niža mikroatslna snaga (170 W) (tabela P-1.2). Kao što je zaključeno kod optimizacije ekstrakcije polifenola iz otpadne jagorčevine, primenom više snage mikrotalasnog zagrevanja se povećava temperatura sistema, što pozitivno utiče na ekstrakciju i drugih jedinjenja iz otpadne hajdučke trave, osim polifenola, pa se na taj način smanjuje relativan sadržaj polifenola u ekstraktima.

Koncentracija etanola je imala statistički značajan uticaj na ekstrakciju polifenola iz otpadne hajdučke trave ($p < 0,0001$). Rezultati eksperimenta pokazuju da je optimalna koncentracije etanola 73% (slika 5.7b, c). Kao što je ranije zaključeno (odeljak 5.1.1.1.2), polifenoli su polarna jedinjenja za čiju ekstrakciju se najčešće koristi etanol u različitom odnosu sa vodom. Voda je polarnija od etanola, pa se polarnost smeše povećava njenim dodatkom, a takođe se podstiče i bubrenje biljnih ćelija. Međutim, dodatkom vode se smanjuje tangens gubitka rastvarača, odnosno smanjuje se sposobnost rastvarača da elektromagnetnu energiju prevodi u toplotu, pa se smanjuje temperatura smeše čime se smanjuje i rastvorljivost polifenola i difuzivnost rastvarača, što dovodi do smanjenja sadržaja polifenola u ekstraktima. Dobijeni rezultati su u skladu sa literaturnim podacima. Na primer, Zhao i saradnici su maksimalan sadržaj polifenola u ekstraktima, primenom MAE iz *Pyracantha fortuneana*, postigli kada su u ekstrakciji koristili 71% etanol (Zhao et al., 2013), dok su Prasad i saradnici maksimalno polifenola ekstrahovali iz *Mangifera pajang* korišćenjem 68% etanola (Prasad et al., 2011).



Slika 5.7. Odzivne površine međusobnih uticaja: vremena ekstrakcije i odnosa rastvarač/čvrsta faza (AC) pri koncentraciji etanola 70% (a), koncentracije etanola i odnosa rastvarač/čvrsta faza (BC) pri vremenu ekstrakcije 30 s (b) i vremena ekstrakcije i koncentracije etanola (AB) pri odnosu rastvarač/čvrsta faza 30 ml/g (c) na sadržaj ukupnih polifenola u ekstraktu (Y_2). Mikrotalasna snaga je iznosila 170 W.

Vreme koje je potrebno za ekstrakciju polifenola se značajno smanjuje primenom MAE, u poređenju sa klasičnim metodama. Prema dobijenim rezultatima vreme koje je potrebno da bi se postigao maksimalan sadržaj ukupnih polifenola u ekstraktu je samo 36 s, a nakon tog vremena dolazi do smanjenja sadržaja polifenola u ekstraktima (slika 5.7a, c). Sa dužom MAE se povećava temperatura sistema, pa se povećava oslobađanje i rastvorljivost polifenola, odnosno ubrzava se ekstrakcija.

Međutim, posle nekog vremena dolazi do relativno brže ekstrakcije drugih jedinjenja iz otpadne hajdučke trave, što utiče na smanjenje relativnog sadržaja polifenola u ekstraktima. Dahmoune i saradnici su zaključili da se dužom ekstrakcijom, usled povećanja temperature sistema, razgrađuju polifenolna jedinjenja (Dahmoune et al., 2015). Međutim, u ovom eksperimentu je najviša temperatura nakon ekstrakcije iznosila 55 °C, pa se ne može pretpostaviti da je termalna degradacija polifenola razlog njihovog smanjenja u ekstraktima jer su ekstrakti na ovoj temperature stabilni (Larrauri et al., 1997). Takođe, treba imati u vidu da sa dužom ekstrakcijom usled većeg zagrevanja sistema, može da dođe do isparavanja rastvarača i smanjenja efikasnosti ekstrakcije polifenola (Medouni-Adrar et al., 2015).

5.1.2.2.3 *Uticao procesnih promenljivih na sadržaj flavonoida u ekstraktima*

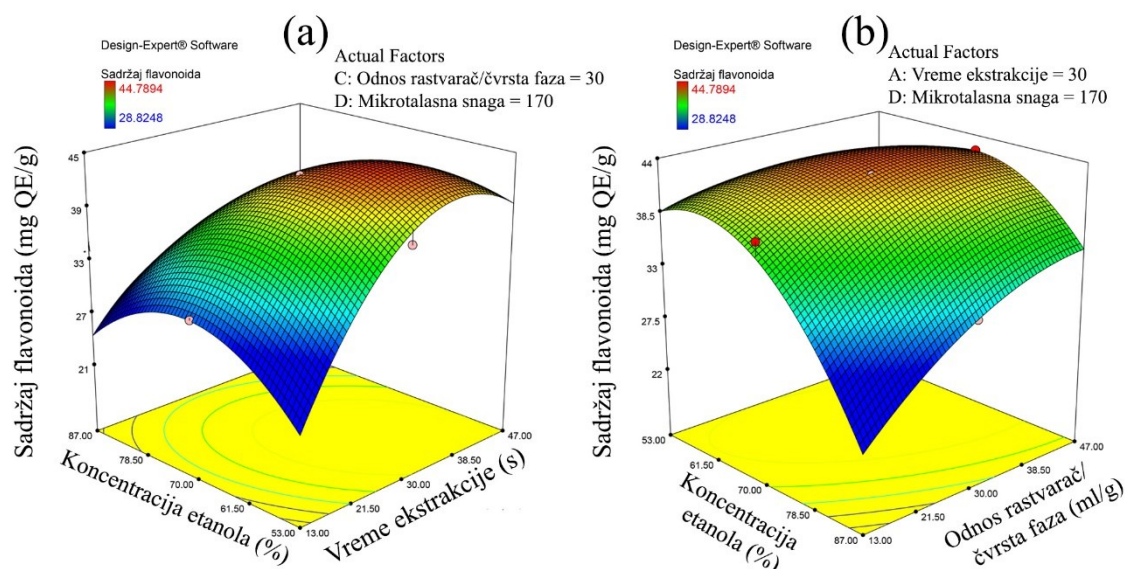
Zavisnost između sadržaja flavonoida u ekstraktima i četiri nezavisne promenljive (vreme ekstrakcije, koncentracija etanola, odnos rastvarač/čvrsta faza uzorka i snaga mikrotalasa) je dobijena pomoću višestruke regresione analize i može se aproksimirati polinomom drugog reda:

$$Y_3 = 41,89 + 0,74A - 2,43B + 1,44C - 0,81D - 1,67AB - 1,26AD + 1,33BC - 3,05A^2 - 2,35B^2 - 0,97C^2 \quad (5.5.)$$

gde je Y_3 (sadržaj flavonoida u ekstraktu) odziv, a promenljive su A (vreme ekstrakcije), B (koncentracija etanola), C (odnos rastvarač/čvrsta faza uzorka) i D (snaga mikrotalasa).

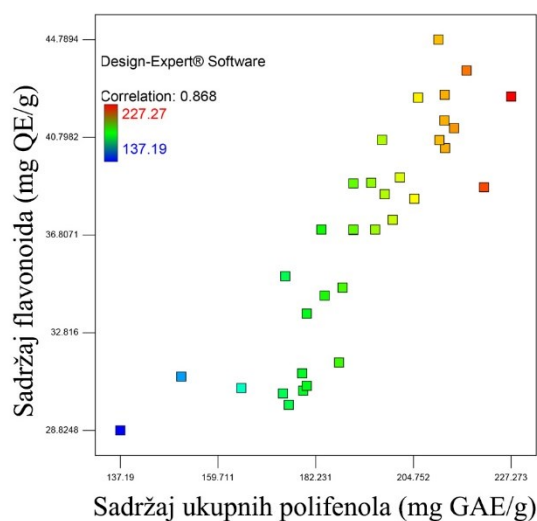
Sadržaj flavonoida u ekstraktima je bio u opsegu od 28,82 do 44,79 mg QE/ g s.m. ekstrakta (tabela P-1.2). Statistički značajan uticaj ($p < 0,05$) na sadržaj flavonoida u ekstraktima su imali četiri linearna faktora (A, B, C, D), tri kvadratna (A^2 , B^2 , C^2) i tri interaktivna faktora (AB, AD, BC) (tabela 5.6). Statistički najveći uticaj je imala koncentracija etanola ($p < 0,0001$) (tabela 5.6). Prema jednačini zavisnosti sadržaja flavonoida u ekstraktima i procesnih promenljivih (jednačina 5.5), negativan uticaj na odziv imali mikrotalasa snaga i koncentracija etanola, dok su odnos rastvarač/čvrsta faza i vreme ekstrakcije imalo pozitivan uticaj. Svi kvadratni članovi su imali negativan predznak, ukazujući na postojanje maksimuma funkcije.

Sadržaj flavonoida se povećavao kada je vreme ekstrakcije povećavano do 35 s, koncentracija etanola do 66% i odnos rastvarač/čvrsta faza do 35 ml/g, pri korišćenju niže mikrotalasne snage u ekstrakciji (slika 5.8).



Slika 5.8. Odzivne površine međusobnih uticaja: vremena ekstrakcije i koncentracije etanola (AB) pri odnosu rastvarač/čvrsta faza od 30 ml/g (a), koncentracije etanola i odnosa rastvarač/čvrsta faza (BC) pri vremenu ekstrakcije od 30 s (b) na sadržaj flavonoida u ekstraktu (Y_3). Mikrotalasna snaga je imala vrednost 170 W.

Ulazne promenljive na sličan način utiču na sadržaj polifenola i flavonoida u ekstraktima (jednačine 5.4 i 5.5). Ovakvo ponašanje je i očekivano, s obzirom na to da flavonoidi predstavljaju podgrupu polifenola (Ramić et al., 2014), a to je potvrđeno i jakim linearnom korelacijom između sadržaja ukupnih polifenola i sadržaja flavonoida u ekstraktima ($R = 0,868, p < 0,01$) (slika 5.9).



Slika 5.9. Korelacija između sadržaja ukupnih polifenola i sadržaja flavonoida u ekstraktima.

5.1.2.2.4 Uticaj procesnih promenljivih na antioksidativnu aktivnost ekstrakata

DPPH test je jedan od najčešće primenjivanih *in vitro* testova za određivanje antioksidativne aktivnosti ekstrakata, koji se zasniva na sposobnosti ekstrakta da neutrališe slobodan DPPH radikal.

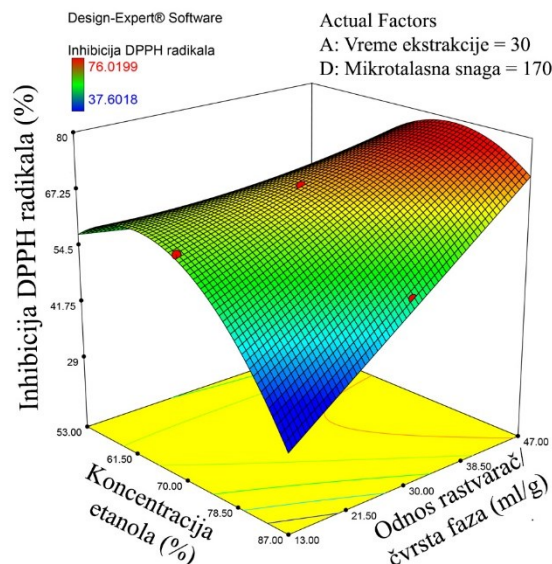
Pomoću višestruke regresione analize dobijena je zavisnost između inhibicije DPPH radikala i četiri nezavisne promenljive (vreme ekstrakcije, koncentracija etanola, odnos rastvarač/čvrsta faza uzorka i snaga mikrotalasa), koja se može aproksimirati polinomom drugog reda:

$$Y_4 = 68,82 - 1,46A - 3,58B + 4,94C + 4,37BC - 2,86BD - 2,19A^2 - 5,84B^2 \quad (5.6)$$

gde je Y_4 (inhibicija DPPH radikala) odziv, a promenljive su A (vreme ekstrakcije), B (koncentracija etanola), C (odnos rastvarač/čvrsta faza uzorka) i D (snaga mikrotalasa).

Procenat neutralizacije DPPH radikala ekstraktima koji su dobijeni pod različitim eksperimentalnim uslovima se kretao u opsegu od 37,61 do 76,11% (tabela P-1.2). Na procenat inhibicije DPPH radikala statistički značajan uticaj ($p < 0,05$) su imala tri linearna (A, B, C), dva interaktivna (BC, BD) i dva kvadratna faktora (A^2 , B^2) (tabela 5.6). Prema jednačini zavisnosti inhibicije DPPH radikala od ulaznih promenljivih (jednačina 5.6), negativan uticaj na odziv su imali vreme ekstrakcije i koncentracija

etanola, dok je odnos rastvarač/čvrsta faza imao pozitivan uticaj. Negativan predznak kvadratnih članova ukazuje na postojanje maksimuma funkcije. Povećanjem koncentracije etanola do 76%, odnosa rastvarača i uzorka do 47 ml/g i vremena ekstrakcije do 30 s, inhibicija DPPH radikala se povećavala (slika 5.10).



Slika 5.10. Odzivna površina međusobnih uticaja koncentracije etanola i odnosa rastvarač/čvrsta faza (BC) na inhibiciju DPPH radikala (Y_4). Snaga mikrotalasa je 170 W, a vreme ekstrakcije 30 s.

FRAP test se primenjuje kao *in vitro* test za određivanje redukcione sposobnosti ekstrakta. Zavisnost između FRAP i četiri nezavisne promenljive (vreme ekstrakcije, koncentracija etanola, odnos rastvarač/čvrsta faza uzorka i snaga mikrotalasa) je dobijena pomoću višestruke regresione analize i može se aproksimirati polinomom drugog reda:

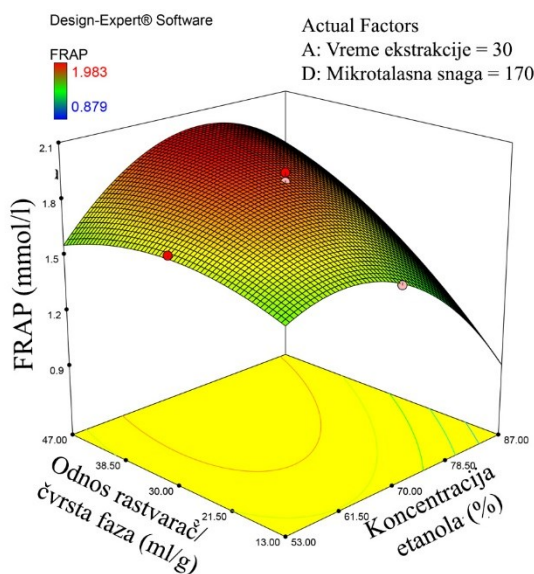
$$Y_5 = 1,80 - 0,16B + 0,13C - 0,10D + 0,078BC - 0,097BD - 0,044A^2 - 0,11B^2 - 0,043C^2 \quad (5.7.)$$

gde je Y_5 (FRAP) odziv, a promenljive su A (vreme ekstrakcije), B (koncentracija etanola), odnos rastvarač/čvrsta faza uzorka (C) i snaga mikrotalasa (D).

FRAP vrednosti ekstrakata su bile u opsegu od 0,879 do 1,984 mmol/l (tabela P-1.2). Statistički značajan uticaj ($p < 0,05$) na FRAP vrednosti su imali tri linearna (B, C, D), dva interaktivna (BC i BD) i tri kvadratna faktora (A^2 , B^2 , C^2) (tabela 5.6). Negativan uticaj na FRAP vrednosti ekstrakata su imali koncentracija etanola i mikrotalasna snaga,

dok je odnos rastvarač/čvrsta faza imao pozitivan uticaj. Takođe, svi kvadratni članovi su imali negativan predznak, što ukazuje na postojanje maksimuma funkcije.

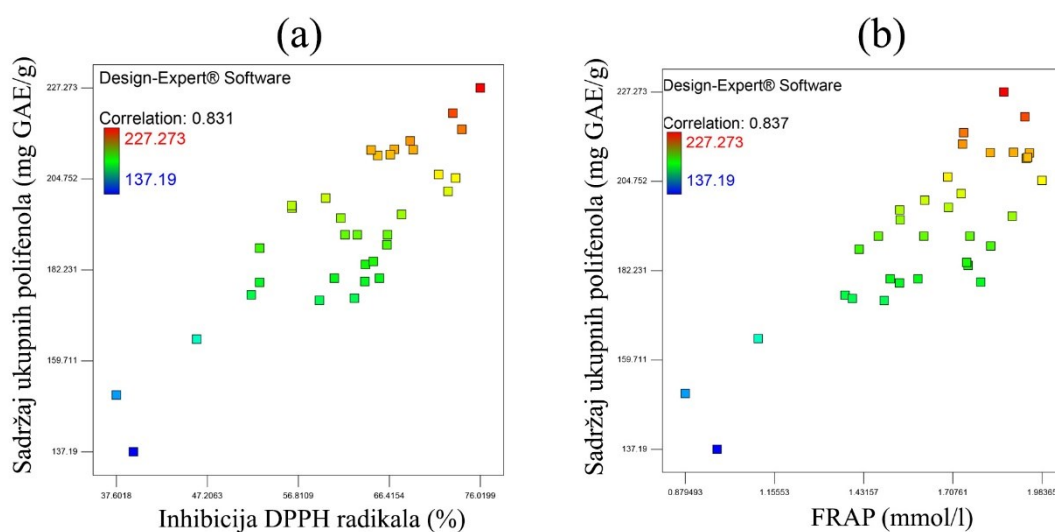
Povećanjem vremena ekstrakcije do 37 s, koncentracije etanola do 73% i odnosa rastvarača i uzorka do 47 ml/g, redukciona sposobnost ekstrakata je dostigla svoju maksimalnu vrednost, a slabija mikrotalasna snaga je povoljnije uticala na FRAP vrednost (slika 5.11).



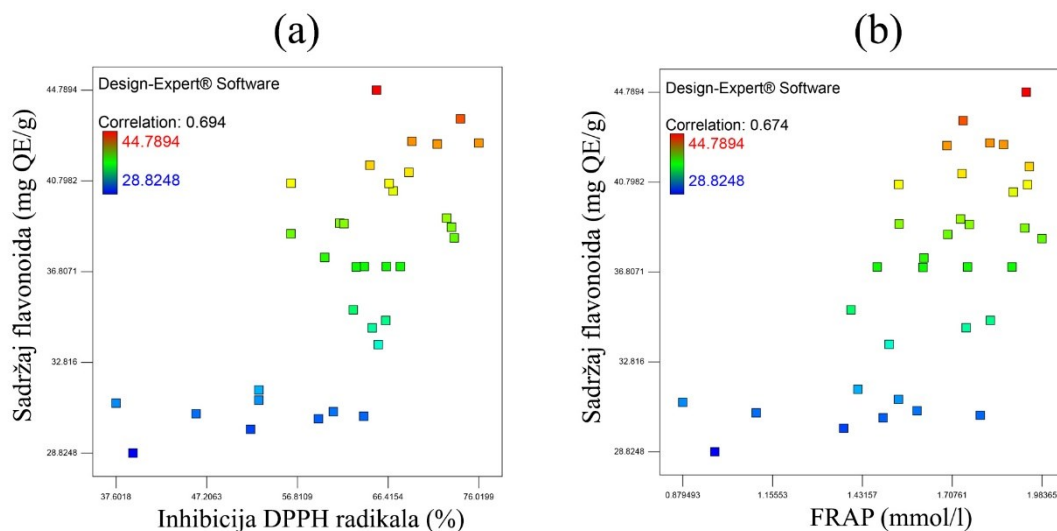
Slika 5.11. Odzivna površina međusobnih uticaja: vremena ekstrakcije i odnosa rastvarač/čvrsta faza (AC) pri koncentraciji etanola od 70% (a), koncentracije etanola i odnosa rastvarač/čvrsta faza (BC) pri vremenu ekstrakcije od 30 s (b) na FRAP (Y_5). Mikrotalasna snaga je imala vrednost 170 W.

Prema rezultatima eksperimenata, inhibicija DPPH radikala i FRAP redukciona moć ekstrakata je bila u statistički značajnoj pozitivnoj korelaciji sa sadržajem ukupnih polifenola u ekstraktima ($R = 0,831$ i $R = 0,837$, $p < 0,01$, slika 5.12), što ukazuje da su zapravo polifenoli jedinjenja u ekstraktima koji su nosioci antioksidativne aktivnosti i da porastom sadržaja ukupnih polifenola u ekstraktima raste i antioksidativna aktivnost. Ovo je u skladu sa očekivanjem, jer je poznato da su polifenoli jedinjenja sa izraženim antioksidativnim svojstvima. Ipak činjenica da stepen korelacije odsutupa u većoj meri od 1,00 ukazuje da sadržaj polifenola kao takav nije direktna mera antioksidativne aktivnosti. Na antioksidativnu aktivnost uticaj ima i hemijska priroda polifenola i rezultati ukazuju na izvesne razlike u sastavu polifenola dobijenih ekstrakcijom pod različitim uslovima.

Ovo može biti posledica različite brzine ekstrakcije strukturno drugačijih polifenola, ali i njihove delimične degradacije pod određenim uslovima. Ovi rezultati su slični onim raportiranim u literaturi (Ilaiyaraja et al., 2015; Kiselova et al., 2006; Ranic et al., 2014; Thaipong et al., 2006). Korelacija između sadržaja flavonoida i antioksidativne aktivnosti ekstrakata, izražene preko inhibicije DPPH radikala i redukcionog kapaciteta ekstrakata je bila nešto niža, iako i dalje statistički značajna ($R = 0,694$ i $R = 0,674$, $p < 0,01$, slika 5.13). Prema rezultatima Dias i saradnika, veći udeo u ukupnim polifenolima ekstrakata dobijenih iz hajdučke trave čine fenolne kiseline (oko 70%) (Dias et al., 2013). Bez obzira na to koji rastvarač i koja tehnika ekstrakcije je korišćena u njihovom radu, najveći udeo u ukupnim polifenolima u ekstraktima su imale sledeće fenolne kiseline: 5-O-kafeoilhinska kiselina (neohlorogenska) i *cis* i *trans* izomeri 3,5-O-dikafeoilhinske kiseline. Na osnovu ovoga se može pretpostaviti da su zapravo fenolne kiseline glavni nosioci antioksidativne aktivnosti MAE ekstrakta, a da flavonoidi u manjoj meri doprinose antioksidativnim svojstvima ekstrakata hajdučke trave.



Slika 5.12. Korelacija između sadržaja ukupnih polifenola i inhibicije DPPH radikala (a) i FRAP redukcione moći (b).



Slika 5.13. Korelacija između sadržaja flavonoida i inhibicije DPPH radikala (a) i FRAP redukcione moći (b).

5.1.2.2.5 Validacija modela

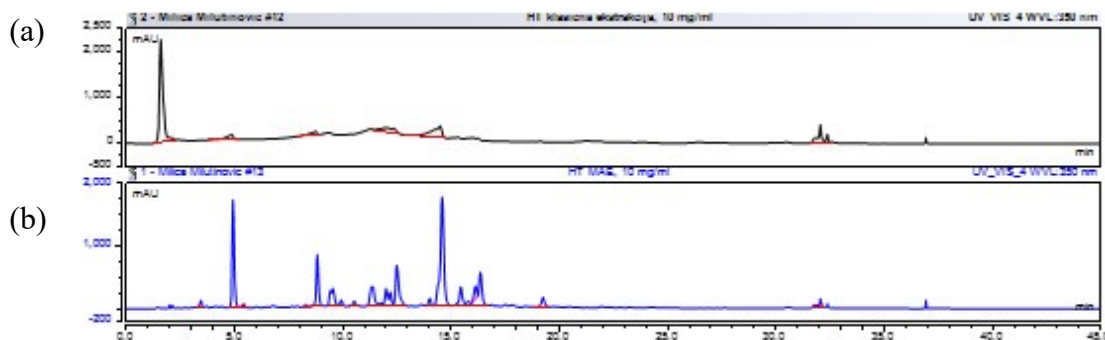
Primenom metode željene funkcije definisani su optimalni uslovi ekstrakcije za dobijanje ekstrakta sa maksimalnim sadržajem polifenola, flavonoida i antioksidativnom aktivnošću. Postupkom numeričke optimizacije dobijeni su sledeći uslovi MAE: vreme trajanja ekstrakcije je 33 s, odnos rastvarač/čvrsta faza je 40 ml/g, koncentracija rastvarača je 70% i mikrotalasna snaga je 170 W. Pri navedenim uslovima Design expert je predvideo vrednosti izlaznih promenljivih koje su prikazane u tabeli 5.7. Izvođenjem ekstrakcije pod optimalnim uslovima dobijene su vrednosti koje se uklapaju u 95% interval predviđanja, pa se može zaključiti da su modeli adekvatni i pouzdani (tabela 5.7).

Tabela 5.7. Predviđene i validirane vrednosti

Odziv	Predviđene vrednosti 95% PI		Validirane vrednosti
Prinos ekstrakcije (mg/g)	113,7	89,06 - 134,49	113,33 ± 2,31
Sadržaj ukupnih polifenola (mg GAE/g)	226,46	211,05 - 242,03	237,74 ± 2,08
Sadržaj flavonoida (mg QE/g)	43,44	39,67 - 47,20	42,95 ± 1,32
DPPH (%)	74,34	67,05 - 81,53	71,72 ± 2,12
FRAP (mmol/l)	1,999	1,770 - 2,200	2,023 ± 0,015

5.1.2.2.6 Poređenje mikrotalasne i klasične ekstrakcije

Kao i za MAE polifenola iz otpadne jagorčevine i za otpadnu hajdučku travu upoređena je efikasnost primenjene tehnike ekstrakcije poređenjem sa klasičnom ekstrakcijom. Rezultati ukazuju na to da se primenom MAE, za samo 33 s, ekstrahuje 48% više ukupnih polifenola, 33% više flavonoida, pri čemu MAE ekstrakt pokazuje veću antioksidativnu aktivnost (tabela 5.8). Ovo ukazuje na značajno bolji kvalitet MAE ekstrakta, međutim, kao i kod ekstrakcije polifenola iz otpadne jagorčevine, prednost klasične ekstrakcije je potrošnja manje količine rastvarača. Rastvarač je u slučaju otpadne hajdučke trave imao isti udeo etanola i za MAE i klasičnu ekstrakciju. U ovom radu utvrđeno je da se koncentrisanjem uzoraka do konstantne koncentracije od 90 mg/ml dobija otpareni rastvarač koji sadrži 72,3% etanola. Ovo ukazuje da se otpareni rastvarač uz malo razblaženje može koristiti u sledećem ciklusu MAE. MAE i klasičnom ekstrakcijom se ekstrahuju različite vrste polifenolnih jedinjenja, na šta ukazuje HPLC hromatogram (slika 5.14).



Slika 5.14. HPLC hromatogram ekstrakta hajdučke trave dobijenog klasičnom ekstrakcijom (a) i MAE ekstrakta hajdučke trave (b).

Slično je zabeleženo i u literaturi prilikom mikrotalasne ekstrakcije polifenola iz origana (Hithamani & Ramalakshmi, 2013). U literaturi postoje brojni podaci koji su pokazali da je MAE efikasnija tehnika ekstrakcije polifenola od klasičnih metoda u pogledu smanjenja potrebnog vremena za izolovanje bioaktivnih jedinjenja (Dahmoune et al., 2015; Pan et al., 2003). Pored jasnih tehničkih prednosti usled smanjenja vremena ekstrakcije, ovim se smanjuje i mogućnost degradacije biološki aktivnih jedinjenja (Medouni-Adrar et al., 2015), što je dodatna prednost MAE u odnosu na klasičnu ekstrakciju.

Tabela 5.8. Poređenje MAE sa klasičnom ekstrakcijom

Metoda ekstrakcije	A	B	C	D	Y ₁	Y ₂	Y ₃	Y ₄	Y ₅
MAE	33	70	40	170	113,33 ±2,31 ^a	237,74 ±2,08 ^a	42,95 ±1,32 ^a	71,72 ±2,12 ^a	2,023 ±0,015 ^a
Klasična ekstrakcija	14400	70	15	-	247,50 ±1,18 ^b	160,38 ± 3,12 ^b	32,30 ±2,24 ^b	54,29 ±2,57 ^b	1,270± 0,010 ^b

A: vreme ekstrakcije (s);

B: koncentracija etanola (%);

C: odnos rastvarač/čvrsta faza (ml/g);

D: mikrotalasna snaga (W);

Y₁: prinos ekstrakcije (mg s.m. ekstrakta/g s.m. uzorka);

Y₂: sadržaj ukupnih polifenola u ekstraktu (mg GAE/g s.m. ekstrakta);

Y₃: sadržaj flavonoida u ekstraktu (mg QE/g s.m. ekstrakta);

Y₄: inhibicija DPPH radikala (%);

Y₅: FRAP (mmol Fe²⁺/l).

* Vrednosti označene različitim slovnim oznakom (a, b) unutar pojedinih kolona se značajno razlikuju ($p = 0,01$).

Dodatni parametar koji se koristi za kvantifikaciju antioksidativnih svojstava je IC₅₀, koji predstavlja koncentraciju ekstrakta koja inhibira 50% početne koncentracije DPPH radikala i niska IC₅₀ vrednost ukazuje na jaku antioksidativnu aktivnost ekstrakta. Za MAE ekstrakt IC₅₀ vrednost je iznosila $6,97 \pm 0,21 \mu\text{g/ml}$, dok je za ekstrakt dobijen klasičnom ekstrakcijom iznosila $9,22 \pm 0,44 \mu\text{g/ml}$, što pokazuje da je MAE ekstrakt potentniji antioksidans. Smanjena antioksidativna aktivnost ekstrakta dobijenog primenom klasične ekstrakcije može biti posledica manje koncentracije ekstrahovanih polifenola (što je jasno uočivo iz dobijenih rezultata, tabela 5.8), ali i različite aktivnosti izolovanih jedinjenja, jer je na HPLC hromatogramu (Slika 5.14) uočljivo da se primenom ove dve ekstrakcione tehnike izoluju jedinjenja različite strukture. Takođe, u toku klasične ekstrakcije je ekstrakt duže izložen nepovoljnim uslovima, kao što su svetlost i kiseonik, koji su pored visoke temperature najvažniji faktori koji doprinose razgradnji polifenola (Medouni-Adrar et al., 2015).

IC₅₀ vrednost MAE ekstrakta je nešto viša od IC₅₀ vrednosti komercijalnih antioksidanasa, kao što su vitamin C ($5,97 \pm 0,08 \mu\text{g/ml}$) i butilhidroksitoluen (BHT) ($3,03 \pm 0,03 \mu\text{g/ml}$) (Milutinović et al., 2013). Antioksidativna aktivnost MAE ekstrakta je veća od, do sada u literaturi zabeleženih, antioksidativnih aktivnosti ekstrakata koji su dobijeni iz hajdučke trave (Dias et al., 2013; Düsman et al., 2013; Nickavar et al., 2006; Potrich et al., 2010). Jedino je antioksidativna aktivnost etarskog ulja dobijenog iz

hajdučke trave (IC_{50} 1,56 $\mu\text{g/ml}$) veća od antioksidativne aktivnosti MAE ekstrakta (Candan et al., 2003). Međutim, iako je etarsko ulje hajdučke trave pokazalo veću antioksidativnu aktivnost, prinos etarskog ulja je niska (0,6% v/w), a hidrodestilacija, kojom se dobija etarsko ulje, duže traje (3 sata) i sam proces je tehnički i energetski zahtevniji od MAE. Veća antioksidativna aktivnost MAE ekstrakta u poređenju sa literaturnim podacima bi mogla da bude posledica različitih faktora. Jedan od faktora koji utiče na efikasnost ekstrakcije polifenola je i veličina čestice uzorka. Uzorak, koji je korišćen za dobijanje MAE ekstrakta, je bio sitan prah, dobijen prosejavanjem biljnog materijala nakon usitnjavanja. Ovakav otpadni prah nije pogodan za primenu u čajnim mešavinama jer prolazi kroz pore filter vrećica ili cediljki, ali je po drugim karakteristikama identičan lekovitom bilju koje nalazi primenu kod potrošača nakon prerade lekovitog bilja. U drugim radovima veličina čestice ili nije zabeležena ili je veća od veličine čestica uzorka korišćenih za dobijanje MAE ekstrakta u ovom radu. Prethodne studije su pokazale da se korišćenjem sitnijih čestica povećava kontaktna površina između rastvarača i uzorka, pa se povećava i prinos polifenola (Chupin et al., 2015; Silva et al., 2007; Stamatopoulos et al., 2013). Drugi faktor, koji bi mogao da utiče na drugačiji sadržaj polifenola u ekstraktima je i drugačiji sadržaj polifenola u samoj biljci, koji je posledica uticaja različitih faktora životne sredine, vrste zemljišta, klimatskih uslova, načina skladištenja i tehnološkog tretmana biljke (Dias et al., 2013; Giorgi et al., 2007; Giorgi et al., 2009). Takođe, kvalitet dobijenog ekstrakta može biti i direktna posledica primene MAE sa svojim specifičnim mehanizmom ekstrakcije, jer dobijeni rezultati ukazuju da se iz istog materijala primenom MAE dobija gotovo 50% više polifenola sa izraženim antioksidativnim svojstvima. Takođe, treba naglasiti da prilikom MAE temperatura sistema u svim eksperimentima je bila niža od 55 °C, tako da nije došlo do termalne degradacije polifenola, što je doprinelo očuvanju kvaliteta ekstrakta (Sólyom et al., 2014; Volf et al., 2014).

Najveći deo otpada koji nastaje tokom prerade lekovitog bilja čini neiskorišćeni deo biljke, koji je različit za svaku biljku i zavisi od lokalizacije bioaktivne komponente. Ovakav otpad ima relativno malu mogućnost iskorišćenja u odnosu na otpad dobijen prosejavanjem biljnog materijala nakon usitnjavanja, jer on predstavlja najfiniji prah dela biljke koji je bogat biološki aktivnim materijama. Otpadni prah nije pogodan za primenu u čajnim mešavinama jer prolazi kroz pore filter vrećica ili cediljki, ali po drugim

karakteristikama je identičan lekovitom bilju koje nalazi primenu kod potrošača. Ova vrsta otpada predstavlja pogodnu polaznu sirovinu za ekstrakciju i mogućnost njene eksploatacije je ispitana u ovoj doktorskoj disertaciji. Posebnu vrstu otpada predstavlja biljni ostatak nakon ekstrakcije.

5.1.3 Optimizacija ekstrakcije polifenola i flavonoida iz otpadnog rastavića (*E. arvense*)

5.1.3.1 Određivanje opsega procesnih promenljivih

Kao i kod optimizacije MAE polifenola i flavonoida iz otpadne hajdučke trave, pre optimizacije ekstrakcije polifenola i flavonoida iz otpadnog rastavića određen je opseg u okviru kog su varirane vrednosti procesnih promenljivih koje utiču na MAE polifenola (tabela 5.9).

Tabela 5.9. Uticaj procesnih promenljivih na sadržaj ukupnih polifenola u ekstraktima dobijenim iz otpadnog rastavića

Koncentracija etanola ¹ (%)	SUP (mg GAE/g)	Vreme ekstrakcije ² (s)	SUP (mg GAE/g)	Odnos rastvarač/čvrsta faza ³ (ml/g)	SUP (mg GAE/g)	Snaga mikrotalasa ⁴ (W)	SUP (mg GAE/g)
0	70,38	30	109,09	10	75,95	170	123,21
20	83,47	60	121,52	20	87,69	340	119,27
50	122,10	90	150,00	30	123,21	510	85,47
60	137,36	120	134,21	40	155,54		
80	90,91	180	89,26	50	151,35		
96	70,91			60	56,21		

¹ vreme ekstrakcije 60 s, odnos rastvarač/čvrsta faza 30 ml/g, mikrotalaska snaga 170 W

² koncentracija etanola 50%, odnos rastvarač/čvrsta faza 30 ml/g, mikrotalaska snaga 170 W

³ vreme ekstrakcije 60 s, koncentracija etanola 50%, mikrotalaska snaga 170 W

⁴ vreme ekstrakcije 60 s, koncentracija etanola 50%, odnos rastvarač/čvrsta faza 30 ml/g
SUP: sadržaj ukupnih polifenola

Na osnovu dobijenih vrednosti sadržaja ukupnih polifenola u ekstraktima izabrani su opsezi procesnih promenljivih koji favorizuju dobijanje ekstrakata sa visokim sadržajem polifenola i sledeći opsezi su korišćeni za optimizaciju ekstrakcije polifenola, odnosno antioksidanasa iz otpadnog rastavića metodom statističkog planiranja

eksperimenta. Vrednosti opsega za vreme ekstrakcije je bilo od 60 do 120 s, za koncentraciju etanola od 50 do 70%, a za odnos rastvarač/čvrsta faza od 30 do 50 ml/g. Vrednosti ove tri promenljive su bile kontinualne, dok je snaga mikrotalasa imala diskretne vrednosti, 170 i 340 W.

5.1.3.2 Optimizacija mikrotalasne ekstrakcije polifenola i flavonoida sa antioksidativnom aktivnošću iz otpadnog rastavića (*E. arvense*)

Za utvrđivanje optimalnih uslova za izvođenje MAE i dobijanje ekstrakta sa maksimalnim sadržajem ukupnih polifenola i maksimalnom antioksidativnom aktivnošću, korišćena je metoda odzivnih površina (RSM) i centralni kompozitni dizajn (CCD). Praćen je uticaj četiri procesne promenljive (vreme ekstrakcije (A), koncentracija etanola (B), odnos rastvarač/čvrsta faza uzorka (C), snaga mikrotalasa (D)) na pet odziva sistema (prinos ekstrakcije (Y_1), sadržaj ukupnih polifenola u ekstraktima (Y_2), sadržaj flavonoida u ekstraktima (Y_3), inhibicija DPPH radikala (Y_4) i FRAP (Y_5)) (tabela P-1.3).

Analizom varijanse (ANOVA) je ocenjena adekvatnost i statistička značajnost svih modela (tabela 5.10). Vrednost koeficijenta determinacije (R^2) za matematički model prinosa ekstrakcije je iznosio 0,942, za model sadržaja ukupnih polifenola 0,885, za model sadržaja flavonoida 0,930, za jednačinu koja opisuje neutralizaciju DPPH 0,959 i za model FRAP redukcione moći 0,932, pa se može zaključiti da postoji dobra korelacija između predviđenih i eksperimentalno dobijenih rezultata (tabela 5.10, slika 5.15). Koeficijent varijacije svih modela je manji od 10% što ukazuje da su modeli pouzdani i precizni. Vrednost adekvatne preciznosti svih modela je veća od 4, što ukazuje da je signal adekvatan (tabela 5.10) (Arasi et al., 2016). Značajan nedostatak fitovanja ukazuje na neadekvatan model, a kako nedostatak fitovanja nije značajan za sve modele, modeli se mogu smatrati adekvatnim.

Tabela 5.10. Analiza varijanse (ANOVA) modela dobijenih primenom višestruke regresione analize

Odziv	R^2	p -vrednost	F -vrednost	Koeficijent varijacije (%)	p -vrednost nedostatka fitovanja	Adekvatna preciznost
Y ₁	0,942	< 0,0001	73,61	7,64	0,1821	27,45
Y ₂	0,885	< 0,0001	23,99	9,47	0,1393	16,46
Y ₃	0,930	< 0,0001	35,55	8,05	0,5165	18,09
Y ₄	0,959	< 0,0001	54,05	9,59	0,6134	25,02
Y ₅	0,932	< 0,0001	31,36	9,15	0,2371	19,89

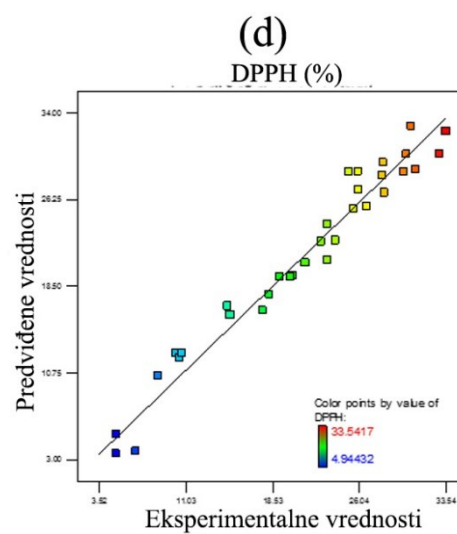
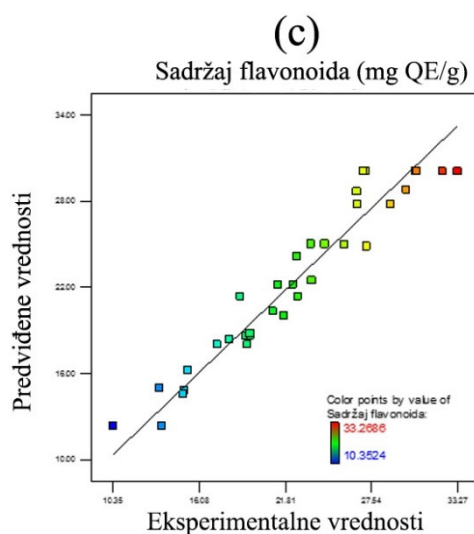
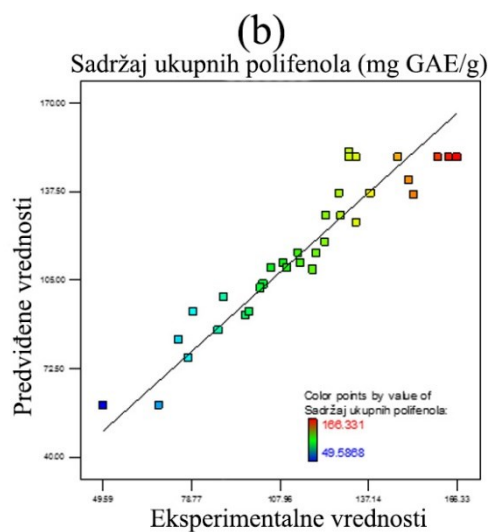
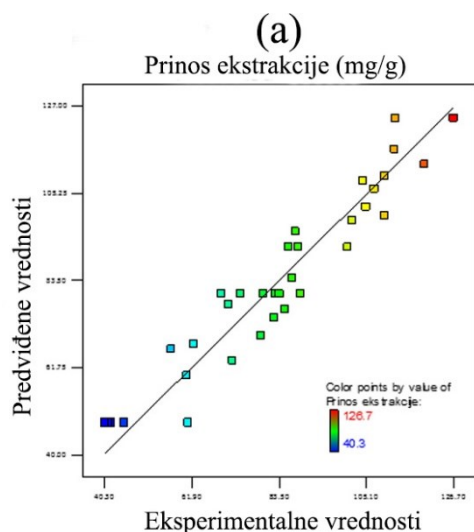
Y₁: prinos ekstrakcije (mg s.m. ekstrakta/g s.m. uzorka);

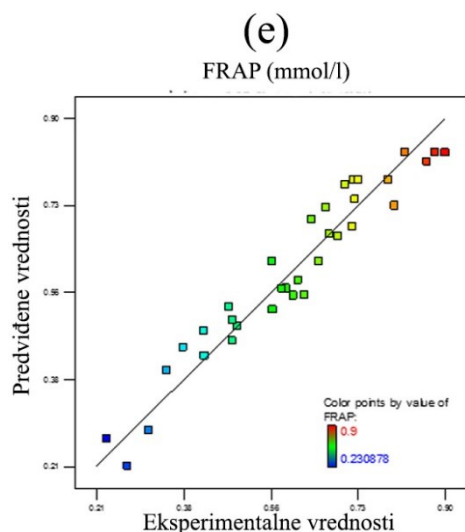
Y₂: sadržaj ukupnih polifenola u ekstraktu (mg GAE/g s.m. ekstrakta);

Y₃: sadržaj flavonoida u ekstraktu (mg QE/g s.m. ekstrakta);

Y₄: inhibicija DPPH radikala (%);

Y₅: FRAP (mmol Fe²⁺/l).





Slika 5.15. Slaganje eksperimentalno dobijenih i modelom predviđenih vrednosti odziva u eksperimentalnom dizajnu MAE antioksidanasa iz otpadnog rastaviča: prinos ekstrakcije (a), sadržaj ukupnih polifenola (b), sadržaj flavonoida (c), DPPH (d), FRAP (e).

Ocena značajnosti uticaja procesnih promenljivih (vremena ekstrakcije, koncentracije etanola, odnosa rastvarač/čvrsta faza uzorka i snage mikrotalasa) na odzive, na osnovu ANOVA statistike, data je u tabeli 5.11, a efekat odgovarajućih faktora je prikazan u daljem tekstu prilikom analize ponašanja svakog od odziva redom. Kao i kod otpadne jagorčevine i hajdučke trave, prilikom analize korišćena „backward“ regresija, pomoću koje su iz modela eliminisani članovi koji nisu značajno uticali na odziv ($p \geq 0,0500$).

Tabela 5.11. p vrednosti analize varijanse (ANOVA) procesnih promenljivih u eksperimentalnom dizajnu MAE antioksidanasa iz otpadnog rastavića

Faktor	p^* -vrednost Prob > F				
	Y ₁	Y ₂	Y ₃	Y ₄	Y ₅
A	≥ 0,0500	≥ 0,0500	≥ 0,0500	≥ 0,0500	≥ 0,0500
B	≥ 0,0500	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
C	< 0,0001	0,0047	< 0,0001	0,0001	0,0057
D	< 0,0001	≥ 0,0500	≥ 0,0500	0,0396	0,0091
AB	0,0210	≥ 0,0500	0,0275	0,0001	0,0445
AC	≥ 0,0500	0,0088	0,0371	< 0,0001	0,0249
AD	≥ 0,0500	0,0221	< 0,0001	< 0,0001	0,0002
BC	0,0493	0,0012	0,0114	< 0,0001	0,0003
BD	≥ 0,0500	≥ 0,0500	≥ 0,0500	≥ 0,0500	≥ 0,0500
CD	≥ 0,0500	≥ 0,0500	≥ 0,0500	≥ 0,0500	≥ 0,0500
A ²	≥ 0,0500	0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
B ²	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
C ²	< 0,0001	0,0011	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001

A: vreme ekstrakcije (s);

B: koncentracija etanola (%);

C: odnos rastvarač/čvrsta faza uzorka (ml/g);

D: snaga mikrotalasa (W);

Y₁: prinos ekstrakcije (mg s.m. ekstrakta /g s.m. uzorka);

Y₂: sadržaj ukupnih polifenola u ekstraktu (mg GAE/g s.m. ekstrakta);

Y₃: sadržaj flavonoida u ekstraktu (mg QE/g s.m. ekstrakta);

Y₄: inhibicija DPPH radikala (%);

Y₅: FRAP (mmol Fe²⁺/l).

* $p < 0,01$ veoma značajno; $0,01 \leq p < 0,05$ značajno; $p \geq 0,05$ nije značajno,

5.1.3.2.1 Uticaj procesnih parametara na prinos ekstrakcije

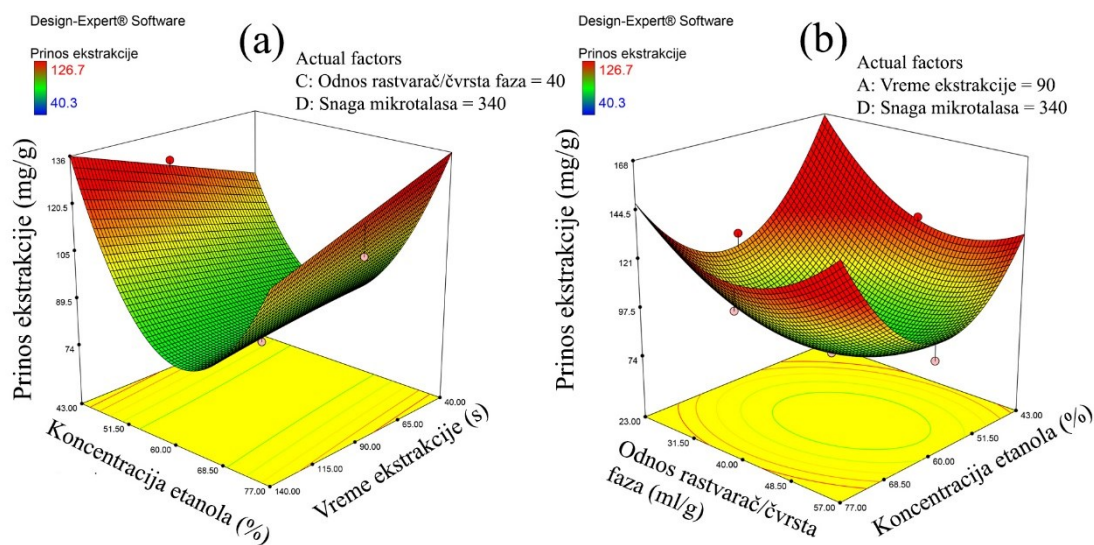
Primenom višestruke regresione analize dobijena je zavisnost između prinosa ekstrakcije i četiri nezavisne promenljive (vreme ekstrakcije, koncentracija etanola, odnos rastvarač/čvrsta faza uzorka i snaga mikrotalasa), koje se mogu aproksimirati polinomom drugog reda:

$$Y_1 = 62,67 - 5,58C + 16,40D - 3,91AB + 3,29BC + 16,53B^2 + 9,49C^2 \quad (5.8.)$$

gde je Y₁ (prinos ekstrakcije) odziv, a promenljive su A (vreme ekstrakcije), B (koncentracija etanola), C (odnos rastvarač/čvrsta faza uzorka) i D (snaga mikrotalasa).

Prinos ekstrakcije je bio u opsegu od 40,3 do 126,7 mg s.m. ekstrakta/g s.m.uzorka (tabela P-1.3). Višestruka regresiona analiza podataka ukazuje na to da su dva linearna člana (odnos rastvarača/čvrsta faza i mikrotalasa snaga) i dva kvadratna člana (B² i C²) bila statistički značajna ($p < 0,05$, tabela 5.11). Od njih statistički najveći uticaj

je imala mikrotalasna snaga ($p < 0,0001$). Prema jednačini zavisnosti prinosa ekstrakcije od promenljivih (jednačina 5.8), negativan uticaj na prinos ekstrakcije je imao odnos rastvarač/čvrsta faza dok je mikrotalasna snaga imala pozitivan uticaj. Pozitivan predznak kvadratnih članova B^2 i C^2 ukazao na postojanje minimuma funkcije. Prinos ekstrakcije se povećavao kada je povećavana mikrotalasna snaga i vreme ekstrakcije i kada je smanjivana koncentracija etanola i zapremina rastvarača (slika 5.16).



Slika 5.16. Odzivne površine međusobnih uticaja: vremena ekstrakcije i koncentracije etanola (AB) pri odnosu rastvarač/čvrsta faza od 40 ml/g (a), koncentracije etanola i odnosa rastvarač/čvrsta faza pri vremenu ekstrakcije od 90 s (BC) (b) na prinos ekstrakcije (Y_1). Snaga mikrotalasa je imala vrednost 340 W.

Maksimalni prinos ekstrakcije je postignut kada je uzorak duže izlagan delovanju mikrotalasnog zračenja veće snage, dok je zapremina rastvarača i koncentracija etanola smanjivana (slika 5.16). Ovi rezultati su u skladu sa rezultatima dobijenim prilikom ekstrakcije polifenola iz otpadne hajdučke trave i otpadne jagorčevine, pa se generalno može zaključiti da se veći prinos ekstrakcije MAE postiže dužom ekstrakcijom, primenom veće mikrotalasnog zračenja i pri upotrebi manje količine rastvarača. Kao što je objašnjeno i kod prinosa ekstrakcije kada su kao uzorak korišćeni otpadna jagorčevina i hajdučka trava, primenom mikrotalasnog zračenja dolazi do bubrenja i pucanja ćelija biljnog materijala usled povećanja pritiska u njihovoj unutrašnjosti, pa je tako olakšana

ekstrakcija. Kada se uzorak duže izloži delovanju mikrotalasnog zračenja veće snage, znači da se biljni materijal više zagreva, rastvaraču se smanjuje viskoznost i olakšano mu je prodiranje u biljni matriks, dok je u isto vreme povećana rastvorljivost biljnih komponenata. Temperatura sistema je bila veća kada je u ekstrakciji korišćena viša snaga i bila je u opsegu od 45 do 78 °C, dok je bila u opsegu od 30 do 41 °C kada je u ekstrakciji primenjena mikrotalasna snaga od 170 W. Sa druge strane, da bi se povećao prinos ekstrakcije, potrebno je smanjiti zapreminu rastvarača. U slučaju kada se koristi veća količina rastvarača tada ona apsorbuje mikrotalasnu energiju, tako da se manje sistem zagreva, a i relativni odnos između ekstrahovane suve materije i rastvarača se smanjuje zbog veće korišćene zapremine rastvarača.

5.1.3.2.2 *Uticao procesnih promenljivih na sadržaj ukupnih polifenola u ekstraktima*

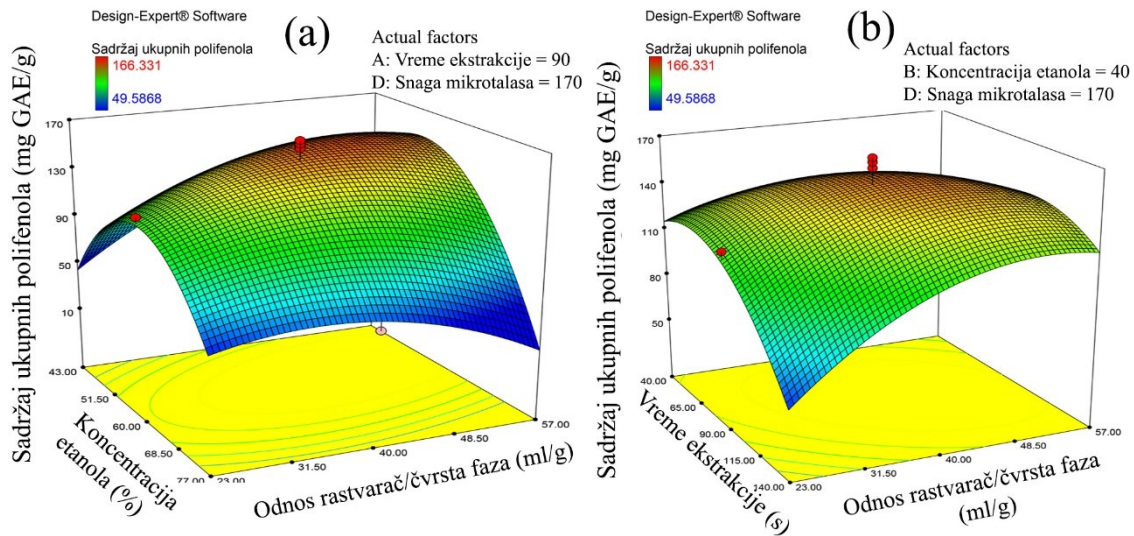
Primenom višestruke regresione analize dobijena je zavisnost između sadržaja ukupnih polifenola u ekstraktima i četiri nezavisne promenljive (vreme ekstrakcije, koncentracija etanola, odnos rastvarač/čvrsta faza uzorka i snaga mikrotalasa), koja se može aproksimirati polinomom drugog reda:

$$Y_2 = 149,99 - 14,99B + 6,52C + 7,80AC + 5,12AD - 9,98BC - 10,63A^2 - 23,22B^2 - 8,52C^2 \quad (5.9)$$

gde je Y_2 (sadržaj ukupnih polifenola u ekstraktu) odziv, a promenljive su A (vreme ekstrakcije), B (koncentracija etanola), C (odnos rastvarač/čvrsta faza uzorka) i D (snaga mikrotalasa).

Sadržaj ukupnih polifenola u ekstraktima je bio upsegu od 49,59 do 166,33 mg GAE/ g s.m. ekstrakta (tabela P-1.3). Višestruka regresiona analiza podataka ukazuje na to da su dva linerna člana (B i C), tri kvadratna člana (A^2 , B^2 i C^2) i tri interaktivna člana (AC, AD i BC) bila statistički značajna ($p < 0,05$, tabela 5.11). Prema jednačini zavisnosti sadržaja ukupnih polifenola u ekstraktima od promenljivih (jednačina 5.9), negativan uticaj na odziv imala je koncentracija etanola, dok je odnos rastvarača prema čvrstoj fazi uzorka imao pozitivan uticaj na odziv. Takođe, negativan predznak kvadratnih članova ukazuje na postojanje maksimuma funkcije.

Sadržaj ukupnih polifenola u ekstraktima je rastao produženjem vremena ekstrakcije do 80 s, povećanjem koncentracije etanola do 55% i odnosa rastvarač/čvrsta faza do 44 ml/g (slika 5.17).



Slika 5.17. Odzivne površine međusobnih uticaja: koncentracije etanola i odnosa rastvarač/čvrsta faza (BC) pri vremenu ekstrakcije od 90 s (a), vremena ekstrakcije i odnosa rastvarač/čvrsta faza (AC) pri koncentraciji etanola od 40% (b) na sadržaj ukupnih polifenola (Y_2). Snaga mikrotalasa je imala vrednost 170 W.

Najveći uticaj na sadržaj ukupnih polifenola u ekstraktima je imala koncentracija etanola ($p < 0,0001$). Povećanjem koncentracije etanola do 55% rastao je i sadržaj ukupnih polifenola, dok je daljim porastom koncentracije etanola sadržaj ukupnih polifenola u ekstraktima opadao (slika 5.17a). Kao što je i u prethodnim optimizacijama zaključeno, za ekstrakciju polifenola postoji optimalan odnos vode i etanola u zavisnosti od biljnog uzoka koji se koristi u ekstrakciji (Hemwimon et al., 2007). Statistički značajan uticaj na sadržaj polifenola u ekstraktima je imao odnos rastvarač/čvrsta faza uzorka ($p < 0,05$). Povećanjem zapremine rastvarača prema masi uzorka do 44 ml/g, sadržaj polifenola u ekstraktima je rastao, dok je daljim povećanjem ovog faktora došlo do smanjenja sadržaja ukupnih polifenola u ekstraktima (slika 5.17). Što se tiče uticaja vremena ekstrakcije na sadržaj ukupnih polifenola u ekstraktu, linearni član nije imao statistički značajan uticaj, ali su kvadratni član i interakcija sa snagom mikrotalasa i odnosom rastvarač/čvrsta faza bili statistički značajni. Po pravilu, vreme koje je potrebno za ekstrakciju polifenola se značajno smanjuje primenom MAE, u poređenju sa klasičnim metodama ekstrakcije. Prema rezultatima, vreme koje je potrebno da bi se postigao maksimalan sadržaj ukupnih polifenola u ekstraktu je samo 80 s (slika 5.17b). Produženjem vremena ekstrakcije se verovatno ekstrahuju i druga jedinjenja iz otpadnog

rastavića, pa se relativan sadržaj polifenola u ekstraktu smanjuje, što nije bio cilj rada, jer su optimizovani uslovi ekstrakcije za dobijanje ekstrakta koji ima maksimalan sadržaj polifenola. Maksimalan sadržaj polifenola u ekstraktu je postignut kada je u ekstrakciji korišćena niža snaga mikrotalasa (170 W). Povećanjem mikrotalasnog snage favorizuje ekstrakciju i drugih jedinjenja iz otpadnog rastavića, zbog čega je relativan sadržaj ukupnih polifenola u ekstraktima dobijenim sa većom mikrotalasnog snagom smanjen.

5.1.3.2.3 *Uticao procesnih promenljivih na sadržaj flavonoida u ekstraktima*

Zavisnost između sadržaja flavonoida u ekstraktima i četiri promenljive (vreme ekstrakcije, koncentracija etanola, odnos rastvarač/čvrsta faza uzorka i snaga mikrotalasa) se može aproksimirati polinomom drugog reda. Dobija se sledeća jednačina:

$$Y_3 = 30,08 - 2,92B + 2,09C + 1,06AB + 1,00AC + 1,91AD - 1,24BC - 1,95A^2 - 4,53B^2 - 3,03C^2 \quad (5.10.)$$

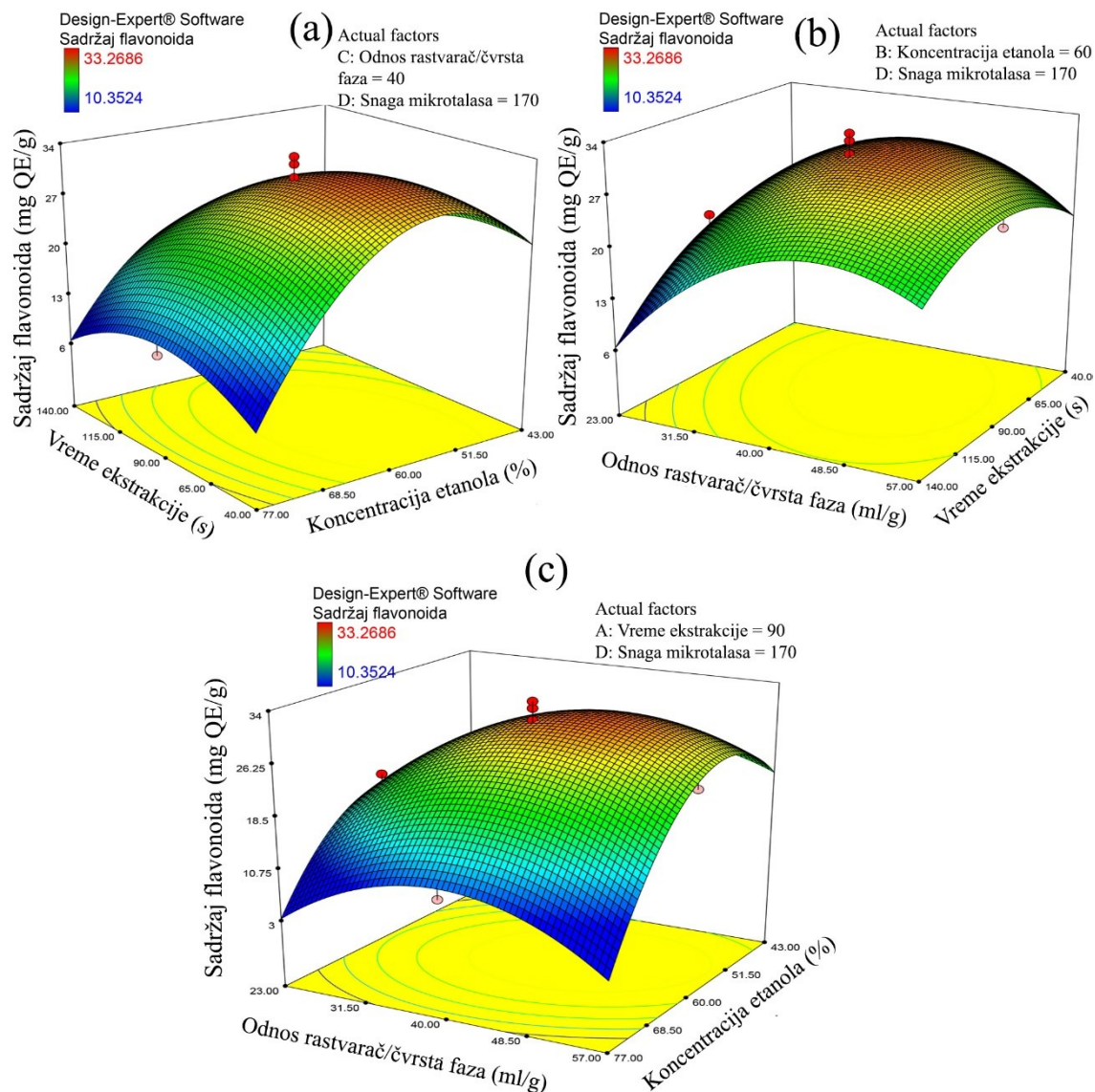
gde je Y_3 (sadržaj flavonoida u ekstraktu) odziv, a promenljive su A (vreme ekstrakcije), B (koncentracija etanola), C (odnos rastvarač/čvrsta faza uzorka) i D (snaga mikrotalasa).

Sadržaj flavonoida u ekstraktima je bio upsegu od 10,35 do 33,27 mg QE/ g s.m. ekstrakta (tabela P-1.3). Višestruka regresiona analiza podataka ukazuje na to da su dva linearna člana (B i C), tri kvadratna člana (A^2 , B^2 i C^2) i četiri interaktivna člana (AB, AC, AD i BC) bila statistički značajna za prinos flavonoida ($p < 0,05$, tabela 5.11). Od svih parametara najveći uticaj na ekstrakciju flavonoida su imali koncentracija etanola i odnos rastvarač/čvrsta faza ($p < 0,0001$). Prema jednačini zavisnosti sadržaja flavonoida u ekstraktu od promenljivih (jednačina 5.10), negativan uticaj na odziv ima koncentracija etanola, dok pozitivan uticaj ima odnos rastvarač/čvrsta faza. Negativan predznak sva tri kvadratna člana ukazuje na postojanje maksimuma funkcije.

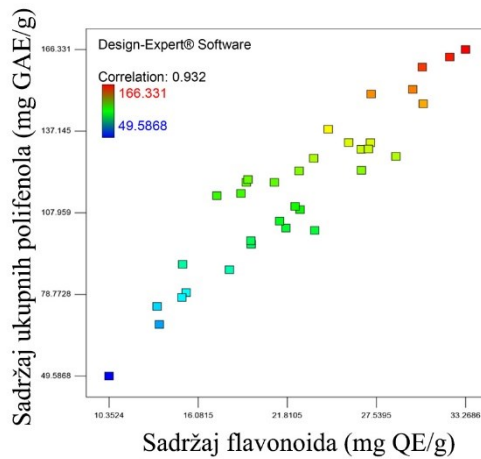
Sadržaj flavonoida u ekstraktima je rastao kada je vreme ekstrakcije povećavano do 72 s, koncentracija etanola do 56% i odnos rastvarač/čvrsta faza do 44 ml/g (slika 5.18).

Ulazne promenljive na sličan način utiču na sadržaj polifenola i flavonoida u ekstraktima (jednačine 5.9 i 5.10), što je potvrđeno jakim statistički značajnom linearanom korelacijom između sadržaja ukupnih polifenola i sadržaja flavonoida u ekstraktima ($R = 0,932$, $p < 0,01$, slika 5.19). Ovde je zaključeno, kao i kod ekstrakcije

flavonoida iz hajdučke trave, da su uslovi ekstrakcije koji favorizuju ekstrakciju ukupnih polifenola slični uslovima koji favorizuju ekstrakciju flavonoida iz rastavića, što je prirodna posledica činjenice da su flavonoidi podgrupa polifenola.



Slika 5.18. Odzivne površine međusobnih uticaja: vremena ekstrakcije i koncentracije etanola (AB) pri odnosu rastvarač/čvrsta faza od 40 ml/g (a), vremena ekstrakcije i odnosa rastvarač/čvrsta faza pri koncentraciji etanola od 60% (AC) (b), koncentracije etanola i odnosa rastvarač/čvrsta faza (BC) pri vremenu ekstrakcije od 90 s (c) na sadržaj flavonoida u ekstraktu (Y_3). Snaga mikrotalasa je iznosila 170 W.



Slika 5.19. Korelacija između sadržaja ukupnih polifenola i sadržaja flavonoida u ekstraktima.

5.1.3.2.4 Uticaj procesnih promenljivih na antioksidativnu aktivnost ekstrakata

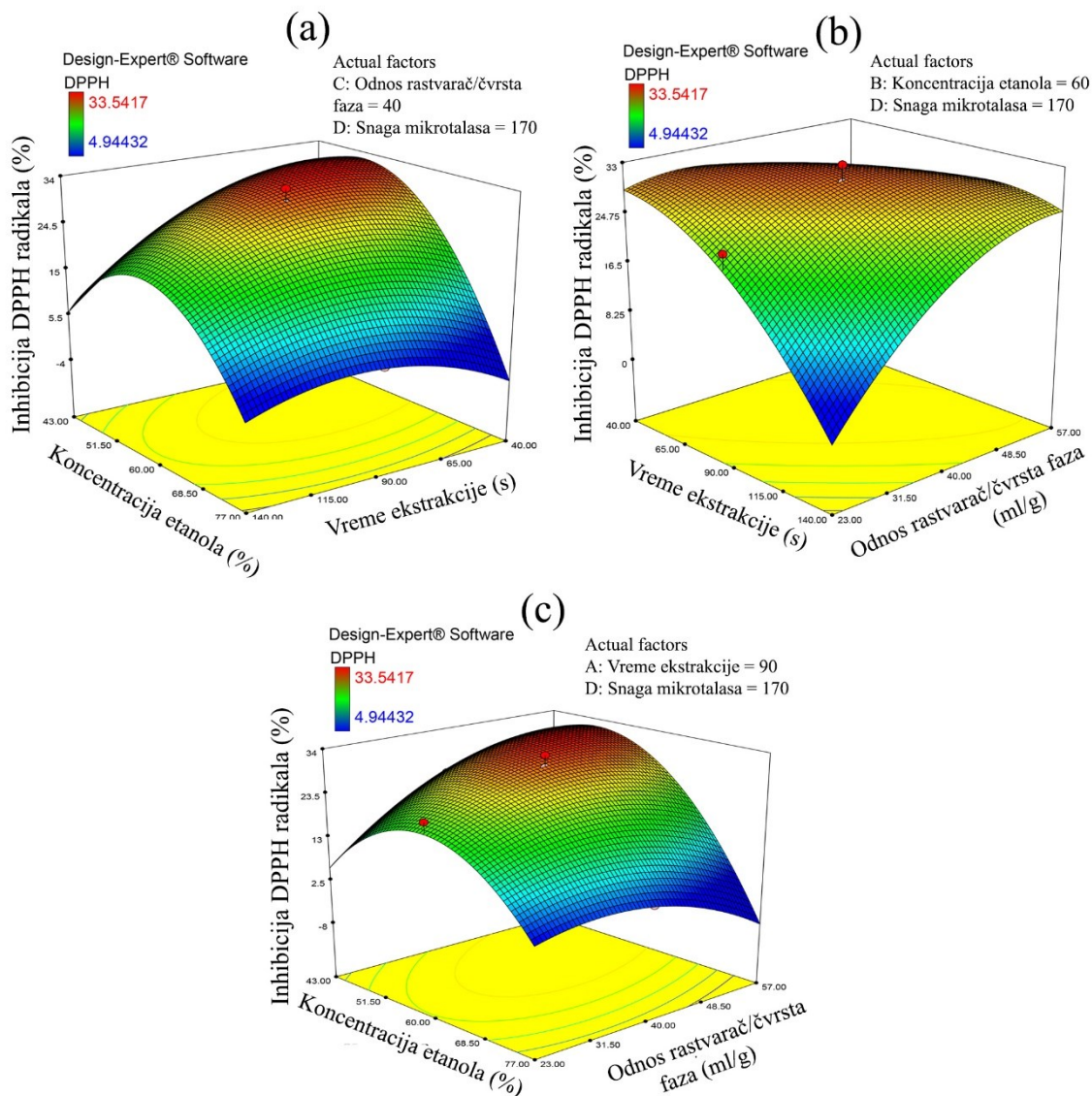
Primenom višestruke regresione analize dobijena je zavisnost između inhibicije DPPH radikala i četiri nezavisne promenljive (vreme ekstrakcije, koncentracija etanola, odnos rastvarač/čvrsta faza uzorka i snaga mikrotalasa), koja se može aproksimirati polinomom drugog reda:

$$Y_4 = 29,56 - 5,58B + 1,87C - 0,77D + 2,42AB + 3,42AC + 2,70AD - 2,96BC - 2,28A^2 - 5,54B^2 - 2,23C^2 \quad (5.11.)$$

gde je Y_4 (inhibicija DPPH radikala) odziv, a promenljive su A (vreme ekstrakcije), B (koncentracija etanola), C (odnos rastvarač/čvrsta faza uzorka) i D (snaga mikrotalasa).

Procenat neutralizacije DPPH radikala ekstraktima, koji su dobijeni pod različitim eksperimentalnim uslovima, se kretao u opsegu od 4,94 do 33,54% (tabela P-1.3). Na procenat inhibicije DPPH radikala statistički značajan uticaj ($p < 0,05$) su imala tri linearna (B, C i D), četiri interaktivna (AB, AC, AD i BC) i tri kvadratna faktora (A^2 , B^2 i C^2) (tabela 5.11). Prema jednačini zavisnosti inhibicije DPPH radikala od ulaznih promenljivih (jednačina 5.11), negativan uticaj na odziv su imali koncentracija etanola i mikrotalasna snaga, dok je odnos rastvarač/čvrsta faza imao pozitivan uticaj. Negativan predznak svih kvadratnih članova ukazuje na postojanje maksimuma funkcije.

Produženjem vremena ekstrakcije do 70 s, povećanjem koncentracije etanola do 55% i odnosa rastvarača i čvrste faze uzorka do 45 ml/g inhibicija DPPH radikala se povećavala (slika 5.20).



Slika 5.20. Odzivna površina međusobnih uticaja: vremena ekstrakcije koncentracije etanola (AB) pri odnosu rastvarač/čvrsta faza od 40 ml/g (a), vremena ekstrakcije i odnosa rastvarač/čvrsta faza (AC) pri koncentraciji etanola od 60% (b) i koncentracije etanola i odnosa rastvarač/čvrsta faza (BC) pri vremenu ekstrakcije od 90 s (c) na inhibiciju DPPH radikala (Y_4). Snaga mikrotalasa je imala vrednost 170 W.

Vrlo slične vrednosti inhibicije DPPH radikala su postignute kada je u ekstrakciji primenjena niža i viša mikrotalaska snaga (proba 23 i 27, tabela P-1.3). Kada je u

eksperimentu korišćena snaga mikrotalasa od 170 W, maksimalna inhibicija DPPH radikala je iznosila 33,54%, a ostali uslovi procesa ekstrakcije su: vreme ekstrakcije 60 s, rastvarač je 50% etanol, odnos rastvarač/čvrsta faza uzorka je 50 ml/g. Sa druge strane, primenom snage od 340 W postignuta je inhibicija od 30,52% za 120 s, sa 50% etanolom i odnosom rastvarač/čvrsta faza 50 ml/g. Primećuje se da se uslovi u ova dva eksperimenta razlikuju samo po vremenu trajanja ekstrakcije i mikrotalasnoj snazi, dok koncentracija etanola i odnos rastvarač/čvrsta faza imaju iste vrednosti. S obzirom na to da se skoro ista antioksidativna aktivnost postiže primenom manje mikrotalasne snage u kombinaciji sa kraćim vremenom, primena veće mikrotalasne snage u kombinaciji sa dužim vremenom ekstrakcije nije opravdana jer je veća potrošnja energije.

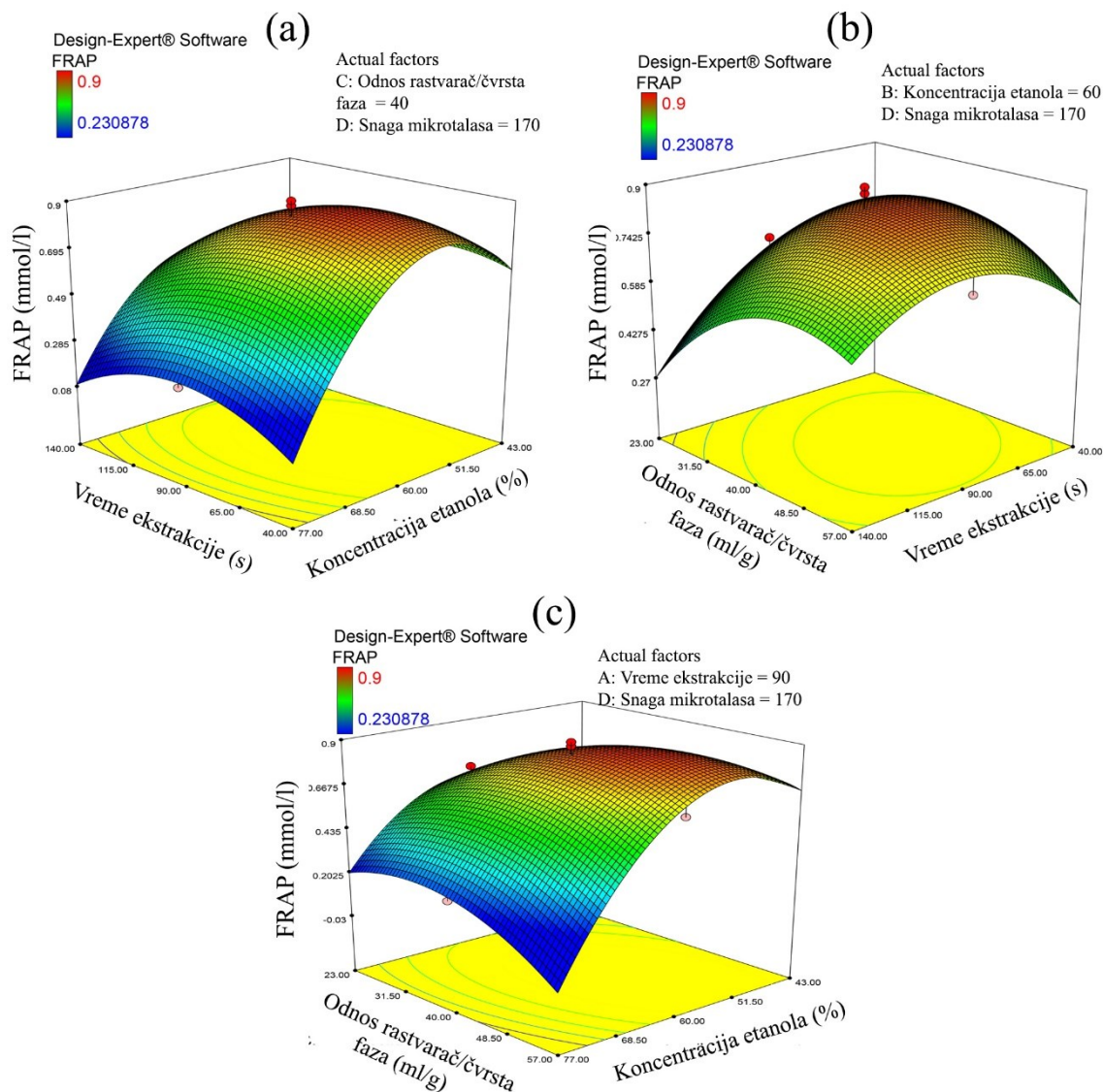
Zavisnost između FRAP redukcione moći i četiri nezavsne promenljive (vreme ekstrakcije, koncentracija etanola, odnos rastvarač/čvrsta faza uzorka i snaga mikrotalasa) je dobijena pomoću višestruke regresione analize i može se aproksimirati polinomom drugog reda:

$$Y_5 = 0,81 - 0,10B + 0,032C - 0,027D + 0,029AB + 0,033AC + 0,047AD - 0,059BC - 0,061A^2 - 0,14B^2 - 0,057C^2 \quad (5.12.)$$

gde je Y_5 (FRAP) odziv, a promenljive su A (vreme ekstrakcije), B (koncentracija etanola), C (odnos rastvarač/čvrsta faza uzorka) i D (snaga mikrotalasa).

FRAP vrednosti ekstrakata su bile u opsegu od 0,231 do 0,900 mmol/l (tabela P-1.3). Statistički značajan uticaj na FRAP vrednosti su imali tri linearna (B, C, D), četiri interaktivna (AB, AC, AD i BC) i tri kvadratna člana (A^2 , B^2 , C^2) ($p < 0,05$, tabela 5.11). Negativan uticaj na FRAP vrednosti ekstrakata su imali koncentracija etanola i mikrotalasna snaga, dok je odnos rastvarač/čvrsta faza imao pozitivan uticaj. Takođe predznak svih kvadratnih članova ukazuje na postojanje maksimuma funkcije.

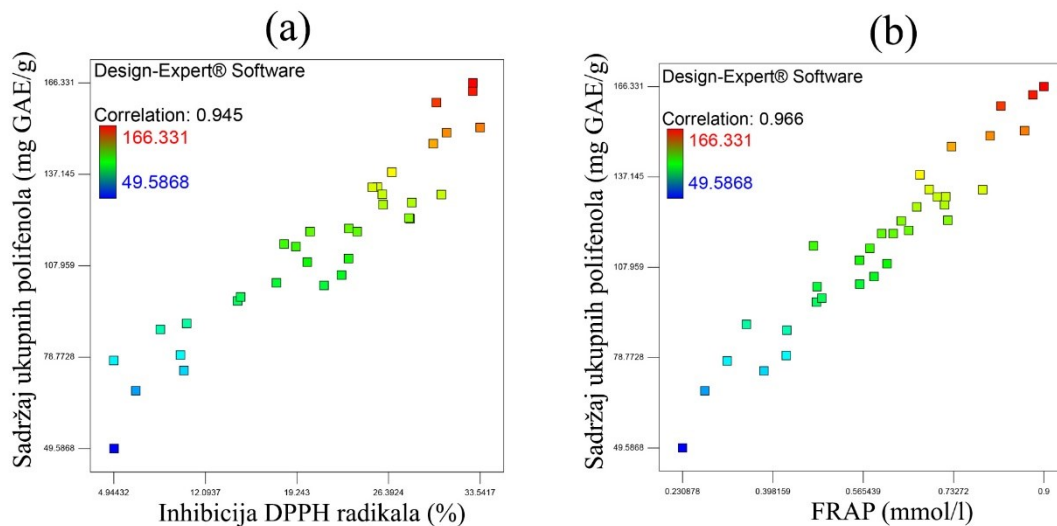
Produženjem vremena ekstrakcije do 80 s i povećanjem koncentracije etanola do 55% i odnosa rastvarača i uzorka do 45 ml/g, redukciona sposobnost ekstrakata je dostigla svoju maksimalnu vrednost (slika 5.21).



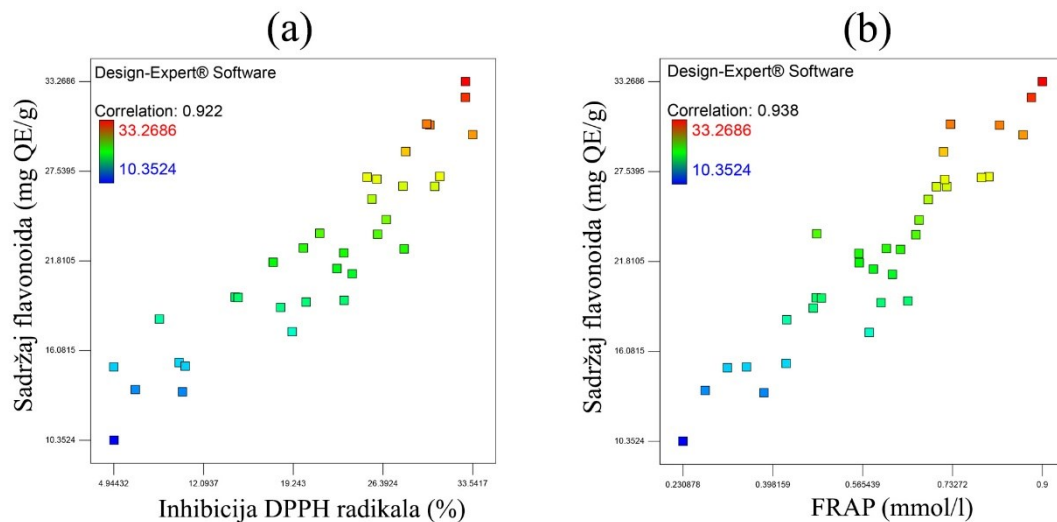
Slika 5.21. Odzivna površina međusobnih uticaja: vremena ekstrakcije i koncentracije etanola (AB) pri odnosu rastvarač/čvrsta faza od 40 ml/g (a), vremena ekstrakcije i odnosa rastvarač/čvrsta faza (AC) pri koncentraciji etanola od 60% (b), koncentracije etanola i odnosa rastvarač/čvrsta faza (BC) pri vremenu ekstrakcije od 90 s (b) na FRAP redukcionu moć (Y_5). Mikrotalaska snaga je imala vrednost 170 W.

Prema rezultatima eksperimenata, inhibicija DPPH radikala i FRAP redukciona moć ekstrakata je bila u pozitivnoj i statistički značajnoj korelaciji sa sadržajem ukupnih polifenola u ekstraktima ($R = 0,945$ i $R = 0,966$, $p < 0,01$, slika 5.22) i sadržajem flavonoida u ekstraktima ($R = 0,922$ i $R = 0,938$, $p < 0,01$, slika 5.23), što ukazuje da su

polifenoli, i to po hemijskom sastavu uglavnom iz grupe flavonoida, jedinjenja u ekstraktima koji su nosioci antioksidativne aktivnosti.



Slika 5.22. Korelacija između sadržaja ukupnih polifenola u ekstraktima i inhibicije DPPH radikala (a) i FRAP redukcione moći (b).



Slika 5.23. Korelacija između sadržaja flavonoida u ekstraktima i inhibicije DPPH radikala (a) i FRAP redukcione moći (b).

5.1.3.2.5 Validacija modela

Primenom metode željene funkcije definisani su optimalni uslovi ekstrakcije za dobijanje ekstrakta sa maksimalnim sadržajem polifenola, flavonoida i antioksidativnom aktivnošću po obe metode ispitivanja (DPPH i FRAP). Postupkom numeričke optimizacije dobijeni su sledeći uslovi MAE: vreme trajanja ekstrakcije je 81 s, odnos rastvarač/čvrsta faza je 45,4 ml/g, koncentracija rastvarača je 54,5% i mikrotalasna snaga je 170 W. Pri navedenim uslovima Design expert je predvideo vrednosti izlaznih promenljivih koje su prikazane u tabeli 5.12. Izvođenjem ekstrakcije pod optimalnim uslovima dobijene su vrednosti koje se uklapaju u 95% interval predviđanja, pa se može zaključiti da su modeli adekvatni i pouzdani (tabela 5.12).

Tabela 5.12. Predviđene i validirane vrednosti

Odziv	Predviđene vrednosti		Validirane vrednosti
		95% PI	
Prinos ekstrakcije (mg/g)	50,9	45,8 - 56,0	54,70 ± 1,57
Sadržaj ukupnih polifenola (mg GAE/g)	154,61	139,14 - 170,06	161,57 ± 1,24
Sadržaj flavonoida (mg QE/g)	31,48	28,33 - 34,63	33,55 ± 1,28
DPPH (%)	33,37	30,03 - 36,71	33,33 ± 0,43
FRAP (mmol/l)	0,875	0,787 - 0,962	0,918 ± 0,007

5.1.3.2.6 Poređenje mikrotalasne i klasične ekstrakcije

Izbor ekstrakcione metode zavisi od prinosa željenih jedinjenja, od složenosti procesa, ekološke prihvatljivosti i troškova proizvodnje (Dahmoune et al., 2013). U ovom radu je poređena antioksidativna aktivnost, sadržaj ukupnih polifenola i sadržaj flavonoida u ekstraktima dobijenim pomoću MAE i pomoću klasične ekstrakcije polifenola iz rastavića. Rezultati pokazuju da se primenom MAE ekstrahuje više polifenola, dok je sadržaj flavonoida gotovo isti, ali je antioksidativna moć MAE ekstrakta gotovo 100% uvećana (tabela 5.13).

Tabela 5.13. Poređenje MAE sa klasičnom ekstrakcijom

Metoda ekstrakcije	A	B	C	D	Y ₁	Y ₂	Y ₃	Y ₄	Y ₅
MAE	81	54,5	45,4	170	54,70± 1,57 ^a	161,57 ±1,24 ^a	33,55 ±1,28 ^c	33,33 ±0,43 ^a	0,918 ±0,007 ^a
Klasična ekstrakcija	14400	70	15	-	125,57 ±1,49 ^b	120,27 ±2,14 ^b	30,61± 2,25 ^c	18,19 ±0,18 ^b	0,477 ± 0,022 ^b

A: vreme ekstrakcije (s);

B: koncentracija etanola (%);

C: odnos rastvarač/čvrsta faza (ml/g);

D: mikrotalasna snaga (W);

Y₁: prinos ekstrakcije (mg s.m. ekstrakta/g s.m. uzorka);

Y₂: sadržaj ukupnih polifenola u ekstraktu (mg GAE/g s.m. ekstrakta);

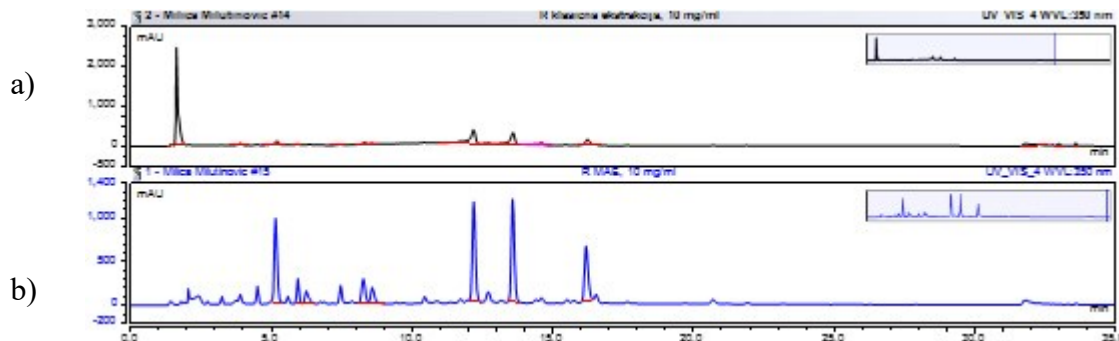
Y₃: sadržaj flavonoida u ekstraktu (mg QE/g s.m. ekstrakta);

Y₄: inhibicija DPPH radikala (%);

Y₅: FRAP (mmol Fe²⁺/l).

* Vrednosti označene različitim slovnim oznakom (a, b, c) unutar pojedinih kolona se značajno razlikuju ($p = 0,01$).

Na osnovu HPLC hromatograma se vidi da se primenom MAE i klasične ekstrakcije ekstrahuju polifenolna jedinjenja različite strukture (slika 5.24).



Slika 5.24. HPLC hromatogram ekstrakta rastavića dobijenog klasičnom ekstrakcijom (a) i MAE ekstrakta rastavića (b).

Činjenica da MAE štedi vreme u poređenju sa klasičnom metodom ekstrakcije je njena glavna prednost, konkretno iz otpadnog rastavića su za samo 81 s dobijeni kvalitetiniji ekstrakti u poređenju sa klasičnom ekstrakcijom, koja je trajala 4 h. Treba istaći da MAE zahteva tri puta veću zapreminu rastvarača u odnosu na klasičnu ekstrakciju iako sa nešto manjim procentom etanola. I pored ovog nedostatka, treba istaći

da postoji mogućnost recirkulacije rastvarača uparavanjem ekstrakta do željene koncentracije. U radu je utvrđeno da se koncentrisanjem uzoraka do konstantne koncentracije od 48 mg/ml dobija otpareni rastvarač koji sadrži 53,2% etanola, što ukazuje da se otpareni rastvarač uz malo razblaženje može koristiti u sledećem ciklusu MAE. Gledano iz više aspekata, s obzirom na to da je uz MAE ušteda vremena značajna, pri čemu se dobija ekstrakt koji sadrži veću količinu polifenola i koji pokazuje veći kapacitet redukcije jona gvožđa i hvatanja DPPH radikala, smatra se da je MAE efikasnija metoda ekstrakcije.

U poređenju sa literaturnim podacima, sadržaj polifenola u MAE ekstraktu je bio veći nego u n-butanolnom (96,4 mg GAE/g ekstrakta), etil-acetatnom (26,4 mg GAE/g ekstrakta) i vodenom ekstraktu (15,4 mg GAE/g ekstrakta) (Čanadanović-Brunet et al., 2009). Sa druge strane, Milovanović i saradnici su ekstrakcijom 80% etanolom postigli veći prinos polifenola u ekstraktu (1070 μ M GAE/g ekstrakta, odnosno 181 mg GAE/g ekstrakta) (Milovanović et al., 2007). U drugom radu je pod optimizovanim uslovima, klasičnom ekstrakcijom i primenom 70% etanola za 12 h dobijen ekstrakt koji je sadržao 123 mg GAE/g ekstrakta (Uslu et al., 2013). Različiti sadržaj polifenola u ekstraktima može da bude posledica različitih faktora. On može da zavisi od sadržaja polifenola u samoj biljci koja je korišćena za dobijanje ekstrakta, a na nju utiču različiti faktori životne sredine, kao što su vrsta zemljišta, klimatski uslovi, kao i način skladištenja i tehnološkog tretmana biljke (Božin et al., 2013; Dias et al., 2013; Giorgi et al., 2007; Giorgi et al., 2009). Takođe, zavisi i od veličine čestica uzorka, od vrste rastvarača i ekstrakcione tehnike koja je korišćena za dobijanje ekstrakta.

Drugi parametar koji se koristi za kvantifikaciju antioksidativnih svojstava je IC_{50} , čija niska vrednost ukazuje na jaku antioksidativnu aktivnost ekstrakta. Za MAE ekstrakt dobijena IC_{50} vrednost je iznosila 24,7 μ g/ml, dok je za ekstrakt dobijen klasičnom ekstrakcijom iznosila 48,0 μ g/ml, ukazujući da je MAE ekstrakt potentniji antioksidans. Antioksidativna aktivnost MAE ekstrakta je veća od antioksidativne aktivnosti koja je zabeležena u radovima Čanadinović-Brunet i saradnika i Štajner i saradnika, ali je niža nego u radovima Mimica-Dukić i saradnika i Kukrić i saradnika (Čanadanović-Brunet et al., 2009; Kukrić et al., 2013; Mimica-Dukic et al., 2008; Štajner et al., 2006). Međutim, važno je napomenuti da je veoma teško porediti IC_{50} sa literaturnim podacima, s obzirom na to da autori koriste različite protokole za određivanje

stepena neutralizacije DPPH radikala (različite su početne koncentracije DPPH radikala, vreme inkubacije i reakcioni medijum), pa se samim tim dobijaju rezultati koji se teško porede (Sharma & Bhat, 2009). U radu Mimica-Dukić i saradnika je postignuta izvanredna antioksidativna aktivnost ekstrakta rastavića (2,37 µg/ml), ali kada se uporede uslovi pod kojima se izvodi DPPH analiza, autori koriste početnu koncentraciju DPPH radikala od 22,5 µM, dok se u ovom radu koristi koncentracija od 40 µM, što može da objasni različitu antioksidativnu aktivnost ekstrakta. S obzirom na to da je sadržaj flavonoida u etil-acetatnom ekstraktu skoro duplo niži nego u MAE ekstraktu (17,47 prema $33,55 \pm 1,28$ mg/g), moguće je da su ekstrahovani polifenoli drugačije strukture, tako da su jači antioksidansi, jer su autori u ekstrakciji koristili i polarni i nepolarni rastvarač, a oni imaju drugačiju selektivnost prema polifenolima od etanola koji je korišćen u MAE procesu (Mimica-Dukic et al., 2008). Međutim, u radu Kukrić i saradnika je postignut znatno veći sadržaj ukupnih polifenola u ekstraktu i veća antioksidativna aktivnost u poređenju sa MAE ekstraktom. Dobijeno je da je sadržaj ukupnih polifenola u ekstraktu $355,80 \pm 17,8$ mg GAE/g, a IC_{50} $13,5 \pm 0,6$ µg/ml, pri čemu su autori u radu koristili višu početnu koncentraciju DPPH radikala 67,5 µg/ml (Kukrić et al., 2013). Razlika u sadržaju polifenola u ekstraktu najverovatnije je posledica različitog sadržaja polifenola u biljci, kvaliteta i porekla biljke, kao i uslova skladištenja i načina obrade.

5.1.3.3 Poređenje sadržaja biološki aktivnih jedinjenja i antioksidativne aktivnost dve šarže otpadnog rastavića

Sa ciljem da se utvrdi uticaj same biljke na kvalitet ekstrakata iz otpadnog lekovitog bilja korišćene su dve šarže otpadnog rastavića. Dodatna šarže je dobijena berbom iz 2016., dok je prethodno ispitana šarža otpadnog rastavića brana 2012. godine. Ekstrakcija polifenola iz oba uzorka je izvođena pod istim, optimalnim uslovima za ekstrakciju polifenola iz otpadnog rastavića, sa ciljem poređenja sadržaja ukupnih polifenola, flavonoida i antioksidativne aktivnosti dva uzorka.

Sadržaj ukupnih polifenola, flavonoida i antioksidativna aktivnost ekstrakata se značajno razlikovala (tabela 5.14), što ukazuje da sadržaj polifenola u ekstraktima veoma zavisi od sadržaja polifenola u biljci, čiji sadržaj zavisi od različitih klimatskih uslova, načina skladištenja, i slično. Slično je zabeleženo i u radu Stracke i saradnika, u kom su autori pratili sadržaj ukupnih polifenola, flavonola, flavanola i antioksidativne aktivnosti u periodu od tri godine (2004.-2006.) u organskim i klasično gajenim jabukama. Autori su zabeležili kod jedne vrste organskih jabuka da je sadržaj flavanola iznosio $89,5 \pm 8,5$ $\mu\text{g/g}$ kada su one brane 2005. godine i $234,7 \pm 38,6$ $\mu\text{g/g}$ kada su brane 2006. godine. Takođe, sadržaj ukupnih polifenola je iznosio $270,8 \pm 39,5$ $\mu\text{g/g}$ u jabukama koje su brane 2005. godine i $495,5 \pm 77,7$ $\mu\text{g/g}$ u jabukama koje su brane 2006. godine. Autori su ovu razliku objasnili različitim klimatskim uslovima i količinom padavina, koje su 2005. godine bile veće u poređenju sa 2006. godinom (Stracke et al., 2009). U drugom radu je pokazano da se koncentracija ukupnih polifenola izolovanih iz paradajza takođe menja tokom godina. Na primer, sadržaj ukupnih polifenola je iznosio $44,0 \pm 7,5$ $\text{mg}/100$ g svežeg uzorka iz 2004. godine, $36,7 \pm 2,1$ $\text{mg}/100$ g svežeg uzorka iz 2005. godine i $33,1 \pm 7,6$ $\text{mg}/100$ g svežeg uzorka iz 2006. godine (Chassy et al., 2006). Ovo ukazuje da godina berbe značajno utiče na kvalitet dobijenog ekstrakta i da ovaj faktor treba imati u vidu pri poređenju rezultata različitih istraživanja. Treba naglasiti da su primenom MAE pod optimalnim uslovima tokom perioda od 3 godine tokom kojih je čuvan i ispitivan otpadni rastavić iz 2012. dobijani ekstrakti vrlo sličnih karakteristika (standardna devijacija rezultata je u okviru standardne devijacije tehničkog ponavljanja eksperimenta).

Tabela 5.14. Poređenje sadržaja bioaktivnih jedinjenja ekstrakata dobijenih pod optimalnim uslovima MAE otpadnog rastavića iz dve šarže – brane 2012. i 2016. godine

Uzorak	Sadržaj ukupnih polifenola (mg GAE/g)	Sadržaj flavonoida (mg QE/g)	DPPH (%)	FRAP (mmol/l)
2012	$161,57 \pm 1,24^a$	$33,55 \pm 1,28^a$	$33,33 \pm 0,43^a$	$0,918 \pm 0,007^a$
2016	$96,16 \pm 4,02^b$	$15,06 \pm 1,56^b$	$22,56 \pm 0,78^b$	$0,583 \pm 0,006^b$

* Vrednosti označene različitom slovnim oznakom (a, b) unutar pojedinih kolona se značajno razlikuju ($p = 0,01$).

5.1.3.4 Ispitivanje mogućnosti uvećanja procesa

Dalje je u radu ispitana mogućnost uvećanja procesa mikrotalasne ekstrakcije polifenola u laboratorijskim uslovima (kućna mikrotalasna pećnica). Problem kod uvećanja mikrotalasne ekstrakcije je ograničena dubina prodiranja mikrotalasnog zračenja, što znači da se u velikim sistemima unutrašnjost zagreva konvekcijom, a ne dipolarnim i kondukcijom mehanizmom, koji se kod mikrotalasnog zagrevanja simultano odigravaju (Díaz-Ortiz et al., 2011; Veggi et al., 2012). Na osnovu pregledane literature konstantnim je održavano vreme ekstrakcije, odnos rastvarač/čvrsta faza i odnos snage mikrotalasnog zračenja prema zapremini rastvarača (Petigny et al., 2014). Kod optimizovane ekstrakcije polifenola iz hajdučke trave odnos snage mikrotalasnog zračenja prema zapremini rastvarača je iznosio 1,417 W/ml, kod rastavića je odnos snage mikrotalasnog zračenja prema zapremini rastvarača iznosio 1,259 W/ml, a kod jagorčevine 1,619 W/ml. U eksperimentu je povećavana masa uzorka lekovitih biljaka i snaga mikrotalasnog zračenja. Ispitivane su tri mikrotalasne snage, i to 160, 350 i 500 W. U ekstraktima rastavića i hajdučke trave, koji su dobijeni na različitim mikrotalasnim snagama, a sa konstantnim odnosom snage mikrotalasnog zračenja i zapremine rastvarača, su određivani sadržaj ukupnih polifenola, flavonoida i antioksidativna aktivnost, dok je u ekstraktu jagorčevine određen sadržaj ukupnih polifenola i antioksidativna aktivnost (tabele 5.15, 5.16 i 5.17).

Tabela 5.15. Poređenje sastava i antioksidativne aktivnosti ekstrakta jagorčevine dobijenim primenom različite snage mikrotalasnog zračenja

Uzorak	Mikrotalasna snaga (W)	Zapremina, (ml)	Sadržaj ukupnih polifenola (mg GAE/g)	DPPH (%)	FRAP (mmol Fe ²⁺ /l)
1	160	99	130,73 ± 3,51 ^a	28,45 ± 2,12 ^a	0,895 ± 0,037 ^a
2	350	216	125,16 ± 1,16 ^a	29,03 ± 1,20 ^a	0,856 ± 0,024 ^a
3	500	309	132,26 ± 3,69 ^a	29,03 ± 0,76 ^a	0,944 ± 0,074 ^a

* Vrednosti označene različitim slovnim oznakom (a, b) unutar pojedinih kolona se značajno razlikuju ($p = 0,01$).

Tabela 5.16. Poređenje sastava i antioksidativne aktivnosti ekstrakta hajdučke trave dobijenim primenom različite snage mikrotalasnog zračenja

Uzorak	Mikrotalasna snaga (W)	Zapremina, (ml)	Sadržaj ukupnih polifenola (mg GAE/g)	Sadržaj flavonoida (mg QE/g)	DPPH (%)	FRAP (mmol Fe ²⁺ /l)
1	160	113	234,67 ± 4,51 ^a	42,40 ± 0,36 ^a	71,30 ± 1,47 ^a	1,973 ± 0,015 ^a
2	350	247	231,20 ± 2,67 ^a	41,70 ± 0,61 ^a	69,30 ± 3,15 ^a	1,970 ± 0,040 ^a
3	500	353	241,75 ± 3,63 ^a	44,17 ± 1,05 ^a	71,63 ± 4,15 ^a	2,113 ± 0,071 ^a

* Vrednosti označene različitim slovnim oznakom (a, b) unutar pojedinih kolona se značajno razlikuju ($p = 0,01$).

Tabela 5.17. Poređenje sastava i antioksidativne aktivnosti ekstrakta rastavića dobijenim primenom različite snage mikrotalasnog zračenja

Uzorak	Mikrotalasna snaga (W)	Zapremina, (ml)	Sadržaj ukupnih polifenola (mg GAE/g)	Sadržaj flavonoida (mg QE/g)	DPPH (%)	FRAP (mmol Fe ²⁺ /l)
1	160	127	96,16 ± 4,02 ^a	15,06 ± 1,56 ^a	22,56 ± 0,78 ^a	0,583 ± 0,006 ^a
2	350	278	92,87 ± 5,81 ^a	16,48 ± 0,05 ^a	24,07 ± 1,95 ^a	0,639 ± 0,002 ^a
3	500	397	99,38 ± 3,85 ^a	18,10 ± 0,21 ^a	25,78 ± 0,57 ^a	0,665 ± 0,004 ^a

* Vrednosti označene različitim slovnim oznakom (a, b) unutar pojedinih kolona se značajno razlikuju ($p = 0,01$).

Na osnovu rezultata se vidi da se da ne postoji statistički značajna razlika između sadržaja ukupnih polifenola, flavonoida i antioksidativne aktivnosti ekstrakata koji su dobijeni primenom tri snage mikrotalasnog zračenja u ekstrakciji bioaktivnih jedinjenja iz sve tri otpadne biljke. Međutim, uvećanje mikrotalasne ekstrakcije je samo 3,1 put, pa se ne može sa sigurnošću tvrditi da bi se isti prinosi bioaktivnih jedinjenja dobili i korišćenjem industrijskih mikrotalasnih pećnica. U literaturi postoji malo radova u kojima je ispitivano uvećanje procesa mikrotalasne ekstrakcije. Petigny i saradnici su u laboratorijskim uslovima optimizovali ekstrakciju etarskih ulja iz lišća *Peumus boldus* i pod optimalnim uslovima dobili prinos od 1,4%. Pod optimizovanim uslovima je odnos

snage mikrotalasnog zračenja i zapremine vode bio 1 W/ml. Korišćenjem istog odnosa i industrijske mikrotalasne pećnice MAC-75, čija je maksimalna snaga iznosila 6000 W i pri povećanju mase uzorka na 1,125 kg (tako da je ukupno uvećanje 30 puta) postigli su isti prinos etarskih ulja (Petigny et al., 2014).

5.2 Biološka aktivnost ekstrakata jagorčevine, hajdučke trave i rastavića

5.2.1 Antimikrobna aktivnost

Antimikrobna aktivnost ekstrakata lekovitih biljaka je testirana na 11 patogenih mikroorganizama, dve Gram-negativne bakterije (*P. aeruginosa* i *E. coli*), tri Gram-pozitivne bakterije (*E. faecalis*, *S. aureus* i *L. monocytogenes*), jednom kvascu (*C. albicans*) i 5 fitopatogenih plesni *A. niger*, *A. flavus*, *F. graminearum*, *F. verticillioides* i *F. proliferatum*.

Ekstrakt jagorčevine nije pokazao antimikrobno dejstvo na testirane patogene bakterije i kvasac, ali je inhibirao rast četiri plesni *A. niger*, *F. graminearum*, *F. verticillioides* i *F. proliferatum*.

Ekstrakt hajdučke trave je inhibirao rast svih testiranih Gram-pozitivnih bakterija i jedne testirane Gram-negativne bakterije (*P. aeruginosa*), ali nije pokazao antimikrobno delovanje na *E. coli* i *C. albicans*. Od ispitanih plesni, inhibirao je rast samo *F. graminearum*.

Ekstrakt rastavića je inhibirao rast svih testiranih Gram-pozitivnih, ali nije pokazao antimikrobno delovanje na Gram-negativne bakterije i *C. albicans*. Od ispitanih plesni, nije inhibirao rast samo *A. flavus*.

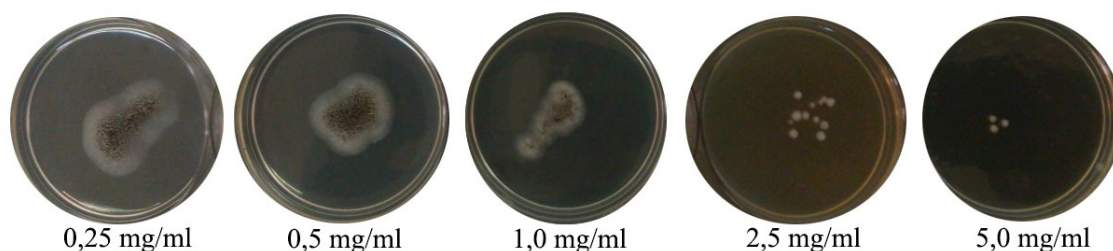
5.2.1.1 Antimikrobna aktivnost ekstrakta jagorčevine

Od svih testiranih mikroorganizama, ekstrakt jagorčevine je inhibirao rast četiri plesni, *A. niger*, *F. graminearum*, *F. verticillioides* i *F. proliferatum* (tabela 5.18).

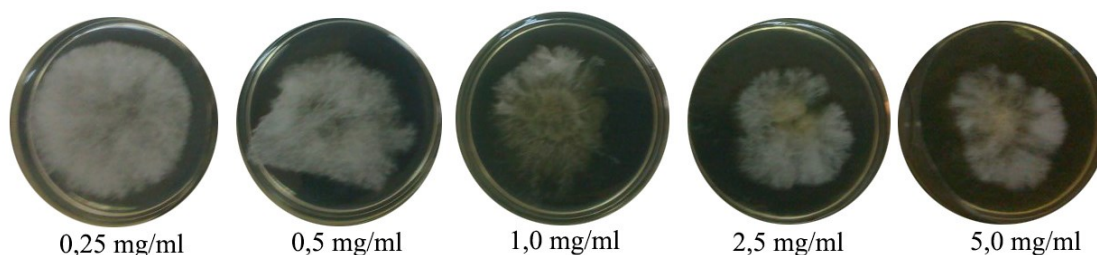
Tabela 5.18. Inhibicija rasta plesni dodatkom ekstrakta jagorčevine u hranljivu podlogu

Koncentracija ekstrakta, mg/ml	Inhibicija rasta, %				
	<i>A. niger</i>	<i>A. flavus</i>	<i>F. graminearum</i>	<i>F. proliferatum</i>	<i>F. verticillioides</i>
0,25	2,00	-	30,00	27,78	40,48
0,50	5,00	-	34,00	33,33	61,90
1,00	50,00	-	36,00	44,44	100,00
2,50	80,00	-	56,00	47,22	100,00
5,00	90,00	-	60,00	55,56	100,00

Najjaču inhibitornu aktivnost je pokazao prema *F. verticillioides*, koju je u potpunosti inhibirao pri koncentracijama višim od 1 mg/ml. Takođe, od svih testiranih ekstrakata lekovitih biljka, ekstrakt jagorčevine je jedini inhibirao rast *A. niger*. Pri tome, najveću inhibiciju od 90% ekstrakt je pokazao kada je krajnja koncentracija u podlozi bila 5 mg/ml (slika 5.25). U poređenju sa druga dva ispitivana ekstrakta, ovaj ekstrakt je pokazao i najjaču inhibitornu aktivnost prema *F. graminearum* (slika 5.26).



Slika 5.25. Rast *A. niger* na ISP podlozi u koju je dodat ekstrakt jagorčevine u navedenim koncentracijama.



Slika 5.26. Rast *F. graminearum* na ISP podlozi u koju je dodat ekstrakt jagorčevine u navedenim koncentracijama.

U literaturi ne postoje podaci o antifungalnoj aktivnosti vrste *P. veris*. Međutim, pokazano je da druga vrsta iz istog roda, *P. macrophylla*, inhibira rast *Trichophyton longifusus*, *A. flavus*, *Microspoum canis*, *C. albicans* i *Candida glaberata* (Najmus-Saqib et al., 2009).

S obzirom na to da je ekstrakt jagorčevine imao najmanje polifenolnih jedinjenja u poređenju sa druga dva ekstrakta, a pokazao je jaču antifungalnu aktivnost, može se pretpostaviti da su za nju odgovorni drugi konstituenti ekstrakta jagorčevine. Koren jagorčevine sadrži do 12% triterpenskkih saponina (priverosaponin B-22 acetat, primulasaponin II i primulasaponin I) i fenolne glikozide (primulaverin i primverin), koji

se tokom sušenja razgrađuju. Saponini pokazuju visoku toksičnost prema plesnima. Na primer, asparagus saponin-1 izolovan iz listova *Asparagus officinalis* pokazuje antifungalnu aktivnost pri čemu su minimalne inhibitorne koncentracije u rasponu od 0,5 do 20,0 µg/ml u zavisnosti od testiranog mikroorganizma (Shimoyamada et al., 1990). Saponini izolovani iz *Allium minutiflorum* su takođe pokazali jaku antifungalnu aktivnost (Barile et al., 2007). Mehanizam antifungalnog delovanja saponina se zasniva na njihovoj interakciji sa ergosterolom iz membrane, što membranu čini propustljivom, gubi se njena funkcija i dolazi do odumiranja ćelija (Francis et al., 2002).

Vrste koje pripadaju rodu *Fusarium* su veoma česti kontaminanti žitarica i drugih namirnica koje se koriste u ljudskoj i životinjskoj ishrani. Tokom svog rasta oni proizvode mikotoksine, sekundarne metabolite koji su povezani sa razvojem nekih od oboljenja ljudi i životinja. Najčešći mikotoksini koje proizvode vrste roda *Fusarium* su trihotecen, fumonizin, zearalenon i moniliformin. Pored *Fusariuma*, mikotoksine proizvode i *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria* i *Claviceps* (Gutleb et al., 2002). Sprečavanje rasta neželjenih mikroorganizama se u industriji hrane i poljoprivredi postiže upotrebom sintetičkih konzervanasa, ali danas postoji sve veća težnja da se sintetički konzervansi zamene prirodnim, koji bi imali minimalan negativan uticaj na organoleptička svojstva proizvoda, a koji bi svojim antimikrobnim delovanjem sprečili razvoj patogenih mikroorganizama. Takvi konzervansi bi mogli da budu ekstrakti lekovitog bilja, etarska ulja dobijena iz, na primer, bosiljka, majčine dušice, origana, cimeta, belog luka i ruzmarina, enzimi životinjskog porekla (lizozim, laktoferin), bakteriocini mikrobiološkog porekla (nisin, nitamicin), organske kiseline i prirodni polimeri (hitozan) (Lucera et al., 2012). U literaturi je opisana antifungalna aktivnost etarskih ulja karanfilića, cimeta, origana, palmarose i limunove trave prema *F. proliferatum* i *F. graminearum*, (Velluti et al., 2003; Velluti et al., 2004). Takođe, rast plesni *F. graminearum* i proizvodnju toksina inhibira i polifenolni ekstrakt dobijen iz *Spirulina* sp. (Pagnussatt et al., 2013). U radu Bobbarala, ekstrakt biljke *Grewia arborea* je najviše inhibirao rast *A. niger*, čak i pri niskim koncentracijama, bliskim koncentracijama standardnog antifungalnog agensa (Bobbarala et al., 2009). Dok je u drugom radu pokazano da vodeni ekstrakti belog luka inhibiraju rast *A. niger* i *A. flavus* (Yin & Cheng, 1998). Ovo ukazuje na potencijalnu primenu preparata dobijenih iz različitih biljnih vrsta za antifungalni tretman, a prvi put je takva potencijalna namena

definisana za ekstrakt jagorčevine. Imajući u vidu da je ekstrakcija optimizovana za maksimalan prinos polifenola, koji najverovatnije nisu odgovorni za antifungalnu aktivnost ekstrakta jagorčevine, moguće je pretpostaviti da bi se ova sposobnost ekstrakta jagorčevine mogla dalje unaprediti optimizacijom ekstrakcije za maksimalan prinos saponina.

5.2.1.2 Antimikrobna aktivnost ekstrakta hajdučke trave

Ekstrakt hajdučke trave je inhibirao rast svih testiranih Gram-pozitivnih bakterija i jedne testirane Gram-negativne bakterije (*P. aeruginosa*), ali nije pokazao antimikrobno delovanje na *E. coli* i *C. albicans* (tabela 5.19). Najveću antimikrobnu aktivnost ekstrakt hajdučke trave je pokazao na *L. monocytogenes*. Antifungalnu aktivnost je ispoljio samo prema *F. graminearum*.

Tabela 5.19. Antimikrobna aktivnost ekstrakta hajdučke trave

Mikroorganizam	Prečnik zone inhibicije ^a (mm)	MIC (mg/ml)
<i>E. faecalis</i>	11,33 ± 0,58	5,0
<i>S. aureus</i>	11,00 ± 1,00	5,0
<i>L. monocytogenes</i>	12,67 ± 0,58	1,25
<i>P. aeruginosa</i>	12,33 ± 0,58	2,5
<i>E. coli</i>	-	
<i>C. albicans</i>	-	

^a Vrednosti su izražene kao srednja vrednost ± standardna devijacija, n = 3

Vrednosti minimalnih inhibitornih koncentracija (MIC) ekstrakta hajdučke trave na testiranim patogenima je bio u opsegu od 1,25 do 5 mg/ml (tabela 5.19). Ekstrakt hajdučke trave zadovoljava kriterijum Fabry i saradnika, prema kom se smatra da biljni ekstrakti imaju značajnu antimikrobnu aktivnost, ako su im MIC vrednosti manje od 8 mg/ml (Fabry et al., 1998). Osim toga, dobijene MIC vrednosti su manje od do sada objavljenih MIC vrednosti za ekstrakte i etarska ulja hajdučke trave, koje su u drugim radovima u rasponu od 4,5 do 72 mg/ml (Candan et al., 2003; Frey & Meyers, 2010; Kokoska et al., 2002). Veća antimikrobna aktivnost MAE ekstrakta hajdučke trave može da bude posledica različitih faktora. Jedan od njih je veći sadržaj ukupnih polifenola u ekstraktu, ali može da bude i posledica većeg sadržaja polifenola u samoj biljci, koji je posledica uticaja različitih faktora životne sredine, vrste zemljišta, klimatskih uslova,

načina skladištenja, tehnološkog tretmana biljke (Dias et al., 2013; Giorgi et al., 2007; Giorgi et al., 2009).

Prema literaturnim podacima, a kao što je dobijeno i ispitivanjem MAE ekstrakta hajdučke trave, ekstrakt i etarska ulja hajdučke trave ne pokazuju antimikrobno delovanje na *E. coli*, osim ekstrakta koji je dobijen maceracijom primenom rastvarača koji je pripremljen mešanjem jednakih zapremina dietil-etra, heksana i metanola (Candan et al., 2003; Kokoska et al., 2002; Nascimento et al., 2000; Stojanović et al., 2005). U ranijim radovima je pokazano da su Gram-pozitivne bakterije osjetljivije na delovanje antimikrobnih agenasa u poređenju sa Gram-negativnim bakterijama, koje imaju spoljašnju membranu izgrađenu od lipopolisaharida, koja je relativno neporopusna za polifenole (Gyawali & Ibrahim, 2012).

Tačan mehanizam antimikrobnog delovanja polifenola još nije u potpunosti razjašnjen. Postoji veliki broj predloženih mehanizama. Polifenoli mogu da reaguju sa ćelijskom membranom, i mogu da inaktiviraju ćelijske enzime ili antimikrobna aktivnost polifenola može biti rezultat kombinacije dejstva ova dva mehanizma. Takođe, pokazano je da mehanizam delovanja zavisi od koncentracije polifenola, pa tako polifenoli u nižim koncentracijama deluju na aktivnost enzima, dok u višim koncentracijama izazivaju denaturaciju proteina. Flavonoidi koji pokazuju antimikrobnu aktivnost mogu da formiraju komplekse sa proteinima formiranjem vodoničnih ili kovalentnih veza. Lipofilni flavonoidi mogu oštetiti ćelijsku membranu, tako da do smrti ćelije dolazi usled gubitka makromolekula (Cowan, 1999; Gyawali & Ibrahim, 2012; Kumar & Pandey, 2013).

Ekstrakt hajdučke trave je pokazao slabo antifungalno dejstvo samo prema plesni *F. graminearum*, dok nije inhibirao rast ostalih testiranih plesni. Najveću inhibiciju od 16% je postignuta pri najvećoj testiranoj koncentraciji ekstrakta (5 mg/ml). U literaturi postoji malo podataka o antifungalnoj aktivnosti hajdučke trave. Pokazano je da etarsko ulje deluje na *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum*, sa MIC vrednošću 0,64 µl/ml, dok u radu Woods-Panzaru i saradnika vodeni ekstrakt hajdučke trave nije delovao na 34 testirana mikroorganizma, od kojih su 24 bakterije i 10 plesni (Đurović-Pejčev et al., 2014; Woods-Panzaru et al., 2009). Međutim, u drugom radu je pokazano da vodeno-etanolni ekstrakt i etarsko ulje hajdučke trave efikasno inhibiraju rast *A. niger* i *Penicillium hirsutum* (Fierascu et al., 2015). Različita aktivnost ekstrakata očigledno

zavisi od rastvarača koji je korišćen u ekstrakciji, ali zavisi i od sastava, porekla, kvaliteta biljke, uslova skladištenja i načina obrade.

5.2.1.3 Antimikrobna aktivnost ekstrakta rastavića

Ekstrakt rastavića je inhibirao rast svih testiranih Gram-pozitivnih bakterija, ali nije pokazao antimikrobno delovanje na Gram-negativne bakterije (*P. aeruginosa* i *E. coli*) i *C. albicans* (tabela 5.20). Antifungalnu aktivnost je ispoljio prema sve tri testirane vrste roda *Fusarium*.

Tabela 5.20. Antimikrobna aktivnost ekstrakta rastavića

Mikroorganizam	Prečnik zone inhibicije ^a (mm)	MIC (mg/ml)
<i>E. faecalis</i>	10,33 ± 0,58	10,0
<i>S. aureus</i>	10,67 ± 0,58	5,0
<i>L. monocytogenes</i>	11,67 ± 0,58	1,25
<i>P. aeruginosa</i>	-	-
<i>E. coli</i>	-	-
<i>C. albicans</i>	-	-

^a Vrednosti su izražene kao srednja vrednost ± standardna devijacija, n = 3

Vrednosti minimalnih inhibitornih koncentracija (MIC) ekstrakta rastavića na testiranim patogenima je bio u opsegu od 1,25 do 10 mg/ml (tabela 5.20). U literaturi postoje podaci o antimikrobnoj aktivnosti ekstrakata rastavića, međutim, MIC su veoma visoke i za etil acetatni ekstrakt iznose 25 mg/ml za *S. aureus*, 50 mg/ml za *P. aeruginosa* i 100 mg/ml za *B. cereus* (Čanadanović-Brunet et al., 2009). U radu Kukrić i saradnika vodeno-etanolni ekstrakt rastavića je inhibirao rast *E. coli*, *S. aureus* i *B. cereus*. MIC vrednost za *E. coli* je iznosila 44,50 mg/ml, za *S. aureus* 11,14 mg/ml i za *B. cereus* 89,10 mg/ml (Kukrić et al., 2013). U drugim radovima je potvrđena antimikrobna aktivnost vodeno-etanolnog ekstrakta i etarskog ulja rastavića prema *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *E. coli*, ali je pokazano i da inhibira rast *S. enteritidis*, *K. pneumoniae*, *C. albicans* i *A. niger* (Milovanović et al., 2007; Radulović et al., 2006).

Ekstrakt rastavića dobijen u ovom radu nije inhibirao rast *E. coli*, kao što je pokazano u literaturi, što može da se objasni različitim sojevima *E. coli* koji su korišćeni u eksperimentima. U ovom radu je antimikrobna aktivnost ispitivana na soju *E. coli* ATCC 25922, dok je u radu Kukrić i saradnika ispitivana antimikrobna aktivnost prema

E. coli koja je izolovana iz namirnica, a u radu Milovanović i saradnika korišćena *E. coli* 95.

Ekstrakt rastavića je delovao na sve tri testirane *Fusarium* plesni, pri čemu je najveću inhibiciju ispoljio prema *F. verticillioides*, pri najvećoj testiranoj koncentraciji, dok nije inhibirao rast *Aspergillus* vrsta (tabela 5.21).

Tabela 5.21. Inhibicija rasta plesni dodatkom ekstrakta rastavića u hranljivu podlogu

Koncentracija ekstrakta, mg/ml	Inhibicija rasta, %				
	<i>A. niger</i>	<i>A. flavus</i>	<i>F. graminearum</i>	<i>F. proliferatum</i>	<i>F. verticillioides</i>
0,25	-	-	10,00	-	11,90
0,50	-	-	16,00	-	14,29
1,00	-	-	17,00	2,78	16,67
2,50	-	-	18,00	10,56	19,05
5,00	-	-	20,00	27,78	33,33

U literaturi je pronađeno da vodeno-etanolni ekstrakt rastavića u koncentraciji 3% u potpunosti inhibira rast plesni *Aspergillus carbonarius* i *F. graminearum*, pri svim ispitivanim uslovima temperature i vlage, a koji odgovaraju uslovima skladištenja poljoprivrednih proizvoda, dok pod određenim uslovima inhibira i rast *A. flavus*, *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus westerdijkiae* i *F. verticillioides*. Ove plesni mogu da kontaminiraju poljoprivredne proizvode i da proizvode mikotoksine (aflatoksine B1, B2, G1 i G2, ohratoksin A, fumonizin B1 i B2, deoksinivalenol i zearalenon), pa se konzumiranjem takvih proizvoda narušava zdravlje i životinja i ljudi (Garcia et al., 2011). Rezultati ukazuju na potencijalnu primenu rastavića kao ekološki prihvatljivog antifungalnog agensa za suzbijanje *Fusarium* vrsta u ograničenoj meri.

5.2.2 Stimulacija rasta probiotskih mikroorganizama (*L. rhamnosus* i *S. boulardii*) dodatkom biljnih ekstrakata u tečne hranjive podloge

Ispitan je uticaj dodatka MAE ekstrakata sve tri lekovite biljke u tečnu hranljivu podlogu na rast probiotskih mikroorganizama (*L. rhamnosus* i *S. boulardii*). Ekstrakt hajdučke trave je stimulisao rast oba testirana mikroorganizma, ekstrakt rastavića je stimulisao rast *S. boulardii*, dok ekstrakt jagorčevine nije stimulisao rast nijednog

testiranog probiotskog mikroorganizma. U daljem tekstu je prikazan uticaj ekstrakta hajduke trave i rastavića na rast *L. rhamnosus* i *S. boulardii*.

5.2.2.1 Uticaj ekstrakta hajdučke trave i rastavića na rast probiotskih mikroorganizama (*L. rhamnosus* i *S. boulardii*)

Da bi se ispitao uticaj ekstrakata hajdučke trave i rastavića na rast probiotskih mikroorganizama, *L. rhamnosus* i *S. boulardii*, sproveden je eksperiment kojim se prati razlika u broju izraslih kolonija na Petri šoljama u uzorcima kojima je u hranljivu podlogu dodat ekstrakt lekovite biljke u odnosu na broj izraslih kolonija na kontrolnim Petri šoljama, gde nije dodat ekstrakt. Nakon inkubacije u trajanju od 24 h dodatak ekstrakta hajdučke trave, u krajnjim koncentracijama od 0,5 do 5,0 mg/ml, je statistički značajno ($p < 0,005$) uticao na porast broja izraslih kolonija probiotskih mikroorganizama, *L. rhamnosus* i *S. boulardii* u poređenju sa brojem izraslih kolonija na kontrolnim Petri šoljama (tabela 5.22). Dodatak ekstrakta rastavića, u krajnjim koncentracijama od 0,5 do 5,0 mg/ml, je statistički značajno ($p < 0,005$) uticao na porast broja izraslih kolonija *S. boulardii* u poređenju sa brojem izraslih kolonija na kontrolnim Petri šoljama (tabela 5.22).

Tabela 5.22. Uticaj ekstrakta hajdučke trave i rastavića na rast probiotskih mikroorganizama *L. rhamnosus* i *S. boulardii*

Koncentracija ekstrakta, mg/ml	Hajdučka trava		Rastavić
	<i>L. rhamnosus</i> Log CFU/ml	<i>S. boulardii</i> Log CFU/ml	<i>S. boulardii</i> Log CFU/ml
0,5	8,68 ± 0,04 ^a	9,62 ± 0,04 ^a	7,87 ± 0,04 ^a
1	9,10 ± 0,10 ^a	8,85 ± 0,04 ^a	7,72 ± 0,09 ^a
2,5	9,01 ± 0,01 ^a	8,60 ± 0,02 ^a	8,04 ± 0,06 ^a
5	8,89 ± 0,01 ^a	7,55 ± 0,10 ^a	7,95 ± 0,07 ^a
Kontrola, log CFU/ml	8,29 ± 0,05	7,20 ± 0,19	6,85 ± 0,07

^a $p < 0,005$ (u poređenju sa kontrolom)

Analiza varijanse (ANOVA) i Tuki test za poređenje srednjih vrednosti su korišćeni za procenu značajne razlike između broja izraslih kolonija na Petri šoljama sa i bez dodatog ekstrakta, sa kriterijumom $p = 0,005$

Broj izraslih kolonija *L. rhamnosus* se najviše povećao kada je krajnja koncentracija hajdučke trave u tečnoj hranljivoj podlozi bila 1 mg/ml (9,10 ± 0,10 log CFU/ml), dok je sa daljim povećanjem koncentracije dodatog ekstrakta dolazilo do smanjenja broja izraslih kolonija. Ipak, u poređenju sa brojem izraslih kolonija na

kontrolnoj Petri šolji ($8,29 \pm 0,5 \log \text{ CFU/ml}$), zaključuje se da u primenjenim koncentracijama ekstrakt hajdučke trave i dalje statistički značajno ($p < 0,005$) stimuliše rast probiotika *L. rhamnosus* (tabela 5.22).

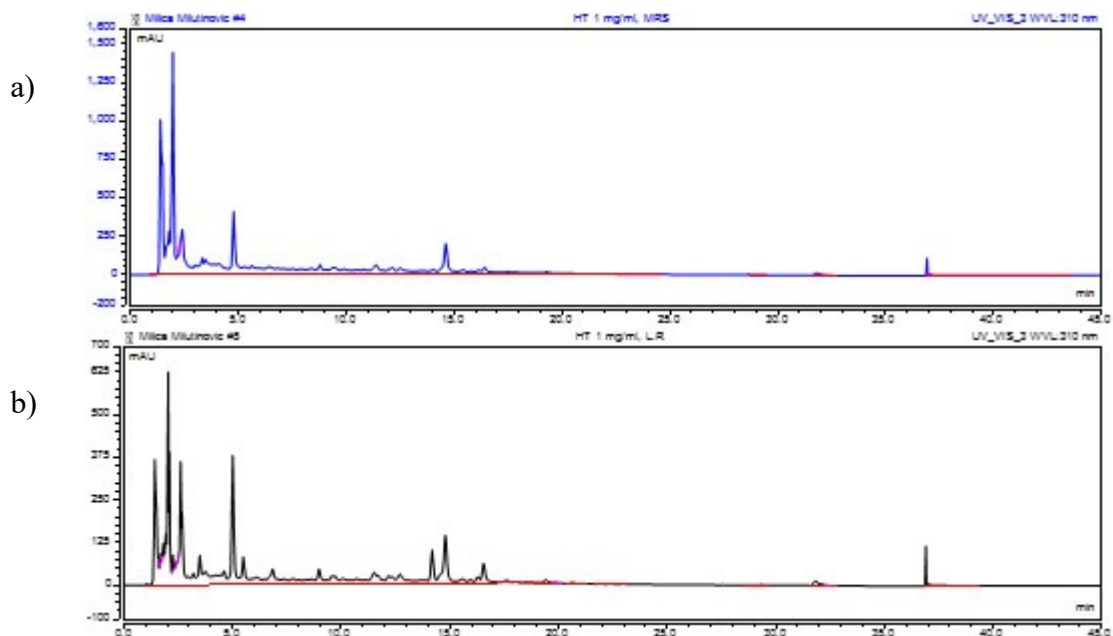
Kada je ekstrakt hajdučke trave testiran kao stimulator rasta *S. boulardii*, najveći porast broja izraslih kolonija na Petri šoljama je primećen kada je krajnja koncentracija ekstrakta u tečnoj hranljivoj podlozi bila $0,5 \text{ mg/ml}$ ($9,62 \pm 0,04 \log \text{ CFU/ml}$). Slično kao i kod *L. rhamnosus*, sa daljim povećanjem koncentracije dodatog ekstrakta, broj izraslih kolonija se smanjivao, ali je i dalje bio statistički značajno veći ($p < 0,005$) u poređenju sa brojem izraslih kolonija na kontrolnoj Petri šolji ($7,20 \pm 0,19 \log \text{ CFU/ml}$), pa se i ovde može zaključiti da dodatak ekstrakta hajdučke trave, u testiranim koncentracijama, statistički značajno stimuliše rast probiotika *S. boulardii* (tabela 5.22). Ovako značajna stimulacija rasta *L. rhamnosus* je ranije je u literaturi raportirana za borovnicu i zeleni čaj, a ovo je prvi takav raport za ekstrakt hajdučke trave (Molan et al., 2009a; Molan et al., 2009b). Treba napomenuti da je *S. boulardii* nakon dodatka hajdučke trave rastao do 250 puta više nego u kontrolnoj hranljivoj podlozi. Ovako značajna stimulacija rasta probiotskog kvasca do sada nije zabeležena u literaturi.

S druge strane, najveća stimulacija rasta kvasca *S. boulardii* ekstraktom rastavića je postignuta kada je ekstrakt dodat u pet puta većoj koncentraciji u poređenju sa ekstraktom hajdučke trave. Broj izraslih kolonija *S. boulardii* se najviše povećao kada je krajnja koncentracija rastavića u tečnoj hranljivoj podlozi bila $2,5 \text{ mg/ml}$ ($8,04 \pm 0,06 \log \text{ CFU/ml}$), dok se sa daljim povećanjem koncentracije dodatog ekstrakta smanjio broja izraslih kolonija, ali je i dalje bio statistički značajno ($p < 0,005$) veći od broja izraslih kolonija na kontrolnoj Petri šolji ($6,85 \pm 0,07 \log \text{ CFU/ml}$) (tabela 5.22). Ipak stimulacija rasta je relativno manja (15 puta u odnosu na 250 puta) u poređenju sa efektom hajdučke trave.

Ovde je važno napomenuti da pri poređenju uticaja ekstrakta hajdučke trave na patogene i probiotske mikroorganizme i pri najvećoj MIC za testirane patogene mikroorganizme, koja iznosi $5,0 \text{ mg/ml}$ (tabela 5.19), ekstrakt hajdučke i dalje stimuliše rast probiotskih mikroorganizama, *L. rhamnosus* i *S. boulardii*. Tačan mehanizam delovanja polifenolnih jedinjenja na rast probiotskih mikroorganizama je nepoznat. Jedno moguće objašnjenje ovakvog ponašanja je da neka polifenolna jedinjenja imaju mogućnost vezivanja gvožđa. Gvožđe je važno kod aerobnih mikroorganizama jer

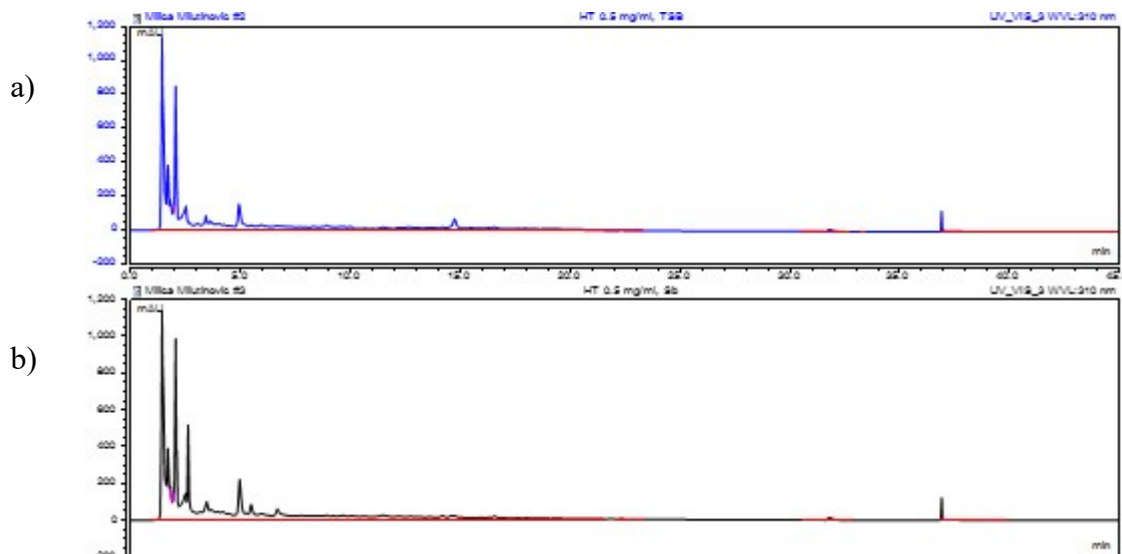
učestvuje u izgradnji hema i redukciji ribonukleotida prekursora molekula DNK. Međutim, laktobacilusima ne treba gvožđe jer za redukciju ribonukleotida koriste enzim kome je kofaktor adenzilkobalamin (Hervert-Hernandez & Goñi, 2011). Stoga bi kompleksiranje gvožđa omelo rast samo nekih i to primarno aerobnih mikroorganizama. Molan i saradnici su pretpostavili da polifenoli, kao antioksidansi, mogu da smanjuju oksidativni stres u tečnoj podlozi koji se stvara kao posledica metaboličkih aktivnosti mikroorganizma i time obezbeđuju bolje okruženje za rast probiotskih mikroorganizama (Molan et al., 2009b). Uz ove mehanizme moguće je da mikroorganizmi tokom rasta koriste dodate polifenole kao supstrat. I bakterije i kvasci tokom rasta proizvode hidrolitičke enzime kojima se određeni flavonoid glikozidi mogu hidrolizovati u odgovarajuće šećere i aglikone, koje kasnije mogu da koriste kao izvor energije (China et al., 2012; Rodríguez et al., 2009).

HPLC analizom polifenola u hranljivoj podlozi, pre i nakon rasta *L. rhamnosus* (koncentracija ekstrakta hajdučke trave je 1 mg/ml), je primećeno da dolazi do malog smanjenja u sadržaju nekih polifenolnih jedinjenja, dok se povećao sadržaj drugih polifenola što ukazuje na to da *L. rhamnosus* koristi polifenole za rast, ali samo delimično tako da kao rezultat bakterijskog metabolizma zaostaju polifenolna jedinjenja promenjene hemijske strukture (slika 5.27).



Slika 5.27. HPLC hromatogram hranljive podloge pre (a) i posle rasta *L. rhamnosus* (b) kada je u hranljivu MRS podlogu dodato 1,0 mg/ml ekstrakta hajdučke trave.

HPLC analizom polifenolnih jedinjenja, pre i nakon rasta *S. boulardii* (koncentracija ekstrakta hajdučke trave je 0,5 mg/ml), primećeno da je kvasac u potpunosti iskoristio jedno polifenolno jedinjenje za svoj rast. Ovo jedinjenje je na osnovu retencionog vremena identifikovano kao 5-O-kafeoilhinska kiselina (Vitalini et al., 2016) što ukazuje na činjenicu da oba mikroorganizma mogu da koriste ekstrakt hajdučke trave kao izvor hranljivih materija (slika 5.28), s tim što je *S. boulardii* selektivan prema jednom jedinjenju.



Slika 5.28. HPLC hromatogram hranljive podloge pre (a) i posle rasta *S. boulardii* (b) kada je u hranljivu TSB podlogu dodato 0,5 mg/ml ekstrakta hajdučke trave.

Dobijeni rezultati su slični prethodno objavljenim rezultatima. China i saradnici su testirali uticaj polifenolnog ekstrakta biljke *Sesbania grandiflora* na rast probiotskog mikroorganizma *Lactobacillus acidophilus*. Sadržaj ukupnih polifenola u tečnoj hranljivoj podlozi se za 24 h smanjio sa 0,03 na 0,017 mg polifenola, dok je broj izraslih kolonija porastao sa $3,00 \times 10^9$ (na kontrolnoj Petri šolji) na $5,53 \times 10^9$. Takođe su pokazali da se nakon rasta *L. acidophilus* smanjio sadržaj rutina, koji je glavna polifenolna komponenta ekstrakta *S. grandiflora*, pa su zaključili da *L. acidophilus* koristi rutin kao nutrijent tokom svog rasta (China et al., 2012). Molan i saradnici su u dva rada pokazali da ekstrakt borovnice i zeleni čaj obogaćen selenom stimulišu rast *L. rhamnosus*. U prvom radu su testirali ekstrakt borovnice i pokazali da se broj izraslih kolonija nakon 24 h inkubacije povećao sa $8,79 \pm 0,034$ na $8,93 \pm 0,09$ log CFU/ml, dok je značajnije

povećanje broja izraslih kolonija zabeleženo nakon 72 h inkubacije, sa $6,75 \pm 0,02$ na $9,60 \pm 0,03$ log CFU/ml. Oni su potvrdili da *L. rhamnosus* može da koristi konstituente ekstrakta borovnice kao izvor hranljivih materija koje koristi za svoj rast (Molan et al., 2009b). U drugom radu su pokazali da zeleni čaj obogaćen selenom statistički značajno ($p < 0,0001$) stimuliše rast *L. rhamnosus* nakon 24 h inkubacije (Molan et al., 2009a). Treba primetiti da je stimulacija pomoću hajdučke trave bila izraženija u odnosu na borovnicu i zeleni čaj za isti period inkubacije. Stimulacija *S. boulardii* pomoću biljnih ekstrakata do sada nije zabeležena u literaturi.

Prema prikazanim rezultatima može se zaključiti da ekstrakt hajdučke trave poseduje prebiotsku aktivnost, jer u testiranim koncentracijama stimuliše rast *L. rhamnosus* i *S. boulardii*, što je sa zdravstvenog aspekta važno zbog koristi koja se dobija povećanjem broja probiotskih bakterija i kvasaca u gastrointestinalnom traktu. Između ostalog je pokazano da se povećanjem broja laktobacilusa u debelom crevu smanjuje formiranje amonijaka, skatola, amina i drugih jedinjenja koja mogu da dovedu do razvoja raka debelog creva (Burns & Rowland, 2000). Ovo je prvi put da su ekstrakti hajdučke trave i rastavića korišćeni za stimulaciju rasta probiotskih mikroorganizama.

5.2.3 Inhibicija aktivnosti acetilholinesteraze

Poslednje dve decenije inhibicija acetilholinesteraze (AChE) je najčešće korišćen pristup u kliničkom lečenju Alchajmerove bolesti. Različite biljke i njihovi konstituenti su pokazali inhibiciju AChE, pa su Uriarte-Pueio i Calvo predložili da flavonoidi koji inhibiraju aktivnost AChE mogu biti novi multipotentni lekovi za lečenje AD (Uriarte-Pueyo & I Calvo, 2011; Vladimir-Knežević et al., 2014). Kao što je rečeno u uvodnom delu, inhibicije aktivnosti AChE je posledica blokade aktivnog centra enzima flavonoidima. Inhibicija zavisi od strukture flavonoida, pa, na primer, prisustvo OH grupe u poziciji C3 na C prstenu je jako važno za povećanje inhibicije, dok se ona smanjuje ako je flavonoid glikozilovan ili ukoliko nema OH grupe (Roseiro et al., 2012).

U ovom radu je inhibicija aktivnosti AChE je ispitana korišćenjem MAE ekstrakta jagorčevine, hajdučke trave i rastavića u rasponu koncentracija od 10 do 1000 µg/ml. Najjaču inhibiciju aktivnosti enzima je pokazala jagorčevina, zatim hajdučka trava i na kraju rastavić (tabela 5.23). Najveća inhibicija od $63,23 \pm 5,83\%$ je postignuta pri najvišoj testiranoj koncentraciji ekstrakta jagorčevine. Iz rezultata se može zaključiti da

je inhibicija aktivnosti rasla kada je povećavana koncentracija ekstrakta, ali da nije u direktnoj korelaciji sa koncentracijom ukupnih polifenola u ekstraktima, s obzirom na to da je maksimalan sadržaj ukupnih polifenola bio u ekstraktu hajdučke trave, koji je pokazao manju inhibitornu aktivnost od jagorčevine.

Tabela 5.23. Inhibicija aktivnosti AChE

Koncentracija ekstrakta, µg/ml	Inhibicija aktivnosti AChE ^a , %		
	Jagorčevina	Rastavić	Hajdučka trava
10	10,16 ± 2,38	-	-
100	24,86 ± 1,61	3,37 ± 0,91	1,71 ± 0,52
500	37,67 ± 2,70	5,20 ± 0,52	9,36 ± 2,02
1000	63,23 ± 5,83	16,75 ± 5,96	29,92 ± 3,63

^a Vrednosti su izražene kao srednja vrednost ± standardna devijacija, n = 3

Roseiro i saradnici su naglasili da je pored *in vitro* eksperimenata u kojima se pokazuje inhibicija AChE, potrebno izolovati aktivne komponente iz ekstrakata i pokazati kakav je njihov metabolizam i apsorpcija u organizmu, odnosno da li te komponente u organizmu stižu do mozga gde bi mogle direktno da utiču na aktivnost AChE. Takođe potrebno je uzeti u obzir i da, osim toga što polifenoli inhibiraju AChE, oni deluju neuroprotektivno, a zahvaljujući anti-inflamatornom dejstvu, inhibiraju monoaminoooksidazu-B, koja se inhibira u lečenju Parkinsonove bolesti, a važni su i u međuceljskoj komunikaciji (Roseiro et al., 2012).

U literaturi postoje podaci o uticaju ekstrakata hajdučke trave i rastavića na aktivnost AChE, ali ne postoje podaci o uticaju ekstrakta jagorčevine. Što se tiče hajdučke trave, Sevindik i saradnici su pokazali da n-butanolna frakcija ekstrakta hajdučke trave pokazuje veću inhibiciju aktivnosti AChE (51,3 ± 0,11%) pri koncentraciji od 25 µg/ml, dok prema radu Sigurdsson i Gudbjarnason ekstrakt hajdučke trave ne pokazuje inhibitornu aktivnost AChE (Sigurdsson & Gudbjarnason, 2007). Sevindik i saradnici su pokazali i da od flavonoida, koji su prisutni u ekstraktu hajdučke trave, najveću inhibitornu aktivnost imaju luteolin-7-O-glukozid sa IC₅₀ vrednošću 1,67 ± 0,302 µM i 6-hidroksi-luteolin-7-O-glukozid sa IC₅₀ vrednošću 1,65 ± 0,122 µM (Sevindik et al., 2015). Kada je reč o ekstraktima drugih biljaka koji pripadaju rodu *Achillea*, pokazano je da *A. phillea*, *A. wilhelmsii* slabo inhibiraju aktivnost AChE (9 i 0,1%) dok *A. eriophora* ne pokazuje nikakvu inhibiciju aktivnosti AChE (Dhivya et al., 2014). U radu Miquel i saradnika je pokazano da je koncentracija ekstrakta rastavića, pri kojoj se inhibira 50%

aktivnosti AChE iznosi $3,134 \pm 0,080$ mg/ml, a zaključeno je i da flavonoidi imaju važnu ulogu u inhibiciji aktivnosti AChE, s obzirom na to da je koncentracija flavonoida bila u negativnoj korelaciji sa IC_{50} vrednostima inhibicije AChE (Miguel et al., 2014).

5.3 Optimizacija uslova fermentacije otpadne hajdučke trave i rastavića

5.3.1 Optimizacija uslova fermentacije hajdučke trave bakterijom *L. rhamnosus* i kvascem *S. boulardii*

Da bi se utvrdili optimalni uslovi fermentacije otpadne hajdučke trave mikroorganizmima *L. rhamnosus* i *S. boulardii* sa ciljem dobijanja ekstrakta sa povećanim sadržajem ukupnih polifenola, što bi doprinelo povećanju biološke aktivnosti ekstrakta, korišćena je metoda odzivnih površina (RSM) i centralni kompozitni dizajn (CCD). Na osnovu preliminarnih ispitivanja izabrane su četiri procesne promenljive koje mogu uticati na sadržaj ukupnih polifenola u ekstraktu. Ekstrakt je nakon fermentacije dobijen primenom optimalnih MAE uslova, a to su snaga mikrotalasnog zagrevanja 170 W, vreme ekstrakcije 33 s, odnos tečne i čvrste faze 40 ml/g i krajnja koncentracija etanola 70 %. Izabrane četiri procesne promenljive su: vreme fermentacije (A), procenat inokuluma (B), koncentracija podloge (C) i odnos tečne i čvrste faze (D). Praćen odziv sistema je bio sadržaj ukupnih polifenola u ekstraktima (Y) (tabela P-1.4).

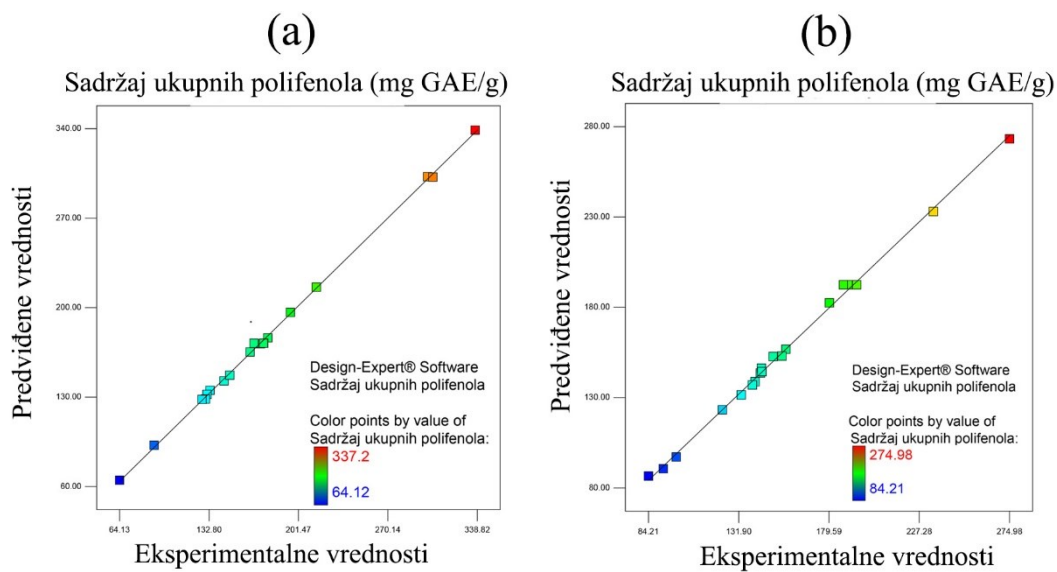
Analizom varijanse (ANOVA) je ocenjena adekvatnost i statistička značajnost oba modela. Vrednost koeficijenta determinacije (R^2) za matematički model sadržaja ukupnih polifenola u ekstraktu, kada je u fermentaciji korišćen *L. rhamnosus*, je iznosio 0,999 i kada je u fermentaciji korišćen *S. boulardii* 0,998, što ukazuje na to da postoji dobra korelacija između ekperimentalnih i modelom predviđenih vrednosti (tabela 5.24, slika 5.29). Takođe, u oba modela nedostatak fitovanja nije bio značajan, koeficijent varijacije je bio manji od 10%, a vrednost adekvatne preciznosti je bila veća od 4, što ukazuje da su modeli pouzdani i precizni.

Tabela 5.24. Analiza varijanse (ANOVA) modela dobijenih primenom višestruke regresione analize

Odziv	R^2	p -vrednost	F -vrednost	Koeficijent varijacije (%)	p -vrednost nedostatka fitovanja	Adekvatna preciznost
Y ₁	0,999	< 0,0001	500,70	2,11	0,6712	85,84
Y ₂	0,998	< 0,0001	186,18	2,59	0,4167	53,72

Y₁: sadržaj ukupnih polifenola u ekstraktu koji je fermentisan bakterijom *L. rhamnosus* (mg GAE/g s.m. ekstrakta);

Y₂: sadržaj ukupnih polifenola u ekstraktu koji je fermentisan kvascem *S. boulardii* (mg GAE/g s.m. ekstrakta).



Slika 5.29. Slaganje eksperimentalno dobijenih i predviđenih vrednosti sadržaja ukupnih polifenola u eksperimentalnom dizajnu fermentacije otpadne hajdučke trave bakterijom *L. rhamnosus* (a) i kvascem *S. boulardii* (b)

Ocena značajnosti uticaja procesnih promenljivih (vremena fermentacije, procenta inokuluma, koncentracije podloge i odnosa tečne i čvrste faze) na odziv sistema, na osnovu ANOVA statistike je data u tabeli 5.25, a efekat odgovarajućih faktora je prikazan u daljem tekstu. Prilikom analize korišćena „backward“ regresija, pomoću koje su iz modela eliminisani članovi koji nisu značajno uticali na odziv ($p \geq 0,0500$).

Tabela 5.25. p vrednosti dobijene analizom varijanse (ANOVA) procesnih promenljivih u eksperimentalnom dizajnu fermentacije otpadne hajdučke trave bakterijom *L. rhamnosus* i kvascem *S. boulardii*

Faktor	p^* -vrednost Prob > F	
	Y ₁	Y ₂
A	0,0206	0,0004
B	0,0069	< 0,0001
C	< 0,0001	< 0,0001
D	< 0,0001	< 0,0001
AB	< 0,0001	0,0011
AC	< 0,0001	0,0041
AD	0,0029	< 0,0001
BC	< 0,0001	$\geq 0,0500$
BD	< 0,0001	0,0025
CD	< 0,0001	0,0034
A ²	< 0,0001	< 0,0001
B ²	0,0151	0,0013
C ²	< 0,0001	< 0,0001
D ²	$\geq 0,0500$	0,0210

A: vreme fermentacije (h);

B: koncentracija inokuluma (%);

C: koncentracija podloge (%);

D: odnos tečno/čvrsto (ml/g);

Y₁: sadržaj ukupnih polifenola u ekstraktu koji je fermentisan bakterijom *L. rhamnosus* (mg GAE/g s.m. ekstrakta);

Y₂: sadržaj ukupnih polifenola u ekstraktu koji je fermentisan kvascem *S. boulardii* (mg GAE/g s.m. ekstrakta);

* $p < 0,01$ veoma značajno; $0,01 \leq p < 0,05$ značajno; $p \geq 0,05$ nije značajno.

5.3.1.1.1 Uticaj procesnih parametara na sadržaj ukupnih polifenola u ekstraktima

Primenom višestruke regresione analize dobijena je zavisnost između sadržaja ukupnih polifenola i četiri nezavisne promenljive (vreme fermentacije, procenat inokuluma, procenat podloge i odnos tečne i čvrste faze), koja se može aproksimirati polinomom drugog reda:

$$Y_1 = 171,86 - 5,03A + 6,92B + 37,01C - 25,69D - 45,37AB - 45,37AC + 10,60AD + 22,20BC + 51,99BD - 21,35CD - 11,93A^2 - 3,65B^2 + 22,86C^2 \quad (5.13.)$$

$$Y_2 = 192,02 - 13,87A - 36,33B - 14,29C - 31,98D - 14,48AB - 6,97AC - 45,38AD - 12,37BD - 7,48CD - 24,46A^2 + 7,21B^2 - 27,89C^2 - 3,69D^2 \quad (5.14.)$$

gde su Y_1 (sadržaj ukupnih polifenola u ekstraktu hajdučke trave fermentisanom bakterijom *L. rhamnosus*) i Y_2 (sadržaj ukupnih polifenola u ekstraktu hajdučke trave fermentisanom kvascem *S. boulardii*) odzivi, a promenljive su A (vreme fermentacije), B (koncentracija inokuluma), C (koncentracija podloge) i D (odnos tečne i čvrste faze).

Sadržaj ukupnih polifenola u ekstraktima, nakon fermentacije bakterijom *L. rhamnosus* i MAE, je varirao u opsegu od 64,13 do 337,2 mg GAE/g (tabela P-1.4). Višestruka regresiona analiza podataka ukazuje na to da su sva četiri linearna člana, svih šest interaktivnih članova i tri kvadratna člana (A^2 , B^2 , C^2) bila statistički značajna ($p < 0,05$, tabela 5.25). Prema jednačini zavisnosti sadržaja ukupnih polifenola u ekstraktima od promenljivih (jednačina 5.13), negativan uticaj na odziv imali su vreme fermentacije i odnos tečna/čvrsta faza, dok su pozitivan uticaj imali koncentracija inokuluma i koncentracija podloge. Pozitivan predznak kvadratnog člana C^2 ukazuje na postojanje minimuma funkcije, dok negativan predznak kvadratnih članova A^2 i B^2 ukazuje na postojanje maksimuma funkcije. Takođe, maksimalne vrednosti sadržaja ukupnih polifenola u ekstraktima su više od pet puta veći od minimalnih koncentracija ukupnih polifenola, što ukazuje na to da ispitivane procesne promenljive imaju veliki uticaj na sadržaj polifenolnih jedinjenja u ekstraktima, nakon fermentacije i MAE.

Najveći uticaj na sadržaj ukupnih polifenola u ekstraktima je imala koncentracija MRS podloge koja je dodata hajdučkoj travi pre inokulisanja bakterijom *L. rhamnosus* ($p < 0,0001$, tabela 5.25), a povećanje sadržaja ukupnih polifenola se postizalo povećanjem koncentracije podloge (slika 5.30a, b i c). Maksimalna koncentracija ukupnih polifenola u ekstraktu je postignuta kada je u hajdučku travu dodata 80% MRS podloga (tabela P-1.4. proba 2.). Curiel i saradnici su slično zaključili nakon fermentacije bobica mirte bakterijom *L. plantarum*, pa je dodatak ekstrakta kvasca u koncentraciji 0,4% omogućio bolji rast bakterije nakon 24 h, dok je slab rast primećen ukoliko je u bobice mirte bila dodata samo destilovana voda (Curiel et al., 2015). U drugom radu u kom je pomoću *L. plantarum* fermentisano mleko, dobijeno od soje i mungo pasulja, je dodato 2% glukoze kao izvor energije za rast bakterije (Gan et al., 2016). Dodatak hranljive podloge omogućava bolji rast bakterije, koja nakon toga sintetiše enzime (kao što su celulaze, β -

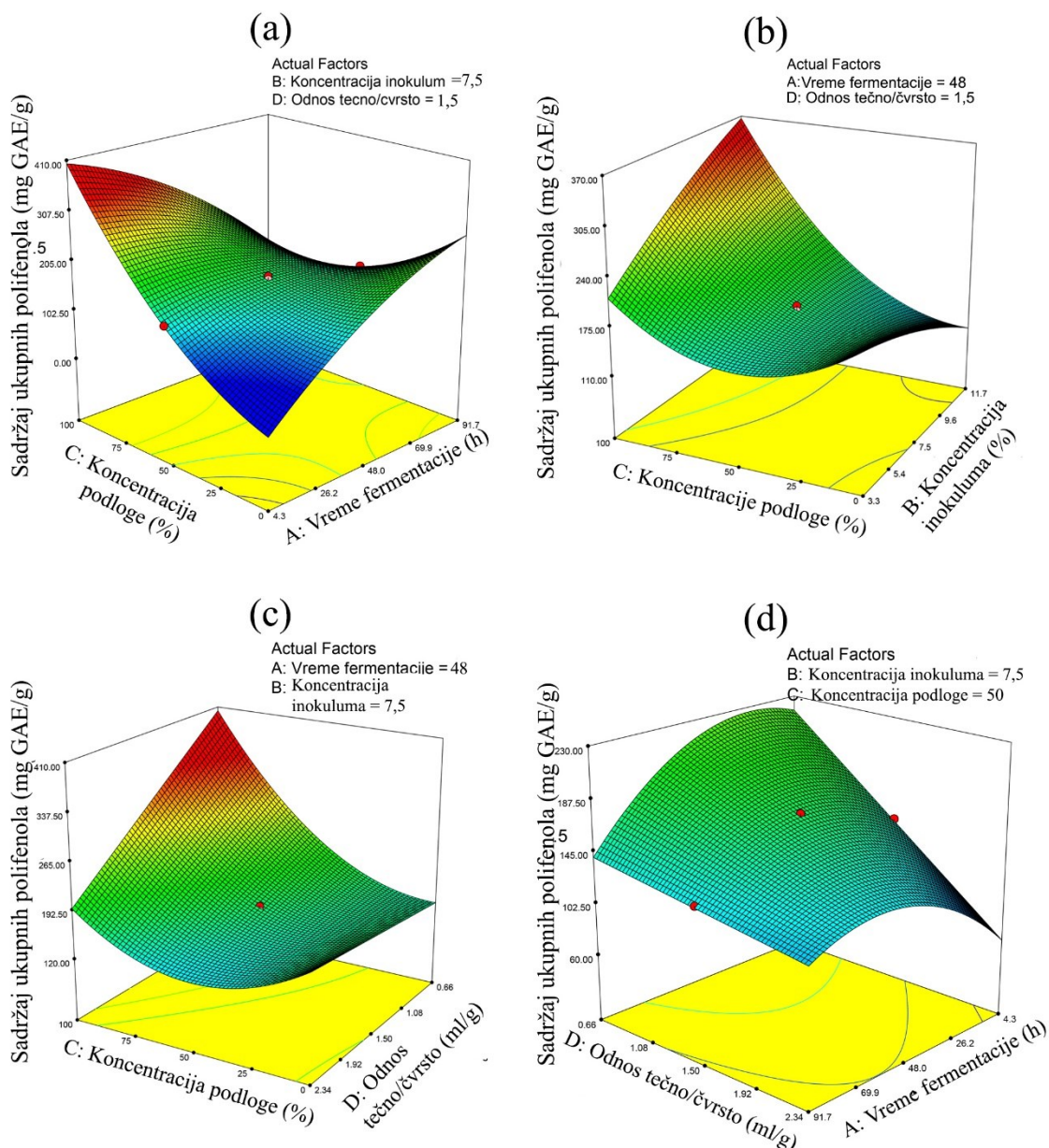
glukozidaze, hemicelulaze, esteraze), kojima se razgrađuje ćelijski zid biljke i raskidaju estarske veze kojima su polifenoli vezani za strukturne komponente biljnog matriksa. Na primer, β -glukozidaza katalizuje hidrolizu glukozidne veze u alkil i aril- β -D glukozidima, oslobađajući polifenolne aglikone (Hur et al., 2014; Huynh et al., 2014).

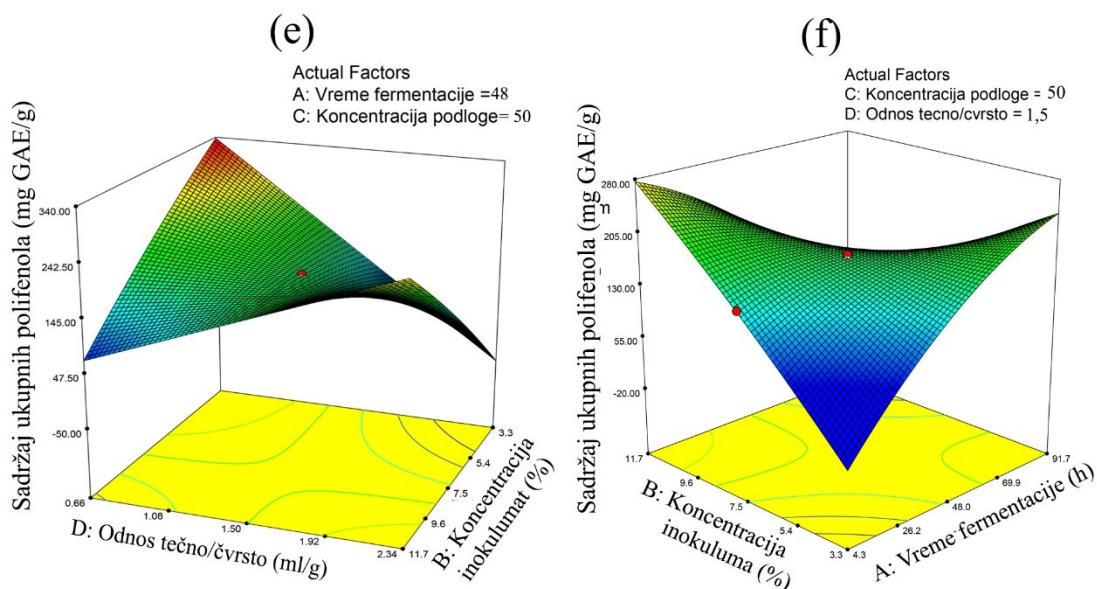
Drugi faktor koji statistički značajno utiče na povećanje sadržaja ukupnih polifenola u ekstraktu, nakon fermentacije i MAE, je odnos tečno/čvrsto ($p < 0,0001$, tabela 5.25). Povećanje sadržaja ukupnih polifenola se postiže smanjenjem odnosa tečne i čvrste faze (slika 5.30c, d i e) i maksimalan prinos polifenola je dobijen kada je odnosa tečne i čvrste faze bio 2,0 ml/g. Verovatno se pod ovakvim uslovima povećava proizvodnja enzima kojima bakterija razlaže ćelijski zid, pa je olakšano oslobađanje polifenola što dovodi do povećanja sadržaja ukupnih polifenola u ekstraktu nakon MAE. U radu Sabu i saradnika je pokazano da odnos tečne prema čvrstoj fazi prilikom fermentacije na čvrstoj podlozi utiče na produkciju enzima tanaze. Enzim je produkovan pomoću *Lactobacillus* sp. ASR-S1 na različitim podlogama, a najveća produkcija enzima je postignuta na ljusci od kafe sa 50% sadržajem vlage, na 33 ° C u toku 72 h (Sabu et al., 2006).

Koncentracija dodatog inokuluma takođe statistički značajno ($p < 0,05$) utiče na sadržaj ukupnih polifenola u ekstraktu (tabela 5.25) i povećanje se postiže povećanjem koncentracije dodatog inokuluma (slika 5.30b, e i f), pri čemu se maksimum postiže ukoliko se u uzorak doda 10% inokuluma (tabela P-1.4.). Niža koncentracija inokuluma ne obezbeđuje dovoljan broj ćelija, što za posledicu ima manju produkciju enzima koji su važni za oslobađanje polifenola ili razgradnju ćelijskog zida. Sa druge strane, povećanjem koncentracije inokuluma posle određenog nivoa može da se smanji proizvodnja enzima usled iscrpljivanja hranljivih materija zbog porasta ćelijske biomase što rezultira smanjenjem metaboličke aktivnosti bakterija, što opet vodi do smanjene proizvodnje enzima (Sabu et al., 2006). Takođe, intenzivniji rast utiče na to da bakterije koriste alternativne izvore energije, što može da dovede do delimičnog trošenja polifenola, jer je pokazano da obe probiotske kulture mogu koristiti polifenole hajdučke trave kao izvor ugljenika. Prilikom proizvodnje enzima tanaze na ljusci od kafe koncentracija dodatog inokuluma, pri kojoj je postignuta najveća proizvodnja enzima, je bila 20%. U drugim radovima su zabeležene niže koncentracije dodatog inokuluma, pa je na primer, u cilju povećanja antioksidativnog potencijala i koncentracije aglikona sojinog mleka

koncentracija dodatog inokuluma *L. rhamnosus* bila 4% (Marazza et al., 2009; Marazza et al., 2012), dok je u fermentaciji različitih žitarica koncentracija inokuluma *L. rhamnosus* bila 5% (Đorđević et al., 2010).

Produženjem vremena fermentacije se smanjuje sadržaj ukupnih polifenola u ekstraktu (slika 5.30a, d i f), a maksimalni sadržaj ukupnih polifenola se postiže kada se uzorak fermentiše 24 h. Nakon tog vremena, bakterije verovatno koriste i polifenole kao supstrat što dovodi do njihovog smanjenja u ekstraktima nakon MAE.

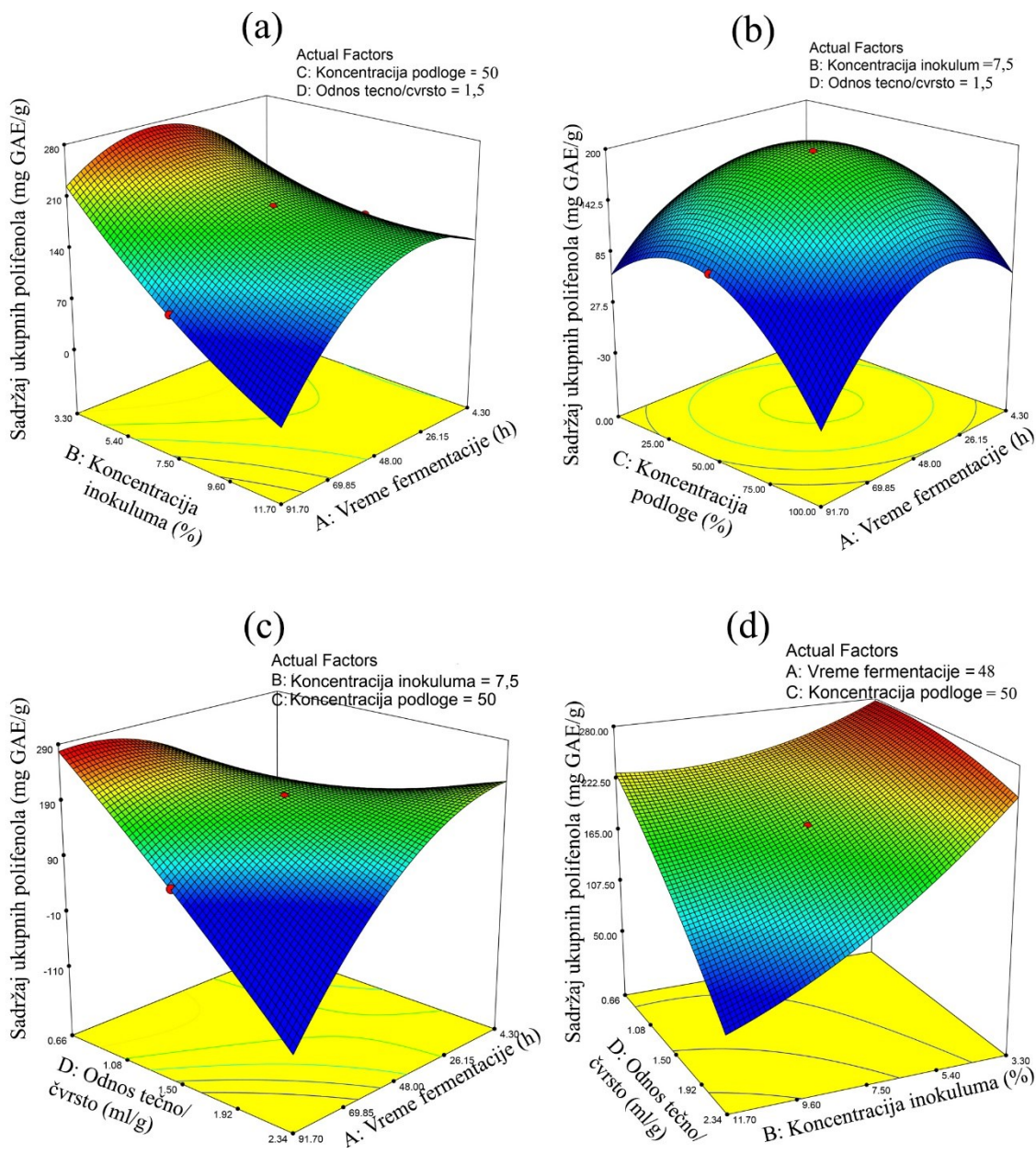


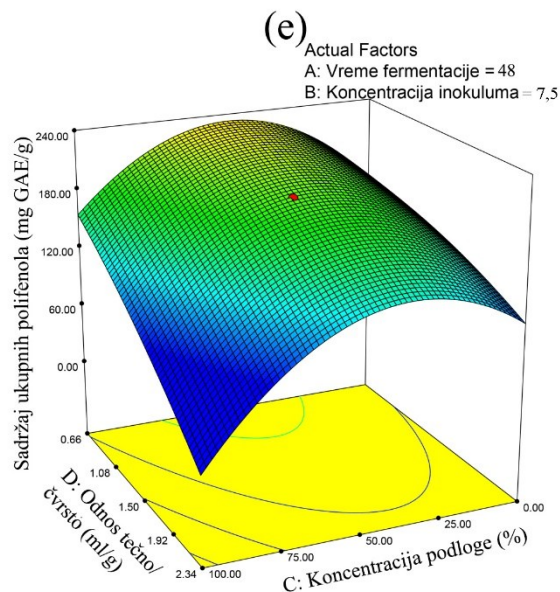


Slika 5.30. Odzivne površine međusobnih uticaja: vremena fermentacije i koncentracije podloge (AC) pri koncentraciji inokuluma od 7,5% i odnosu tečno/čvrsto 1,5 ml/g (a), koncentracije inokuluma i koncentracije podloge (BC) pri vremenu fermentacije od 48 h i odnosu tečno/čvrsto 1,5 ml/g (b), koncentracije podloge i odnosa tečno/čvrsto (CD) pri vremenu fermentacije od 48 h i koncentraciji inokuluma od 7,5% (c), vremena fermentacije i odnosa tečno/čvrsto (AD) pri koncentraciji inokuluma od 7,5% i koncentraciji podloge od 50% (d), koncentracije inokuluma i odnosa tečno/čvrsto (BD) pri vremenu fermentacije od 48 h i koncentraciji podloge od 50% (e), vremena fermentacije i koncentracije inokuluma (AB) pri koncentraciji podloge od 50% i odnosu tečno/čvrsto 1,5 ml/g (f) na saržaj ukupnih polifenola u ekstraktu nakon fermentacije otpadne hajdučke trave bakterijom *L. rhamnosus* (Y_1).

Sadržaj ukupnih polifenola u ekstraktima, nakon fermentacije kvascem *S. boulardii* i MAE, je varirao u opsegu od 84,20 do 274,98 mg GAE/g (tabela P-1.4). Višestruka regresiona analiza podataka ukazuje na to da su sva četiri linearna člana, pet interaktivnih članova (AB, AC, AD, BD i BC) i sva četiri kvadratna člana bila statistički značajna ($p < 0,05$, tabela 5.25). Prema jednačini zavisnosti sadržaja ukupnih polifenola u ekstraktima od promenljivih (jednačina 5.14) povećanje se postiže smanjenjem vremena fermentacije, koncentracije inokuluma, koncentracije hranljive podloge i odnosa tečne prema čvrstoj fazi uzorka. Negativan predznak kvadratnih članova A^2 i C^2 ukazuje na postojanje maksimuma funkcije, dok pozitivan predznak člana B^2 ukazuje na

postojanje minimuma funkcije. Najveći uticaj na sadržaj ukupnih polifenola u ekstraktima je imala koncentracija dodatog inokuluma, pa zatim odnos tečne i čvrste faze, koncentracija dodate podloge i na kraju, vreme fermentacije (slika 5.31). Maksimalne vrednosti sadržaja ukupnih polifenola u ekstraktima su više od tri puta veće od minimalnih koncentracija ukupnih polifenola, ukazujući na to da ispitivane procesne promenljive imaju veliki uticaj na sadržaj polifenolnih jedinjenja u ekstraktima, nakon fermentacije kvascem *S. boulardii* i MAE.





Slika 5.31. Odzivne površine međusobnih uticaja: vremena fermentacije i koncentracije inokuluma (AB) pri koncentraciji podloge od 50% i odnosu tečno/čvrsto 1,5 ml/g (a), vremena fermentacije i koncentracije podloge (AC) pri koncentraciji inokuluma od 7,5% i odnosu tečno/čvrsto 1,5 ml/g (b), vremena fermentacije i odnosa tečno/čvrsto (AD) pri koncentraciji inokuluma od 7,5% i koncentraciji podloge od 50% (c), koncentracije inokuluma i odnosa tečno/čvrsto (BD) pri vremenu fermentacije od 48 h i koncentraciji podloge od 50% (d), koncentracije podloge i odnosa tečno/čvrsto (CD) pri vremenu fermentacije od 48 h i koncentraciji inokuluma od 7,5% (e) na saržaj ukupnih polifenola u ekstraktu nakon fermentacije otpadne hajdučke trave kvascem *S. boulardii* (Y₂).

5.3.1.1.2 Validacija modela

Primenom metode željene funkcije definisani su optimalni uslovi fermentacije za dobijanje ekstrakta sa maksimalnim sadržajem ukupnih polifenola. Postupkom numeričke optimizacije dobijeni su sledeći uslovi fermentacije otpadne hajdučke trave bakterijom *L. rhamnosus*: vreme trajanja fermentacije je 24 h, koncentracija inokuluma je 10%, koncentracija podloge je 80%, a odnos tečne prema čvrstoj fazi je 1,99 ml/g. Pri navedenim uslovima Design expert je predvideo vrednost izlazne promenljive 334,32 mg GAE/g, a 95% PI 321,31 do 347,34 mg GAE/g. Izvođenjem fermentacije pod optimalnim uslovima dobijeno je $332,30 \pm 6,96$ mg GAE/g ukupnih polifenola u ekstraktu. S obzirom

na to da se dobijena vrednost izlazne promenljive uklapa u 95% interval predviđanja može se zaključiti da je model adekvatan i pouzdan.

Postupkom numeričke optimizacije dobijene su sledeći uslovi fermentacije otpadne hajdučke trave kvascem *S. boulardii*: vreme trajanja fermentacije je 49,3 h, koncentracija inokuluma je 3,3%, koncentracija podloge je 40%, a odnos tečne prema čvrstoj fazi je 1,00 ml/g. Pri navedenim uslovima Design expert je predvideo vrednost izlazne promenljive 277,31 mg GAE/g, a 95% PI 263,70 do 301,72 mg GAE/g. Izvođenjem fermentacije pod optimalnim uslovima dobijeno je $289,50 \pm 7,13$ mg GAE/g ukupnih polifenola u ekstraktu. S obzirom na to da je dobijena vrednost izlazne promenljive uklapa u 95% interval predviđanja može se zaključiti da je model adekvatan i pouzdan.

Bakterije mlečno-kiselinskog vrenja su i ranije korišćene za povećanje prinosa polifenola u ekstraktima, kao i za povećanje antioksidativne aktivnosti fermentacijom soje, jabuka i žitarica (Huynh et al., 2014). Fermentacijom ječmenog i zobenog brašna bakterijama *L. johnsonii*, *L. reuteri* i *L. acidophilus*, sadržaj slobodnih fenolnih kiselina se povećao 20 puta u poređenju sa nefermentisanom kontrolom, pri čemu je *L. johnsonii*, pokazao veću aktivnost od ostalih sojeva (Hole et al., 2012). U radu Đorđević i saradnika *L. rhamnosus* je korišćena u fermentaciji heljde, ječma, pšenice i raži, pri čemu se sadržaj polifenola nakon ekstrakcije povećao od 18 do 38%, u poređenju sa nefermentisanim uzorcima (Đorđević et al., 2010). *L. plantarum* je korišćen u fermentaciji bobica mirte i nakon fermentacije se sadržaj ukupnih polifenola povećao sa $135 \pm 2,35$ na $669,38 \pm 4,19$ mg GAE/g, što je uticalo na povećanje antioksidativne aktivnosti fermentisanih ekstrakata u odnosu na nefermentisane (Curiel et al., 2015). U ovom radu, nakon fermentacije hajdučke trave bakterijom *L. rhamnosus* u poređenju sa MAE ekstraktom sadržaj ukupnih polifenola u ekstraktu je povećan za 34,2%, što je slično rezultatima koji su objavljeni u radu Đorđević i saradnika (Đorđević et al., 2010).

U literaturi postoje podaci o upotrebi kvasca *S. cerevisiae* u fermentacionim procesima, dok *S. boulardii* nije ispitan. U ovom radu, nakon fermentacije hajdučke trave kvascem *S. boulardii* u poređenju sa MAE ekstraktom sadržaj ukupnih polifenola u ekstraktu je povećan za 17,0%. Znatno veće povećanje sadržaja polifenola je postignuto kada je *S. cerevisiae* korišćen u fermentaciji pšeničnih mekinja sa ciljem povećanja prinosa slobodnih polifenola. Fermentacijom se prinos *p*-kumarinske kiseline povećao za

48%, ferulinske kiselina za 51% i siringinske kiseline za 333%, u poređenju sa kontrolnim, nefermentisanim uzorkom. S druge strane sadržaj slobodne vanilinske kiseline se smanjio, verovatno kao posledica njegove konverzije u druge metabolite (Moore et al., 2007). Takođe, kada se uporedi povećanje prinosa ukupnih polifenola nakon fermentacije hajdučke trave bakterijom *L. rhamnosus* i kvascem *S. boulardii*, zaključuje se da se znatno veće povećanje postiže kada se hajdučka trava fermentiše bakterijom *L. rhamnosus*. Razlog ovakvom ponašanju mogu da budu različiti enzimi koje proizvode ova dva mikroorganizma tokom rasta na otpadnoj hajdučkoj travi, ali i činjenica da *S. boulardii* može koristiti neka polifenolna jedinjenja u svom metabolizmu, što utiče na smanjenje njihovog sadržaja u ekstraktu.

5.3.1.1.3 Poređenje biološke aktivnosti fermentisanog i nefermentisanog ekstrakta

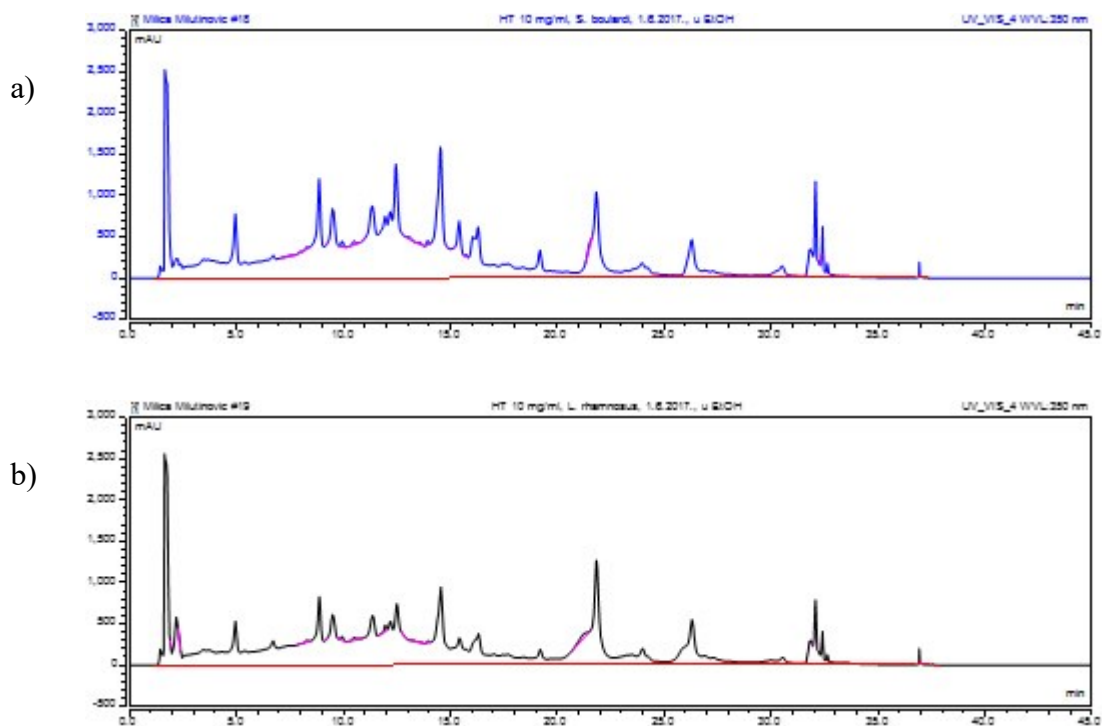
Nakon ekstrakcije polifenolnih jedinjenja iz fermentisanih uzoraka hajdučke trave, poređena je njihova biološka aktivnost sa uzorkom koji je dobijen na identičan način, ali nije inokulisan mikroorganizmima. Iz rezultata se može videti da se sadržaj ukupnih polifenola, flavonoida i antioksidativna aktivnost ekstrakata dobijenih nakon fermentacije korišćenjem oba mikroorganizma statistički značajno povećala ($p < 0,01$, tabela 5.26). IC_{50} vrednost za uzorak fermentisan bakterijom *L. rhamnosus* je iznosila $6,23 \pm 0,05 \mu\text{g/ml}$, za uzorak fermentisan kvascem *S. boulardii* $6,52 \pm 0,05 \mu\text{g/ml}$ i za nefermentisan uzorak $6,76 \pm 0,06 \mu\text{g/ml}$. Dobijene vrednosti ukazuju na to da su fermentisani ekstrakti pokazuju veoma visoku antioksidativnu vrednost koja je nešto niža od antioksidativne aktivnosti vitamina C ($5,97 \pm 0,08 \mu\text{g/ml}$), ali je i dalje niža od antioksidativne aktivnosti BHT ($3,03 \pm 0,03 \mu\text{g/ml}$) (Milutinović et al., 2013).

Tabela 5.26. Sadržaj polifenolnih jedinjenja i antioksidativna aktivnost ekstrakta nefermentisane hajdučke trave i ekstrakata hajdučke trave fermentisane bakterijom *L. rhamnosus* i kvascem *S. boulardii*

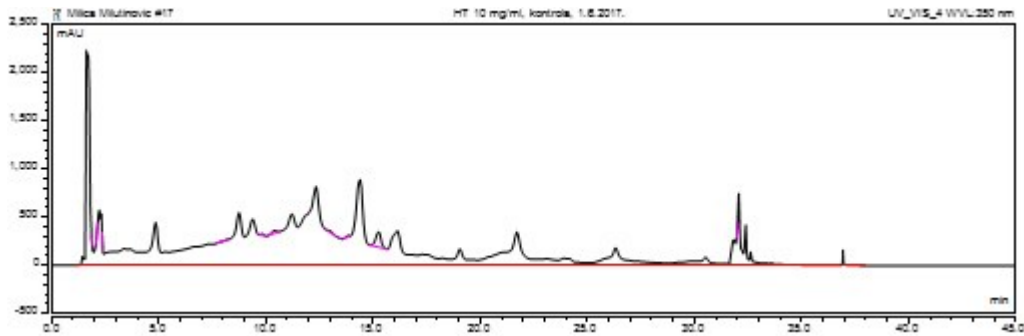
Uzorak	Sadržaj ukupnih polifenola, mg GAE/g	Sadržaj flavonoida, mg QE/g	Inhibicija DPPH radikala, %	FRAP, mM
Fermentisan - <i>L. rhamnosus</i>	332,30 ± 6,96 ^b	51,67 ± 0,87 ^b	80,30 ± 0,61 ^b	2,848 ± 0,021 ^b
Fermentisan - <i>S. boulardii</i>	289,50 ± 7,13 ^b	47,58 ± 0,92 ^b	76,63 ± 0,55 ^b	2,161 ± 0,007 ^b
Nefermentisan	231,26 ± 4,07 ^a	41,72 ± 0,70 ^a	73,95 ± 0,70 ^a	2,000 ± 0,008 ^a

* Vrednosti označene različitom slovnim oznakom (a, b) unutar pojedinih kolona se značajno razlikuju ($p = 0,01$).

Iz HPLC hromatograma se vidi da se profili ekstrahovanih polifenola nakon fermentacije probiotskim mikroorganizmima *L. rhamnosus* i *S. boulardii* razlikuju od profila nefermentisanog uzorka (slika 5.32).



c)



Slika 5.32. HPLC hromatogram MAE ekstrakata dobijenih nakon fermentacije hajdučke trave kvascem *S. boulardii* (a) i bakterijom *L. rhamnosus* (b) i nefermentisan ekstrakt hajdučke trave (c).

Zapravo, mikroorganizmi dok rastu na nekom supstratu proizvode enzime, kao što su celulaze, hemicelulaze, pektinaze, amilaze i glukanaze, kojima se oslobađaju vezani polifenoli, što može da objasni povećanje prinosa nekog polifenolnog jedinjenja nakon fermentacije (Shahidi & Yeo, 2016). Sa druge strane, mikroorganizmi proizvode i β -glukozidaze, kojima se glukozidi prevode u odgovarajuće aglikone, pri čemu mogu da koriste šećer za svoj rast, pa takvi ekstrakti mogu da sadrže iste koncentracije polifenola, ali da pokazuju veću antioksidativnu aktivnost, jer su aglikoni jači antioksidansi od glukozida (Heim et al., 2002; Marazza et al., 2012). Takođe, tokom fermentacije može da dođe i do smanjenja sadržaja ukupnih polifenola, ukoliko ih mikroorganizmi koriste kao supstrat za rast, pa i krajnji ekstrakt može da pokazuje manji sadržaj ukupnih polifenola i manju antioksidativnu aktivnost (Othman et al., 2009). Treba primetiti da su se FRAP redukciona moć i inhibicija DPPH radikala povećali nakon fermentacije, ali u različitoj meri. Ovo ukazuje na to da je hemijska transformacija polifenola u većoj meri uticala na sposobnost redukovanja jona gvožđa, što je verovatno od velikog značaja za inhibiciju mikroorganizama, koja je takođe povećana nakon fermentacije.

Antimikrobna aktivnost ekstrakta hajdučke trave, koji je prethodno fermentisan bakterijom *L. rhamnosus* se povećala prema svim Gram-pozitivnim bakterijama, dok je ostala nepromenjena prema Gram-negativnoj bakteriji *P. aeruginosa*, u odnosu na MAE ekstrakt hajdučke trave. Za fermentisan ekstrakt MIC vrednost za *S. aureus* je iznosila 0,31 mg/ml, za *E. faecalis* 2,5 mg/ml i za *L. monocytogenes* 0,62 mg/ml. Za MAE ekstrakt

MIC vrednost za *S. aureus* je iznosila 5,0 mg/ml, za *E. faecalis* 5,0 mg/ml i za *L. monocytogenes* 1,25 mg/ml.

Ekstrakt koji je dobijen nakon fermentacije kvascem *S. boulardii* je pokazao jaču antimikrobnu aktivnost prema *S. aureus*, *L. monocytogenes* i *P. aeruginosa*, u poređenju sa MAE ekstraktom. MIC vrednosti za *S. aureus* je iznosila 0,31 mg/ml, za *L. monocytogenes* 0,62 mg/ml i za *P. aeruginosa* 0,31 mg/ml, za fermentisani ekstrakt. MIC vrednost MAE ekstrakta bez fermentacije za *S. aureus* je iznosila 5,0 mg/ml, za za *L. monocytogenes* 1,25 mg/ml i za *P. aeruginosa* je iznosila 2,5 mg/ml..

U radu Rizzello i saradnika je pokazano da je značajno povećanje antimikrobne aktivnosti postignuto kada je ehinacea (*Echinacea purpurea*) fermentisana bakterijom *L. plantarum*. Kontrolni ekstrakt, koji nije bio fermentisan, nije pokazivao antimikrobnu aktivnost, dok je fermentisan ekstrakt imao značajnu antimikrobnu aktivnost prema Gram-pozitivnim i Gram-negativnim bakterijama (Rizzello et al., 2013).

Ekstrakti koji su dobijeni fermentacijom hajdučke trave bakterijom *L. rhamnosus* i kvascem *S. boulardii*, su pokazali i veću inhibiciju enzima AChE u poređenju sa MAE ekstraktom nefermentisanog uzorka. Pri koncentraciji ekstrakta od 500 µg/ml, inhibicija aktivnosti AChE uzorka fermentisanog bakterijom *L. rhamnosus* je iznosila 42,57%, kvascem *S. boulardii* 43,11%, dok je za nefermentisan uzorak iznosila 31,72%. Povećanje aktivnosti može da bude posledica povećanja sadržaja ukupnih polifenola i flavonoida, ali i različite strukture ekstrahovanih polifenolnih jedinjenja, nakon fermentacije mikroorganizmima.

5.3.2 Optimizacija uslova fermentacije rastavića mikroorganizmima *L. rhamnosus* i *S. boulardii*

U ovom delu rada su optimizovani uslovi za izvođenje procesa fermentacije otpadnog rastavića mikroorganizmima *S. boulardii* i *L. rhamnosus* sa ciljem dobijanja ekstrakata sa povećanim sadržajem polifenola, što bi u krajnjem cilju doprinelo povećanju biološke aktivnosti ekstrakta. Za optimizaciju je korišćena metoda odzivnih površina (RSM) i centralni kompozitni dizajn (CCD). Na osnovu preliminarnih ispitivanja izabrane su četiri procesne promenljive koje mogu uticati na sadržaj ukupnih polifenola u ekstraktu, a to su: vreme fermentacije (A), procenat inokuluma (B), procenat podloge (C) i odnos tečne i čvrste faze (D). Ekstrakt je nakon fermentacije dobijen primenom

optimalnih MAE uslova, a to su snaga mikrotalasnog zagrevanja 170 W, vreme ekstrakcije 81 s, odnos tečne i čvrste faze 45,4 ml/g i krajnja koncentracija etanola 54,5%. Praćen odziv sistema je bio sadržaj ukupnih polifenola u ekstraktima (Y) (tabela P-1.5).

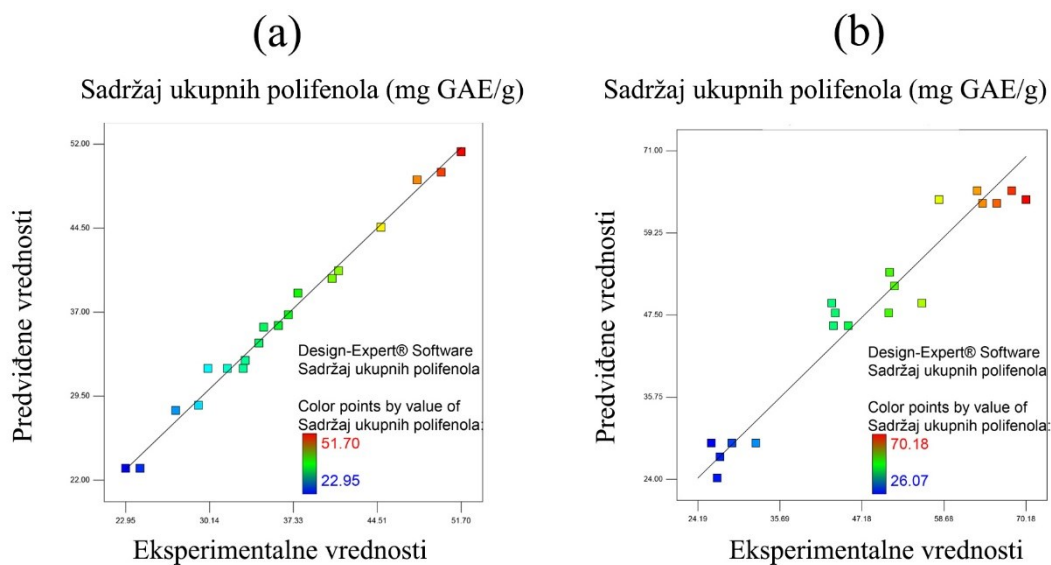
Analizom varijanse (ANOVA) je ocenjena adekvatnost i statistička značajnost modela. Vrednost koeficijenta determinacije (R^2) za matematički model sadržaja ukupnih polifenola u ekstraktu koji je dobijen kada je u fermentaciji korišćen *L. rhamnosus* je iznosio 0,984 i kada je u fermentaciji korišćen *S. boulardii* je iznosio 0,938, što ukazuje da postoji dobra korelacija između ekperimentalnih i modelom predviđenih vrednosti (tabela 5.27, slika 5.33). Takođe, u oba modela nedostatak fitovanja nije bio značajan, koeficijent varijacije je bio manji od 10%, a vrednost adekvatne preciznosti je bila veća od 4, što ukazuje da su modeli pouzdani i precizni.

Tabela 5.27. Analiza varijanse (ANOVA) modela dobijenih primenom višestruke regresione analize

Odziv	R^2	p -vrednost	F -vrednost	Koeficijent varijacije (%)	p -vrednost nedostatka fitovanja	Adekvatna preciznost
Y ₁	0,984	< 0,0001	38,44	4,66	0,4821	21,09
Y ₂	0,938	< 0,0001	23,89	9,77	0,3128	13,46

Y₁: sadržaj ukupnih polifenola u ekstraktu koji je fermentisan bakterijom *L. rhamnosus* (mg GAE/g s.m. ekstrakta);

Y₂: sadržaj ukupnih polifenola u ekstraktu koji je fermentisan kvascem *S. boulardii* (mg GAE/g s.m. ekstrakta).



Slika 5.33. Slaganje eksperimentalno dobijenih i predviđenih vrednosti sadržaja ukupnih polifenola u eksperimentalnom dizajnu fermentacije otpadnog rastavića bakterijom *L. rhamnosus* (a) i kvascem *S. boulardii* (b)

Ocena značajnosti uticaja procesnih promenljivih (vremena fermentacije, koncentracije inokuluma, koncentracije podloge i odnosa tečne i čvrste faze) na odziv sistema, na osnovu ANOVA statistike, data je u tabeli 5.28, a efekat odgovarajućih faktora je prikazan u daljem tekstu. Prilikom analize korišćena „backward“ regresija, pomoću koje su iz modela eliminisani članovi koji nisu značajno uticali na odziv ($p \geq 0,0500$).

Tabela 5.28. p vrednosti dobijene analizom varijanse (ANOVA) procesnih promenljivih u eksperimentalnom dizajnu fermentacije otpadnog rastavića bakterijom *L. rhamnosus* i kvascem *S. boulardii*

Faktor	p^* -vrednost Prob > F	
	Y ₁	Y ₂
A	< 0,0001	≥ 0,0500
B	0,0122	0,0037
C	0,0002	<0,0001
D	≥ 0,0500	≥ 0,0500
AB	≥ 0,0500	≥ 0,0500
AC	0,0004	≥ 0,0500
AD	0,0073	0,0318
BC	0,0083	≥ 0,0500
BD	0,0020	≥ 0,0500
CD	≥ 0,0500	≥ 0,0500
A ²	0,0010	< 0,0001
B ²	0,0088	0,0172
C ²	< 0,0001	0,0223
D ²	0,0003	0,0002

A: vreme fermentacije (h);

B: koncentracija inokuluma (%);

C: koncentracija podloge (%);

D: odnos tečno/čvrsto (ml/g);

Y₁: sadržaj ukupnih polifenola u ekstraktu koji je fermentisan bakterijom *L. rhamnosus* (mg GAE/g s.m. ekstrakta);

Y₂: sadržaj ukupnih polifenola u ekstraktu koji je fermentisan kvascem *S. boulardii* (mg GAE/g s.m. ekstrakta);

* $p < 0,01$ veoma značajno; $0,01 \leq p < 0,05$ značajno; $p \geq 0,05$ nije značajno.

5.3.2.1.1 Uticaj procesnih parametara na sadržaj ukupnih polifenola u ekstraktima

Primenom višestruke regresione analize dobijena je zavisnost između sadržaja ukupnih polifenola u oba modela i četiri nezavisne promenljive (vreme fermentacije, procenat inokuluma, procenat podloge i odnos tečne i čvrste faze), koja se može aproksimirati polinomima drugog reda:

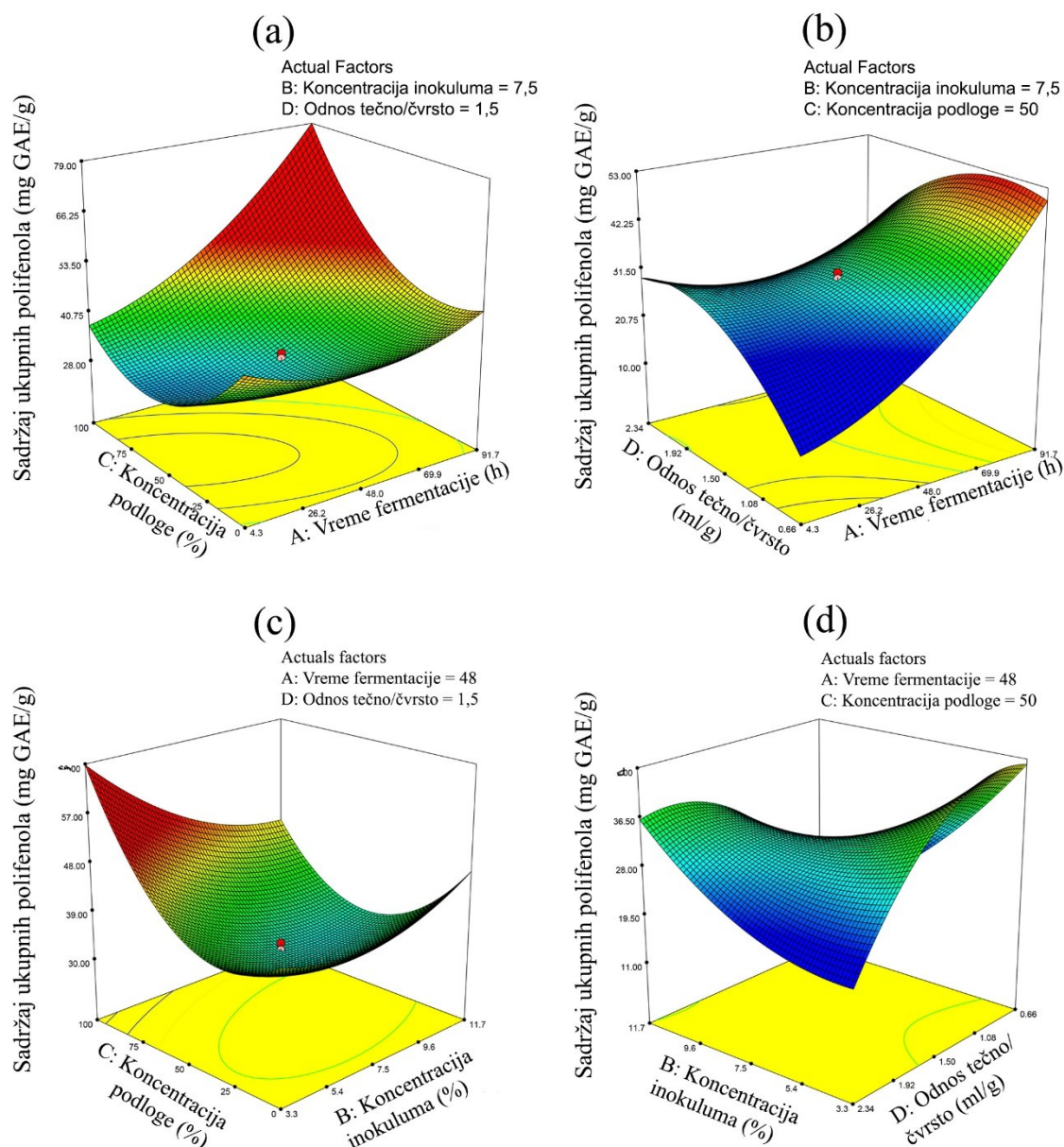
$$Y_1 = 31,97 + 6,18A - 2,38B + 3,36C + 3,74AC - 3,46AD - 2,17BC + 4,44BD + 2,52A^2 + 1,67B^2 + 4,84C^2 - 3,15D^2 \quad (5.15.)$$

$$Y_2 = 29,18 + 7,27B + 8,75C + 6,36AD + 12,31A^2 + 3,62B^2 + 3,44C^2 + 7,08D^2 \quad (5.16.)$$

gde su Y_1 (sadržaj ukupnih polifenola u ekstraktu rastavića fermentisanim bakterijom *L. rhamnosus*) i Y_2 (sadržaj ukupnih polifenola u ekstraktu rastavića fermentisanim kvascem *S. boulardii*) odzivi, a promenljive su A (vreme fermentacije), B (procenat inokuluma), C (procenat podloge) i D (odnos tečne i čvrste faze).

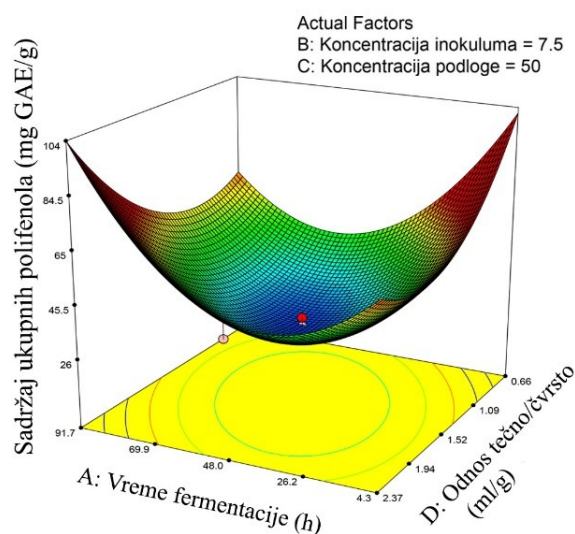
U slučaju fermentacije otpadnog rastavića bakterijom *L. rhamnosus*, sadržaj polifenola je u ekstraktima, nakon fermentacije i MAE ekstrakcije u zavisnosti od fermentacionih uslova, bio u opsegu od 22,95 do 51,70 mg GAE/g s.m. ekstrakta (tabela P-1.5). Višestruka regresiona analiza podataka ukazuje na to da su tri linearna člana (A, B i C), četiri interaktivna člana (AC, AD, BC i BD) i sva četiri kvadratna člana bila statistički značajna ($p < 0,05$, tabela 5.28). Prema jednačini zavisnosti sadržaja ukupnih polifenola u ekstraktima od promenljivih (jednačina 5.15), negativan uticaj na odziv su imali koncentracija inokuluma, dok su vreme fermentacije i koncentracija podloge imali pozitivan uticaj na sadržaj ukupnih polifenola u ekstraktu, nakon fermentacije i MAE. Takođe, maksimalne vrednosti sadržaja ukupnih polifenola u ekstraktima su više od dva puta veći od minimalnih koncentracija ukupnih polifenola, ukazujući na to da ispitivane procesne promenljive imaju veliki uticaj na sadržaj polifenolnih jedinjenja u ekstraktima, nakon fermentacije i MAE. Pozitivan predznak kvadratnih članova A^2 , B^2 i C^2 ukazuju na postojanje minimuma funkcije, dok negativan predznak člana D^2 ukazuje na postojanje maksimuma funkcije. Najveći uticaj na sadržaj ukupnih polifenola u ekstraktima je imalo vreme fermentacije ($p < 0,0001$), pri čemu se prinos polifenola povećavao kada je povećavano vreme fermentacije (slika 5.34a i b). Koncentracija dodate MRS podloge je takođe imala statistički značajan uticaj ($p < 0,05$) i kao i kod fermentacije hajdučke trave bakterijom *L. rhamnosus*, povećanjem koncentracije dodate podloge, povećavao se sadržaj polifenola (slika 5.34a i c). Koncentracija dodatog inokuluma takođe statistički značajno ($p < 0,05$) utiče na sadržaj ukupnih polifenola u ekstraktu i povećanje se postizalo smanjenjem koncentracije dodatog inokuluma (slika 5.34c i d), što je suprotno od rezultata dobijenih prilikom fermentacije hajdučke trave, ukazujući na značaj vrste supstrata tokom optimizacije uslova fermentacije. Linearan član odnos tečne prema čvrstoj fazi nije imao statistički značajan uticaj na sadržaj ukupnih polifenola u ekstraktima, ali je njegov kvadratni efekat i interakcija sa vremenom fermentacije i sa koncentracijom dodatog inokuluma bila statistički značajna ($p < 0,05$). Povećanje

sadržaja ukupnih polifenola u ekstraktu se postizalo smanjenjem odnosa tečne prema čvrstoj fazi (slika 5.34b i d).



Slika 5.34. Odzivne površine međusobnih uticaja: vremena fermentacije i koncentracije podloge (AC) pri koncentraciji inokuluma od 7,5% i odnosu tečno/čvrsto 1,5 ml/g (a), vremena fermentacije i odnosa tečno/čvrsto (AD) pri koncentraciji inokuluma od 7,5% i koncentraciji podloge od 50% (b), koncentracije inokuluma i koncentracije podloge (BC) pri vremenu fermentacije od 48 h i i odnosu tečno/čvrsto 1,5 ml/g (c) i koncentracije inokuluma i odnosa tečno/čvrsto (BD) pri vremenu fermentacije od 48 h i koncentraciji podloge od 50% (d) na sadržaj ukupnih polifenola u ekstraktu nakon fermentacije otpadnog rastavića bakterijom *L. rhamnosus* (Y_1).

Sadržaj ukupnih polifenola u ekstraktima, nakon fermentacije kvascem *S. boulardii* i MAE, je bio veći nego kada je u fermentaciji korišćen *L. rhamnosus* i varirao je u opsegu od 26,07 do 70,18 mg GAE/g (tabela P-1.5). Višestruka regresiona analiza podataka ukazuje na to da su dva linearna člana (B i C), jedan interaktivni član (AD) i sva četiri kvadratna člana bila statistički značajna ($p < 0,05$) (tabela 5.28). Prema jednačini zavisnosti sadržaja ukupnih polifenola u ekstraktima od promenljivih (jednačina 5.16), svi faktori imaju pozitivan uticaj na na odziv. Pozitivan predznak svih kvadratnih članova ukazuje na postojanje minimuma funkcije. Slično kao i kod fermentacije rastavića bakterijom *L. rhamnosus*, maksimalne vrednosti sadržaja ukupnih polifenola u ekstraktima su više od dva i po puta veći od minimalnih koncentracija ukupnih polifenola, što znači da ispitivane procesne promenljive imaju veliki uticaj na sadržaj polifenolnih jedinjenja u ekstraktima, nakon fermentacije i MAE. Sa slike 5.35 se vidi da se maksimalan sadržaj ukupnih polifenola u ekstraktima može postići ukoliko se fermentacija izvodi kraći vremenski period pri čemu je manji odnos tečne prema čvrstoj fazi ili ukoliko se fermentacija izvodi duži vremenski period, pri čemu je veći odnos tečne prema čvrstoj fazi.



Slika 5.35. Odzivne površine međusobnih uticaja: vremena fermentacije i odnosa tečno/čvrsto (AD) pri koncentraciji inokuluma od 7,5% i koncentraciji podloge od 50% na sadržaj ukupnih polifenola u ekstraktu nakon fermentacije otpadnog rastavića kvascem *S. boulardii* (Y_2).

5.3.2.1.2 Validacija modela

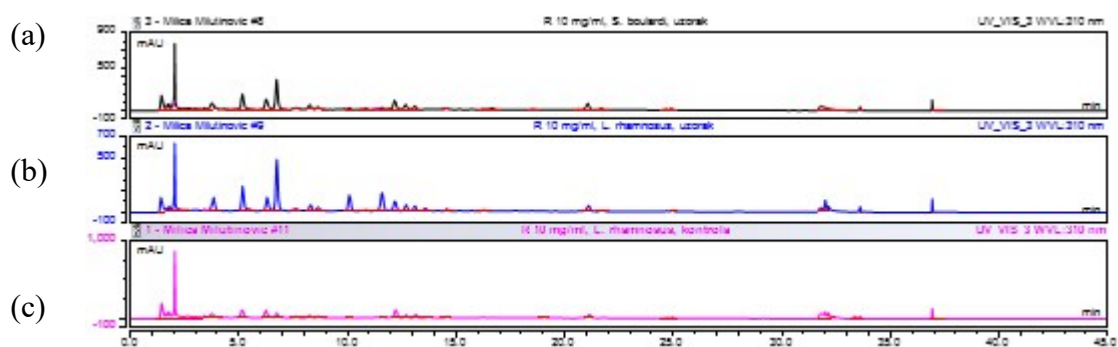
Primenom metode željene funkcije definisani su optimalni uslovi fermentacije za dobijanje ekstrakta sa maksimalnim sadržajem ukupnih polifenola. Postupkom numeričke optimizacije dobijeni su sledeći uslovi fermentacije otpadnog rastavića bakterijom *L. rhamnosus*: vreme trajanja fermentacije je 71,6 h, koncentracija inokuluma je 5,4%, koncentracija dodate MRS podloge je 71%, a odnos tečne prema čvrstoj fazi je 1,17 ml/g. Pri navedenim uslovima Design expert je predvideo da je sadržaj ukupnih polifenola u ekstraktu 54,04 mg GAE/g, a 95% PI 49,14 do 58,93 mg GAE/g. Izvođenjem fermentacije pod optimalnim uslovima dobijeno je $56,3 \pm 8,66$ mg GAE/g ukupnih polifenola u ekstraktu. S obzirom na to da je dobijena vrednost izlazne promenljive uklapa u 95% interval predviđanja može se zaključiti da je model adekvatan i pouzdan.

Numeričkom analizom su dobijeni i optimalni uslovi i za izvođenje fermentacije otpadnog rastavića kvascem *S. boulardii*. Pri tome je program predvideo da se maksimalan sadržaj ukupnih polifenola u ekstraktima može postići primenom dva načina fermentacije. U prvom je vreme fermentacije iznosilo 22,2 h, koncentracija inokuluma 9,9%, koncentracija dodate podloge 75% i odnos tečne prema čvrstoj fazi 1,08 ml/g. I pri ovim uslovima je program predvideo da će nakon fermentacije i ekstrakcije da se dobije 71,23 mg GAE/g. U drugom predloženom modelu fermentacije, vreme trajanja fermentacije je 73,5 h, koncentracija inokuluma je 8,9%, koncentracija dodate TSB podloge 79% i odnos tečno/čvrsto 1,97 ml/g. Program je predvideo da je vrednost izlaza 70,20 mg GAE/g. S obzirom na to da se dva predložena modela izvođenja fermentacije razlikuju u vremenu i odnosu tečno/čvrsto, izabran je prvi model, u kom je fermentacija trajala 22,2 h i odnos tečno/čvrsto bilo 1,08 ml/g. Izvođenjem fermentacije pod optimalnim uslovima dobijeno je $79,87 \pm 0,97$ mg GAE/g ukupnih polifenola u ekstraktu, a kako se dobijena vrednost izlazne promenljive uklapa u 95% interval predviđanja (od 56,95 do 83,95 mg GAE/g) može se zaključiti da je model adekvatan i pouzdan.

5.3.2.1.3 Poređenje biološke aktivnosti fermentisanog i nefermentisanog ekstrakta

Dalje se u radu poredila biološka aktivnost fermentisanih ekstrakata i nefermentisanog ekstrakta, koji je dobijen pod identičnim uslovima, s tim što nije inokulisan mikroorganizmima.

Sadržaj ukupnih polifenola, flavonoida i antioksidativna aktivnost, izražena i preko inhibicije DPPH radikala i redukcije gvožđa je prikazan u tabeli 5.29. Iz rezultata se jasno može videti da se sadržaj ukupnih polifenola statistički značajno povećao samo kada je rastavić fermentisan kvascem *S. boulardii*, dok se čak malo smanjio kada je u fermentaciji korišćena bakterija *L. rhamnosus*. Sadržaj flavonoida se malo povećao fermentacijom bakterijom *L. rhamnosus*, dok se značajno povećao kada je rastavić fermentisan kvascem *S. boulardii*. Međutim, što se tiče antioksidativne aktivnost ekstrakata, značajno povećanje je postignuto u ekstraktima koji su dobijeni kada su u fermentaciji korišćena oba mikroorganizma, pri čemu je veće povećanje postignuto kada je kao mikroorganizam korišćen *S. boulardii*. IC₅₀ vrednost za uzorak koji je dobijen nakon fermentacije bakterijom *L. rhamnosus* je iznosila 19,32 ± 0,05%, za uzorak koji je dobijen nakon fermentacije kvascem *S. boulardii* 16,03 ± 0,27% dok je za nefermentisan uzorak iznosila 23,58 ± 0,15 µg/ml. Iz HPLC hromatograma se vidi da se profili ekstrahovanih polifenola nakon fermentacije bakterijom *L. rhamnosus* razlikuje od profila nefermentisanog ekstrakta, dok je profil ekstrakta koji je fermentisan *S. boulardii* isti kao i profil nefermentisanog ekstrakta, ali je koncentracija ekstrahovanih jedinjenja povećana (slika 5.36).



Slika 5.36. HPLC hromatogram MAE ekstrakata dobijenih nakon fermentacije rastavića kvascem *S. boulardii* (a) i bakterijom *L. rhamnosus* (b) i nefermentisan ekstrakt rastavića (c)

Ovo ukazuje da se fermentacijom samo pomoću *L. rhamnosus* dobijaju različiti polifenoli, koji očigledno imaju drugačije biološke aktivnosti, dok je dostupnost polifenola povećana fermentacijom pomoću kvasca *S. boulardii*.

Tabela 5.29. Sadržaj bioaktivnih jedinjenja i antioksidativna aktivnost ekstrakta nefermentisanog rastavića i ekstrakata rastavića fermentisanog bakterijom *L. rhamnosus* i kvascem *S. boulardii*

Uzorak	Sadržaj ukupnih polifenola, mg GAE/g	Sadržaj flavonoida, mg QE/g	Inhibicija DPPH radikala, %	FRAP, mM
Fermentisan - <i>L. rhamnosus</i>	56,30 ± 8,66 ^a	6,55 ± 0,22 ^a	25,88 ± 0,17 ^b	0,577 ± 0,05 ^b
Fermentisan - <i>S. boulardii</i>	79,87 ± 0,97 ^b	10,39 ± 0,72 ^b	31,18 ± 0,29 ^b	0,630 ± 0,05 ^b
Nefermentisan	58,69 ± 3,08 ^a	5,42 ± 0,70 ^a	21,22 ± 0,77 ^a	0,377 ± 0,05 ^a

* Vrednosti označene različitom slovnom oznakom (a, b) unutar pojedinih kolona se značajno razlikuju ($p = 0,01$).

Fermentacija rastavića nije značajno promenila antimikrobnu aktivnost koja se povećala samo kod ekstrakta koji je dobijen fermentacijom bakterijom *L. rhamnosus* prema bakteriji *E. faecalis*. MIC vrednost je smanjena sa 10 na 5 mg/ml. Sa druge strane, fermentacijom rastavića kvascem *S. boulardii* se nije postiglo poboljšanje antimikrobne aktivnosti. Wen i saradnici su dobili slične rezultate, i to prilikom fermentacije otpada koji je dobijen nakon pripreme čaja od lekovitih biljaka *Magnolia officinalis* i *Glycyrrhizae radix*, a mikroorganizam koji je korišćen u fermentaciji je *Aspergillus oryzae*. Nakon fermentacije se sadržaj polifenola povećao kod *M. officinalis* dok se kod *G. radix* malo smanjio. Međutim, ispitivanjem antimikrobne aktivnosti je utvrđeno da se aktivnost uzorka *M. officinalis* dobijenog nakon fermentacije smanjila u poređenju sa nefermentisanim uzorkom *M. officinalis* prema *L. monocytogenes* BCRC 14848 i *S. aureus* BCRC 15211. S druge strane kod uzorka *G. radix*, koji je dobijen nakon fermentacije, antimikrobna aktivnost se povećala prema *S. aureus* BCRC 12154 i *S. enterica* BCRC 12948, u odnosu na nefermentisan uzorak *G. radix*, iako je krajnja koncentracija polifenola bila manja, što ukazuje na to da antimikrobna aktivnost zavisi od strukture ekstrahovanih polifenolnih jedinjenja, a ne samo od koncentracije polifenola (Wen et al., 2013).

6 ZAKLJUČAK

Na osnovu analize svih dobijenih rezultata, koji su prikazani u prethodnom poglavlju, izvedeni su sledeći zaključci:

- Razvijena je metoda mikrotalasne ekstrakcije polifenola iz otpadne jagorčevine, kojom se za kraće vreme postiže skoro isti prinos polifenolnih jedinjenja kao u ekstraktu koji je dobijen klasičnom metodom ekstrakcije.
- 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.
- Optimalni uslovi mikrotalasne ekstrakcije za dobijanje maksimalnog sadržaja ukupnih polifenola u ekstraktu iz otpadne jagorčevine su: vreme trajanja ekstrakcije 80 s, koncentracija etanola 49%, odnos rastvarač/čvrsta faza 35 ml/g i mikrotalasna snaga 170 W.
- Pod optimalnim uslovima iz otpadne jagorčevine je ekstrahovano $130,73 \pm 3,51$ mg GAE/g ukupnih polifenola. Antioksidativna aktivnost, izražena preko inhibicije DPPH radikala je iznosila $28,45 \pm 2,12\%$ i izražena preko redukcije gvožđa $0,895 \pm 0,037$ mmol/l.
- Optimalni uslovi mikrotalasne ekstrakcije za dobijanje maksimalnog sadržaja ukupnih polifenola u ekstraktu sa maksimalnom antioksidativnom aktivnošću iz otpadne hajdučke trave su: vreme trajanja ekstrakcije 33 s, koncentracija etanola 70%, odnos rastvarač/čvrsta faza 40 ml/g i mikrotalasna snaga 170 W.
- Pod optimalnim uslovima iz otpadne hajdučke trave je ekstrahovano $237,74 \pm 2,08$ mg GAE/g ukupnih polifenola i $42,95 \pm 1,32$ mg QE/g flavonoida. Antioksidativna aktivnost, izražena preko inhibicije DPPH radikala je iznosila $71,72 \pm 2,12\%$ i izražena preko redukcije gvožđa $2,023 \pm 0,015$ mmol/l.
- Optimalni uslovi mikrotalasne ekstrakcije za dobijanje maksimalnog sadržaja ukupnih polifenola u ekstraktu sa maksimalnom antioksidativnom aktivnošću iz otpadnog rastavića su: vreme trajanja ekstrakcije 81 s, koncentracija etanola 54,5%, odnos rastvarač/čvrsta faza 45,4 ml/g i mikrotalasna snaga 170 W.
- Pod optimalnim uslovima iz otpadnog rastavića je ekstrahovano $161,57 \pm 1,24$ mg GAE/g ukupnih polifenola i $33,55 \pm 1,28$ mg QE/g flavonoida. Antioksidativna

aktivnost, izražena preko inhibicije DPPH radikala je iznosila $33,33 \pm 0,43\%$ i izražena preko redukcije gvožđa $0,918 \pm 0,007$ mmol/l.

- Svi dobijeni ekstrakti su pokazali antimikrobnu aktivnost, pri čemu je najveću antimikrobnu aktivnost prema plesnima pokazao ekstrakt jagorčevine. Prvi put je pokazano da ekstrakt jagorčevine inhibira rast *A. niger*, *F. graminearum*, *F. verticillioides* i *F. proliferatum*. Pri najvećoj testiranoj koncentraciji ekstrakta jagorčevine (5 mg/ml) inhibicija rasta plesni *A. niger* je iznosila 90,00%, *F. graminearum* 60,00%, *F. verticillioides* 100% i *F. proliferatum* 55,56%.
- Ekstrakt hajdučke trave je inhibirao rast svih testiranih Gram-pozitivnih bakterija (*E. faecalis*, *S. aureus* i *L. monocytogenes*) i jedne testirane Gram-negativne bakterije (*P. aeruginosa*). Od ispitanih plesni je inhibirao rast samo *F. graminearum*. MIC vrednosti ekstrakta hajdučke trave za *E. faecalis* je iznosila 5,0 mg/ml, za *S. aureus* 5,0 mg/ml, za *L. monocytogenes* 1,25 mg/ml i za *P. aeruginosa* 2,5 mg/ml. Pri najvećoj testiranoj koncentraciji ekstrakta hajdučke trave (5 mg/ml) inhibicija rasta plesni *F. graminearum* je iznosila 16,00%.
- Ekstrakt rastavića je inhibirao rast svih testiranih Gram-pozitivnih bakterija (*E. faecalis*, *S. aureus* i *L. monocytogenes*). Od ispitanih plesni je inhibirao rast *A. niger*, *F. graminearum*, *F. verticillioides* i *F. proliferatum*. MIC vrednosti ekstrakta rastavića za *E. faecalis* je iznosila 10,0 mg/ml, za *S. aureus* 5,0 mg/ml i za *L. monocytogenes* 1,25 mg/ml. Pri najvećoj testiranoj koncentraciji ekstrakta rastavića (5 mg/ml) inhibicija rasta plesni *F. graminearum* je iznosila 20,00%, *F. verticillioides* 33,33% i *F. proliferatum* 27,78%.
- Ekstrakt hajdučke trave je stimulisao rast probiotskih mikroorganizama *L. rhamnosus* i *S. boulardii*, pri čemu je najveća stimulacija rasta postignuta kada je ekstrakt dodat hranljivoj podlozi u krajnjoj koncentraciji 1 mg/ml za *L. rhamnosus* i 0,5 mg/ml za *S. boulardii*.
- Ekstrakt rastavića je stimulisao rast *S. boulardii*, a najveća stimulacija rasta je postignuta pri koncentraciji ekstrakta 2,5 mg/ml.
- Svi ekstrakti su inhibirali aktivnost enzima acetilholinesteraze, a najveću inhibitornu aktivnost je pokazao ekstrakt jagorčevine. Pri najvećoj testiranoj koncentraciji od 1 mg/ml inhibicija je iznosila $63,23 \pm 5,83\%$.

- Fermentacijom otpadne hajdučke trave probiotskim mikroorganizmima *L. rhamnosus* i *S. boulardii* je povećan sadržaj ukupnih polifenolnih jedinjenja u ekstraktima, a dobijeni ekstrakti su imali veću antioksidativnu i antimikrobnu aktivnost u poređenju sa nefermentisanim uzorkom.
- Optimalni uslovi fermentacije otpadne hajdučke trave bakterijom *L. rhamnosus* za dobijanje maksimalnog sadržaja ukupnih polifenola u ekstraktu su: vreme trajanja fermentacije 24 h, koncentracija inokuluma je 10%, koncentracija podloge je 80%, a odnos tečne prema čvrstoj fazi je 1,99 ml/g. Pod optimalnim uslovima, nakon fermentacije i ekstrakcije, je dobijeno $332,30 \pm 6,96$ mg GAE/g.
- Dobijeni ekstrakt je pokazivao veću antioksidativnu i antimikrobnu aktivnost u poređenju sa nefermentisanim ekstraktom. Antioksidativna aktivnost, izražena preko inhibicije DPPH radikala je iznosila $80,30 \pm 0,61\%$, a izražena preko redukcije gvožđa, je iznosila $2,848 \pm 0,021$ mmol/l. MIC vrednosti za *S. aureus* je iznosila 0,31 mg/ml, za *E. faecalis* 2,5 mg/ml i za *L. monocytogenes* 0,62 mg/ml.
- Optimalni uslovi fermentacije otpadne hajdučke trave kvascem *S. boulardii* za dobijanje maksimalnog sadržaja ukupnih polifenola u ekstraktu su: vreme trajanja fermentacije 49,3 h, koncentracija inokuluma je 3,3%, koncentracija podloge je 40%, a odnos tečne prema čvrstoj fazi je 1,00 ml/g. Pod optimalnim uslovima, nakon fermentacije i ekstrakcije, je dobijeno $289,50 \pm 7,13$ mg GAE/g.
- Dobijeni ekstrakt je pokazivao veću antioksidativnu i antimikrobnu aktivnost u poređenju sa nefermentisanim ekstraktom. Antioksidativna aktivnost, izražena preko inhibicije DPPH radikala je iznosila $76,63 \pm 0,55\%$, a izražena preko redukcije gvožđa $2,161 \pm 0,007$ mmol/l. MIC vrednosti za *S. aureus* je iznosila 0,31 mg/ml, za *L. monocytogenes* 0,62 mg/ml i za *P. aeruginosa* 0,31 mg/ml.
- Povećanje sadržaja ukupnih polifenola u ekstraktu nakon fermentacije otpadnog rastavića je postignuto samo kada je rastavić fermentisan kvacem *S. boulardii*. Međutim, 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 je pokazao samo ekstrakt koji je dobijen nakon fermentacije bakterijom *L. rhamnosus*.

- Optimalni uslovi fermentacije otpadnog rastavića bakterijom *L. rhamnosus* za dobijanje maksimalnog sadržaja ukupnih polifenola u ekstraktu su: vreme trajanja fermentacije 71,6 h, koncentracija inokuluma je 5,4%, koncentracija podloge je 71%, a odnos tečne prema čvrstoj fazi je 1,17 ml/g. Pod optimalnim uslovima, nakon fermentacije i ekstrakcije, je dobijeno $56,3 \pm 8,66$ mg GAE/g.
- Dobijeni ekstrakt je pokazivao veću antioksidativnu i antimikrobnu aktivnost u poređenju sa nefermentisanim ekstraktom. Antioksidativna aktivnost, izražena preko inhibicije DPPH radikala je iznosila $25,88 \pm 0,17\%$, a preko redukcije gvožđa $0,577 \pm 0,05$ mmol/l. MIC vrednosti za *E. faecalis* je iznosila 5,0 mg/ml.
- Optimalni uslovi fermentacije otpadnog rastavića kvascem *S. boulardii* za dobijanje maksimalnog sadržaja ukupnih polifenola u ekstraktu su: vreme trajanja fermentacije 22,2 h, koncentracija inokuluma je 9,9%, koncentracija podloge je 75%, a odnos tečne prema čvrstoj fazi je 1,08 ml/g. Pod optimalnim uslovima, nakon fermentacije i ekstrakcije, je dobijeno $79,87 \pm 0,97$ mg GAE/g.
- Dobijeni ekstrakt je pokazivao veću antioksidativnu aktivnost u poređenju sa nefermentisanim ekstraktom. Antioksidativna aktivnost, izražena preko inhibicije DPPH radikala je iznosila $31,18 \pm 0,29\%$, a preko redukcije gvožđa $0,630 \pm 0,05$ mmol/l.

Na osnovu dobijenih rezultata i detaljnog literaturnog pregleda, naučni doprinos ove disertacije se ogleda u tome što je pokazano da se otpad iz prerade lekovitih biljaka može iskoristiti za dobijanje ekstrakata sa različitim biološkim svojstvima, uz potencijalno korišćenje biotehnoloških postupaka za poboljšanje prinosa polifenola. 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 ekstrakata 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 ekstrakata, 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. Optimizacijom mikrotalasne ekstrakcije definisani su uslovi za brzu proizvodnju biljnih ekstrakata poboljšane biološke aktivnosti u odnosu na klasičnu ekstrakciju.

7 LITERATURA

1. Acosta-Estrada, B.A., Gutiérrez-Urbe, J.A., Serna-Saldívar, S.O. 2014. Bound phenolics in foods, a review. *Food Chem.*, **152**, 46-55.
2. Ahmad, J., Langrish, T. 2012. Optimisation of total phenolic acids extraction from mandarin peels using microwave energy: The importance of the Maillard reaction. *J. Food Eng.*, **109**(1), 162-174.
3. Ajila, C., Brar, S., Verma, M., Tyagi, R., Godbout, S., Valero, J. 2011. Extraction and analysis of polyphenols: recent trends. *Crit. Rev. Biotech.*, **31**(3), 227-249.
4. Akram, M. 2013. Minireview on *Achillea millefolium* Linn. *J. Membr. Biol.*, **246**(9), 661-663.
5. Alberto, M.R., Fariás, M.E., Manca de Nadra, M.C. 2001. Effect of gallic acid and catechin on *Lactobacillus hilgardii* 5w growth and metabolism of organic compounds. *J. Agric. Food Chem.*, **49**(9), 4359-4363.
6. Applequist, W.L., Moerman, D.E. 2011. Yarrow (*Achillea millefolium* L.): A Neglected Panacea? A Review of Ethnobotany, Bioactivity, and Biomedical Research. *Econ. Bot.*, **65**(2), 209-225.
7. Arasi, M.A.S.A.G., Rao, M.G., Bagyalakshmi, J. 2016. Optimization of microwave-assisted extraction of polysaccharide from *Psidium guajava* L fruits. *Int. J. Biol. Macromolec.*
8. Aslam, K., Nawchoo, I.A., Bhat, M.A., Ganie, A.H., Aslam, N. 2014. Ethnopharmacological review of genus *Primula*. *Int. J. Adv. Res.*, **2**(4), 29-34.
9. Axelsson, L. 1998. Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology. in: *Lactic Acid Bacteria: Microbiology and Functional Aspects*, (Eds.) S. Salminen, A.v. Wright, A. Ouwehand, Marcel Dekker, Inc.
10. Balasundram, N., Sundram, K., Samman, S. 2006. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chem.*, **99**(1), 191-203.
11. Ballard, T., Mallikarjunan, P., Zhou, K., O'Keefe, S. 2010. Microwave-assisted extraction of phenolic antioxidant compounds from peanut skins. *Food Chem.*, **120**(4), 1185-1192.

12. Balouiri, M., Sadiki, M., Ibsouda, S.K. 2016. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, **6**(2), 71-79.
13. Baras, J., Dimitrijević-Branković, S., Rakin, M., Stevović, B. 2000. Usporedna ispitivanja aktivnosti sojeva bakterija mlečno-kiselinskog vrenja u soku cvekle i mrkve. *Acta periodica technologica*(31), 609-615.
14. Barile, E., Bonanomi, G., Antignani, V., Zolfaghari, B., Sajjadi, S.E., Scala, F., Lanzotti, V. 2007. Saponins from *Allium minutiflorum* with antifungal activity. *Phytochem.*, **68**(5), 596-603.
15. Baş, D., Boyacı, İ.H. 2007. Modeling and optimization I: Usability of response surface methodology. *J. Food Eng.*, **78**(3), 836-845.
16. Başbülbül, G., Özmen, A., Biyik, H.H., Şen, Ö. 2008. Antimitotic and antibacterial effects of the *Primula veris* L. flower extracts. *Caryologia*, **61**(1), 88-91.
17. Benedek, B., Gjoncaj, N., Saukel, J., Kopp, B. 2007. Distribution of phenolic compounds in Middleeuropean taxa of the *Achillea millefolium* L. aggregate. *Chem. Biodivers.*, **4**(5), 849-857.
18. Benedek, B., Kopp, B. 2007. *Achillea millefolium* L. sl revisited: recent findings confirm the traditional use. *Wien. Med. Wochenschr.*, **157**(13-14), 312-314.
19. Benetis, R., Radušienė, J., Jakštis, V., Janulis, V., Malinauskas, F. 2008. Development of an RP-HPLC Method for the Analysis of Phenolic Compounds in *Achillea millefolium* L. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, **31**(4), 596-610.
20. Bezerra, M.A., Santelli, R.E., Oliveira, E.P., Villar, L.S., Escalera, L.A. 2008. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta*, **76**(5), 965-977.
21. Bialonska, D., Kasimsetty, S.G., Schrader, K.K., Ferreira, D. 2009. The effect of pomegranate (*Punica granatum* L.) byproducts and ellagitannins on the growth of human gut bacteria. *J. Agric. Food Chem.*, **57**(18), 8344-8349.
22. Bobbarala, V., Katikala, P.K., Naidu, K.C., Penumajji, S. 2009. Antifungal activity of selected plant extracts against phytopathogenic fungi *Aspergillus niger* F2723. *Indian J. Sci. Technol.*, **2**(4), 87-90.

23. Bouras, M., Chadni, M., Barba, F.J., Grimi, N., Bals, O., Vorobiev, E. 2015. Optimization of microwave-assisted extraction of polyphenols from *Quercus* bark. *Ind. Crop. Prod.*, **77**, 590-601.
24. Box, G.E., Wilson, K. 1951. On the experimental attainment of optimum conditions. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)*, **13**(1), 1-45.
25. Božin, B., Kladar, N., Grujić, N., Anačkov, G., Samojlik, I., Gavarić, N., Čonić, B.S. 2013. Impact of origin and biological source on chemical composition, anticholinesterase and antioxidant properties of some St. John's wort species (*Hypericum* spp., *Hypericaceae*) from the Central Balkans. *Molecules*, **18**(10), 11733-11750.
26. Bravo, L. 1998. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr. Rev.*, **56**(11), 317-333.
27. Burns, A., Rowland, I. 2000. Anti-carcinogenicity of probiotics and prebiotics. *Curr. Issues Mol. Biol.*, **1**(1), 13-24.
28. Bye, R., Thingstad, S.F., Paulsen, B.S. 2010. Horsetail (*Equisetum* spp.) as a Source of Silicon Supplement in Human Nutrition—A Myth? *J. Herbs Spices Med. Plants*, **16**(2), 119-125.
29. Camel, V. 2000. Microwave-assisted solvent extraction of environmental samples. *Trends Anal. Chem.*, **19**(4), 229-248.
30. Candan, F., Unlu, M., Tepe, B., Daferera, D., Polissiou, M., Sökmen, A., Akpulat, H.A. 2003. Antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil and methanol extracts of *Achillea millefolium* subsp. *millefolium* Afan.(Asteraceae). *J. Ethnopharmacol.*, **87**(2), 215-220.
31. Carocho, M., Ferreira, I.C. 2013. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food Chem. Toxicol.*, **51**, 15-25.
32. Chang, C.-C., Yang, M.-H., Wen, H.-M., Chern, J.-C. 2002. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *J. Food Drug Anal.*, **10**(3).
33. Chassy, A.W., Bui, L., Renaud, E.N., Van Horn, M., Mitchell, A.E. 2006. Three-year comparison of the content of antioxidant microconstituents and several

- quality characteristics in organic and conventionally managed tomatoes and bell peppers. *J. Agric. Food Chem.*, **54**(21), 8244-8252.
34. China, R., Mukherjee, S., Sen, S., Bose, S., Datta, S., Koley, H., Ghosh, S., Dhar, P. 2012. Antimicrobial activity of *Sesbania grandiflora* flower polyphenol extracts on some pathogenic bacteria and growth stimulatory effect on the probiotic organism *Lactobacillus acidophilus*. *Microbiol. Res.*, **167**(8), 500-506.
 35. Chung, K.-T., Lu, Z., Chou, M. 1998. Mechanism of inhibition of tannic acid and related compounds on the growth of intestinal bacteria. *Food Chem. Toxicol.*, **36**(12), 1053-1060.
 36. Chupin, L., Maunu, S.L., Reynaud, S., Pizzi, A., Charrier, B., Charrier-El Bouhtoury, F. 2015. Microwave assisted extraction of maritime pine (*Pinus pinaster*) bark: Impact of particle size and characterization. *Ind. Crop. Prod.*, **65**(0), 142-149.
 37. Costa, N.R., Lourenço, J., Pereira, Z.L. 2011. Desirability function approach: a review and performance evaluation in adverse conditions. *Chemometr. Intell. Lab.*, **107**(2), 234-244.
 38. Cowan, M.M. 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clin. Microbiol. Rev.*, **12**(4), 564-582.
 39. Csupor-Löffler, B., Hajdú, Z., Zupkó, I., Réthy, B., Falkay, G., Forgo, P., Hohmann, J. 2009. Antiproliferative effect of flavonoids and sesquiterpenoids from *Achillea millefolium* sl on cultured human tumour cell lines. *Phytother. res.*, **23**(5), 672-676.
 40. Cueva, C., Moreno-Arribas, M.V., Martín-Álvarez, P.J., Bills, G., Vicente, M.F., Basilio, A., Rivas, C.L., Requena, T., Rodríguez, J.M., Bartolomé, B. 2010. Antimicrobial activity of phenolic acids against commensal, probiotic and pathogenic bacteria. *Res. Microbiol.*, **161**(5), 372-382.
 41. Curiel, J.A., Pinto, D., Marzani, B., Filannino, P., Farris, G.A., Gobbetti, M., Rizzello, C.G. 2015. Lactic acid fermentation as a tool to enhance the antioxidant properties of *Myrtus communis* berries. *Microb. Cell Fact.*, **14**(1), 67.
 42. Currie, H.A., Perry, C.C. 2007. Silica in plants: biological, biochemical and chemical studies. *Ann. Bot.*, **100**(7), 1383-1389.

43. Cushnie, T.P.T., Lamb, A.J. 2005. Antimicrobial activity of flavonoids. *Int. J. Antimicrob. Agents*, **26**, 343–356.
44. Cuvelier, M.-E., Richard, H., Berset, C. 1992. Comparison of the antioxidative activity of some acid-phenols: structure-activity relationship. *Biosci. Biotechnol. Biochem*, **56**(2), 324-325.
45. Czerucka, D., Piche, T., Rampal, P. 2007. Review article: yeast as probiotics—*Saccharomyces boulardii*. *Aliment. Pharmacol. Ther.*, **26**(6), 767-778.
46. Čanadanović-Brunet, J.M., Četković, G.S., Djilas, S.M., Tumbas, V.T., Savatović, S.S., Mandić, A.I., Markov, S.L., Cvetković, D.D. 2009. Radical scavenging and antimicrobial activity of horsetail (*Equisetum arvense* L.) extracts. *Int. J. Food Sci. Tech.*, **44**(2), 269-278.
47. Četojević-Simin, D.D., Čanadanović-Brunet, J.M., Bogdanović, G.M., Djilas, S.M., Četković, G.S., Tumbas, V.T., Stojiljković, B.T. 2010. Antioxidative and antiproliferative activities of different horsetail (*Equisetum arvense* L.) extracts. *J. Med. Food*, **13**(2), 452-459.
48. Dahmoune, F., Boulekbache, L., Moussi, K., Aoun, O., Spigno, G., Madani, K. 2013. Valorization of *Citrus limon* residues for the recovery of antioxidants: Evaluation and optimization of microwave and ultrasound application to solvent extraction. *Ind. Crop. Prod.*, **50**, 77-87.
49. Dahmoune, F., Nayak, B., Moussi, K., Remini, H., Madani, K. 2015. Optimization of microwave-assisted extraction of polyphenols from *Myrtus communis* L. leaves. *Food Chem.*, **166**, 585-595.
50. Dahmoune, F., Spigno, G., Moussi, K., Remini, H., Cherbal, A., Madani, K. 2014. *Pistacia lentiscus* leaves as a source of phenolic compounds: Microwave-assisted extraction optimized and compared with ultrasound-assisted and conventional solvent extraction. *Ind. Crop. Prod.*, **61**, 31-40.
51. Dai, J., Mumper, R.J. 2010. Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*, **15**(10), 7313-7352.
52. Del Castillo, E. 2007. *Process optimization: a statistical approach*. Springer Science & Business Media.

53. Demir, N., Gungor, A.A., Nadaroglu, H., Demir, Y. 2014. The antioxidant and radical scavenging activities of Primrose (*Primula vulgaris*). *Eur. J. Exp. Biol.*, **4**, 395-401.
54. Dhivya, P., Sobiya, M., Selvamani, P., Latha, S. 2014. An approach to Alzheimer's disease treatment with cholinesterase inhibitory activity from various plant species. *Int. J. Pharm.Tech. Res.*, **6**(5), 1450-1467.
55. Dhobi, M., Mandal, V., Hemalatha, S. 2009. Optimization of microwave assisted extraction of bioactive flavonolignan-silybinin. *J. Chem. Metrl.* , 13-23.
56. Dias, M.I., Barros, L., Dueñas, M., Pereira, E., Carvalho, A.M., Alves, R.C., Oliveira, M., Santos-Buelga, C., Ferreira, I.C. 2013. Chemical composition of wild and commercial *Achillea millefolium* L. and bioactivity of the methanolic extract, infusion and decoction. *Food Chem.*, **141**(4), 4152-4160.
57. Díaz-Ortiz, Á., De la Hoz, A., Alcázar, J., Carrillo, J., Herrero, M., Muñoz, J.d.M., Prieto, P., De Cózar, A. 2011. Reproducibility and Scalability of Microwave-Assisted Reactions. in: *Microwave Heating*, (Ed.) U. Chandra, In-Tech, pp. 137-162.
58. Do Monte, F.c.H.M., dos Santos, J.G., Russi, M., Lanziotti, V.M.N.B., Leal, L.K.A.M., de Andrade Cunha, G.M. 2004. Antinociceptive and anti-inflammatory properties of the hydroalcoholic extract of stems from *Equisetum arvense* L. in mice. *Pharmacol. Res.*, **49**(3), 239-243.
59. Dos Santos, J., Blanco, M., Do Monte, F., Russi, M., Lanziotti, V., Leal, L., Cunha, G. 2005. Sedative and anticonvulsant effects of hydroalcoholic extract of *Equisetum arvense*. *Fitoterapia*, **76**(6), 508-513.
60. Du, F.-Y., Xiao, X.-H., Luo, X.-J., Li, G.-K. 2009. Application of ionic liquids in the microwave-assisted extraction of polyphenolic compounds from medicinal plants. *Talanta*, **78**(3), 1177-1184.
61. Duarte, T.L., Lunec, J. 2005. Review: When is an antioxidant not an antioxidant? A review of novel actions and reactions of vitamin C. *Free Radical Res.*, **39**(7), 671-686.
62. Düsman, E., Almeida, I.V.d., Coelho, A.C., Balbi, T.J., Düsman Tonin, L.T., Vicentini, V.E.P. 2013. Antimutagenic Effect of Medicinal Plants *Achillea*

- millefolium* and *Bauhinia forficata* In Vivo. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.*, **2013**.
63. Đorđević, M., Antunović, M., Bransilava, R., Kristina, D., Snežana, Đ. 2014. Dijagnostički značaj određivanja aktivnosti holinesteraze. *MD-Medical data*, **6(2)**, 143-146.
 64. Đorđević, T. 2013. Uticaj fermentacije na degradaciju ostataka pesticida u fermentisanim proizvodima od žita, Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet.
 65. Đorđević, T.M., Šiler-Marinković, S.S., Dimitrijević-Branković, S.I. 2010. Effect of fermentation on antioxidant properties of some cereals and pseudo cereals. *Food Chem.*, **119(3)**, 957-963.
 66. Đurović-Pejčev, R., Potočnik, I., Milijašević-Marčić, S., Todorović, B., Rekanović, E., Stepanović, M. 2014. Antifungal activity of six plant essential oils from Serbia against *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum*. *Pesticidi i fitomedicina*, **29(4)**, 291-297.
 67. Edwards-Ingram, L., Gitsham, P., Burton, N., Warhurst, G., Clarke, I., Hoyle, D., Oliver, S.G., Stateva, L. 2007. Genotypic and physiological characterization of *Saccharomyces boulardii*, the probiotic strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **73(8)**, 2458-2467.
 68. El Gharras, H. 2009. Polyphenols: food sources, properties and applications—a review. *Int. J. Food Sci. Tech.*, **44(12)**, 2512-2518.
 69. Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V., Featherstone, R.M. 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharm.*, **7(2)**, 88IN191-9095.
 70. Fabry, W., Okemo, P.O., Ansorg, R. 1998. Antibacterial activity of East African medicinal plants. *J. Ethnopharmacol.*, **60(1)**, 79-84.
 71. Fang, Y.-Z., Yang, S., Wu, G. 2002. Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition*, **18(10)**, 872-879.
 72. Farooqui, A., Khan, A., Borghetto, I., Kazmi, S.U., Rubino, S., Paglietti, B. 2015. Synergistic antimicrobial activity of *Camellia sinensis* and *Juglans regia* against multidrug-resistant bacteria. *PloS one*, **10(2)**, e0118431.

73. FDA, F.D.A. 2012. Guidance for Industry: Q3C–Tables and List. *Rockville, MD: FDA*.
74. Fierascu, I., Ungureanu, C., Avramescu, S.M., Fierascu, R.C., Ortan, A., Soare, L.C., Paunescu, A. 2015. In Vitro Antioxidant and Antifungal Properties of *Achillea millefolium* L. *Rom. Biotechnol. Lett.*, **20**(4), 10626-10636.
75. Filly, A., Fernandez, X., Minuti, M., Visinoni, F., Cravotto, G., Chemat, F. 2014. Solvent-free microwave extraction of essential oil from aromatic herbs: from laboratory to pilot and industrial scale. *Food Chem.*, **150**, 193-198.
76. Folashade, O., Omoregie, H., Ochogu, P. 2012. Standardization of herbal medicines-A review. *Int. J. Biodivers. Conserv.*, **4**(3), 101-112.
77. Francis, G., Kerem, Z., Makkar, H.P., Becker, K. 2002. The biological action of saponins in animal systems: a review. *Br. J. Nutr.* , **88**(06), 587-605.
78. Frey, F.M., Meyers, R. 2010. Antibacterial activity of traditional medicinal plants used by Haudenosaunee peoples of New York State. *BMC Complement. Altern. Med.*, **10**(1), 64.
79. Gahlaut, A., Chhillar, A.K. 2013. Evaluation of antibacterial potential of plant extracts using resazurin based microtiter dilution assay. *Int J Pharm Pharm Sci*, **5**(2), 372-376.
80. Gan, R.Y., Shah, N.P., Wang, M.F., Lui, W.Y., Corke, H. 2016. *Lactobacillus plantarum* WCFS1 fermentation differentially affects antioxidant capacity and polyphenol content in mung bean (*Vigna radiata*) and soya bean (*Glycine max*) milks. *J. Food Process. Pres.*
81. Garcia, D., Garcia-Cela, E., Ramos, A.J., Sanchis, V., Marín, S. 2011. Mould growth and mycotoxin production as affected by *Equisetum arvense* and *Stevia rebaudiana* extracts. *Food control*, **22**(8), 1378-1384.
82. Gate, L., Paul, J., Ba, G.N., Tew, K., Tapiero, H. 1999. Oxidative stress induced in pathologies: the role of antioxidants. *Biomed. Pharmacother.*, **53**(4), 169-180.
83. Giorgi, A., Licheri, G., Mingozi, M., Cocucci, M. 2007. Influence of light irradiance on total phenols content, antioxidant capacity, growth and photosynthetic pigments of yarrow grown in fields and controlled environment. *Planta Med.*, **73**(9), 1020-1020.

84. Giorgi, A., Mingozi, M., Madeo, M., Speranza, G., Cocucci, M. 2009. Effect of nitrogen starvation on the phenolic metabolism and antioxidant properties of yarrow (*Achillea collina* Becker ex Rchb.). *Food Chem.*, **114**(1), 204-211.
85. Guil-Guerrero, J., Ramos, L., Moreno, C., Zúñiga-Paredes, J., Carlosama-Yepez, M., Ruales, P. 2016. Antimicrobial activity of plant-food by-products: A review focusing on the tropics. *Livestock Science*, **189**, 32-49.
86. Gutleb, A.C., Morrison, E., Murk, A.J. 2002. Cytotoxicity assays for mycotoxins produced by *Fusarium* strains: a review. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, **11**(3), 309-320.
87. Gyawali, R., Ibrahim, S.A. 2012. Impact of plant derivatives on the growth of foodborne pathogens and the functionality of probiotics. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **95**(1), 29-45.
88. Halász, A. 2009. Lactic acid bacteria. *Food Quality and Standards*, **3**, 70-82.
89. Halliwell, B. 1989. Free radicals, reactive oxygen species and human disease: a critical evaluation with special reference to atherosclerosis. *Brit. J. Exp. Pathol.*, **70**(6), 737.
90. Halliwell, B. 2006. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol.*, **141**(2), 312-322.
91. Hayek, S.A., Gyawali, R., Ibrahim, S.A. 2013. Antimicrobial Natural Products. in: *Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education*, (Ed.) A. Méndez-Vilas, Formatex research center.
92. Heim, K.E., Tagliaferro, A.R., Bobilya, D.J. 2002. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J. Nutr. Biochem.*, **13**(10), 572-584.
93. Hemwimon, S., Pavasant, P., Shotipruk, A. 2007. Microwave-assisted extraction of antioxidative anthraquinones from roots of *Morinda citrifolia*. *Sep. Purif. Technol.*, **54**(1), 44-50.
94. Herrero, M., Martín-Álvarez, P.J., Señoráns, F.J., Cifuentes, A., Ibáñez, E. 2005. Optimization of accelerated solvent extraction of antioxidants from *Spirulina platensis* microalga. *Food Chem.*, **93**(3), 417-423.
95. Hervert-Hernandez, D., Goñi, I. 2011. Dietary polyphenols and human gut microbiota: a review. *Food Rev. Int.*, **27**(2), 154-169.

96. Hithamani, G., Ramalakshmi, K. 2013. Microwave assisted extraction of phenolics from *Origanum vulgare*. *Int. J. Agric. Soil Sci.*, **1**, 7-12.
97. Hole, A.S., Rud, I., Grimmer, S., Sigl, S., Narvhus, J., Sahlstrøm, S. 2012. Improved bioavailability of dietary phenolic acids in whole grain barley and oat groat following fermentation with probiotic *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus johnsonii*, and *Lactobacillus reuteri*. *J. Agric. Food Chem.*, **60**(25), 6369-6375.
98. <http://peaknootropics.com>.
99. <http://www.damocos.co.kr>.
100. <http://www.mocbilja.rs/>.
101. <http://www.mountpisgaharboretum.com>.
102. <http://www.pfaf.org>.
103. Hudson, L.E., McDermott, C.D., Stewart, T.P., Hudson, W.H., Rios, D., Fasken, M.B., Corbett, A.H., Lamb, T.J. 2016. Characterization of the probiotic yeast *Saccharomyces boulardii* in the healthy mucosal immune system. *PloS one*, **11**(4), e0153351.
104. Huo, C.-H., Li, Y., Zhang, M.-L., Wang, Y.-F., Zhang, Q., Qin, F., Shi, Q.-W., Kiyota, H. 2013. Cytotoxic flavonoids from the flowers of *Achillea millefolium*. *Chem. Nat. Compd.*, **48**(6), 958-962.
105. Hur, S.J., Lee, S.Y., Kim, Y.-C., Choi, I., Kim, G.-B. 2014. Effect of fermentation on the antioxidant activity in plant-based foods. *Food Chem.*, **160**, 346-356.
106. Husby, C. 2013. Biology and Functional Ecology of Equisetum with Emphasis on the Giant Horsetails. *Bot. Rev.*, **79**(2), 147-177.
107. Huynh, N.T., Van Camp, J., Smagghe, G., Raes, K. 2014. Improved release and metabolism of flavonoids by steered fermentation processes: a review. *Int. J. Mol. Sci.*, **15**(11), 19369-19388.
108. Ilaiyaraja, N., Likhith, K.R., Sharath Babu, G.R., Khanum, F. 2015. Optimisation of extraction of bioactive compounds from *Feronia limonia* (wood apple) fruit using response surface methodology (RSM). *Food Chem.*, **173**(0), 348-354.
109. Jacob, R.A. 1995. The integrated antioxidant system. *Nutr. Res.*, **15**(5), 755-766.

110. Jaquet, M., Rochat, I., Moulin, J., Cavin, C., Bibiloni, R. 2009. Impact of coffee consumption on the gut microbiota: a human volunteer study. *Int. J. Food Microbiol.*, **130**(2), 117-121.
111. John, K.M., Vijayan, D., Kumar, R.R., Premkumar, R. 2006. Factors influencing the efficiency of extraction of polyphenols from young tea leaves. *Asian J. Plant Sci.*, **5**(1), 123-126.
112. Jovanović, Z. 2012. Mehanizmi neurodegeneracije kod Alchajmerove bolesti. *Med. Pregl.*, **65**, 301-307.
113. Karabegović, I.T., Stojičević, S.S., Veličković, D.T., Nikolić, N.Č., Lazić, M.L. 2013. Optimization of microwave-assisted extraction and characterization of phenolic compounds in cherry laurel (*Prunus laurocerasus*) leaves. *Sep. Purif. Technol.*, **120**, 429-436.
114. Karazhiyan, H., Razavi, S., Phillips, G.O. 2011. Extraction optimization of a hydrocolloid extract from cress seed (*Lepidium sativum*) using response surface methodology. *Food Hydrocolloids*, **25**(5), 915-920.
115. Karl, C., Müller, G., Pedersen, P. 1981. Die Flavonoide in den Blüten von *Primula officinalis*. *Planta Med.*, **41**(01), 96-99.
116. Kevin, N. 2012. Equisetum - Unabridged Guide. *Emereo Pty limited*.
117. Khiari, Z., Makris, D.P., Kefalas, P. 2009. An investigation on the recovery of antioxidant phenolics from onion solid wastes employing water/ethanol-based solvent systems. *Food Bioprocess Tech.*, **2**(4), 337.
118. Kiselova, Y., Ivanova, D., Chervenkov, T., Gerova, D., Galunska, B., Yankova, T. 2006. Correlation between the in vitro antioxidant activity and polyphenol content of aqueous extracts from Bulgarian herbs. *Phytother. res.*, **20**(11), 961-965.
119. Kokoska, L., Polesny, Z., Rada, V., Nepovim, A., Vanek, T. 2002. Screening of some Siberian medicinal plants for antimicrobial activity. *J. Ethnopharmacol.*, **82**(1), 51-53.
120. König, H., Fröhlich, J. 2009. Lactic acid bacteria. in: *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine*, Springer, pp. 3-29.

121. Krishnan, R.Y., Rajan, K. 2016. Microwave assisted extraction of flavonoids from *Terminalia bellerica*: Study of kinetics and thermodynamics. *Sep. Purif. Technol.*, **157**, 169-178.
122. Kukrić, Z., Topalić-Trivunović, L., Pavičić, S., Žabić, M., Matoš, S., Davidović, A. 2013. Total phenolic content, antioxidant and antimicrobial activity of *Equisetum arvense* L. *Hem. Ind.*, **19**(1), 37-43.
123. Kumar, S., Pandey, A.K. 2013. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *Sci. World J.*, **2013**.
124. Lakshmi, T., Geetha, R., Roy, A., Kumar, S.A. 2011. Yarrow (*Achillea millefolium* linn). A herbal medicinal plant with broad therapeutic use-A review. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.*, **9**, 136-141.
125. Larrauri, J.A., Rupérez, P., Saura-Calixto, F. 1997. Effect of drying temperature on the stability of polyphenols and antioxidant activity of red grape pomace peels. *J. Agric. Food Chem.*, **45**(4), 1390-1393.
126. Lee, S.K., Mbwambo, Z., Chung, H., Luyengi, L., Gamez, E., Mehta, R., Kinghorn, A., Pezzuto, J. 1998. Evaluation of the antioxidant potential of natural products. *Comb. Chem. High T. Scr.*, **1**(1), 35.
127. Li, H.-B., Wong, C.-C., Cheng, K.-W., Chen, F. 2008. Antioxidant properties in vitro and total phenolic contents in methanol extracts from medicinal plants. *Food Sci. Biotechnol.*, **41**(3), 385-390.
128. Li, H., Deng, Z., Wu, T., Liu, R., Loewen, S., Tsao, R. 2012. Microwave-assisted extraction of phenolics with maximal antioxidant activities in tomatoes. *Food Chem.*, **130**(4), 928-936.
129. Li, Y., Skouroumounis, G.K., Elsey, G.M., Taylor, D.K. 2011. Microwave-assistance provides very rapid and efficient extraction of grape seed polyphenols. *Food Chem.*, **129**(2), 570-576.
130. Lidström, P., Tierney, J., Wathey, B., Westman, J. 2001. Microwave assisted organic synthesis—a review. *Tetrahedron*, **57**(45), 9225-9283.
131. Liyana-Pathirana, C., Shahidi, F. 2005. Optimization of extraction of phenolic compounds from wheat using response surface methodology. *Food chem.*, **93**(1), 47-56.

132. Lucera, A., Costa, C., Conte, A., Del Nobile, M.A. 2012. Food applications of natural antimicrobial compounds. *Front Microbiol.* , **3**.
133. Mahesh, B., Satish, S. 2008. Antimicrobial activity of some important medicinal plant against plant and human pathogens. *World J. Agr. Sci.*, **4**(5), 839-843.
134. Makovec, S., Kos, B., Šušković, J., Bilandžić, N. 2014. Tetraciklinski antibiotici i određivanje njihovih rezidua u hrani. *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam*, **9**(1-2), 7-16.
135. Mandal, V., Mohan, Y., Hemalatha, S. 2007. Microwave assisted extraction—an innovative and promising extraction tool for medicinal plant research. *Pharmacogn. Rev.*, **1**(1), 7-18.
136. Marazza, J.A., Garro, M.S., de Giori, G.S. 2009. Aglycone production by *Lactobacillus rhamnosus* CRL981 during soymilk fermentation. *Food Microbiol.*, **26**(3), 333-339.
137. Marazza, J.A., Nazareno, M.A., de Giori, G.S., Garro, M.S. 2012. Enhancement of the antioxidant capacity of soymilk by fermentation with *Lactobacillus rhamnosus*. *J. Funct. Foods*, **4**(3), 594-601.
138. Meda, A., Lamien, C.E., Romito, M., Millogo, J., Nacoulma, O.G. 2005. Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. *Food Chem.*, **91**(3), 571-577.
139. Medouni-Adrar, S., Boulekbache-Makhlouf, L., Cadot, Y., Medouni-Haroune, L., Dahmoune, F., Makhoukhe, A., Madani, K. 2015. Optimization of the recovery of phenolic compounds from Algerian grape by-products. *Ind. Crop. Prod.*, **77**, 123-132.
140. Miguel, M., Bouchamaa, N., Aazza, S., Gaamoussi, F., Lyoussi, B. 2014. Antioxidant, anti-inflammatory and anti-acetylcholinesterase activities of eleven extracts of Moroccan plants. *Fresenius Environ Bull*, **23**, 1375-88.
141. Mihajlovski, K.R. 2016. Poljoprivredni i industrijski otpad kao supstrat za proizvodnju celulaza i amilaza pomoću novog bakterijskog soja *Paenibacillus chitinolyticus* CKS1, Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet.
142. Mijin, D.Ž., Petrović, S.D. 2005. Microwaves in organic chemistry and organic chemical. *Hem. Ind.*, **59**(9-10), 224-229.

143. Milovanović, V., Radulović, N., Todorović, Z., Stanković, M., Stojanović, G. 2007. Antioxidant, antimicrobial and genotoxicity screening of hydro-alcoholic extracts of five Serbian Equisetum species. *Plant Food Hum. Nutr.*, **62**(3), 113-119.
144. Milutinović, M.D., Šiler-Marinković, S.S., Antonović, D.G., Mihajlovska, K.R., Pavlović, M.D., Dimitrijević-Branković, S.I. 2013. The antioxidant properties of dried extracts from the spent espresso coffee. *Hem. Ind.*, **67**(2), 261-267.
145. Mimica-Dukic, N., Simin, N., Cvejic, J., Jovin, E., Orcic, D., Bozin, B. 2008. Phenolic compounds in field horsetail (*Equisetum arvense* L.) as natural antioxidants. *Molecules*, **13**(7), 1455-1464.
146. Molan, A., Flanagan, J., Wei, W., Moughan, P. 2009a. Selenium-containing green tea has higher antioxidant and prebiotic activities than regular green tea. *Food Chem.*, **114**(3), 829-835.
147. Molan, A.L., Lila, M.A., Mawson, J., De, S. 2009b. In vitro and in vivo evaluation of the prebiotic activity of water-soluble blueberry extracts. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **25**(7), 1243-1249.
148. Montgomery, D.C. 2008. *Design and analysis of experiments*. John Wiley & Sons.
149. Moore, J., Cheng, Z., Hao, J., Guo, G., Liu, J.-G., Lin, C., Yu, L. 2007. Effects of solid-state yeast treatment on the antioxidant properties and protein and fiber compositions of common hard wheat bran. *J. Agric. Food Chem.*, **55**(25), 10173-10182.
150. Morozowska, M., Wesołowska, M. 2004. In vitro clonal propagation of *Primula veris* L. and preliminary phytochemical analysis. *Acta Biol. Cracov. Bot.*, **46**, 169-175.
151. Müller, A., Ganzera, M., Stuppner, H. 2006. Analysis of phenolic glycosides and saponins in *Primula elatior* and *Primula veris* (primula root) by liquid chromatography, evaporative light scattering detection and mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, **1112**(1), 218-223.
152. Nagai, T., Myoda, T., Nagashima, T. 2005. Antioxidative activities of water extract and ethanol extract from field horsetail (*tsukushi*) *Equisetum arvense* L. *Food Chem.*, **91**(3), 389-394.

153. Najmus-Saqib, Q., Alam, F., Ahmad, M. 2009. Antimicrobial and cytotoxicity activities of the medicinal plant *Primula macrophylla*. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, **24**(3), 697-701.
154. Nascimento, G.G., Locatelli, J., Freitas, P.C., Silva, G.L. 2000. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. *Braz. J. Microbiol.*, **31**(4), 247-256.
155. Nickavar, B., Kamalinejad, M., Haj-Yahya, M., Shafaghi, B. 2006. Comparison of the free radical scavenging activity of six iranian *Achillea*. species. *Pharmaceutical biology*, **44**(3), 208-212.
156. Nordberg, J., Arner, E.S. 2001. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic. Biol. Med.*, **31**(11), 1287-1312.
157. Oh, H., Kim, D.-H., Cho, J.-H., Kim, Y.-C. 2004. Hepatoprotective and free radical scavenging activities of phenolic petrosins and flavonoids isolated from *Equisetum arvense*. *J. Ethnopharmacol.*, **95**(2), 421-424.
158. Othman, N.B., Roblain, D., Chammen, N., Thonart, P., Hamdi, M. 2009. Antioxidant phenolic compounds loss during the fermentation of Chétoui olives. *Food Chem.*, **116**(3), 662-669.
159. Pagnussatt, F.A., Kupski, L., Darley, F.T., Filoda, P.F., Ponte, É.M.D., Gardabuffon, J., Badiale-Furlong, E. 2013. Fusarium graminearum growth inhibition mechanism using phenolic compounds from *Spirulina* sp. *Food Sci. Technol. (Campinas)*, **33**, 75-80.
160. Palhares, R.M., Drummond, M.G., Brasil, B.d.S.A.F., Cosenza, G.P., Brandão, M.d.G.L., Oliveira, G. 2015. Medicinal plants recommended by the world health organization: DNA barcode identification associated with chemical analyses guarantees their quality. *PloS one*, **10**(5), e0127866.
161. Pan, X., Niu, G., Liu, H. 2003. Microwave-assisted extraction of tea polyphenols and tea caffeine from green tea leaves. *Chem. Eng. Process. Process Intensif.*, **42**(2), 129-133.
162. Pavlović, M.D., Buntić, A.V., Šiler-Marinković, S.S., Dimitrijević-Branković, S.I. 2013. Ethanol influenced fast microwave-assisted extraction for natural antioxidants obtaining from spent filter coffee. *Sep. Purif. Technol.*, **118**, 503-510.
163. Percival, M. 1998. Antioxidants. *Clin. Nutr. Insights*, 1-4.

164. Petigny, L., Périno, S., Minuti, M., Visinoni, F., Wajsman, J., Chemat, F. 2014. Simultaneous microwave extraction and separation of volatile and non-volatile organic compounds of boldo leaves. From lab to industrial scale. *Int. J. Mol. Sci.*, **15**(5), 7183-7198.
165. Petrović, S., Mijin, D., Stojanović, N. 2005. *Hemija prirodnih organskih jedinjenja*. Tehnološko-metalurški fakultet, Beograd.
166. Petrovska, B.B. 2012. Historical review of medicinal plants' usage. *Pharmacogn. Rev.*, **6**(11), 1.
167. Potrich, F.B., Allemand, A., da Silva, L.M., dos Santos, A.C., Baggio, C.H., Freitas, C.S., Mendes, D.A.G.B., Andre, E., de Paula Werner, M.F., Marques, M.C.A. 2010. Antiulcerogenic activity of hydroalcoholic extract of *Achillea millefolium* L.: Involvement of the antioxidant system. *J. Ethnopharmacol.*, **130**(1), 85-92.
168. Prakash Maran, J., Sivakumar, V., Thirugnanasambandham, K., Sridhar, R. 2013. Optimization of microwave assisted extraction of pectin from orange peel. *Carbohydr. Polym.*, **97**(2), 703-709.
169. Prasad, K.N., Hassan, F.A., Yang, B., Kong, K.W., Ramanan, R.N., Azlan, A., Ismail, A. 2011. Response surface optimisation for the extraction of phenolic compounds and antioxidant capacities of underutilised *Mangifera pajang* Kosterm. peels. *Food Chem.*, **128**(4), 1121-1127.
170. Radanović, D., Nastovski, T. 2002. Proizvodnja lekovitog i aromaticnog bilja po principima organske poljoprivrede. *Lek. Sirov.*, **22**, 83-99.
171. Radulović, N., Stojanović, G., Palić, R. 2006. Composition and antimicrobial activity of *Equisetum arvense* L. essential oil. *Phytother. res.*, **20**(1), 85-88.
172. Rajilić-Stojanović, M. 2013. Function of the microbiota. *Best Pract. Res. Cl. Ga.*, **27**(1), 5-16.
173. Ramić, M., Vidović, S., Zeković, Z., Vladić, J., Cvejic, A., Pavlić, B. 2014. Modeling and optimization of ultrasound-assisted extraction of polyphenolic compounds from *Aronia melanocarpa* by-products from filter-tea factory. *Ultrason. Sonochem.*
174. Ranic, M., Nikolic, M., Pavlovic, M., Buntic, A., Siler-Marinkovic, S., Dimitrijevic-Brankovic, S. 2014. Optimization of microwave-assisted extraction

- of natural antioxidants from spent espresso coffee grounds by response surface methodology. *J. Clean. Prod.*, **80**, 69-79.
175. Rates, S.M.K. 2001. Plants as source of drugs. *Toxicon*, **39**(5), 603-613.
 176. Reffitt, D., Ogston, N., Jugdaohsingh, R., Cheung, H., Evans, B.A.J., Thompson, R., Powell, J., Hampson, G. 2003. Orthosilicic acid stimulates collagen type 1 synthesis and osteoblastic differentiation in human osteoblast-like cells in vitro. *Bone*, **32**(2), 127-135.
 177. Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Paganga, G. 1996. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic. Biol. Med.*, **20**(7), 933-956.
 178. Rizzello, C.G., Coda, R., Macías, D.S., Pinto, D., Marzani, B., Filannino, P., Giuliani, G., Paradiso, V.M., Di Cagno, R., Gobbetti, M. 2013. Lactic acid fermentation as a tool to enhance the functional features of *Echinacea* spp. *Microb. Cell Fact.*, **12**(1), 44.
 179. Rodríguez, H., Curiel, J.A., Landete, J.M., de las Rivas, B., de Felipe, F.L., Gómez-Cordovés, C., Mancheño, J.M., Muñoz, R. 2009. Food phenolics and lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.*, **132**(2), 79-90.
 180. Roseiro, L.B., Rauter, A.P., Serralheiro, M.L.M. 2012. Polyphenols as acetylcholinesterase inhibitors: Structural specificity and impact on human disease. *Nutr. Aging*, **1**(2), 99-111.
 181. Routray, W., Orsat, V. 2012. Microwave-assisted extraction of flavonoids: a review. *Food Bioprocess Technol.*, **5**(2), 409-424.
 182. Sabu, A., Augur, C., Swati, C., Pandey, A. 2006. Tannase production by *Lactobacillus* sp ASR-S1 under solid-state fermentation. *Process Biochem.*, **41**(3), 575-580.
 183. Salminen, M.K., Tynkkynen, S., Rautelin, H., Saxelin, M., Vaara, M., Ruutu, P., Sarna, S., Valtonen, V., Järvinen, A. 2002. *Lactobacillus* bacteremia during a rapid increase in probiotic use of *Lactobacillus rhamnosus* GG in Finland. *Clin. Infect. Dis.*, **35**(10), 1155-1160.
 184. Salvetti, E., Torriani, S., Felis, G.E. 2012. The genus *Lactobacillus*: a taxonomic update. *Probiotics Antimicrob. Proteins.* , **4**(4), 217-226.

185. Sandhu, N.S., Kaur, S., Chopra, D. 2010. *Equisetum arvense*: pharmacology and phytochemistry—a review. *Asian J. Pharm. Clin. Res.*, **3**(3), 146-150.
186. Sanit, S. 2016. Antifungal activity of crude extracts of some medicinal plants against *Fusarium* sp., the pathogen of dirty panicle disease in rice. *J. Med. Plant Res.*, **10**(19), 248-255.
187. Santana-Méridas, O., González-Coloma, A., Sánchez-Vioque, R. 2012. Agricultural residues as a source of bioactive natural products. *Phytochem. Rev.*, **11**(4), 447-466.
188. Sarker, S.D., Nahar, L., Kumarasamy, Y. 2007. Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the in vitro antibacterial screening of phytochemicals. *Methods*, **42**(4), 321-324.
189. Savić, L. 2014. Metode ekstrakcije biljnih materijala: Usporedna analiza cirkulatorne ekstrakcije i ekstrakcije primenom superkritičnog ugljen-dioksida. *Lek. Sirov.*(34), 93-103.
190. Sevindik, H.G., Güvenalp, Z., Yerdelen, K.Ö., Yuca, H., Demirezer, L.Ö. 2015. The discovery of potential anticholinesterase compounds from *Achillea millefolium* L. *Ind. Crop. Prod.*, **76**, 873-879.
191. Shahidi, F., Yeo, J. 2016. Insoluble-Bound Phenolics in Food. *Molecules*, **21**(9), 1216.
192. Shang, X., Guo, X., Li, B., Pan, H., Zhang, J., Zhang, Y., Miao, X. 2016. Microwave-assisted extraction of three bioactive alkaloids from *Peganum harmala* L. and their acaricidal activity against *Psoroptes cuniculi* in vitro. *J. Ethnopharmacol.*, **192**, 350-361.
193. Sharma, O.P., Bhat, T.K. 2009. DPPH antioxidant assay revisited. *Food Chem.*, **113**(4), 1202-1205.
194. Shimoyamada, M., Suzuki, M., Sonta, H., Maruyama, M., Okubo, K. 1990. Antifungal activity of the saponin fraction obtained from *Asparagus officinalis* L. and its active principle. *Agric. Biol. Chem.*, **54**(10), 2553-2557.
195. Shostak, L.G., Marchyshyn, S.M., Kozachok, S.S., Karbovska, R.V. 2016. Investigation of phenolic compounds of *Primula veris* L. *J. Educ. Health Sport*, **5**(5), 424-432.

196. Sies, H. 1997. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp. Physiol.*, **82**(2), 291-295.
197. Sigurdsson, S., Gudbjarnason, S. 2007. Inhibition of acetylcholinesterase by extracts and constituents from *Angelica archangelica* and *Geranium sylvaticum*. *Z. Naturforsch. C Bio. Sci.*, **62**(9-10), 689-693.
198. Silva, E., Rogez, H., Larondelle, Y. 2007. Optimization of extraction of phenolics from *Inga edulis* leaves using response surface methodology. *Sep Purif. Technol.*, **55**(3), 381-387.
199. Simić, V.M., Rajković, K.M., Stojičević, S.S., Veličković, D.T., Nikolić, N.Č., Lazić, M.L., Karabegović, I.T. 2016. Optimization of microwave-assisted extraction of total polyphenolic compounds from chokeberries by response surface methodology and artificial neural network. *Sep Purif. Technol.*, **160**, 89-97.
200. Singleton, V., Rossi, J.A. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.*, **16**(3), 144-158.
201. Sólyom, K., Solá, R., Cocero, M.J., Mato, R.B. 2014. Thermal degradation of grape marc polyphenols. *Food Chem.*, **159**, 361-366.
202. Spigno, G., De Faveri, D.M. 2009. Microwave-assisted extraction of tea phenols: A phenomenological study. *J. Food Eng.*, **93**, 210-217.
203. Srikanta, B., Siddaraju, M., Dharmesh, S.M. 2007. A novel phenol-bound pectic polysaccharide from *Decalepis hamiltonii* with multi-step ulcer preventive activity. *World J. Gastroenterol.*, **13**(39), 5196.
204. Stamatopoulos, K., Chatzilazarou, A., Katsoyannos, E. 2013. Optimization of multistage extraction of olive leaves for recovery of phenolic compounds at moderated temperatures and short extraction times. *Foods*, **3**(1), 66-81.
205. Stanković, M., Stanojeić, L. 2014. *Tehnologija lekovitog začinskog i aromatičnog bilja*. Tehnološki fakultet, Leskovac.
206. Stefanović, R. 2010. Paradigma održivog razvoja poljoprivrede - strateški koncept zaštite životne sredine. *Ecologica*, 112-114.

207. Stojanović, G., Radulović, N., Hashimoto, T., Palić, R. 2005. In vitro antimicrobial activity of extracts of four *Achillea* species: The composition of *Achillea clavennae* L.(Asteraceae) extract. *J. Ethnopharmacol.*, **101**(1), 185-190.
208. Stracke, B.A., Rüfer, C.E., Weibel, F.P., Bub, A., Watzl, B. 2009. Three-year comparison of the polyphenol contents and antioxidant capacities in organically and conventionally produced apples (*Malus domestica* Bork. Cultivar Golden Delicious'). *J. Agric. Food Chem.*, **57**(11), 4598-4605.
209. Sutherland, J., Miles, M., Hedderley, D., Li, J., Devoy, S., Sutton, K., Lauren, D. 2009. In vitro effects of food extracts on selected probiotic and pathogenic bacteria. *Int. J. Food Sci. Nutr.*, **60**(8), 717-727.
210. Szöllösi, R., Varga, I.S. 2002. Total antioxidant power in some species of Labiatae (Adaptation of FRAP method). *Acta Biol. Szeged.*, **46**(3-4), 125-127.
211. Szymański, M., Witkowska-Banaszczak, E., Klak, N., Marciniak, K., Wołowicz, T., Szymański, A. 2014. Effects of trace elements on polyphenolic compounds in *Millefolii* herba. *Pol. J. Environ. Stud.*, **23**(2), 459-466.
212. Šljivić-Ivanović, M.Z., Smičiklas, I.D., Marković, J.P., Milenković, A.S. 2013. Analysis of factors influencing Cu (II) sorption by clinoptilolite. *Hem. Ind.*, **67**(5), 739-745.
213. Štajner, D., Popović, B., Čanadanović-Brunet, J., Boža, P. 2006. Free radical scavenging activity of three *Equisetum* species from Fruška gora mountain. *Fitoterapia*, **77**(7), 601-604.
214. Štefan, L., Tepšić, T., Zavidčić, T., Urukalo, M., Tota, D., Domitrović, R. 2007. Lipidna peroksidacija - uzroci i posljedice. *Medicina*, **43**, 84-93.
215. Švarc-Gajić, J., Stojanović, Z., Carretero, A.S., Román, D.A., Borrás, I., Vasiljević, I. 2013. Development of a microwave-assisted extraction for the analysis of phenolic compounds from *Rosmarinus officinalis*. *J. Food Eng.*, **119**(3), 525-532.
216. Thaipong, K., Boonprakob, U., Crosby, K., Cisneros-Zevallos, L., Byrne, D.H. 2006. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *J. Food Comp. Anal.*, **19**(6), 669-675.

217. Tirzitis, G., Bartosz, G. 2010. Determination of antiradical and antioxidant activity: basic principles and new insights. *Acta Biochim. Pol.*, **57**(2), 139-42.
218. Tünde;, J., Eleonora;, M., Vicas Laura, Neagu;, O., Annamária, P. 2015.
219. Turudija Živanović, S. 2015. Organizacija proizvodnje i prerade lekovitog aromatičnog bilja i Srbiji, Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet.
220. Uriarte-Pueyo, I., I Calvo, M. 2011. Flavonoids as acetylcholinesterase inhibitors. *Curr. Med. Chem.*, **18**(34), 5289-5302.
221. Uslu, M.E., Erdogan, I., Bayraktar, O., Ates, M. 2013. Optimization of extraction conditions for active components in Equisetum arvense extract. *Rom. Biotech. Lett.*, **18**(2), 8115-8131.
222. Veggi, P.C., Martinez, J., Meireles, M.A.A. 2012. Fundamentals of microwave extraction. in: *Microwave-Assisted Extraction for Bioactive Compounds*, Springer, pp. 15-52.
223. Velluti, A., Sanchis, V., Ramos, A., Egido, J., Mari, S. 2003. Inhibitory effect of cinnamon, clove, lemongrass, oregano and palmarose essential oils on growth and fumonisin B 1 production by *Fusarium proliferatum* in maize grain. *Int. J. Food Microbiol.*, **89**(2), 145-154.
224. Velluti, A., Sanchis, V., Ramos, A., Turon, C., Marin, S. 2004. Impact of essential oils on growth rate, zearalenone and deoxynivalenol production by *Fusarium graminearum* under different temperature and water activity conditions in maize grain. *J. Appl. Microbiol.*, **96**(4), 716-724.
225. Ventola, C.L. 2015. The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. *Pharmacy and Therapeutics*, **40**(4), 277.
226. Vitalini, S., Beretta, G., Iriti, M., Orsenigo, S., Basilico, N., Dall'Acqua, S., Iorizzi, M., Fico, G. 2011. Phenolic compounds from *Achillea millefolium* L. and their bioactivity. *Acta Biochim. Pol.*, **58**(2), 203.
227. Vitalini, S., Madeo, M., Tava, A., Iriti, M., Vallone, L., Avato, P., Cocuzza, C.E., Simonetti, P., Argentieri, M.P. 2016. Chemical Profile, Antioxidant and Antibacterial Activities of *Achillea moschata* Wulfen, an Endemic Species from the Alps. *Molecules*, **21**(7), 830.
228. Vladimir-Knežević, S., Blažeković, B., Kindl, M., Vladić, J., Lower-Nedza, A.D., Brantner, A.H. 2014. Acetylcholinesterase inhibitory, antioxidant and

- phytochemical properties of selected medicinal plants of the Lamiaceae family. *Molecules*, **19**(1), 767-782.
229. Volf, I., Ignat, I., Neamtu, M., Popa, V.I. 2014. Thermal stability, antioxidant activity, and photo-oxidation of natural polyphenols. *Chem. Papers*, **68**(1), 121-129.
230. Vuleta, G., Primorac, M., Milić, J., Savić, S. 2012. *Farmaceutska tehnologija I*. Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet, Beograd.
231. Walker, G.M. 1998. *Yeast physiology and biotechnology*. John Wiley & Sons.
232. Wang, L., Wei, W., Tian, X., Shi, K., Wu, Z. 2016. Improving bioactivities of polyphenol extracts from *Psidium guajava* L. leaves through co-fermentation of *Monascus anka* GIM 3.592 and *Saccharomyces cerevisiae* GIM 2.139. *Ind. Crop. Prod.*, **94**, 206-215.
233. Wang, L., Weller, C.L. 2006. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends Food Sci. Tech.*, **17**(6), 300-312.
234. Ward, F.E., Garling, D.L., Buckler, R.T., Lawler, D.M., Cummings, D.P. 1981. Antimicrobial 3-methylene flavanones. *J. Med. Chem.*, **24**(9), 1073-1077.
235. Wen, Y.-L., Yan, L.-P., Chen, C.-S. 2013. Effects of fermentation treatment on antioxidant and antimicrobial activities of four common Chinese herbal medicinal residues by *Aspergillus oryzae*. *J. Food Drug Anal.*, **21**(2), 219-226.
236. Wichtl, M. 2004. *Herbal drugs and phytopharmaceuticals: a handbook for practice on a scientific basis*. Medpharm GmbH Scientific Publishers.
237. Wojdyło, A., Oszmiański, J., Czemerys, R. 2007. Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food Chem.*, **105**(3), 940-949.
238. Woods-Panzaru, S., Nelson, D., McCollum, G., Ballard, L.M., Millar, B.C., Maeda, Y., Goldsmith, C.E., Rooney, P.J., Loughrey, A., Rao, J.R. 2009. An examination of antibacterial and antifungal properties of constituents described in traditional Ulster cures and remedies. *Ulster Med J*, **78**(1), 13-15.
239. Wu, S.-C., Su, Y.-S., Cheng, H.-Y. 2011. Antioxidant properties of *Lactobacillus*-fermented and non-fermented *Graptopetalum paraguayense* E. Walther at different stages of maturity. *Food Chem.*, **129**(3), 804-809.

240. Wu, T., Yan, J., Liu, R., Marcone, M.F., Aisa, H.A., Tsao, R. 2012. Optimization of microwave-assisted extraction of phenolics from potato and its downstream waste using orthogonal array design. *Food Chem.*, **133**(4), 1292-1298.
241. Yen, W.-J., Wang, B.-S., Chang, L.-W., Duh, P.-D. 2005. Antioxidant properties of roasted coffee residues. *J. Agric. Food Chem.*, **53**(7), 2658-2663.
242. Yin, M., Cheng, W. 1998. Inhibition of *Aspergillus niger* and *Aspergillus flavus* by some herbs and spices. *J Food Prot.*, **61**, 123-125.
243. Zanello, G., Meurens, F., Berri, M., Salmon, H. 2009. *Saccharomyces boulardii* effects on gastrointestinal diseases. *Curr. Issues Intest. Microbiol.* , **11**(1), 47.
244. Zhang, Y., Zheng, B., Tian, Y., Huang, S. 2012. Microwave-assisted extraction and anti-oxidation activity of polyphenols from lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) seeds. *Food Sci. Biotechnol.*, **21**(6), 1577-1584.
245. Zhao, C.F., Li, S., Li, S.J., Song, G.H., Yu, L.J., Zhang, H. 2013. Extraction optimization approach to improve accessibility of functional fraction based on combination of total polyphenol, chromatographic profiling and antioxidant activity evaluation: *Pyracantha fortuneana* fruit as an example. *J. Funct. Foods*, **5**(2), 715-728.

PRILOG 1

OPTIMIZACIJA: VREDNOSTI PROCESNIH PROMENLJIVIH I ODZIVA

Tabela P-1.1. Vrednosti procesnih promenljivih i odziva u eksperimentalnom dizajnu modela optimizacije MAE polifenola iz otpadne jagorčevine

Proba	Procesne promenljive				Odzivi	
	A	B	C	D	Y ₁	Y ₂
1	120	3	35	340	180	56,40
2	221	45	35	340	145	42,50
3	180	20	20	170	154	78,51
4	60	70	50	170	108	124,79
5	221	45	35	170	124	67,11
6	120	45	35	170	84	124,71
7	180	70	20	340	164	48,07
8	60	20	50	170	86	85,95
9	120	45	10	340	114	85,53
10	120	3	35	170	159	95,87
11	60	20	50	340	114	49,92
12	180	20	20	340	176	52,89
13	180	70	50	340	148	69,48
14	60	20	20	340	119	79,67
15	60	70	20	340	94	81,90
16	120	45	35	340	115	92,15
17	120	45	35	170	84	128,84
18	120	45	60	170	82	98,76
19	180	20	50	340	138	47,69
20	60	70	50	340	124	108,10
21	180	70	20	170	142	75,21
22	60	20	20	170	84	106,12
23	120	45	35	170	83	118,68
24	120	45	60	340	105	72,40
25	180	20	50	170	115	84,30
26	19	45	35	170	64	123,72
27	120	45	35	340	114	101,82
28	120	45	10	170	94	115,26
29	180	70	50	170	114	110,05
30	120	45	35	340	124	91,82
31	60	70	20	170	85	109,17
32	120	87	35	170	146	116,30
33	19	45	35	340	82	92,98
34	120	87	35	340	174	75,62

A: vreme ekstrakcije (s); B: koncentracija etanola (%); C: odnos rastvarač/čvrsta faza (ml/g);

Y₁: prinos ekstrakcije (mg s.m. ekstrakta/g s.m. uzorka); Y₂: sadržaj ukupnih polifenola u ekstraktu (mg GAE/g s.m. ekstrakta).

Tabela P-1.2. Vrednosti procesnih promenljivih i odziva u eksperimentalnom dizajnu modela optimizacije MAE polifenola i drugih antioksidanasa iz otpadne hajdučke trave

Proba	Procesne promenljive				Odzivi				
	A	B	C	D	Y ₁	Y ₂	Y ₃	Y ₄	Y ₅
1	30	87	30	340	72	151,24	31,02	37,61	0,879
2	40	80	20	340	148	137,19	28,82	39,38	0,978
3	20	80	20	340	80	165,29	30,55	46,02	1,105
4	20	80	20	170	68	176,03	29,87	51,77	1,374
5	30	70	13	340	153	175,21	35,12	62,83	1,397
6	30	87	30	170	48	187,60	31,60	52,63	1,418
7	20	80	40	340	84	190,91	37,03	66,15	1,477
8	40	80	40	340	92	174,38	30,33	59,07	1,495
9	13	70	30	340	102	180,17	33,59	65,49	1,514
10	40	80	20	170	90	179,34	31,15	52,65	1,543
11	40	60	20	170	158	197,52	40,69	56,19	1,543
12	30	70	13	170	113	195,04	38,94	61,28	1,545
13	47	70	30	340	147	180,17	30,64	60,65	1,600
14	40	60	20	340	168	190,91	37,03	63,03	1,618
15	47	70	30	170	105	200,00	37,43	59,73	1,621
16	30	70	30	340	117	205,79	42,42	71,68	1,691
17	30	53	30	170	153	198,35	38,47	56,19	1,694
18	30	70	47	340	126	201,65	39,16	72,57	1,734
19	30	70	30	340	138	214,05	41,18	68,58	1,738
20	30	70	30	340	126	217,36	43,53	74,12	1,741
21	20	60	40	340	112	184,30	34,32	64,82	1,751
22	20	60	20	340	132	183,47	37,03	63,94	1,755
23	30	53	30	340	123	190,91	38,91	61,73	1,760
24	13	70	30	170	66	179,34	30,44	63,94	1,794
25	30	70	30	170	114	211,57	42,53	69,03	1,824
26	20	60	40	170	144	188,43	34,66	66,15	1,825
27	30	70	47	170	108	227,27	42,46	76,11	1,866
28	20	60	20	170	106	195,87	37,03	67,70	1,891
29	30	70	30	170	117	212,40	40,35	67,04	1,896
30	40	80	40	170	76	220,66	38,76	73,23	1,931
31	40	60	40	170	144	210,74	44,79	65,27	1,935
32	40	60	40	340	124	210,74	40,69	66,59	1,939
33	30	70	30	170	114	211,57	41,49	64,60	1,945
34	20	80	40	170	48	204,96	38,29	73,45	1,984

A: vreme ekstrakcije (s); B: koncentracija etanola (%); C: odnos rastvarač/čvrsta faza (ml/g); D: snaga mikrotalasa (W);

Y₁: prinos ekstrakcije (mg s.m. ekstrakta/g s.m. uzorka); Y₂: sadržaj ukupnih polifenola u ekstraktu (mg GAE/g s.m. ekstrakta); Y₃: sadržaj flavonoida u ekstraktu (mg QE/g s.m. ekstrakta); Y₄: inhibicija DPPH radikala (%); Y₅: FRAP (mmol Fe²⁺/l).

Tabela P-1.3. Vrednosti procesnih promenljivih i odziva u eksperimentalnom dizajnu modela optimizacije MAE polifenola i drugih antioksidanasa iz otpadnog rastavića

Proba	Procesne promenljive				Odzivi				
	A	B	C	D	Y ₁	Y ₂	Y ₃	Y ₄	Y ₅
1	60	50	50	340	86	133,06	25,76	25,52	0,688
2	60	70	30	340	110	89,50	15,08	10,64	0,349
3	90	60	57	170	72	127,44	23,51	25,97	0,665
4	60	70	50	340	107	77,69	15,03	4,94	0,314
5	140	60	40	170	61	109,09	22,63	20,05	0,610
6	90	60	57	340	87	137,80	24,44	26,65	0,671
7	140	60	40	340	79	128,10	28,79	28,21	0,716
8	60	70	50	170	82	87,60	18,09	8,58	0,424
9	90	60	23	170	69	119,83	19,29	23,30	0,650
10	90	60	23	340	119	114,05	17,28	19,16	0,578
11	60	50	30	170	85	122,92	22,57	28,08	0,636
12	90	60	40	340	74	130,74	27,03	25,91	0,718
13	60	70	30	170	71	118,84	19,18	20,27	0,600
14	40	60	40	170	42	123,14	26,58	27,99	0,722
15	90	60	40	170	41	160,03	30,49	30,13	0,820
16	120	70	30	170	79	74,46	13,44	10,42	0,382
17	90	77	40	170	88	49,59	10,35	4,97	0,231
18	120	50	30	340	112	102,48	21,72	17,65	0,559
19	90	60	40	340	84	146,92	30,55	29,88	0,729
20	40	60	40	340	89	114,88	18,83	18,24	0,473
21	90	43	40	170	100	110,22	22,32	23,27	0,558
22	120	70	30	340	105	97,96	19,47	14,85	0,489
23	60	50	50	170	61	152,07	29,87	33,54	0,864
24	120	70	50	340	101	101,65	23,57	21,36	0,480
25	90	60	40	170	40	163,64	32,25	32,96	0,880
26	90	77	40	340	112	68,03	13,59	6,67	0,272
27	120	50	50	340	110	130,66	26,57	30,52	0,703
28	90	60	40	170	45	166,33	33,27	32,97	0,900
29	120	50	50	170	62	150,42	27,20	30,93	0,800
30	60	50	30	340	104	118,84	20,98	23,95	0,621
31	90	60	40	340	83	133,01	27,16	25,14	0,787
32	90	43	40	340	127	104,96	21,32	22,73	0,585
33	120	70	50	170	57	96,69	19,49	14,62	0,479
34	120	50	30	170	87	79,42	15,31	10,16	0,423

A: vreme ekstrakcije (s); B: koncentracija etanola (%); C: odnos rastvarač/čvrsta faza (ml/g); D: snaga mikrotalasa (W);

Y₁: prinos ekstrakcije (mg s.m. ekstrakta/g s.m. uzorka); Y₂: sadržaj ukupnih polifenola u ekstraktu (mg GAE/g s.m. ekstrakta); Y₃: sadržaj flavonoida u ekstraktu (mg QE/g s.m. ekstrakta); Y₄: inhibicija DPPH radikala (%); Y₅: FRAP (mmol Fe²⁺/l).

Tabela P-1.4. Vrednosti procesnih promenljivih i odziva u eksperimentalnom dizajnu modela optimizacije fermentacije otpadne hajdučke trave bakterijom *L. rhamnosus* i kvascem *S. boulardii*

Proba	Procesne promenljive				Odzivi	
	A	B	C	D	Y ₁	Y ₂
1	48	7,5	50	1,50	174,84	187,25
2	22	5,0	20	1,00	131,29	144,13
3	48	7,5	50	0,66	215,27	234,77
4	48	7,5	50	1,50	174,70	191,63
5	22	10,0	80	2,00	337,20	123,29
6	48	7,5	50	1,50	167,41	194,21
7	48	7,5	0	1,50	172,39	139,12
8	74	5,0	20	2,00	195,39	143,35
9	48	7,5	100	1,50	304,73	92,04
10	22	10,0	20	2,00	164,38	150,09
11	91,7	7,5	50	1,50	130,13	98,88
12	74	5,0	80	2,00	90,64	84,21
13	74	10,0	20	1,00	64,13	179,81
14	48	7,5	50	2,34	127,43	133,27
15	22	5,0	80	1,00	300,70	143,90
16	48	3,3	50	1,50	148,78	274,98
17	48	11,7	50	1,50	178,00	154,76
18	74	10,0	80	1,00	133,60	156,84
19	4,3	7,5	50	1,50	144,36	140,56

A: vreme fermentacije (h); B: koncentracija inokuluma (%); C: koncentracija podloge (%); D: odnos tečno/čvrsto (ml/g);

Y₁: sadržaj ukupnih polifenola u ekstraktu hajdučke trave fermentisanim bakterijom *L. rhamnosus* (mg GAE/g s.m. ekstrakta); Y₂: sadržaj ukupnih polifenola u ekstraktu hajdučke trave fermentisanim kvascem *S. boulardii* (mg GAE/g s.m. ekstrakta).

Tabela P-1.5. Vrednosti procesnih promenljivih i odziva u eksperimentalnom dizajnu modela optimizacije fermentacije otpadnog rastavića bakterijom *L. rhamnosus* i kvascem *S. boulardii*

Proba	Procesne promenljive				Odzivi	
	A	B	C	D	Y ₁	Y ₂
1	48	7,5	50	1,50	33,03	28,97
2	22	5,0	20	1,00	34,38	45,26
3	48	7,5	50	0,66	22,95	55,60
4	48	7,5	50	1,50	31,67	26,07
5	22	10,0	80	2,00	34,78	63,33
6	48	7,5	50	1,50	30,00	32,31
7	48	7,5	0	1,50	40,65	26,90
8	74	5,0	20	2,00	27,24	43,20
9	48	7,5	100	1,50	51,70	51,07
10	22	10,0	20	2,00	37,71	50,95
11	91,7	7,5	50	1,50	50,00	70,18
12	74	5,0	80	2,00	47,93	66,09
13	74	10,0	20	1,00	36,90	43,46
14	48	7,5	50	2,34	24,19	42,96
15	22	5,0	80	1,00	36,05	64,09
16	48	3,3	50	1,50	41,20	27,30
17	48	11,7	50	1,50	33,20	51,74
18	74	10,0	80	1,00	44,83	68,18
19	4,3	7,5	50	1,50	29,20	58,00

A: vreme fermentacije (h); B: koncentracija inokuluma (%); C: koncentracija podloge (%); D: odnos tečno/čvrsto (ml/g);

Y₁: sadržaj ukupnih polifenola u ekstraktu rastavića fermentisanim bakterijom *L. rhamnosus* (mg GAE/g s.m. ekstrakta); Y₂: sadržaj ukupnih polifenola u ekstraktu rastavića fermentisanim kvascem *S. boulardii* (mg GAE/g s.m. ekstrakta).

PRILOG 2
SPISAK SKRAĆENICA KORIŠĆENIH U DISERTACIJI

AChE	acetilholinesteraza
ACh	acetilholin
AD	Alchajmerova bolest (<i>Alzheimer's disease</i>)
ANOVA	analiza varijanse
BHT	butilhidroksitoluen
CCD	centralni kompozitni dizajn (<i>Central Composite Design</i>)
DPPH	2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
DCQA	dikafeoilhinska kiselina (<i>Dicaffeoylquinic Acid</i>)
FRAP	antioksidativni potencijal neutralizacije jona gvožđa (<i>Ferric Reducing Antioxidant Power</i>)
GAE	ekvivalenti galne kiseline (<i>Gallic Acid Equivalents</i>)
HPLC	tečna hromatografija visokih performansi (<i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
IC ₅₀	koncentracija antioksidansa koja neutrališe 50% početne koncentracije DPPH radikala (<i>Inhibition Concentration</i>)
MAE	mikrotalasna ekstrakcija (<i>Microwave Assisted Extraction</i>)
MIC	minimalna inhibitorna koncentracija ekstrakta
PI	interval predviđanja (<i>Prediction Interval</i>)
QE	ekvivalenti kvercetina (<i>Quercetin Equivalent</i>)
RSM	metoda odzivne površine (<i>Response Surface Methodology</i>)
SEM	skenirajući elektronski mikroskop
s.m.	suva materija

BIOGRAFIJA AUTORA

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 biohemijско inženjerstvo i biotehnologiju 09.07.2008. godine 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 biohemijско 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 biohemijско inženjerstvo i biotehnologiju, u okviru projekta Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja: Primena biotehnoloških 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).

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Милица Милутиновић

број индекса 4056/2010

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

ИСКРИШЋЕЊЕ ОТПАДА ИЗ ПРЕРАДЕ ЈАГОРЧЕВИНЕ (*Primula veris*), РАСТАВИЊА (*Equisetum arvense*) И ХАДЛУЧКЕ ТРАВЕ (*Achillea millefolium*) ЗА ДОБИЈАЊЕ БИОЛОШКИ АКТИВНИХ ПОЛИФЕНОЛА

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, 21.6.2017.

Милица Милутиновић

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Милица Милутиновић

Број индекса 4056/2010

Студијски програм БИОХЕМИЈСКО ИНЖЕЊЕРСТВО И БИОТЕХНОЛОГИЈА

Наслов рада ИСКОРИШЋЕЊЕ ОСТАВА ИЗ ПРЕРАДЕ ЈАГОРЧЕВИНЕ (PRIMUM XENIS), РАСТАВИЊА (EQUISETUM ARVENSE) И ХАЈДУЧКЕ ТРАВЕ (ACHILLEA MILEFOLIUM) ЗА ДОБИЈАЊЕ БИОЛОШКИ АКТИВНИХ ПОЛИФЕНОЛА

Ментор ДР СУЗАНА ДИМИТРИЈЕВИЋ-БРАЈКОВИЋ, ТЕХНОЛОШКО-МЕТАЛУРШКИ ФАКУЛТЕТ
УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ

Потписани/а Милица Милутиновић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања 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 докторанда

У Београду, 21. 6. 2017.

Милица Милутиновић

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

ИСКОРИШЋЕЊЕ ОТПАДА ИЗ ПРераДЕ ЈАГОРЧЕВИНЕ (*Primula veris*), РАСТАВИЦА (*Equisetum arvense*) И ХАЛДУЧКЕ ТРАВА (*Achillea millefolium*) ЗА ДОБИВАЊЕ ЕНЕРГИЈИ АКТИВНИХ ПОЛУФЕНИЛА
која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 21. 6. 2017.

