

UNIVERZITET U BEOGRADU  
TEHNOLOŠKO-METALURŠKI FAKULTET

Sladana Z. Davidović

**PRIMENA DEKSTRANA IZ BAKTERIJA  
MLEČNE KISELINE ZA SINTEZU  
NANOČESTICA SREBRA I  
PROIZVODNJU JESTIVIH FILMOVA**

doktorska disertacija

Beograd, 2019

UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACULTY OF TECHNOLOGY AND METALLURGY

Sladana Z. Davidović

**APPLICATION OF DEXTRAN FROM  
LACTIC ACID BACTERIA FOR SILVER  
NANOPARTICLES SYNTHESIS AND  
EDIBLE COATINGS PRODUCTION**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2019

**MENTOR:**

---

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

**ČLANOVI KOMISIJE:**

---

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

---

Dr Katarina Mihajlovski, naučni saradnik  
Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet

---

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

**DATUM ODBRANE:**

---

## **Zahvalnica**

*Najveću zahvalnost dugujem svom mentoru, prof. dr Suzani Dimitrijević-Branković, na predloženoj temi i ukazanom poverenju. Neizmerno sam joj zahvalna na prenetom znanju i svesrdnoj pomoći tokom izrade ove doktorske disertacije, ali i na podršci, razumevanju, strpljenju i pozitivnoj energiji, kojom je učinila da rad na ovoj disertaciji bude jedno izuzetno prijatno iskustvo.*

*Veliku zahvalnost dugujem i doc. dr Mirjani Rajilić-Stojanović na brojnim sugestijama i korisnim savetima tokom planiranja eksperimenata i pisanja naučnih radova. Takođe hvala dr Katarini Mihajlovski na sugestijama tokom pisanja disertacije.*

*Posebno želim da se zahvalim dr Vesni Lazić na uloženom trudu i vremenu, prenetom znanju i nesebičnoj pomoći tokom svih faza izrade ove doktorske disertacije.*

*Neizmernu zahvalnost dugujem i dr Aleksandri Nešić, naučnom saradniku Instituta za nuklearne nauke Vinča, Univerziteta u Beogradu na nesebičnoj pomoći pri planiranju i izvođenju eksperimenata i analiziranju dobijenih rezultata iz oblasti jestivih filmova i premaza.*

*Veliko hvala svim dragim kolegama, profesorima, i tehničarima sa Katedre za Biohemijsko inženjerstvo i biotehnologiju na prijatnoj radnoj atmosferi. Posebno hvala Mioni i Nedi na iskrenom prijateljstvu i bezuslovnoj pomoći tokom rada u laboratoriji i u pisanju.*

*Konačno, ogromnu zahvalnost dugujem svojoj porodici na bezrezervnoj podršci i razumevanju tokom svih godina mog školovanja, a bratu Aleksandru još i na tehničkoj pomoći.*

# Primena dekstrana iz bakterija mlečne kiseline za sintezu nanočestica srebra i proizvodnju jestivih filmova

## Rezime

Predmet istraživanja ove doktorske disertacije je izolovanje bakterija mlečne kiseline iz zrna vodenog kefira, u cilju sinteze dekstrana, kao i ispitivanje mogućnosti primene dobijenog dekstrana za sintezu nanočestica srebra i proizvodnju jestivih filmova.

Iz zrna vodenog kefira izolovano je ukupno dvanaest bakterija mlečne kiseline, dok je sposobnost sinteze visokih prinosa dekstrana ustanovljena kod tri izolata. Nakon karakterizacije i identifikacije bakterija koje mogu da proizvode dekstran, za dalji rad je odabran izolat *Leuconostoc mesenteroides* T3. Dekstran je sintetisan pomoću enzima dekstransaharaze, izolovane iz odabranog soja. FTIR i NMR spektroskopijom je utvrđeno da je dekstran dobijen iz *Lc. mesenteroides* T3 linearan molekul, u kome su molekuli glukoze povezani  $\alpha$ -(1→6) glikozidnim vezama.

Svojstvo dekstrana da služi istovremeno kao redukciono sredstvo i stabilizator iskorišćeno je za sintezu nanočestica srebra. Ispitivanjem uticaja koncentracije dekstrana, pH vrednosti rastvora dekstrana i temperature na sintezu nanočestica srebra, utvrđeno je da su optimalni parametri: 0,03% dekstrana, pH = 9 i temperatura 60 °C, dok je koncentracija srebra u svim eksperimentima bila 0,2 mM. Nanočestice srebra sintetisane na ovaj način bile su stabilne više od tri meseca. Nanočestice srebra sintetisane pomoću dekstrana mogu selektivno da detektuju cistein među dvanaest testiranih aminokiselina, sa granicom detekcije 12  $\mu$ M. Koristeći ovu osobinu razvijena je brza i jednostavna metoda za detekciju cisteina pomoću dobijenog koloida.

Koloidni rastvor nanočestica srebra sintetisanih pomoću dekstrana je primenjen i za obradu pamučne tkanine i ispitana su njena antimikrobna svojstva. Prisustvo nanočestica srebra na tkanini je potvrđeno skenirajućom elektronskom mikroskopijom, difrakcijom X-zraka i spektrofotometrijski, merenjem refleksije. Antimikrobno dejstvo je pokazano prema Gram-negativnoj bakteriji *Escherichia coli*, Gram-pozitivnoj bakteriji *Staphylococcus aureus* i gljivici *Candida albicans*. Da bi se postigla potpuna redukcija broja živih ćelija svih testiranih mikroorganizama, za obradu pamučne tkanine je korišćen koloidni rastvor nanočestica srebra koncentracije 1 mM.

Dekstran iz *Lc. mesenteroides* T3 pokazao se pogodnim za sintezu jestivih filmova. Ispitan je uticaj koncentracije dekstrana i sorbitola kao plastifikatora na mehaničke osobine i barijerna svojstva filmova prema vodenoj pari. U cilju pronalaženja optimalne formulacije primenjena je metoda odzivnih površina. Utvrđeno je da najbolje mehaničke (zateznu čvrstoću 4,12 MPa i izduženje pri kidanju 60,82%) i barijerne osobine (propustljivost vodene pare  $6,87 \cdot 10^{-12}$  g/smPa) ima film sastava 3,40% dekstrana i 20,43% sorbitola. Borovnice su premazane optimalnom formulacijom, a zatim je praćen uticaj premaza na očuvanje kvaliteta ploda tokom skladištenja 21 dan na 8 °C. Rezultati gubitka mase, ukupnih šećera i titracijske kiselosti premazanih i kontrolnih, nepremazanih borovnica, pokazali su da premaz na bazi dekstrana može da produži rok trajanja borovnica tokom produženog skladištenja na hladnom.

Ključne reči: zrno vodenog kefir, dekstran, *Leuconostoc mesenteroides*, nanočestice srebra, pamučna tkanina, detekcija cisteina, jestivi filmovi, jestivi premazi, produženje roka trajanja

**Naučna oblast:** Tehnološko inženjerstvo

**Uža naučna oblast:** Biohemijско inženjerstvo i biotehnologija

**UDK broj:**

## **Application of dextran from lactic acid bacteria for silver nanoparticles synthesis and edible coatings production**

### **ABSTRACT**

The scope of this doctoral dissertation is the isolation of dextran producing lactic acid bacteria from the water kefir grain and testing the possibility of the obtained dextran for silver nanoparticles synthesis and edible film's production.

Twelve lactic acid bacteria were isolated from water kefir grains, and three of them produced high yields of dextran. After characterization and identification of the dextran producing bacteria, *Leuconostoc mesenteroides* T3 was selected for further investigation. The dextran was synthesized by enzyme dextransucrase isolated from the selected strain. FTIR and NMR spectroscopies reveal that dextran from *Lc. mesenteroides* T3 is a linear molecule with glucose molecules linked by  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 6) glycosidic bonds.

The dextran has both a reducing and stabilizing ability, and these features were exploited for synthesis of silver nanoparticles. By testing the influence of the dextran concentration, pH and the temperature on the synthesis of the silver nanoparticles, it was found that the optimal parameters for dextran-coated silver nanoparticles synthesis were 0.03% dextran, pH = 9 and temperature 60 °C. The concentration of silver was 0.2 mM. The silver nanoparticles synthesized by this method were stable for at least three months. It was determined that silver nanoparticles synthesized by dextran could selectively detect cysteine among twelve tested amino acids, with a detection limit of 12  $\mu$ M. Using this feature a quick and simple method for cysteine detection with the obtained colloid was developed.

The cotton fabric was impregnated with silver nanoparticles synthesized by dextran, and its antimicrobial properties were tested. The presence of silver nanoparticles on the surface of cotton fabric was confirmed by scanning electron microscopy, X-ray diffraction measurements and reflectance spectrophotometry. The cotton fabric impregnated with silver nanoparticles showed antimicrobial activity against bacteria *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, and fungus *Candida albicans*. Maximum reduction of viable cells of all tested microorganisms was obtained when 1.0 mM colloid consisting of silver nanoparticles was applied.

Dextran from *Lc. mesenteroides* T3 was used for the synthesis of edible films. The influence of the concentration of dextran and sorbitol as plasticizers on mechanical and water vapor barrier properties was examined using response surface methodology. After optimization by desirability approach, it was found that a film made of 3.40 wt% of dextran and 20.43 wt% of sorbitol showed the lowest water vapor permeability ( $6.87 \cdot 10^{-12}$  g/s m Pa), and the highest tensile strength and elasticity (4.12 MPa and 60.82%, respectively). The optimal formulation was applied as a coating on blueberries, and the effect of the coating on preserving the fruit quality was monitored during storage for 21 days at 8 °C. The results of weight loss, total sugars and titratable acidity of coated compared to control blueberries, showed that the dextran based coating can prolong the shelf life of blueberries, during prolonged storage in cold conditions.

Key words: water kefir grain, dextran, *Leuconostoc mesenteroides*, silver nanoparticles, antimicrobial fabric, cysteine detection, edible films, edible coatings, extending shelf-life

**Scientific area:** Technological engineering

**Scientific discipline:** Biochemical engineering and biotechnology

**UDC number:**



# SADRŽAJ

<b>1</b>	<b>UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>PREGLED LITERATURE</b> .....	<b>3</b>
2.1	BAKTERIJE MLEČNE KISELINE .....	3
2.2	EGZOPOLISAHARIDI .....	4
2.2.1	<i>Biosinteza egzopolisaharida</i> .....	4
2.2.2	<i>Homopolisaharidi bakterija mlečne kiseline</i> .....	6
2.2.2.1	Dekstran .....	11
2.2.3	<i>Skrining i izolacija sojeva koji proizvode egzopolisaharide</i> .....	12
2.2.4	<i>Kefirno zrno kao izvor bakterija koje proizvode egzopolisaharide</i> .....	13
2.3	NANOČESTICE METALA .....	14
2.3.1	<i>Primena polisaharida za sintezu nanočestica metala</i> .....	15
2.3.2	<i>Optičke osobine nanočestica metala</i> .....	17
2.3.3	<i>Morfološke karakteristike nanočestica metala</i> .....	19
2.3.4	<i>Primena nanočestica metala za kolorimetrijske senzore</i> .....	21
2.3.4.1	Detekcija cisteina .....	21
2.3.5	<i>Nanočestice srebra</i> .....	22
2.3.5.1	Mehanizam antimikrobnog dejstva nanočestica srebra .....	23
2.3.5.2	Toksičnost nanočestica srebra .....	24
2.3.5.3	Primena nanočestica srebra u proizvodnji tkanine sa antimikrobnim svojstvima .....	25
2.4	POLIMERNI MATERIJALI ZA PAKOVANJE HRANE .....	25
2.5	JESTIVI FILMOVI I PREMAZI .....	27
2.5.1	<i>Funkcionalne osobine jestivih filmova i premaza</i> .....	28
2.5.2	<i>Primena polisaharida za proizvodnju jestivih filmova i premaza</i> .....	29
2.5.2.1	Premazi za sveže voće i povrće .....	30
<b>3</b>	<b>CILJEVI RADA</b> .....	<b>33</b>
<b>4</b>	<b>MATERIJAL I METODE</b> .....	<b>34</b>
4.1	IZOLOVANJE I IDENTIFIKACIJA BMK KOJE SINTETIŠU DEKSTRAN .....	34
4.1.1	<i>Određivanje morfoloških karakteristika izolovanih sojeva</i> .....	35
4.1.2	<i>Ispitivanje fizioloških i biohemijskih karakteristika izolovanih sojeva</i> .....	36
4.1.2.1	Katalaza test .....	36
4.1.2.2	Sposobnost rasta na različitim temperaturama .....	36
4.1.2.3	Tolerancija na različite koncentracije natrijum-hlorida .....	36
4.1.2.4	Fermentacija šećera .....	36
4.1.3	<i>Molekularna karakterizacija metodom 16S rRNK sekvencioniranja</i> .....	37

4.2	UTVRĐIVANJE SPOSOBNOSTI PROIZVODNJE DEKSTRANA U TEČNOJ PODLOZI.....	39
4.2.1	<i>Uticaj temperature i dužine trajanja fermentacije na prinos dekstrana</i> .....	39
4.2.1.1	Izolacija i prečišćavanje dekstrana.....	39
4.2.2	<i>Karakterizacija uzoraka dekstrana</i> .....	40
4.2.2.1	Kvantitativno određivanje .....	40
4.2.2.2	Određivanje monomernog sastava.....	41
4.2.2.3	Infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom (FTIR) .....	41
4.3	SINTEZA DEKSTRANA POMOĆU DEKSTRANSAHARAZE IZ SOJA <i>LEUCONOSTOC MESENTEROIDES T3</i> .....	42
4.3.1	<i>Proizvodnja i prečišćavanje dekstransaharaze iz soja T3</i> .....	42
4.3.1.1	Određivanje koncentracije proteina .....	43
4.3.1.2	Određivanje aktivnosti dekstransaharaze .....	44
4.3.2	<i>Sinteza dekstrana</i> .....	46
4.3.3	<i>Karakterizacija dekstrana</i> .....	46
4.3.3.1	NMR.....	46
4.3.3.2	Reološke osobine.....	47
4.3.3.3	SEM.....	47
4.4	SINTEZA NANOČESTICA SREBRA POMOĆU DEKSTRANA IZ <i>LC. MESENTEROIDES T3</i> I ISPITIVANJE MOGUĆNOSTI NJIHOVE PRIMENE.....	47
4.4.1	<i>Optimizacija sinteze nanočestica srebra pomoću dekstrana iz Lc. mesenteroides T3</i> .....	47
4.4.2	<i>Primena nanočestica srebra za detekciju cisteina</i> .....	48
4.4.3	<i>Primena nanočestica srebra za dobijanje pamučne tkanine sa antimikrobnim svojstvima</i> .....	49
4.4.3.1	Citotoksičnost .....	49
4.4.3.2	Modifikovanje pamučne tkanine koloidnim rastvorom srebra.....	50
4.4.3.3	Karakterizacija pamučne tkanine modifikovane koloidnim rastvorom nanočestica srebra.....	50
4.4.3.4	Analiza antimikrobnih svojstava tkanine .....	51
4.5	SINTEZA JESTIVIH FILMOVA OD DEKSTRANA IZ <i>LC. MESENTEROIDES T3</i> .....	51
4.5.1	<i>Dizajn eksperimenta optimizacije</i> .....	52
4.5.2	<i>Karakterizacija jestivih filmova na bazi dekstrana iz Lc. mesenteroides T3</i> .....	53
4.5.2.1	Mehanička svojstva .....	53
4.5.2.2	Propustljivost vodene pare.....	53
4.5.2.3	Ugao kvašenja.....	53
4.5.2.4	Termička svojstva .....	54
4.5.3	<i>Ispitivanje uticaja prevlake na bazi dekstrana na održanje kvaliteta ploda borovnice tokom skladištenja</i> .....	54
4.5.3.1	<b>Parametri kvaliteta borovnica</b> .....	54

4.5.3.1.1	Gubitak mase.....	54
4.5.3.1.2	Određivanje sadržaja rastvorne suve materije (ukupnih šećera) .....	55
4.5.3.1.3	Titracijska kiselost .....	55
<b>5</b>	<b>REZULTATI I DISKUSIJA .....</b>	<b>56</b>
5.1	IDENTIFIKACIJA SOJEVA BMK KOJI SINTETIŠU DEKSTRAN.....	56
5.1.1	<i>Utvrdjivanje sposobnosti proizvodnje dekstrana u tečnoj podlozi .....</i>	<i>60</i>
5.1.2	<i>Karakterizacija uzoraka dekstrana .....</i>	<i>64</i>
5.1.3	<i>Karakterizacija dekstrana sintetisanog pomoću dekstransaharaze izolovane iz BMK izolata Leuconostoc mesenteroides T3.....</i>	<i>65</i>
5.1.3.1	NMR spektroskopija .....	65
5.1.3.2	Reološke osobine.....	66
5.1.3.3	Površinska morfologija .....	68
5.2	PRIMENA DEKSTRANA IZ LC. MESENTEROIDES T3 ZA SINTEZU NANOČESTICA SREBRA .....	69
5.2.1	<i>Optimizacija sinteze nanočestica pomoću dekstrana i određivanje njihove stabilnosti.....</i>	<i>69</i>
5.2.1	<i>Osetljivost i selektivnost nanočestica srebra sintetisanih pomoću dekstrana za detekciju cisteina.....</i>	<i>75</i>
5.2.2	<i>Primena nanočesticasrebra sintetisanih pomoću dekstrana za dobijanje tkanine sa antimikrobnim svojstvima .....</i>	<i>79</i>
5.2.3	<i>Modifikacija pamučne tkanine nanočesticama srebra.....</i>	<i>82</i>
5.2.3.1	Antimikrobna aktivnost pamučne tkanine modifikovane nanočesticama srebra .....	86
5.3	PRIMENA DEKSTRANA IZ LC. MESENTEROIDES T3 ZA SINTEZU JESTIVIH FILMOVA I PREMAZA.....	89
5.3.1	<i>Optimizacija sastava jestivog filma na bazi dekstrana .....</i>	<i>89</i>
5.3.1.1	Adekvatnost modela i analiza odzivnih površina za mehaničke osobine.....	90
5.3.1.2	Adekvatnost modela i analiza odzivnih površina za propustljivost vodene pare i ugao kvašenja.....	93
5.3.1.3	Određivanje optimalnih uslova i validacija modela .....	95
5.3.2	<i>Ispitivanje termičke stabilnosti jestivih filmova.....</i>	<i>96</i>
5.3.1	<i>Uticaj jestivog filma na bazi dekstrana i sorbitola na održivost kvaliteta borovnice tokom skladištenja .....</i>	<i>97</i>
<b>6</b>	<b>ZAKLJUČAK .....</b>	<b>101</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURA .....</b>	<b>103</b>

## 1 UVOD

Porast broja stanovništva, ali i ekološke svesti sa jedne strane i iscrpljenost fosilnih goriva sa druge, usmeravaju naučna istraživanja ka potrazi za novim materijalima koji mogu zameniti polimere na bazi nafte [1]. Prirodni polimeri, uključujući polisaharide, proteine i nukleinske kiseline, predstavljaju odličnu alternativu, s obzirom na to da se dobijaju iz obnovljivih izvora. Veoma su rasprostranjeni u prirodi, a kao biokompatibilni i biorazgradivi nisu štetni ni za ljudsko zdravlje, ni za životnu sredinu. Za dizajniranje novih materijala, posebno su pogodni polisaharidi zbog raznolikosti u strukturama i hemijskim osobinama, kao što su monosaharidni sastav, dužina lanca, naelektrisanje i stereohemija. Poslednjih decenija, mnogi polisaharidi poreklom iz životinja, biljaka i mikroorganizama, našli su primenu u medicini, farmaciji, poljoprivredi, ekologiji, kozmetici, prehrambenoj industriji [1–4].

Za novim izvorima polisaharida i dalje se neprestano traga. S obzirom na raznovrsnost i funkcionalnost hemijskih proizvoda dobijenih iz mikroorganizama, mikroorganizmi se smatraju najboljim izborom za razvoj novih bioproizvoda. Među svim do sada poznatim rodovima, bakterije mlečne kiseline (BMK) su najviše istraživana grupa mikroorganizama jer poseduju GRAS-status (*Generally Recognized As Safe*) [5]. BMK su veoma rasprostranjene u prirodi; često se nalaze na raznom voću, povrću, mesu, mlečnim proizvodima, žitaricama, fermentisanim proizvodima. Mnogi sojevi BMK sintetišu različite tipove egzopolisaharida (EPS), koji se tokom fermentacije izlučuju u medijum, što znatno olakšava postupak njihove izolacije. Pronalaženje i izučavanje novih sojeva koji proizvode EPS otvara mogućnost za dobijanje polimera novih strukturnih i funkcionalnih osobina.

Mnogi mikrobni EPS-i imaju široku komercijalnu primenu. Zahvaljujući svojim strukturnim i reološkim svojstvima najveći broj primena su našli u prehrambenoj industriji, gde se koriste kao ugušćivači, stabilizatori, emulgatori, veziva, ambalažni materijali za pakovanje hrane, zatim u farmaciji, medicini, kozmetici, poljoprivredi. U skorije vreme mikrobni EPS-i se sve češće koriste u nanotehnologiji, za sintezu nanočestica metala.

Najviše korišćen od svih EPS-a koje sintetišu BMK je dekstran. Sintetisani su takođe i različiti tipovi estara i etara dekstrana, čime su dobijeni makromolekuli

različitih svojstava, koja zavise od tipa supstituenta, stepena supstitucije i molekulske mase dekstrana. Komercijalnu primenu imaju i prirodni dekstrani, kao i njihovi parcijalni hidrolizati, ali i derivati dekstrana.

Najpoznatija je primena dekstrana u medicini, kao zamena za krvnu plazmu. Dekstrani veće molekulske mase mogu služiti kao osmotski agensi, pa se primenjuju u tretmanu hipovolemije [6]. Primenu u medicini su našli i derivati dekstrana: dekstran-sulfati sprečavaju zgrušavanje i olakšavaju protok krvi, pa se koriste kao zamena za heparin, dok se gvožđe-dekstran upotrebljava za tretman anemije. U mikrohirurgiji, dekstran smanjuje rizik od gubitka slobodnog tkiva pri transferu. Rasprostranjena je i primena dekstrana u hemiji za pravljenje matriksa za hromatografske kolone kao što su Sephadex, Sephacryl i Superdex [7–9].

Primena dekstrana je u velikoj meri uslovljena svojstvima, kao što su molekulska masa, tip veze i stepen grananja [10]. Ove karakteristike dekstrana zavise od uslova gajenja i korišćenog soja BMK, što ukazuje na značaj izolacije i karakterizacije novih sojeva.

U ovoj doktorskoj tezi zrno vodenog kefir je korišćeno za izolaciju novih BMK sojeva sa visokim potencijalom za proizvodnju dekstrana. Prvi deo istraživanja obuhvata karakterizaciju samih izolata, kao i dobijenih dekstrana. Drugi deo teze zasniva se na primeni dekstrana iz izolata *Leuconostoc mesenteroides* T3 za sintezu nanočestica srebra. Razvijena je brza i jednostavna metoda za detekciju cisteina pomoću sintetisanih nanočestica. Takođe, nanočestice srebra su iskorišćene za dobijanje tkanine sa antimikrobnim svojstvima. U trećem delu disertacije dekstran je korišćen za sintezu jestivih filmova i premaza sa ciljem pronalaženja formulacije koja ima najbolji uticaj na održanje kvaliteta ploda borovnice tokom skladištenja.

## 2 PREGLED LITERATURE

### 2.1 Bakterije mlečne kiseline

Bakterije mlečno-kiselinskog vrenja (BMK) su Gram-pozitivni, nesporigeni štapići ili koke, katalaza-negativne, anaerobne ili mikroaerofilne bakterije karakteristične po sposobnosti da fermentišu šećer do mlečne kiseline [11]. Ovoj grupi bakterija pripadaju različiti rodovi, uključujući *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Teragenococcus*, *Vagococcus*, *Sporolactobacillus* i *Weisella* [12]. Zbog jedinstvenog svojstva mlečnokiselinske fermentacije, BMK se koriste u cilju produženja roka trajanja, unapređenja ukusa i nutritivne vrednosti, poboljšanja teksture prehrambenih proizvoda. Neke BMK proizvode proteinska antimikrobna jedinjenja bakteriocine, koji inhibiraju rast Gram pozitivnih patogena i bakterija uzročnika kvarenja hrane, pa se koriste kao aditivi u hrani. Poznato je da su BMK dobri probiotici jer regulišu ravnotežu crevne mikrobiote i da deluju pozitivno kod dijareje, alergija, intolerancije laktoze [11].

BMK se nalaze u prirodnim sredinama, na različitim plodovima povrća i voća, kao epifitna mikrobiota zelenih delova biljaka, u ustima i intestinalnom traktu ljudi i životinja, u mleku i mlečnim proizvodima, u ukišeljnom vinu, pivu, voćnim sokovima koji previru, u fermentisanim proizvodima od mesa, turšijama, salati, itd. U zemljištu se ređe nalaze, osim u okolini mlekara, fabrika za proizvodnju skroba i slično, gde dolaze sa otpadnim vodama iz proizvodnog procesa [13].

Za izdvajanje i gajenje BMK se koriste podloge složenog sastava, kao što su APT i MRS [14], koje su bogate peptidima i aminokiselinama kao i lako asimilativnim ugljenim hidratima, a za rast i razvoj im je neophodno prisustvo vitamina B kompleksa, makar i u tragovima [13].

Posebnu pažnju privlači sposobnost mnogih sojeva BMK da sintetišu širok spektar egzopolisaharida (EPS). Imajući u vidu raznolikost njihovih strukturnih i funkcionalnih svojstava, EPS-i su našli veliki broj komercijalnih primena [15].

## 2.2 Egzopolisaharidi

Egzopolisaharidi su dugolančani polisaharidi proizvedeni ekstracelularno, uglavnom od strane bakterija i mikroalgi, a ređe kod kvasaca i gljiva. Sastoje se od niza razgranatih jedinica šećera ili njihovih derivata. Šećeri koji ulaze u sastav EPS-a su pretežno glukoza, galaktoza, manoza, N-acetilglukozamin, N-acetilgalaktozamin i ramnoza, u različitim molarnim odnosima [16]. EPS nisu stalno vezani za površinu mikrobne ćelije, već se tokom rasta izlučuju u spoljašnju sredinu u vidu rastresite sluzi. To ih razlikuje od strukturno sličnih kapsularnih polisaharida, koji ostaju stalno vezani za površinu mikrobne ćelije. EPS igraju ključnu ulogu u zaštiti mikroorganizama od nepovoljnih uslova sredine, kao što su isušivanje, nedostatak hranljivih materija, prisustvo toksičnih jedinjenja, osmotski stres, bakteriofagi i antagonisti [17]. Njihova je uloga takođe u adheziji bakterija za čvrste površine, obrazovanju biofilma, ćelijskom prepoznavanju i patogenosti. Generalno, bakterije ne koriste EPS koji sintetišu kao hranu, mada *Streptococcus mutans* i *Streptococcus sobrinus* imaju sposobnost razgradnje dekstrana koji sintetišu, dok *Streptococcus mutans* koristi oligosaharide koje sam proizvodi.

Mikrobni EPS se mogu podeliti u dve grupe na osnovu monosaharidnog sastava i puta biosinteze. Homopolisaharide (HoPS) čine dekstran, mutan, alternan, reuternan, pululan, levan, inulin, kurdlan, celuloza itd. Predstavnici heteropolisaharida (HePS) su gelan, ksantan, kefiran [18]. HoPS se sastoje od identičnih monosaharidnih jedinica, D-glukoze ili D-fruktoze, na osnovu čega je izvršena njihova podela na glukane i fruktane [19]. Sa druge strane, HePS izolovani iz BMK se sastoje od niza jedinica koje međusobno nemaju mnogo strukturnih sličnosti [20].

### 2.2.1 Biosinteza egzopolisaharida

Mikrobni polisaharidi se mogu sintetisati intracelularno ili ekstracelularno. Mehanizmi biosinteze kod većine proučavanih polisaharida su veoma slični. Nekoliko osnovnih karakteristika biosinteze je prisutno u svim mikroorganizmima. Međutim, kakav će se supstrat primeniti, zavisi od vrste odabranog proizvođača polisaharida. Brojna istraživanja su uključivala proizvodnju egzopolisaharida pomoću kvasaca i bakterija. Tipična sinteza polisaharida u bakterijama uključuje mnoge korake koji su

zajednički za sintezu kapsula i ćelijskog zida. Sutherland (Saterlend) [21] je generalizovao ekstracelularnu sintezu u 4 osnovna koraka:

- **Usvajanje supstrata** je jedno od prvih ograničenja u proizvodnji polisaharida. Postoje tri mehanizma ulaska supstrata u ćeliju: olakšana difuzija, aktivni transport i grupna translokacija. Koji će se od ovih mehanizama primeniti, zavisi od tipa mikroorganizma [4].
- **Intermedijarni metabolizam:** Supstrat koji je ušao u ćeliju je obično fosforilisan ili mehanizmom translokacije grupe ili uz pomoć heksokinaze koja koristi adenozin 5'-trifosfat. Ovako fosforilisan supstrat se onda može koristiti za energiju ili za formiranje intracelularnih polisaharida, lipopolisaharida, polisaharida ćelijskog zida ili egzopolisaharida. Prema tome, postoji konkurencija za korišćenje supstrata za sintezu različitih proizvoda, a kontrolisana je od strane same ćelije.
- **Formiranje polisaharida:** Za nekoliko bakterijskih polisaharida se zna da su izgrađeni od niza jedinica šećernih ostataka. Prenos odgovarajućih glikozil grupa iz „šećernih nukleotida” omogućava formiranje ovih jedinica na nosaču. Tačan mehanizam daljeg produženja lanca i oslobađanje ekstracelularnih polisaharida je još uvek nepoznat, ali se može pretpostaviti da se sinteza polisaharida obavlja u citoplazmatičnoj membrani koja je ujedno i mesto sinteze lipopolisaharida. Pošto postoji konkurencija za izoprenoidne lipide između lipo- i egzopolisaharidnih peptidoglukana i tejhodne kiseline, dostupnost izoprenoid-lipidnog fosfata predstavlja jedan od najkritičnijih faktora za biosintezu egzopolisaharida.
- **Modifikacija i odvajanje polisaharida:** Mnogi polisaharidi sadrže acil- ili acetal supstituente. Pošto je odnos acil grupa u polisaharidima promenljiv, a takođe karakteristike polimera mogu zavisiti od sadržaja acil supstituenata, potrebno je posvetiti dosta pažnje faktorima koji uslovljavaju sintezu ovih grupa. Dobijeni preliminarni rezultati, ukazuju na to da se acilacija dešava dok je rastući oligosaharid zakačen za lipidni nosač. Uobičajene nešećerne komponente su o-acetil i acetal grupe o-(1-karboksietilidin) piruvata, mada se i druge acil grupe kao što su formil, sukcinil i malonil takođe mogu naći u nekim mikrobnim polisaharidima.



Način na koji se formirani egzopolisaharid otpušta sa izoprenoid-lipidnog nosača, još uvek nije poznat. Najverovatnije je da prisutni enzimi cepaju terminalnu fosfatnu vezu između monosaharidnih ostataka. Dužina lanca polisaharida može zavisiti od brzine rasta, pa u slučaju velike brzine rasta, može doći do izvrtanja lipidnog nosača i oslobađanja polisaharida manje molekulske mase [21].

### 2.2.2 Homopolisaharidi bakterija mlečne kiseline

Za razliku od HePS čija se sinteza odvija kombinovanim dejstvom više tipova glikoziltransferaza koje koriste nukleotidne šećere, HoPS se sintetišu iz samo jednog supstrata – saharoze, aktivnošću ekstracelularnih enzima, koji se obično nazivaju glikansaharaze. Enzimi koji sintetišu glukane – glukansaharaze (GS) postoje samo kod BMK, dok su fruktansaharaze (FS) prisutne i kod drugih Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija [22–24].

Iako GS i FS enzimi katališu veoma sličnu reakciju na istim supstratima, njihove aminokiselinske sekvence nisu slične i proteinske strukture im se znatno razlikuju [24]. GS i FS su transglikozidaze koje se evolutivno, po strukturi i na osnovu mehanizma dejstva svrstavaju u glikozil-hidrolaze (GH). Prema klasifikaciji glikozil-hidrolaza u familije (koja je zasnovana na aminokiselinskim sekvencama), GS pripadaju familiji GH70, a FS se klasifikuju kao familija GH68 [25].

GS enzimi se klasifikuju na osnovu reakcije koju katalizuju i specifičnosti proizvoda:

1. Dekstransaharaza (saharoza:1,6- $\alpha$ -D-glukan-6- $\alpha$ -D-glukoziltransferaza, EC 2.4.1.5). Zajedno sa dekstransaharazom kao EC 2.4.1.5. klasifikovani su i mutansaharaza (saharoza:1,3- $\alpha$ -D-glukan-3- $\alpha$ -D-glukoziltransferaza) i reutersaharaza (saharoza:1,4(6)- $\alpha$ -D-glukan-4(6)- $\alpha$ -D-glukoziltransferaza).
2. Alternansaharaza (saharoza:1,6(1,3)- $\alpha$ -D-glukan-6(3)- $\alpha$ -D-glukoziltransferaza, EC 2.4.1.140).

Takođe razlikuju se i dva FS enzima po različitim proizvodima koje sintetišu:

1. Inulosaharaza (saharoza:2,1- $\beta$ -D-fruktoziltransferaza, EC 2.4.1.9) i
2. Levansaharaza (saharoza:2,6- $\beta$ -D-fruktan-6- $\beta$ -D-fruktoziltransferaza, EC 2.4.1.10).

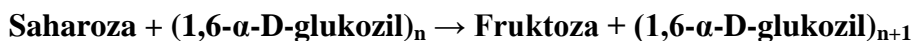
Mikrobni GS enzimi (GH70) isključivo sintetišu  $\alpha$ -glukane. Sinteza ovih polimera zabeležena je kod sledećih rodova BMK: *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Weissella*, *Enterococcus*, *Pediococcus* i *Oenococcus* [26–35].

GS su veliki ekstracelularni proteini prosečne molekulske mase od 160 kDa [24]. GS enzimi sintetišu različite glukane, koji se međusobno razlikuju po tipu glikozidnih veza, stepenu i tipu grananja, dužini glukanskog lanca, molekulskoj masi i konformaciji polimera. Sve ove osobine snažno doprinose specifičnim osobinama polisaharida, kao što su rastvorljivost, reološke osobine i druge fizičke karakteristike [28].

GS enzimi seku glikozidne veze supstrata (saharoze) i kupuju glukoznu jedinicu na:

- rastući glukanski lanac (transglikozilacija),
- vodu (hidroliza), ili
- drugi supstrat akceptor (akceptorska reakcija).

Energija oslobođena cepanjem energijom bogate glikozidne veze u molekulu saharoze, troši se za sintezu novih glikozidnih veza. Dekstran se sintetiše prema sledećoj reakciji:

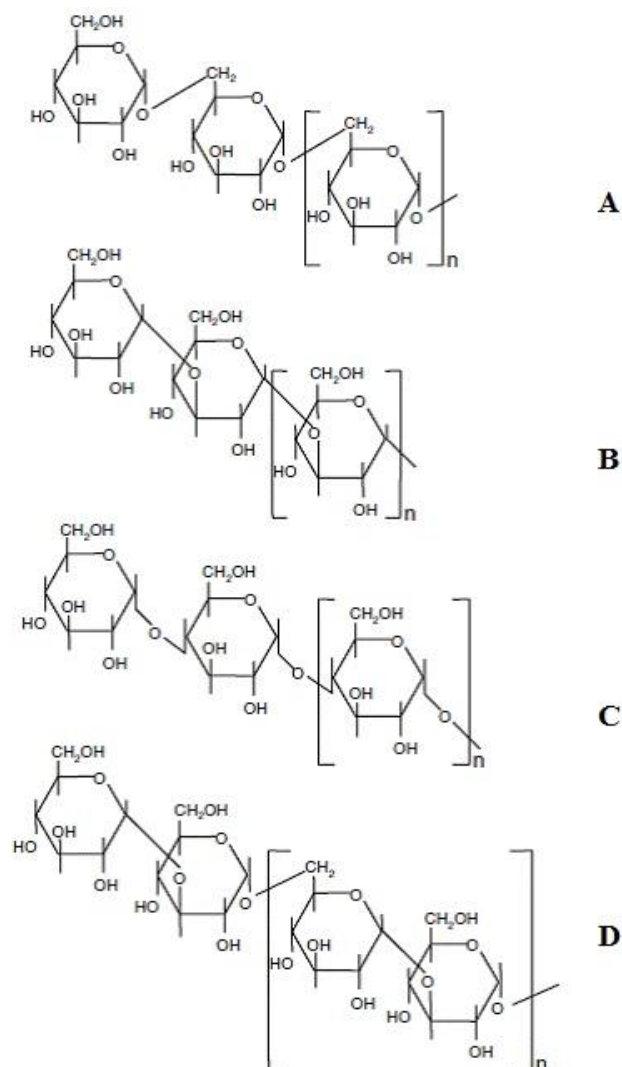


Postoje mnogi primeri GS enzima koji sintetišu linearne glukane sa  $\alpha$ -(1→6) glikozidnim vezama (dekstran), ali i onih koje katalizuju formiranje dve različite glikozidne veze. Na taj način nastaje razgranat glukanski proizvod, ili linearan glukan sa dve različite (alterirajuće) glikozidne veze [24].

U zavisnosti od tipa glavnih glikozidnih veza prisutnih u molekulu njihovih glukana, razlikuju se četiri tipa  $\alpha$ -glukana koje sintetišu BMK: dekstran, mutan, alternan i reuteran [11,24]. Strukture ovih polimera prikazane su na slici 2.1.

Naziv „dekstran” je prvi upotrebio Scheibler (Šajbler) 1874. godine, kada je pronašao zgusnut sok koji je preostao od prerade šećerne trske i šećerne repe [36]. Gustina soka je poticala od ugljenog hidrata empirijske formule  $(C_6H_{10}O_6)_n$ , sa pozitivnom optičkom rotacijom, po čemu je polimer i dobio ime. Odgovarajući ekstracelularni enzim nazvan je dekstransaharaza. Prethodno je Paster pokazao da

gustina soka potiče od mikrobne aktivnosti, a van Tieghem (fan Tihem) je pronašao i da je *Leuconostoc mesenteroides* organizam uzročnik [37,38].



Slika 2.1 Strukture  $\alpha$ -glukana: a) dekstran, b) mutan, c) reuteran, d) alternan

Zajednička osobina svih dekstrana je obilje  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 6) veza u glavnom lancu, sa tačkama grananja u pozicijama O2, O3 ili O4 [39]. Stepen grananja koji uključuje  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 2),  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3) i  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4) veze u dekstranima varira u zavisnosti od porekla dekstransaharaze [11].

Guggenheim (Gugenhajm) je pokazao da je gluklan, nerastvoran u vodi, izolovan iz *S. mutans* OMZ176, sadržao visok procenat (do 90%)  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3) glikozidnih veza [40]. Predložio je mutan kao ime za ovaj polimer, a odgovarajući enzim je shodno tome

nazvan mutansaharaza. Mutani su strukturne i funkcionalne komponente kariogenih biofilmova [41]. Polimere mutana uglavnom proizvode različite streptokoke, pre svih sojevi *Streptococcus mutans* i *S. sobrinus* [41,42].

Mutani se sintetišu aktivnošću jednog ili više GT enzima, koji se međusobno razlikuju po udelu  $\alpha$ -(1→3) i  $\alpha$ -(1→6) veza, zatim po stepenu grananja koji uvode u glukan, kao i po ukupnoj dužini lanca sintetisanog glukana. Svojstva nastalog mutana zavise od relativnih aktivnosti više GT enzima, ali i od njihovih dinamičkih interakcija, s obzirom na to da jedan GT enzim može da modifikuje proizvod nastao aktivnošću drugog [43–45]. Kao posledica toga molekuli mutana imaju veoma razgranate i raznovrsne strukture, u kojima dominiraju  $\alpha$ -(1→3) veze [41].

Côté i Robyt (Kote i Robi) su izolovali glukanski polimer iz *Lc. mesenteroides* NRRL B-1355 koji se sastojao od alterirajućih  $\alpha$ -(1→6) i  $\alpha$ -(1→3) glikozidnih veza. Da bi ga razlikovali od dekstrana (95%  $\alpha$ -(1→6)) koji takođe sintetiše ovaj soj, novoizolovani polisaharid su nazvali alternan, a odgovarajući GS enzim – alternansaharaza [46]. Zbog jedinstvene strukture, alternan je dobro rastvoran, slabo viskoznan i izuzetno je otporan na enzimsku hidrolizu [11].

Još jedan tip glukana sa pretežno  $\alpha$ -(1→4) glikozidnim vezama identifikovan je kod *Lactobacillus reuteri* LB 121. Glukan je nazvan reuteran, a odgovarajući GS enzim reuteransaharaza. Reuteran koji sintetiše *Lb. reuteri* 121 je glukan sa  $\alpha$ -(1→4),  $\alpha$ -(1→6) glikozidnim vezama i grananjem u  $\alpha$ -(1→4,6) položaju [47].

Bakterijske FS sintetišu ili levan (levansaharaza) ili inulin (inulosaharaza). Enzimi inulosaharaze su prisutni jedino kod BMK, dok su levansaharaze široko rasprostranjene i kod Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija. Aminokiselinske sekvence levansaharaza iz Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija se podudaraju svega oko 20%. FS enzimi BMK su veći. Levansaharaza iz *S. salivarius* ATCC 13419 je posebno veliki enzim, molekulske mase 140 kDa [48]. Većina istraživanja vezanih za levansaharazu izvedena je na enzimima izolovanim najviše iz *Bacillus* spp. i *Zymomonas* spp., i u manjoj meri iz *Lactobacillus* spp., *Streptococcus* spp. i *Gluconacetobacter* spp. vrsta [24].

Bakterijske FS su ekstracelularni enzimi koji seku glikozidnu vezu supstrata (uglavnom saharoza, mada može ponekad i rafinoza), a oslobođenu energiju koriste da kupuju fruktoznu jedinicu na:

- rastući fruktanski (levan ili inulin) lanac (transfruktozilacija),
- saharozu,
- vodu (hidroliza), ili
- drugi akceptor (rafinoza).

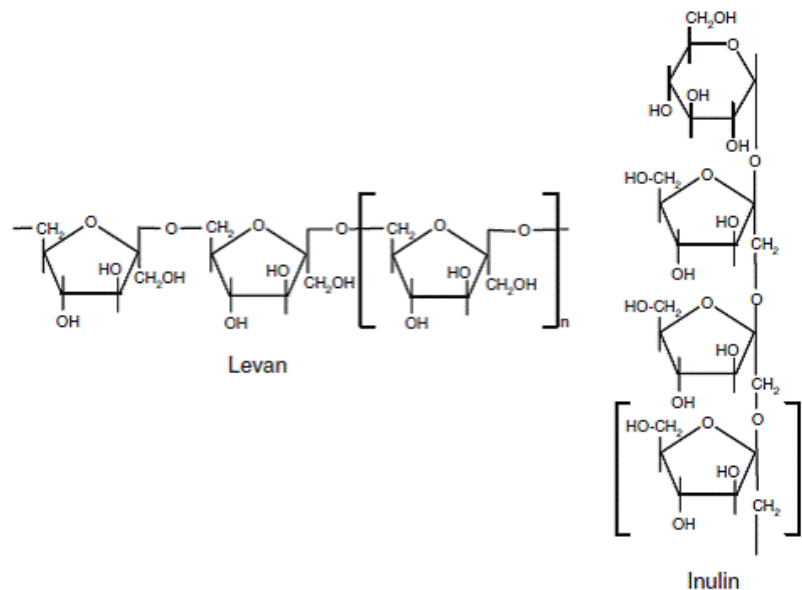
Kako se saharoza koristi kao akceptor u inicijaciji primarne reakcije, bakterijski fruktani imaju neredukujuću glukoznu jedinicu na kraju lanca. U reakciji inicijacije FS, fruktoza iz molekula saharoze se enzimski kupluje na drugu neredukujuću fruktozu sa primarnom alkoholnom grupom na poziciji C-2, igrajući ulogu akceptorskog supstrata, tj. saharoze, rafinoze ili molekula fruktana [49,50], poznatije kao reakcija formiranja prajmera. U narednim koracima sledi elongacija prajmera. Jasna razlika između FS i GS enzima je upravo u tome što GS enzimi ne mogu da koriste saharozu kao akceptor.

Levani se sastoje od molekula fruktoze povezanih u najvećoj meri  $\beta$ -(2→6) glikozidnim vezama sa po kojim grananjem u položaju  $\beta$ -(2→1). Među BMK, sinteza levana je zabeležena kod *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus sanfranciscensis* LTH 2590 i *Lactobacillus reuteri* LB 121. Takođe, levansaharazu sintetiše i *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F, pored dekstransaharaze [19,24].

Levan je jedinstven polisaharid po relativno niskoj unutrašnjoj viskoznosti u poređenju sa sličnim molekulima velike molekulske mase. Ne gelira i ne bubri u vodi na sobnoj temperaturi [11].

Fruktani inulinskog tipa (slika 2.2) u glavnom nizu sadrže  $\beta$ -(2→1) povezane molekule fruktoze, sa grananjem u položaju  $\beta$ -(2→6). *Lactobacillus johnsonii* NCC 533 proizvodi inulin iz saharoze dejstvom inulosaharaze. Među BMK, sinteza inulina je primećena još kod *Streptococcus mutans* JC2 [11], *Leuconostoc citreum* CW28 [51] i *Lactobacillus reuteri* 121 [52].

Strukture levana i inulina prikazane su na slici 2.2.



Slika 2.2 Strukture levana i inulina

### 2.2.2.1 Dekstran

Osim BMK, dekstrane sintetišu i sirćetne bakterije, uglavnom iz roda *Gluconobacter* [53–57]. Ove bakterije sintetišu enzim dekstran dekstrinazu (EC 2.4.1.2), transglukozidazu koja maltodekstrine pretvara u (oligo)dekstran. Dekstran dekstrinaza katalizuje prenos  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4) glukozilne jedinice iz donora u molekul akceptora, formirajući  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 6) vezu [54]. Dekstran iz *Gluconobacter* sojeva se u suštini sastoji od  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 6) lanaca glukoze sa tačkama grananja u položaju  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4) [10].

Pored prirodnog procesa fermentacije, dekstran se može sintetisati i hemijskim putem [58].

Za industrijsko dobijanje dekstrana koristi se soj *Lc. mesenteroides* NRRL B-512F [10,59]. Bakterija se gaji u podlozi bogatoj saharozom, koja je, osim što služi kao izvor ugljenika, neophodna i za indukciju sinteze dekstransaharaze. Ostali hranljivi sastojci podloge obuhvataju organske izvore azota (kvašćev ekstrakt, pepton, hidrolizat kazeina) i minerale (kalcijum i fosfat), koji se dodaju radi većeg prinosa dekstransaharaze i dekstrana. Početna pH vrednost fermentacionog medijuma je između 6,7 i 7,2, što je optimalno za sintezu enzima. Nakon definisanja početnih uslova, dalji tok procesa se slabo kontroliše. Tokom prvih 20 sati fermentacije, kao posledica metaboličke aktivnosti, odnosno izlučivanja mlečne kiseline, pH opada na vrednost oko 5, što pogoduje proizvodnji dekstrana, jer je na toj pH vrednosti aktivnost

dekstranasaharaze najveća. Temperatura inkubacije i koncentracija saharoze utiču na molekulsku masu i stepen grananja dekstrana. Na temperaturi nižoj od 25 °C, povećava se količina dekstrana nižih molekulskih masa, dok na višim temperaturama dolazi do grananja. Sa povećanjem koncentracije saharoze, opadaju i stepen grananja i prinos dekstrana velike molekulske mase [60]. Optimalnim se smatra koncentracija saharoze 2-10 % [59]. Nakon 24-48 h fermentacije dekstran se iz fermentacionog medijuma dobija alkoholnom precipitacijom i prečišćava ponovnim taloženjem, nakon rastvaranja u vodi. Ostaci ćelija uklanjaju se centrifugiranjem. Nativni dekstran se zatim delimično hidrolizuje da bi se dobio proizvod željene mase za odgovarajuću primenu [10,59].

Mana ovog uobičajenog procesa je što se istovremeno, pod identičnim uslovima, odvijaju umnožavanje ćelija, proizvodnja dekstransaharaze i sinteza dekstrana. Ne samo da uslovi ne mogu biti optimalni za sve tri faze, već se i menjaju tokom fermentacije. Alternativni način dobijanja dekstrana je enzimska sinteza. U tu svrhu se može koristiti supernatant dobijen nakon odvajanja ćelija, koji sadrži dekstransaharazu, ili prečišćen enzim. Najjednostavnija metoda za prečišćavanje dekstransaharaze je metoda dvofazne raspodele korišćenjem poli(etilenglikola) (PEG). Enzimska sinteza dekstrana se odvija pod kontrolisanim uslovima. Osim toga, ovaj način sinteze daje čistiji polimer, koji je lakše prečistiti.

### **2.2.3 Skrining i izolacija sojeva koji proizvode egzopolisaharide**

Mikroorganizmi koji proizvode EPS nađeni su u različitim ekološkim nišama. Sredine bogate medijumom sa visokim odnosom zastupljenosti ugljenika spram azota, kao što su efluenti iz šećerne, prehrambene, ili papirne industrije, sadrže ove organizme [61].

Mikroorganizmi koji proizvode EPS mogu se izolovati korišćenjem složenih podloga ili hemijski definisanih sintetičkih podloga. Obrazuju sluzave kolonije, pa se mogu detektovati makroskopski, ali ne postoji direktna korelacija između morfoloških karakteristika kolonija na čvrstoj podlozi i sposobnosti kulture da proizvodi EPS u tečnom medijumu.

#### 2.2.4 Kefirno zrno kao izvor bakterija koje proizvode egzopolisaharide

Kefir je napitak koji nastaje fermentacionom aktivnošću mikroorganizama smeštenih unutar polisaharidnog matriksa – kefirnog zrna [62]. U zavisnosti od strukture polisaharidnog matriksa, razlikuju se zrna mlečnog i vodenog kefira, čija imena potiču od supstrata u kojima se gaje. Mlečni kefir se dobija fermentacijom mleka, dok vodeni kefir nastaje fermentacijom vodenog rastvora saharoze kome se obično doda suvo voće (najčešće suve smokve) i kriška limuna [62,63]. Oba napitka su blago kiselog ukusa, sa niskim sadržajem etanola (0,2-3%) i ugljen-dioksida.

Kefirna zrna predstavljaju masu od nekoliko različitih vrsta bakterija i kvasaca okruženih kompleksnim matriksom od proteina i ugljenih hidrata. Mikroorganizmi prisutni u zrnu fermentišu supstrat, tako da se zrna na kraju svakog procesa fermentacije ponovo upotrebe za novu fermentaciju. Mikrobiološki sastav kefira i kefirnih zrna može da se razlikuje u zavisnosti od porekla, podneblja, vrste kefira, tipa supstrata (mleko ili voda) i slično, ali su uvek prisutni predstavnici različitih rodova BMK, sirćetnih bakterija i kvasaca [62,64–71].

Zrna mlečnog kefira svojim oblikom podsećaju na male želatinozne cvetove karfiola, veličine 20-30 mm, bele do žute boje [62]. Osnovnu komponentu matriksa zrna mlečnog kefira čini polisaharid kefiran. To je u vodi rastvoran heteropolisaharid koji se sastoji od približno jednakih količina glukoze i galaktoze. Glavni producent egzopolisaharidnog matriksa kefirnog zrna mlečnog kefira je *Lactobacillus kefiranofaciens* [72,73].

Zrna vodenog kefira se malo razlikuju od zrna mlečnog. Nešto su sitnija (5–15 mm), providne bele boje, dok je izgled takođe nalik sitnim karfiolima [63]. Polisaharidnu komponentu matriksa u kome su smešteni mikroorganizmi predstavlja dekstran. Za obrazovanje zrna vodenog kefira odgovoran je *Lactobacillus hilgardii* [63,64,74].

Fels i saradnici [75] su ispitivali strukture EPS-a vodenog kefira i kefirnih zrna. Egzopolisaharidnu frakciju kefirnog napitka uglavnom su činili razgranati dekstrani (sa grananjem u položajima O2 i O3), ali su nađene i manje količine levana. Nerastvorni dekstrani iz kefirnog zrna su uglavnom O3-razgranati, sa povećanim udelom 1,3-vezanih glukoznih jedinica u odnosu na rastvorne dekstrane. Prisustvo EPS-a različitih

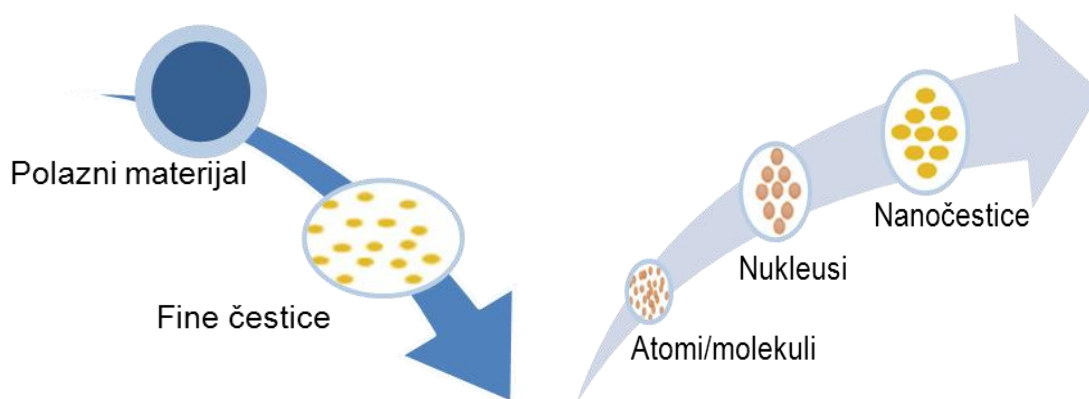


struktura u vodenom kefiru ukazuje da je više različitih bakterija uključeno u njihovu sintezu.

### 2.3 Nanočestice metala

Termin nanočestica metala se koristi za opisivanje čestica metala sa minimalno jednom dimenzijom (dužina, širina ili debljina) unutar nanometarskog opsega veličine (1–100 nm) [76]. Široko rasprostranjena, praktična primena nanočestica u različitim oblastima, počevši od katalize, preko optike, antibakterijske aktivnosti, biomedicine, pa do skladištenja podataka, može se pripisati određenom broju njihovih jedinstvenih svojstava. Naime, zbog velikog odnosa površine i zapremine (specifična površina), nanočestice imaju značajno izmenjene fizičke, hemijske i biološke osobine u odnosu na iste materijale makroskopske veličine [77].

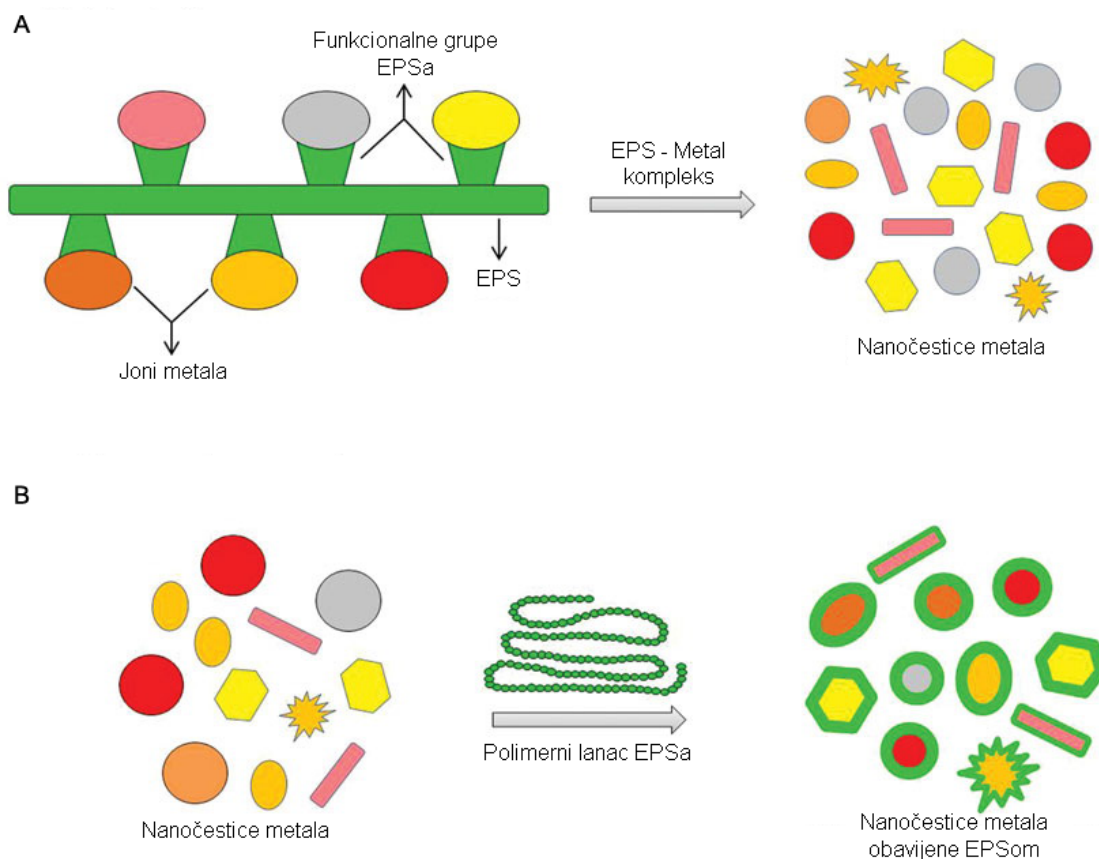
Generalno, postoje dva pristupa za sintezu nanočestica: „odozgo na dole“ (engl. *top down*) i „odozdo na gore“ (engl. *bottom up*) [78]. Prvi pristup podrazumeva usitnjavanje odgovarajućeg polaznog materijala primenom fizičkih ili hemijskih metoda. Drugi pristup „odozdo na gore“ je najčešći metod sinteze metalnih nanočestica. Metalni prekursor (jon metala) se redukuje do nulto-valentnog stanja, nakon čega sledi nukleacija i rast nanokristala. Šematski su ova dva pristupa prikazani na slici 2.3.



Slika 2.3 Dva pristupa u sintezi nanočestica metala: „odozgo na dole“ (levo) i „odozdo na gore“ (desno)

### 2.3.1 Primena polisaharida za sintezu nanočestica metala

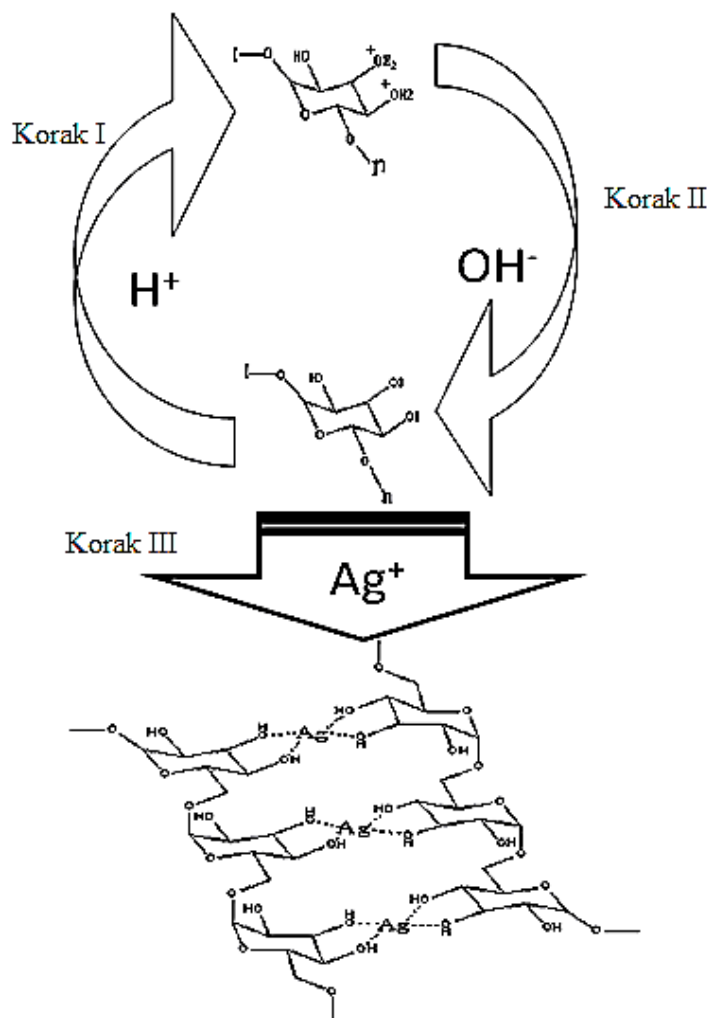
Veličina i oblik nanočestica, kao i njihova odgovarajuća fizička, hemijska i biološka svojstva u velikoj meri zavise od metode sinteze. Različite fizičke i hemijske metode, kao što su mikrotalasno zračenje, laserska ablacija, koloidni metod sinteze, koji podrazumeva upotrebu različitih redukujućih agenasa, ali i još drugih metoda, trenutno su u širokoj upotrebi za sintezu nanočestica metala [79–82]. One omogućavaju dobijanje čestica sa željenim karakteristikama. Međutim, ove metode proizvodnje su obično skupe, zahtevaju veliki utrošak energije i potencijalno su opasne za životnu sredinu i žive organizme usled korišćenja toksičnih rastvarača i stvaranja opasnih nusproizvoda [83]. „Zelena“ sinteza (engl. *green synthesis*) nanočestica se pokazala kao dobra alternativa konvencionalnim fizičko-hemijskim metodama sinteze [84]. Osim toga, nanočestice sintetisane „zelenim putem“ su biokompatibilne, pa su pogodne i za primenu u biomedicini [83]. U literaturi su opisane brojne metode zelene sinteze nanočestica metala, koje uključuju upotrebu mikroorganizama, biljaka ili biljnih ekstrakata, kao i prirodnih polimera [85]. Prirodni polimeri, kao što su polisaharidi, ne samo da služe za redukciju metala, već imaju značajnu ulogu u stabilizaciji sintetisanih nanočestica [84,86]. Pored biljnih i životinjskih polisaharida, za sintezu nanočestica metala uspešno su korišćeni i mikrobni egzopolisaharidi [86–88]. Na slici 2.4 šematski je prikazana uloga EPS-a u sintezi i stabilizaciji nanočestica metala.



Slika 2.4 Šematski prikaz (A) redukcije metala i (B) stabilizacije nanočestica metala mikrobim EPS-ima [86]

Sa slike 2.4 se vidi da funkcionalne grupe EPS-a mogu privući katjone različitih metala i obrazovati komplekse sa njima. Nanočestice metala različitog oblika i veličine nastaju dejstvom EPS-a kao redukcionog sredstva. Nanočestice metala su obložene ili prekrivene slojem EPS-a, čime se povećava njihova stabilnost [86].

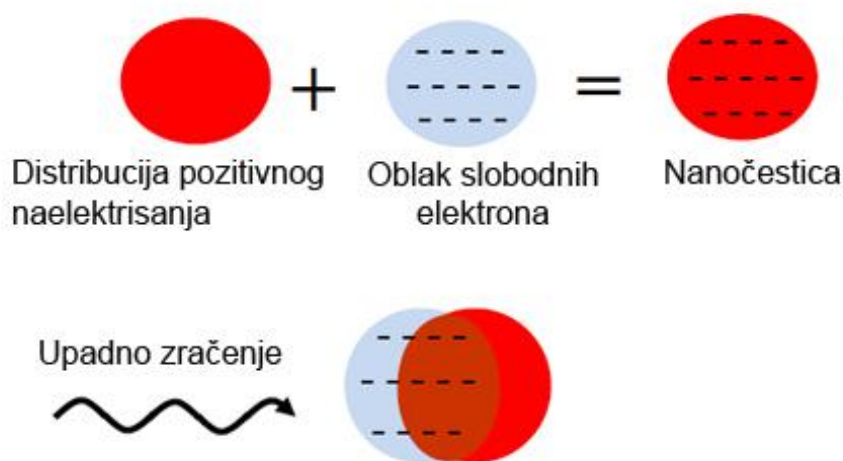
Bankura i saradnici [88] su opisali mehanizam sinteze nanočestica srebra u vodi, na sobnoj temperaturi, korišćenjem dekstrana kao redukcionog, ali i stabilizacionog sredstva. Mehanizam je prikazan na slici 2.5 i sastoji se od tri koraka. U prvom koraku dekstran je protonovan, jer je pH vrednost čiste vode  $\text{pH} \sim 6$ . U ovim uslovima sprečena je redukcija srebra iz  $\text{Ag}^+$  u  $\text{Ag}^0$ . U koraku-II se dodaje mala količina natrijum-hidroksida koja deprotonuje hidroksilne grupe dekstrana, preko kojih dolazi do redukcije  $\text{Ag}^+$  jona i formiranja nanočestica srebra (korak-III), što se uočava trenutnom promenom boje rastvora [88].



Slika 2.5 Šematski prikaz mehanizma protonovanja (Korak-I), deprotonovanja (Korak-II) hidroksilne grupe dekstrana i koordinacije između molekula dekstrana i nanočestica srebra (Korak-III) [88]

### 2.3.2 Optičke osobine nanočestica metala

Nanočestice metala imaju sposobnost da apsorbiraju elektromagnetno (EM) zračenje u intervalu talasnih dužina od ultraljubičastog do infracrvenog. Interakcijom upadne svetlosti sa elektronima koji se nalaze u površinskom sloju metala, u apsorpcionom spektru koloidnih rastvora metala formiraju se apsorpcione trake *Lorentz* (Lorenz) – ovog tipa, nazvane rezonancije površinskog plazmona (engl. *surface plasmon resonance* – SPR) (Slika 2.6).



Slika 2.6 Šematski prikaz plazmonske rezonance.

Položaj, širina i broj apsorpcionih traka zavise najviše od veličine i oblika nanočestica, ali i od međučestičnih interakcija i dielektrične konstante sredine koja ih okružuje [85]. Kod čestica metala nanometarskih dimenzija dolazi do promene gustine naelektrisanja u česticama, dok je prostorno kretanje elektrona ograničeno, što dovodi do promene elektronskih kao i optičkih svojstva nanočestica metala [89]. Dakle, interakcijom nanočestica metala sa EM zračenjem, dolazi do oscilacija elektrona iz provodne zone čestica, koje apsorbuju i/ili rasejavaju zračenje određene frekvencije – frekvencije plazmonske oscilacije [90]. Kod nanočestica nekih metala (Ag, Au, Cu) se ove rezonantne oscilacije javljaju u vidljivom delu elektromagnetnog spektra [91]. Zato se promena boje rastvora, pri sintezi nanočestica srebra smatra prvim pokazateljem da je došlo do redukcije metala i stvaranja nanočestica. Kod nanočestica srebra SPR traka se javlja u oblasti 380–450 nm, što odgovara žućkasto-braon boji [88].

Ultraljubičasta-vidljiva (UV-Vis, od engl. *Ultra Violet - Visible*) spektroskopija ima značajnu ulogu u analizi optičkih osobina nanočestica metala. Ona omogućava praćenje formiranja nanočestica i pruža preliminarne informacije o njihovoj veličini i obliku putem različitog odgovora na elektromagnetne talase, u rasponu od 190 do 700 nm [92]. UV-Vis spektroskopija se koristi kao metoda, kod optimizacije sinteze nanočestica (uticaj koncentracije, temperature i pH na stabilnost metalnih nanočestica) [93]. Infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom (FTIR) se primenjuje da bi se ustanovile funkcionalne grupe u spektru. Ova metoda kod analize metalnih

nanočestica na bazi polisaharida, može da ukaže na konjugaciju između nanočestice metala i polisaharida [94].

### 2.3.3 Morfološke karakteristike nanočestica metala

Osnovne morfološke karakteristike nanočestica su veličina i oblik. Sintetisane su nanočestice različitih veličina i oblika, od sfernog, preko ovalnog, štapićastog, trouglastog, prizmatičnog i dr., što zavisi od mnogo faktora, kao što su izbor soli koja služi kao izvor metalnih jona, redukujućeg sredstva, stabilizatora, tehnike sinteze, kao i od eksperimentalnih uslova (pH, temperatura, koncentracija metalnog prekursora...) [95–98].

Martínez-Castañón (Martinez-Kastanjón) i saradnici [95] su sintetisali nanočestice srebra sfernog oblika, veličine 7 i 29 nm, u zavisnosti od pH vrednosti, koristeći galnu kiselinu istovremeno kao redukciono sredstvo i stabilizator. Kada su za redukciju srebra koristili UV-zračenje, takođe u prisustvu galne kiseline, dobijene su veće nanočestice (89 nm) pseudosfernog oblika. Sferne nanočestice različitih veličina u opsegu od 5 – 100 nm dobijene su redukcijom srebra nitrata ( $\text{AgNO}_3$ ) pomoću natrijum bor hidrida ( $\text{NaBH}_4$ ), uz trinatrijum citrat (TSC), kao sekundarno redukciono sredstvo i stabilizator [99]. Kontrola veličine postignuta je variranjem njihovih koncentracija i temperature.

Iako se pristupom sinteze „odozdo na gore“ najčešće dobijaju nanočestice sfernog oblika, pokazano je da se hemijskom i fotohemijskom redukcijom u prisustvu odgovarajućeg stabilizatora, mogu dobiti nanočestice specifičnog oblika [98]. Kontrola oblika je olakšana dodatkom površinski aktivnih supstanci koje pored uloge stabilizatora, favorizuju rast čestica duž određenog kristalografskog pravca.

Za sintezu nanoštapića zlata korišćen je metod rasta nanočestica, posredstvom centra nukleacije (engl. *seed-mediated growth*) [97]. Najpre se jakim redukcionim sredstvima joni metala redukuju do sfernih čestica veličine ~4 nm, koje služe kao centri nukleacije. Zatim se na njihovoj površini odvija naknadna redukcija jona metala slabim redukcionim sredstvom (askorbinska kiselina), u prisustvu aditiva koji diktiraju pravac rasta nanočestica (cetiltrimetilamonijum bromid, CTAB). Na ovaj način nastaju nanoštapići, čija dužina i širina zavise od početnih koncentracija reaktanata.

Pristup rasta posredstvom centara nukleacije primenjen je i kod sinteze trouglastih nanoprizmi srebra [100]. Odnos jakog ( $\text{NaBH}_4$ ) i slabog (TSC) redukujućeg sredstva je bio presudan za stvaranje malih sfernih nanočestica i njihovu naknadnu transformaciju u trouglaste nanoprizme.

Nanokocke srebra različitih veličina u rasponu od 50 – 115 nm sintetisane su redukcijom srebra nitrata pomoću etilen glikola, u prisustvu polivinil pirolidona (PVP), pri čemu su se molski odnos PVP-a u odnosu na srebro nitrat, kao i temperatura i vreme pokazali kao ključni parametri koji određuju geometrijski oblik i veličinu čestica srebra [96].

Pristupom „zelene“ sinteze dobijene su nanočestice srebra četiri različita oblika (sferne, ovalne, štapičaste i oblika cveta) [101]. Sok od nara je korišćen za redukciju jona srebra, a CTAB kao stabilizator. Sferne čestice sintetisane pomoću mikrotalasnog zračenja služile su kao centri nukleacije za dobijanje ostala tri oblika.

Za karakterisanje morfologije sintetisanih nanočestica prevashodno se koriste različiti tipovi mikroskopa. Skenirajuća elektronska mikroskopija (SEM) može dati informacije o veličini, distribuciji i obliku nanočestica [102]. Međutim, tokom procesa pripreme – naparavanja uzorka plemenitim metalima (najčešće platina i zlato) dolazi do promene morfologije nanočestica, pa se javljaju greške na slikama [103]. Zato je za karakterizaciju nanočestica najbolje koristiti transmisionu elektronsku mikroskopiju (TEM). TEM-om se mogu odrediti veličina čestica, oblik i eventualna agregacija sa velikom prostornom rezolucijom ( $< 1$  nm) [104]. Osim toga TEM može da pruži više detalja na atomskom nivou, kao što je kristalna struktura [105].

Dinamičko rasejanje svetlosti (DLS, od engl. *dynamic light scattering*) je tehnika kojom se može meriti veličina nanočestica u rastvoru [106]. DLS metoda se zasniva na snimanju fluktuacija intenziteta laserskog svetla, koje nastaje rasejavanjem prilikom kontakta sa nanočesticama, na osnovu čega se određuje ekvivalent sfernog hidrodinamičkog prečnika čestica [107]. DLS je osetljiva i na fleksibilne molekule prirodnih polimera, kao što su proteini i polisaharidi, pa je pogodna za karakterizaciju nanočestica metala na bazi polisaharida [105].

Difrakcija X-zraka (XRD, od engl. *X-Ray diffraction*) se koristi za određivanje kristalnih svojstava nanočestica metala, kao što su veličina kristala i raspored prostorne kristalne rešetke [94]. Veličina kristala se određuje na osnovu Šererove jednačine (2.1):

$$d=0,89\lambda \beta \cos\theta \quad (2.1)$$

gde je  $d$  – veličina čestice,  $\lambda$  – talasna dužina X-zračenja (1,5406 Å),  $\beta$  – širina najjačeg pika (u radijanima) na polovini maksimuma i  $2\theta$  je Bragov ugao [108].

### 2.3.4 Primena nanočestica metala za kolorimetrijske senzore

Optičke osobine nanočestica metala iskorišćene su za razvoj mnogih kolorimetrijskih senzora. Tehnike zasnovane na kolorimetrijskim sensorima posebno su značajne za biohemijske analize, jer pružaju mogućnost jednostavnog očitavanja (često i golim okom), brze su, jeftine i veoma osetljive [109,110]. Najviše su za ovu svrhu korišćene nanočestice zlata i srebra, zbog izražene površinske plazmonske rezonance, hemijske stabilnosti i jednostavne pripreme. Osim toga, površina nanočestica se tokom sinteze može jednostavno kontrolisati i prilagoditi specifičnim uslovima detekcije. Površinski funkcionalizovane nanočestice Au i Ag iskorišćene su kao kolorimetrijske sonde za detekciju širokog spektra analita, uključujući DNK, proteine, male molekule i jone metala [109,111–119].

#### 2.3.4.1 Detekcija cisteina

Cistein (Cys) je neesencijalna  $\alpha$ -aminokiselina sa nepolarnom tiolnom (-SH) grupom. Zahvaljujući visokoj reaktivnosti tiolne grupe Cys ima značajne uloge u važnim biološkim procesima, kao što su sinteza proteina, odnosno uvijanje proteina u svoju funkcionalnu konformaciju. Osim toga Cys učestvuje u detoksikaciji i metaboličkim procesima [120–122]. Značaj razvoja metoda za detekciju cisteina ogleda se u činjenici da nivo ove aminokiseline u krvi može da ukaže na određena patološka stanja ili bolesti. Koncentracija Cys u serumu/plazmi kod zdravih osoba je  $\sim 250 \mu\text{M}$  [123]. Ako je nivo Cys suviše nizak, organizam je podložniji štetnom dejstvu slobodnih radikala, usporen je rast kose, dolazi do depigmentacije i oštećenja jetre i mišića [124]. S druge strane, visok nivo Cys se detektuje kod obolelih od Alchajmerove i Parkinsonove bolesti i kod reumatoidnog artritisa [125–127].

Različite hromatografske, elektrohemijske, elektroforetske i dr. metode se koriste za detekciju Cys. Međutim, one nisu pogodne za rutinske analize jer su skupe,



dugo traju i zahtevaju složene instrumente. Zato su u poslednje vreme istraživanja usmerena na razvoj kolorimetrijskih senzora na bazi nanočestica metala, koji bi omogućili brzu i jednostavnu detekciju Cys. Pokazano je da nanočestice Au i Ag, kako modifikovane, tako i nemođifikovane, mogu selektivno detektovati Cys sa visokom osetljivošću [124,128–131]. Ove metode se zasnivaju na promeni boje koloidnog rastvora u prisustvu Cys, do koje dolazi usled aglomeracije nanočestica, indukovane reakcijom tiolnih grupa cisteina i nanočestica metala [131]. Prednost nanočestica srebra (Ag NČ) u odnosu na nanočestice zlata (Au NČ) kod razvoja kolorimetrijskih metoda je u tome što Ag NČ imaju veći ekstinkcioni koeficijent u odnosu na Au NČ iste veličine, a osim toga su i jeftinije [132].

### 2.3.5 Nanočestice srebra

Nanočestice Ag poseduju specifična optička, električna i termička svojstva i visoku stabilnost, koja ih čine idealnim za primenu u brojnim oblastima, poput solarnih ćelija, optičkih, hemijskih senzora i biosenzora, katalize, molekularne detekcije, elektronike i drugim [77]. Ipak, najveća je njihova primena u medicini, gde se koriste kao antimikrobni i terapijski agensi [133].

Mnoge soli metala, kao i nanočestice metala pokazale su se efikasnim u sprečavanju rasta različitih uzročnika infekcija. Značajan antimikrobni potencijal je pokazan kod mnogih nanočestica metala (Au, Cu, Se) [134–138], ali je najveći broj istraživanja sa ciljem kontrole i suzbijanja rasta patogenih mikroorganizama urađen na nanočesticama srebra.

Antimikrobna svojstva srebra prema širokom spektru patogena, uključujući viruse, Gram-pozitivne, Gram-negativne bakterije i gljivice, poznata su od davnina, zbog čega se srebro u različitim oblicima upotrebljava već 2000 godina [139]. Na početku primene srebra kao dezinfekcionog agensa, najčešće je korišćen srebro-nitrat za tretman raznih infekcija [133]. Nagli porast istraživanja antimikrobnog potencijala nanočestica počinje 1920-tih, kada je američka uprava za hranu i lekove (FDA) zvanično odobrila upotrebu Ag NČ kao antimikrobnog sredstva za tretman rana [140]. Međutim 1940-ih, nakon otkrića antibiotika, upotreba srebra značajno opada [133], da

bi već 20 godina kasnije srebro-nitrat ponovo počeo da se koristi, kao odlično sredstvo za tretman opekotina.

Prevelika upotreba antibiotika dovela je do pojave multirezistentnih sojeva bakterija i gljivica, pa je poslednjih godina sve veći broj istraživanja usmeren ka pronalaženju novih, efikasnih antimikrobnih sredstava, među kojima su se Ag NČ pokazale kao odlični kandidati. Procenjuje se da je godišnja proizvodnja Ag NČ blizu 320 tona [141].

#### *2.3.5.1 Mehanizam antimikrobnog dejstva nanočestica srebra*

Brojne studije su pokazale da nanočestice imaju veću antimikrobnu aktivnost od slobodnih jona srebra [142–145]. Zbog izuzetno malih dimenzija, i istovremeno velike površine, omogućen je bolji kontakt nanočestica sa mikroorganizmima. Osim toga, smatra se da Ag NČ služe kao rezervoar iz koga se otpuštaju  $Ag^+$ -joni [146], pa se antimikrobno delovanje pripisuje ne samo fizičkim svojstvima samih nanočestica, već i otpuštanju jona srebra. Pretpostavlja se da kombinovano dejstvo nanočestica i slobodnih jona zajednički doprinosi snažnoj antimikrobnoj aktivnosti širokog spektra [147]. U prilog ovoj pretpostavci je i činjenica da je rezistencija na elementarno srebro veoma retka [148], što ukazuje da je antimikrobna aktivnost posledica više različitih mehanizama koji sinergistički deluju. Predloženi mehanizmi obuhvataju interakciju Ag NČ-ica i  $Ag^+$  jona sa različitim ćelijskim strukturama i njihovim komponentama, kao što su ćelijski zid, ćelijska membrana, ribozomi, mitohondrije, lizozomi, odnosno proteini, peptidoglikani, lipopolisaharidi, nukleinske kiseline i enzimi, usled kojih dolazi do promene ćelijskog metabolizma, stvaranja reaktivnih kiseoničnih vrsta i narušavanja strukturnog integriteta ćelije, što kao konačni ishod dovodi do smrti mikrobne ćelije [133,146,147,149–157]. Koji će se od ovih mehanizama ispoljiti i u kojoj meri zavisi od brojnih faktora, kao što su vrsta ćelije, koncentracija Ag NČ, ali i njihov oblik i veličina [133,158,159].

Da bi ispoljile antimikrobno dejstvo Ag NČ moraju da dođu u kontakt sa ćelijom mikroorganizma. Pokazano je da Ag NČ imaju tendenciju nakupljanja na ćelijskoj membrani [146]. Kao posledica interakcije menja se struktura ćelijske membrane, čime ona gubi svoju najvažniju funkciju selektivne propustljivosti i dolazi do curenja ćelijskog sadržaja u spoljašnju sredinu [150,160]. Primećeno je takođe obrazovanje pora

i u ćelijskom zidu [155], kao i otpuštanje molekula mureinske kiseline [150], što je ukazivalo da je došlo do njegove razgradnje.

Nanočestice takođe prodiru u ćeliju, gde ispoljavaju svoje toksično dejstvo posredstvom stvaranja reaktivnih kiseoničnih vrsta [149,151,160]. Nekontrolisano stvaranje reaktivnih vrsta kiseonika izaziva oksidativni stres, usled čega dolazi do oštećenja proteina, lipida, DNK, ćelijske membrane i mitohondrija [153,161,162].

Metalno srebro ( $\text{Ag}^0$ ) na površini nanočestica u aerobnim rastvorima može da se oksiduje u  $\text{Ag}_2\text{O}$  [163]. Metaboličkom aktivnošću mikrobnih ćelija stvara se kiselo okruženje za oslobađanje jona srebra, koji u velikoj meri doprinose antimikrobnom dejstvu  $\text{Ag N}\check{\text{C}}$ . Joni srebra pokazuju veliki afinitet prema elektron-donorskim funkcionalnim grupama, pre svega tiolnim i fosfatnim, zatim hidroksilnim, imidazolnim i indolnim [147]. Ove grupe su prisutne u proteinima, enzimima i nukleinskim kiselinama, pa su to mesta u ćeliji na koja deluju joni srebra.

#### 2.3.5.2 Toksičnost nanočestica srebra

Antimikrobno dejstvo  $\text{Ag N}\check{\text{C}}$  prema patogenim mikroorganizmima je poželjno svojstvo, ali treba imati u vidu da one istovremeno mogu ispoljiti toksičnost prema višim organizmima, s obzirom na to da su makromolekuli sa kojima  $\text{Ag N}\check{\text{C}}$  ostvaruju interakciju prisutni i u prokariotskim i u eukariotskim ćelijama. Još jedno važno pitanje koje se nameće sa sve većom upotrebom  $\text{Ag N}\check{\text{C}}$  jeste i bezbednost po životnu sredinu.

$\text{Ag N}\check{\text{C}}$  pokazuju toksične efekte na sve vrste ćelija, tako što ometaju njihove metaboličke puteve, indukuju apoptozu, utiču na stvaranje reaktivnih kiseoničnih vrsta i pojavu genotoksičnosti [164]. Najčešći efekti  $\text{Ag N}\check{\text{C}}$  primećeni su na eritrocite, gde nanočestice dovode do liziranja ćelijske membrane i izazivaju reakcije povezane sa oksidativnim stresom. Pokazano je da su  $\text{Ag N}\check{\text{C}}$  toksične za ćelije jetre [165], kože [166], pluća [167] i neurone [168].

Međutim, nekoliko studija je ukazalo da toksično dejstvo  $\text{Ag N}\check{\text{C}}$  postaje manje izraženo za organizme povećane složenosti, tj. da se smanjuje u stepenu od virusa do bakterija, gljivica i na kraju sisara [133,169]. Brojne studije su pokazale da  $\text{Ag N}\check{\text{C}}$  sintetisane „zelenim“ putem ne ispoljavaju citotoksično dejstvo prema ćelijama sisara [158,170–172]. Takođe, uticaj „zeleno“ sintetisanih  $\text{Ag N}\check{\text{C}}$ -ica na životnu sredinu je

mного manji od uticaja onih dobijenih konvencionalnim hemijskim i fizičkim metodama [173].

#### *2.3.5.3 Primena nanočestica srebra u proizvodnji tkanine sa antimikrobnim svojstvima*

Tekstilna industrija poslednjih godina ulaže u implementaciju Ag NČ, sa naglaskom na proizvodnju medicinskog tekstila i tekstila za sportske ili vojne primene, gde je potrebna dugotrajna antimikrobna efikasnost protiv širokog spektra mikroorganizama. Postoji mnoštvo radova vezanih za impregnaciju Ag NČ na različite tekstilne materijale (pamuk, poliestar, poliamid...) [174–181]. Pamučne tkanine obrađene Ag NČ-ma, kao prirodne i najviše korišćene tkanine, najviše su i istraživane [180–185]. Jedan od razloga je i što pamuk apsorbuje ogromnu količinu vlage, pa je podložniji mikrobiološkom napadu. Imajući u vidu da upotreba Ag NČ može imati i štetna dejstva, kao i činjenicu da se načinom sinteze ta štetna dejstva mogu značajno smanjiti, o čemu je bilo reči u prethodnom poglavlju, sve je veći broj istraživanja usmeren na primenu Ag NČ-ica dobijenih „zelenim“ putem za potrebe tekstilne industrije [177,186–190].

## **2.4 Polimerni materijali za pakovanje hrane**

Glavna uloga pakovanja je da sačuva kvalitet i bezbednost hrane. Ambalaža bi trebalo da zaštiti hranu od raznih spoljašnjih uticaja, kao što su svetlost, vlaga, temperatura, prašina, mikroorganizmi, kao i od fizičkih oštećenja, čime se produžava rok trajanja prehrambenih proizvoda [191]. S druge strane, pakovanje čini hranu estetski privlačnom za potrošače, a takođe omogućava pružanje informacija o upakovanom proizvodu. [192].

Plastika poseduje brojne osobine kao što su fleksibilnost, čvrstoća, mala masa, stabilnost, nepropusnost i lakoća sterilizacije i oblikovanja, koje je čine idealnim ambalažnim materijalom [193]. Prema izveštaju Asocijacije proizvođača plastike, Plastics Europe, iz 2018. godine [194], godišnja svetska proizvodnja plastike ima uzlazni trend i 2017. godine je dostigla 348 miliona tona, od čega je 64,4 miliona tona proizvedeno u Evropi. Plastična ambalaža predstavlja gotovo 40 % evropskog tržišta plastike i ima ključnu ulogu u zaštiti i očuvanju hrane tokom prerade, skladištenja i

transporta [195,196]. Najzastupljeniji polimerni ambalažni materijali su polietilen (PE), polipropilen (PP), polietilen tereftalat (PET), polivinil hlorid (PVC) i polistiren (PS) [197].

Upotreba plastike ima međutim i svoju tamnu stranu, koja se ogleda u količini otpada koji nastaje nakon potrošnje upakovanog proizvoda. Najveći broj monomera koji se koriste za proizvodnju plastike, kao što su etilen i propilen, dobija se iz fosilnih ugljovodonika [198]. Kako najčešće korišteni plastični materijali nisu biorazgradivi, oni se nakupljaju na deponijama ili u životnoj sredini i predstavljaju veliki ekološki problem i opasnost po ljudsko zdravlje. Čak i kada počne njihova spora razgradnja, nastaje mikroplastika, koja vodotokovima dospeva do mora i okeana, pa tako poslednjih godina može da se pronađe u ribama i drugom živom svetu, a izuzetno je toksična. Iako se sve više plastičnog otpada reciklira, time se problem njegovog odlaganja trajno ne rešava, već se samo prolongira. Spaljivanje kao način za ponovno dobijanje energije iz otpadne plastike je drugo predložene rešenje, ali ovaj postupak može imati ozbiljan uticaj na životnu sredinu.

Na osnovu činjenice da je poslednjih decenija primećen brzi rast upotrebe sintetičkih polimera, predviđa se da će se 2100. godine koristiti 25% trenutne svetske proizvodnje nafte samo za proizvodnju plastike [197]. Imajući u vidu sve do sada rečeno, kao jedno od mogućih rešenja za prevazilaženje ovog ekološkog problema, nameće se upotreba biorazgradivih i prirodnih polimera za potrebe proizvodnje ambalažnih pakovanja.

Biorazgradivim materijalima se smatraju oni koji se razlažu na ugljen dioksid, vodu, metan ili biomasu, prvenstveno dejstvom mikroorganizama [197]. S druge strane, prirodni polimeri su oni koji se u potpunosti dobijaju iz obnovljivih izvora. Treba imati u vidu da su svi prirodni polimeri biorazgradivi, dok obrnuto nije slučaj. Tako na primer, polikaprolakton (PCL), poliglikolid (PLG) i polibutilen sukcinat adipat (PBSA) su biorazgradivi polimeri, ali se dobijaju iz neobnovljivih (fosilnih) izvora [199].

Prirodni polimeri se prema poreklu mogu podeliti na [200,201]:

- polimere direktno ekstrahovane/izolovane iz biomase, kao što su polisaharidi i proteini;
- polimere proizvedene klasičnim hemijskim sintezama od prirodnih monomera (primer je polimlečna kiselina, PLA) i

- polimere dobijene direkno iz mikroorganizama, kao što su polihidroksialkanoati (PHA) i egzopolisaharidi (pululan, gelan, dekstran).

## 2.5 Jestivi filmovi i premazi

Jestivi filmovi i premazi su materijali sačinjeni od nekog prirodnog polimera, proizvedeni na različite načine usled različite krajnje namene jednih i drugih [202]. Naime, jestivi premazi se pripremaju u tečnom obliku, pa se zatim pogodnom metodom (raspršivanje, premazivanje, potapanje), nanose na hranu i na njenoj površini obrazuju prijanjajući omotač, koji postaje deo finalnog proizvoda [203]. Za razliku od njih, filmovi se pripremaju odvojeno od hrane u vidu samostalnog tankog sloja jestivog materijala, koji se najpre oblikuje, pa se tek naknadno, kao već obrazovana folija, nanosi na prehrambeni proizvod. Česta upotreba filmova je za ispitivanje mehaničkih, barijernih i drugih osobina nekog materijala [202].

Bez obzira na oblik u kome dolaze u kontakt sa hranom, uloga jestivih filmova i premaza je ista. Oni poboljšavaju kvalitet prehrambenog proizvoda, štiteći ga od fizičkih, hemijskih i bioloških oštećenja [204]. Jestivi filmovi i premazi mogu biti nosači različitih aktivnih sastojaka, kao što su agensi protiv tamnjenja, boje, antioksidanti, antimikrobne supstance, hranljive materije, arome i začini, čime dodatno utiču na poboljšanje stabilnosti, kvaliteta, funkcionalnosti i bezbednosti hrane.

Različita jedinjenja se mogu koristiti u formulaciji jestivih filmova i premaza, a njihov izbor uglavnom zavisi od ciljane primene. Na osnovu sastava, jestivi filmovi i premazi se mogu podeliti u tri kategorije: hidrokoloide, lipidi i kompoziti [197]. Hidrokoloide uključuju proteine i polisaharide. U lipide spadaju voskovi, smole, triacilgliceroli i masne kiseline. Kompoziti sadrže i hidrokoloide i lipide.

Formulacijama filmova se dodaju jedinjenja kao što su plastifikatori i emulgatori [205]. Dodatkom plastifikatora smanjuju se međumolekulske sile između polimernih lanaca, pa su dobijeni filmovi fleksibilniji i elastičniji. Plastifikatori koji se koriste za jestive prevlake obuhvataju glicerol, sorbitol, saharozu, propilen glikol, polietilen glikol, masne kiseline i monogliceride. Emulgatori ili površinski aktivne materije se koriste za poboljšanje stabilnosti emulzija, osiguravaju dobro površinsko vlaženje, prekrivanje i

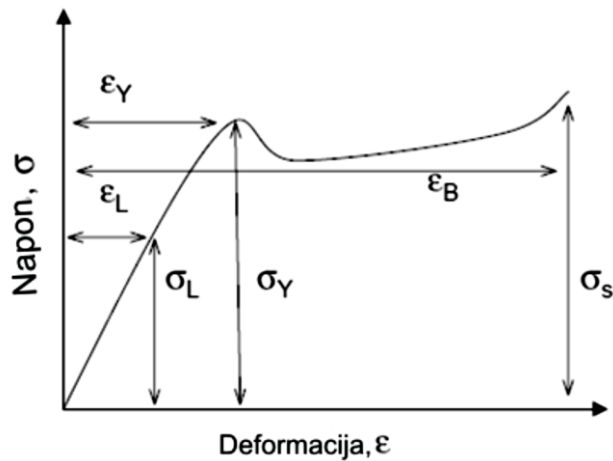
prijanjanje premaza na površinu hrane. Uobičajeni emulgatori koji se koriste za premaze su masne kiseline, etilen glikol monostearat, glicerol monostearat, esteri masnih kiselina, lecitin, estar saharoze i sorbitan monostearat ili polisorbati (Tween).

### **2.5.1 Funkcionalne osobine jestivih filmova i premaza**

Glavna svojstva jestivih filmova i premaza su njihove barijerne (propustljivost za gasove i vlagu) i mehaničke osobine [206]. Određivanje propustljivosti ambalažnih materijala za gasove i vodenu paru je od velikog značaja u primeni materijala za procenu održivosti upakovanog proizvoda [207]. Barijerna svojstva polimernih filmova su povezana sa fizičkim i hemijskim osobinama polimera. Vodena para i kiseonik mogu da se prenose iz unutrašnjeg ili spoljnog okruženja kroz zid polimernog pakovanja, usled čega se kvalitet upakovanog proizvoda stalno menja, čime se smanjuje njegov rok trajanja [208].

Fizički i hemijski kvalitet upakovanog proizvoda zavisi od ravnotežnog sadržaja vlage u proizvodu. Sa jedne strane, važno je sprečiti isušivanje proizvoda, a sa druge strane hrskavi proizvodi ne bi trebalo da budu izloženi atmosferi sa velikim sadržajem vlage. Propustljivost za druge gasove, poput kiseonika je takođe važna jer omogućava kontrolu zrenja voća ili smanjenje oksidacije nekih sastojaka hrane, kao što su polinezasićeni lipidi [209,210]. Zahtev za određenim barijernim svojstvima ambalažnog materijala zavisi od vrste upakovanog proizvoda, namene sistema proizvod-ambalaža i željenog roka trajanja proizvoda.

Sposobnost ambalažnog materijala da zaštiti upakovani proizvod tokom transporta i skladištenja zavisi od njegovih mehaničkih osobina [211]. Mehanička otpornost jestivih filmova se obično procenjuje merenjem tri parametra: zatezne čvrstoće, Jangovog modula elastičnosti i procenta izduženja pri kidanju [212]. Ovi parametri se određuju sa krive napon-deformacija (engl. *stress-strain*) prema standardnoj metodi Američkog društva za ispitivanje i materijale (American Society for Testing and Materials – ASTM). Tipičan izgled krive napon-deformacija za hidrokolidne filmove prikazan je na slici 2.7.



Slika 2.7 Kriva napon – deformacija za hidrokolidne filmove [212]

Zatezna čvrstoća se računa kao količnik maksimalnog opterećenja koje film trpi pre pucanja ( $\sigma_Y$ ) i početne površine poprečnog preseka filma. Izduženje pri kidanju se izražava kao procenat promene početne dužine uzorka filma pre kidanja i mera je elastičnosti filma ( $\epsilon_B$ ). Jangov modul se eksperimentalno određuje kao nagib krive napon-deformacija dobijene tokom testa opterećenja ( $Y = \frac{\sigma_L}{\epsilon_L}$ ) i predstavlja meru krutosti filma. Veličine  $\sigma_L$  i  $\epsilon_L$  predstavljaju zateznu čvrstoću i zatezno izduženje (izduženje pri kidanju) u elastičnom – lineranom opsegu delovanja sile.

## 2.5.2 Primena polisaharida za proizvodnju jestivih filmova i premaza

Objavljen je veliki broj radova, čiji rezultati pokazuju da različiti polisaharidi poreklom iz biljaka (skrob, pektin, derivati celuloze) [213–216], životinja (hitozan) [217–219], algi (alginat, karagenan, agar) [214,216,219,220] i mikroorganizama (pululan, kefiran) [221,222] imaju sposobnost obrazovanja jestivih filmova i premaza, koji se mogu koristiti kao ambalažni materijali za čuvanje hrane. Osobine polisaharidnih filmova se razlikuju u zavisnosti od strukture polisaharida, prisustva ili odsustva račvanja, molekulske mase, naelektrisanja i prisustva supstituenata [223]. Po pravilu, linearni, nejonski polisaharidi velike molekulske mase obrazuju jake filmove. U većini slučajeva je potrebno dodavanje plastifikatora da bi se dobili filmovi na bazi polisaharida [207]. Bez plastifikatora, polisaharidni filmovi su kruti, usled interakcije



između polimernih lanaca. Plastifikatori smanjuju koheziju unutar mreže filma, slabeći intermolekularne sile između susednih polisaharidnih lanaca. Na taj način plastifikatori modifikuju ili poboljšavaju mehanička svojstva filmova, smanjuju rigidnost njihove strukture, povećavaju pokretljivost i fleksibilnost polisaharidnih lanaca, kao i otpornost filmova na lom.

Polisaharidi obrazuju filmove izuzetnih barijernih svojstava prema gasovima, kao što su kiseonik i ugljen dioksid [223]. S druge strane, usled hidrofilne prirode molekula, polisaharidi ne deluju dobro kao fizičke barijere prema vodenoj pari. Neki polisaharidi, kao što su npr. alginat i karagenan, su izuzetno higroskopni, pa se primenjuju kao relativno debeli filmovi na površini namirnica, koji apsorbuju vodu, čime privremeno sprečavaju dalji gubitak vlage iz hrane [207]. Na ovaj način proizvod ne gubi značajnu količinu vlage, sve dok premaz ne bude dehidriran.

Derivati celuloze, metilceluloza i hidroksipropil celuloza, imaju odlična barijerna svojstva prema lipidima, pa se koriste za premazivanje proizvoda koji se prže u dubokom ulju [224].

Dekstran se koristi radi očuvanja arome, boje i svežine hrane tokom skladištenja u uslovima hlađenja i zamrzavanja. Upotrebljava se kao dodatak za sprečavanje gubitka vlage kod proizvoda kao što su škampi, meso, suvo voće, sir, maslac i smrznuta hrana [225].

#### *2.5.2.1 Premazi za sveže voće i povrće*

Sveže voće i povrće veoma je podložno kvarenju usled visokog sadržaja vode i hranjivih materija, ali i sopstvenog metabolizma. S obzirom na to da se voće i povrće sastoji od živog tkiva, nakon žetve su uobičajene promene u kvalitetu uzrokovane fiziološkim i biohemijskim procesima, koje u znatnoj meri utiču na rok trajanja proizvoda. Respiracija, transpiracija i proizvodnja etilena glavni su faktori koji doprinose propadanju voća i povrća [226]. Stepenu u kome ovi faktori utiču na kvalitet i rok trajanja proizvoda zavisi od sorte i stadijuma zrelosti. Sa ekonomskog aspekta očuvanje voća i povrća igra značajnu ulogu u održavanju njihovog kvaliteta tokom perioda od berbe do konzumiranja od strane krajnjeg potrošača [202].

Generalno, svrha upotrebe jestivih filmova i premaza za voće i povrće je da uspori prenos gasova, vode i isparljivih sastojaka, na taj način što stvara modifikovanu

atmosferu, čime se usporavaju procesi disanja i starenja, smanjuje gubitak arome, zadržava vlaga i odlaže promena boje tokom skladištenja [226]. Jestivi premazi takođe smanjuju mehaničke povrede voća i povrća tokom transporta i skladištenja, kao i rizik od mikrobnih kontaminacija.

Jestivi premazi na bazi polisaharida obrazuju polupropusnu membranu na površini voća, čime smanjuju dotok kiseonika, ali pri tome ne stvaraju anaerobne uslove [207]. To je izuzetno bitno imajući u vidu da smanjenje koncentracije kiseonika usporava ćelijsko disanje, a samim tim i starenje, ali da u anaerobnim uslovima dolazi do produkcije etanola, stvaranja neugodnih mirisa i kvarenja voća.

Neki od primera polisaharidnih premaza za sveže voće i povrće dati su tabeli 2.1.

Tabela 2.1 Primeri polisaharidnih premaza za sveže voće i povrće

Polisaharid	Sastav premaza	Voće / povrće	Dejstvo premaza	Referenca
Hitozan	Hitozan, glicerol	Papaja	Sprečava gubitak vode i povećanje rastvorne suve materije, održava boju i čvrstinu ploda	[217]
	Hitozan	Paradajz	Sprečava gubitak vode, poboljšava senzorne osobine (boja, ukus, miris), spečava mikrobnu kontaminaciju	[218]
Skrob	Skrob, sorbitol	Jagode	Neprovidan omotač poboljšava senzorne osobine (sprečava promenu boje ploda)	[219]
	Skrob, glicerol	Krastavac	Odlaze gubitak mase i askorbinske kiseline, održava čvrstinu, smanjuje broj kvasaca i plesni	[215]
Alginat i pektin	Alginat/glicerol/Tween Pektin/glicerol/Tween Alginat/pektin/glicerol/Tween	Borovnice	Poboljšava čvrstinu plodova, smanjuje broj kvasaca i mezofilnih aerobnih bakterija	[216]
CMC*	CMC, propilen glikol	Krastavac	Održava čvrstinu, sadržaj vode i pH ploda tokom skladištenja na sobnoj temperaturi	[215]
Pululan	Pululan, glicerol	Borovnice	Usporava respiraciju, smanjuje gubitak mase, antimikrobno dejstvo	[221]
Dekstran	Dekstran, glicerol	Guava	Održava kaviteta ploda (veličina, boja, aroma, sadržaj vode) tokom skladištenja na 4 °C	[227]
Karagenan	Karagenan, glicerol, Tween 80	Jagode	Dobre barijerne osobine prema kiseoniku, održava čvrstinu ploda	[219]

\*CMC – karboksimetil celuloza

### 3 CILJEVI RADA

Osnovni cilj ovog doktorskog rada je izolovanje bakterija mlečne kiseline koje sintetišu dekstran iz zrna vodenog kefir i ispitivanje mogućnosti primene dobijenog dekstrana za sintezu nanočestica srebra i proizvodnju jestivih filmova.

Specifični ciljevi disertacije se mogu podeliti u tri grupe koje obuhvataju:

- izolaciju, karakterizaciju i identifikaciju bakterija iz zrna vodenog kefir, selekciju soja koji daje najveći prinos dekstrana i karakterizaciju dobijenog dekstrana;
- optimizaciju sinteze nanočestica srebra pomoću dekstrana, njihovu karakterizaciju i ispitivanje mogućnosti primene sintetisanih nanočestica srebra kao hemijskog senzora za detekciju cisteina i za dobijanje tkanine sa antimikrobnim svojstvima i
- optimizaciju formulacije jestivog filma na bazi dekstrana i utvrđivanje njegovog uticaja na održanje kvaliteta borovnice tokom skladištenja.

## 4 MATERIJAL I METODE

### 4.1 Izolovanje i identifikacija BMK koje sintetišu dekstran

#### Materijal:

Za izolaciju BMK korišćena su nekomercijalna zrna vodenog kefir.

Mikrobiološke podloge:

- MRS bujon, „Torlak“, Beograd, Srbija

Sastav podloge:	g/L
Pepton	10,0
Mesni ekstrakt	10,0
Ekstrakt kvasca	5,0
Dekstroza	20,0
Kalijum-hidrogenfosfat	2,0
Natrijum-hlorid	5,0
Natrijum-acetat	2,5
Magnezijum-sulfat	1,1
Mangan-sulfat	0,2
Triamonijum-citrat	2,0
Agar (za MRS agar)	18,0

- M17 bujon, Biolab, Mađarska

Sastav podloge:	g/L
Pepton	17,25
Laktoza	5,00
Magnezijum-sulfat	0,25
Askorbinska kiselina	0,50
Natrijum-glicerofosfat	19,00

Rastvoreno je 42 g gotove podloge u 1L destilovane vode i dodato je 18 g agara.

Mikrobiološke podloge su pripremane suspendovanjem određene količine sastojaka u destilovanoj vodi i sterilisane u autoklavu (Sutjeska, Srbija) na 121°C, 20 minuta.

Fiziološki rastvor: rastvoreno je 8,5 g NaCl (Centrohem, Beograd, Srbija) u 1 L destilovane vode, raspoređeno u epruvete po 9 mL i sterilisano u autoklavu na 121 °C, 20 minuta.

### **Postupak:**

Zrna vodenog kefira (1 g) su mehanički homogenizovana u 9 mL fiziološkog rastvora i napravljena su decimalna razblaženja u fiziološkom rastvoru, iz kojih su zasejane čvrste podloge MRS i M17. Ploče su inkubirane dva dana na 30 °C. Sa svake ploče je potom odabrano 5 do 10 kolonija i zasejano u MRS bujon. Čistoća odabranih izolata je proverena zasejavanjem na MRS agar.

Za utvrđivanje sposobnosti sinteze dekstrana korišćena je MRS podloga, koja je pripremljena sa saharozom (50 g/L) umesto glukoze (MRSs). Pojava sluzavih kolonija na površini MRSs agara je ukazivala da izolat sintetiše dekstran. Za dalji rad su odabrana tri izolata, čije kolonije su produkovale najviše dekstrana.

Za identifikaciju odabranih izolata (T1, T3 i T5) korišćene su fenotipske i molekularne metode.

#### **4.1.1 Određivanje morfoloških karakteristika izolovanih sojeva**

Morfološka svojstva kultura ispitana su mikroskopskim pregledom preparata na mikroskopu Axio Imager A1, Carl Zeiss MicroImaging GmbH., Nemačka.

Za bojenje mikrobioloških preparata korišćena su standardna sredstva za bojenje po Gramu:

- gencijana violet,
- kalijum-jodid po Lugol-u,
- 95% etanol,
- safranin.

## **4.1.2 Ispitivanje fizioloških i biohemijskih karakteristika izolovanih sojeva**

### *4.1.2.1 Katalaza test*

Testiranje produkcije katalaze je izvedeno korišćenjem 3% vodonik peroksida koji je nanet preko kultura izraslih na MRS agarnoj podlozi.

Očitavanje rezultata:

Pozitivan rezultat testa se, nakon nakapavanja 3% rastvora vodonik peroksida preko izraslih kolonija na čvrstoj podlozi, ogleda pojavom pene (usled nastajanja kiseonika razgradnjom vodonik-peroksida).

### *4.1.2.2 Sposobnost rasta na različitim temperaturama*

Izolati BMK su testirani na mogućnost rasta na različitim temperaturama u MRS bujonu. Za ova ispitivanja 8 mL MRS bujona je inokulisano kulturama sa površine kosog agara i inkubirano 24 h na 30 °C. Posle toga ove kulture su korišćene za zasejavanje novog MRS bujona koji je stavljan na inkubaciju na različitim temperaturama: 15 °C, 30 °C i 37 °C. Rezultati su čitani nakon 3 dana. Sposobnost rasta na testiranoj temperaturi procenjena je na osnovu stepena zamućenja bujona.

### *4.1.2.3 Tolerancija na različite koncentracije natrijum-hlorida*

Za ispitivanje tolerancije izolata na prisustvo različitih koncentracija natrijum-hlorida, kulture su inkubirane u MRS bujonu, kome su dodate sledeće koncentracije NaCl: 4%, 6,5% i 9,6%. Kao kontrola paralelno je zasejan i običan MRS bujon. Inkubacija je trajala 24 h na 30 °C. Sposobnost rasta je procenjena poređenjem optičkih gustina merenih na 570 nm.

### *4.1.2.4 Fermentacija šećera*

Za određivanje sposobnosti fermentacije korišćen je API 50 CHL sistem (BioMérieux, France) prema uputstvu proizvođača.

### 4.1.3 Molekularna karakterizacija metodom 16S rRNK sekvencioniranja

#### Potrebni rastvori:

- 1 M TRIS-HCl pufer pH 8,8: 60,57 g Tris (hidroksimetil)-aminometana je rastvoreno u 500 mL destilovane vode, pH rastvora je podešen na 8,8 dodatkom 1 M NaOH.
- 0,5 M EDTA: 18,6 g di-natrijum-etilendiamintetraacetata je rastvoreno u 100 mL destilovane vode, pH rastvora je podešen na 8,8 dodatkom 1 M NaOH. Potrebno je dobro mešati ili zagrevati smešu do potpunog rastvaranja).
- 3 M NaCl: 17,4 g natrijum hlorida je rastvoreno u 100 mL destilovane vode. Rastvor je filtriran a zatim sterilisan u autoklavu i čuvan na sobnoj temperaturi do dalje upotrebe.
- 3 M Na-acetat: 24,6 g natrijum acetata je rastvoreno u 100 mL destilovane vode, pH rastvora je podešen na 8. Rastvor je filtriran, a zatim sterilisan u autoklavu i čuvan na sobnoj temperaturi do dalje upotrebe.
- TEN pufer: Pomešano je 4 mL 1 M Tris-HCl pufera pH 8,8 sa 800  $\mu$ L 0,5 M EDTA pH 8,8 i 40 mL 3 M NaCl u čaši od 500 mL. Zatim je dodata destilovana voda do konačne zapremine od 400 mL. Rastvor je filtriran a zatim sterilisan u autoklavu i čuvan na sobnoj temperaturi do dalje upotrebe.
- Kiseli fenol-hloroform: Fenol je prvo otopljen na sobnoj temperaturi a potom u vodenom kupatilu na 50 °C. U zapreminskom odnosu 1:1:0,2 je sipan fenol, hloroform i destilovana voda u menzuru (42 °C). Na vrh špatule je dodat hinolin dok tečnost ne postane jako žuta.
- Neutralni fenol-hloroform: Kiseli fenol-hloroform, koji je ostavljen preko noći u frižideru na +4 °C, je mešan u zapreminskom odnosu 1:0,5 sa 1 M Tris HCl puferom pH 8,8. Rastvor je snažno promućkan i ostavljen u frižideru preko noći na +4 °C. Zatim je izdvojena gornja faza i u zapreminskom odnosu 1:0,5 je sipan 1 M HCl. Rastvor je snažno promućkan i ostavljen u frižideru preko noći na +4 °C. Rastvor je čuvan u tamnoj boci u frižideru na +4 °C.
- 1 M MgCl<sub>2</sub> – 0,95 g magnezijum-hlorida je rastvoreno u 5 mL destilovane vode.



### Postupak:

Genomska DNK je izolovana iz čistih kultura, mehaničkom destrukcijom ćelija korišćenjem fenol-hloroformske metode po sledećem postupku:

- 1) Svež MRS medijum zasejan je sa 10 % inokuluma i ostavljen preko noći na 37 °C
- 2) 1,5 mL kulture je oboreno centrifugiranjem na 10.000 obrtaja/min i oprano u 1 mL TEN pufera
- 3) U kulturu je dodato 200 µL 2% SDS i staklene kuglice i vorteksiranjem su razbijene ćelije
- 4) U smešu je dodato 100 µL neutralnog fenol-hloroforma i ponovo vorteksirano 30 s
- 5) Nakon 5 min centrifugiranja na 13.000 obrtaja/min odvojena je gornja vodena faza
- 6) U vodenu fazu je dodato 100 µL 3 M Na-aceata pH 4,8 i 1000 µL izopropanola
- 7) Nakon 5 min stajanja na sobnoj temperaturi i 10 min centrifugiranja na 13.000 obrtaja/min, supernatant je uklonjen
- 8) DNK pelet je rastvoren u 300 µL rastvora dobijenog mešanjem 100 µL 3 M Na-acetata, 10 µL 1 M MgCl<sub>2</sub> i 890 µL H<sub>2</sub>O
- 9) DNK je oborena dodatkom 700 µL 100 % etanola ohlađenog na -20 °C
- 10) Nakon sat vremena stajanja na sobnoj temperaturi rastvor je centrifugiran 5 min na 13.000 obrtaja/min
- 11) Po ukklanjanju supernatanta DNK je još jednom prečišćena u 75 % etanolu
- 12) Nakon sušenja DNK je rastvorena u 50 µL ultra čiste destilovane dejonizovane vode

Dobijena DNK je korišćena kao obrazac za umnožavanje (amplifikaciju) gena metodom PCR. Kompletan 16S rRNK kodirajućeg gena je amplifikovana pomoću prajmera UNI16SF 5'-GAG AGT TTG ATC CTG GC-3' i UNI16SR 5'-AGG AGG TGA TCC AGC CG-3' u PCR miksu koji je sadržao 2,5 µL 10xPCR pufera (0,5 M KCl, 0,1 M Tris-HCl, pH 8,8 na 25 °C, i 0,8% Nonidet P40), 1,5 µL MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 18,25 µL ultra čiste ddH<sub>2</sub>O, 0,25 µL Taq polimeraze (Fermentas, Lithuania) i 1 µL genomske DNK izolata. PCR je izvedena u GeneAmp 2700 PCR Cycler (Applied Biosystems, Foster City, California, USA) koristeći sledeći program: inicijalna denaturacija od 5 min na 96 °C praćena sa 30 ciklusa denaturacije na 96 °C u trajanju od 30 s, vezivanja prajmera na 55 °C u trajanju od 30 s i amplifikacija na 72 °C u trajanju od 30 s, dok je konačna amplifikacija izvedena na 72 °C u trajanju od 5 min.

Rezultati PCR-a su detektovani elektroforezom na agaroznom gelu (1 %) i zatim prečišćeni korišćenjem gotovog paketa QiaquickPCR Purification Kit (Qiagen, USA) po uputstvu proizvođača. Amplifikovana DNK je sekvencionirana u Macrogen Europe Inc. (Amsterdam, Holandija) automatizovanim DNA analyzer 3730xl (Applied Biosystems, Foster City, USA) uz korišćenje BigDye™ cycle sequencing kit (Applied Biosystems, FosterCity, CA). Dobijena sekvenca je podvrgnuta BLAST analizi u okviru NCBI baze podataka.

## **4.2 Utvrđivanje sposobnosti proizvodnje dekstrana u tečnoj podlozi**

Tri odabrana izolata (T1, T3 i T5) su zasejana u MRSs bujon (50 g/L saharoze) i gajeni 18 h na 30 °C. Ove prekonoćne kulture su korišćene kao inokulum u narednom eksperimentu.

### **4.2.1 Uticaj temperature i dužine trajanja fermentacije na prinos dekstrana**

MRSs bujon je zasejan prekonoćnim kulturama (2% inokulum) odabranih izolata T1, T3 i T5 i inkubiran na tri različite temperature: 23, 30 i 37 °C. Inkubacija je trajala 48 h. Tokom tog vremena periodično su uzimani alikvoti, radi određivanja koncentracije dekstrana i ćelijske biomase.

Broj živih ćelija određen je metodom decimalnih razblaženja na MRS agaru. Uzorci za određivanje dekstrana su zagrevani 15 min na ključalom vodenom kupatilu da bi se inaktivirale bakterije. Ćelije su odvojene centrifugiranjem na 7000 obrtaja/min tokom 15 min, a supernatanti su sačuvani za kvantifikaciju dekstrana.

#### *4.2.1.1 Izolacija i prečišćavanje dekstrana*

U epruvete je odmereno po 2,5 mL supernatanta, a zatim dodato po 5 mL hladnog 96% etanola. Epruvete su snažno izvorteksirane i ostavljene preko noći na –20 °C da se dekstran istaloži. Uzorci su potom centrifugirani (Sigma-Aldrich, Nemačka) 15 min na 13000 obrtaja/min. Supernatanti su odbačeni, a talozi dekstrana su rastvoreni u vrućoj destilovanoj vodi i procedura taloženja je ponovljena još dva puta. Dobijeni

talozi su rastvoreni u toploj destilovanoj vodi i nakon hlađenja prebačeni u normalne sudove, koji su dopunjeni destilovanom vodom do crte radi kvantifikacije.

Uzorci dekstrana su dodatno prečišćeni dijalizom u crevu za dijalizu, kroz membranu veličine pora 10 kDa naspram destilovane vode tokom noći. Nakon dijalize uzorci su osušeni sprej sušenjem (BÜCHI Mini Spray Dryer B-290, ulazna temperatura 150 °C, izlazna temperatura 70 °C) i čuvani u frižideru.

## **4.2.2 Karakterizacija uzoraka dekstrana**

### *4.2.2.1 Kvantitativno određivanje*

Prinos dekstrana je određivan fenol-sumpornom metodom [228], a rezultati su izraženi preko koncentracije, kao masa glukoze u 1 L (g/L).

Princip metode:

Određivanje šećera se zasniva na merenju apsorbance obojenog aromatičnog kompleksa koji se formira između fenola i ugljenih hidrata, na 490 nm. Količina prisutnog šećera se određuje upoređivanjem sa standardnom krivom, dobijenom spektrofotometrijskom metodom. Pod odgovarajućim uslovima, tačnost metode je  $\pm 2\%$ . Ova metoda se može koristiti i u slučajevima kada su uz šećer prisutni ostaci soli i proteina i u slučaju kada su šećeri zakačeni za polimer. Uz izuzetak određenih deoksi šećera, metoda je veoma opšta i može se primeniti za redukujuće i neredukujuće šećere, kao i mnoge druge vrste ugljenih hidrata uključujući i oligosaharide.

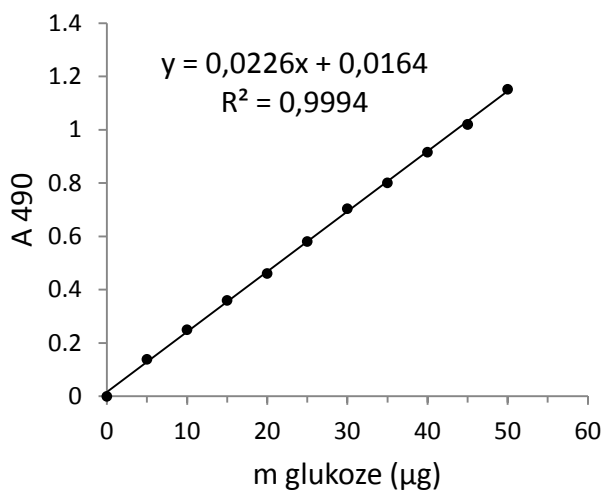
#### **Potrebni reagensi:**

- 4% fenol: 40 g fenola rastvoriti u 1 L destilovane vode, čuvati do 6 meseci na sobnoj temperaturi
- 96% sumporna kiselina
- 1 mg/mL standardnog šećera (glukoza) u zatvorenim epruvetama

#### **Postupak:**

Standardna kriva se dobija merenjem apsorbance rastvora šećera različitih koncentracija. Standardni rastvor šećera, koncentracije 1 mg/mL se odgovarajućom pipetom raspoređuje u 10 različitih suvih epruveta, tako da se zapremina u svakoj narednoj epruveti povećava za 5  $\mu$ L, u opsegu od 5  $\mu$ L do 50  $\mu$ L, zatim se dodaje 500  $\mu$ L 4% fenola i 2,5 ml 96% sumporne kiseline. Epruvete se vorteksiraju i ostave 30 min na sobnoj temperaturi, nakon čega se meri apsorbance na 490 nm naspram slepe probe koja

se dobija mešanjem 500  $\mu\text{L}$  4% fenola i 2,5 mL 96% sumporne kiseline. Dobijena standardna kriva je prikazana na slici 4.1. Nepoznata masa šećera u uzorku se određuje na osnovu standardne krive.



Slika 4.1 Standardna kriva za određivanje glukoze

#### 4.2.2.2 *Određivanje monomernog sastava*

Monomerni sastav izolovanih EPS-a utvrđen je tankoslojnom hromatografijom na filter papiru (Whatman No. 1). Uzorci su rastvoreni u 2 M TFA (koncentracija 1 mg/mL) i hidrolizovani na temperaturi 120  $^{\circ}\text{C}$  tokom 3 h. Kao standardi su korišćeni glukoza, fruktoza i galaktoza.

#### 4.2.2.3 *Infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom (FTIR)*

Glavne strukturne grupe prečišćenih uzoraka EPS-a utvrđene su pomoću FTIR spektroskopije metodom sa kalijum-bromidom. Praškasti uzorak dekstrana (0,6 mg) pomešan je sa 200 mg KBr. Smeša je tableirana pod pritiskom 350 MPa i osušena na 110  $^{\circ}\text{C}$  48 h pre analize. Analiza je izvedena na sobnoj temperaturi (27  $^{\circ}\text{C}$ ) u opsegu talasnih brojeva 400-4000  $\text{cm}^{-1}$ , sa rezolucijom od 4  $\text{cm}^{-1}$ .

### 4.3 Sinteza dekstrana pomoću dekstransaharaze iz soja *Leuconostoc mesenteroides* T3

Na osnovu prethodne karakterizacije za dalji rad je odabran izolat *Leuconostoc mesenteroides* T3.

#### 4.3.1 Proizvodnja i prečišćavanje dekstransaharaze iz soja T3

Sastav mikrobiološke podloge za produkciju dekstransaharaze (DS podloga):

Kvašćev ekstrakt, Torlak	5,0 g/L
Mesni ekstrakt, Torlak	15,0 g/L
Saharoza	50,0 g/L
Tween 80	2 mL/L
Natrijum-hlorid	0,02 g/L
Kalijum-hidrogenfosfat	60,0 g/L
Magnezijum sulfat heptahidrat	0,4 g/L
Mangan sulfat monohidrat	0,02 g/L
Gvožđe (II) sulfat heptahidrat	0,04 g/L

Nakon rastvaranja svih sastojaka pH podloge je podešeno na 6,9 dodatkom ortofosforne kiseline i podloga je sterilisana u autoklavu.

#### Postupak:

U cilju dobijanja dekstransaharaze bakterija je gajena u DS bujonu. Zapremina od 1 L DS podloge zasejana je sa 20 mL prekonocne kulture gajene u MRSs bujonu. Inkubacija je trajala 16 h na 23 °C. Čelije su potom odvojene centrifugiranjem na 7000 obrtaja/min, 15 minuta. Iz supernatanta enzim je taložen polietilenglikolom mase 400 Da (PEG 400), u odnosu 3:1 supernatant prema PEG-u. Supernatant i PEG 400 su ohlađeni na 4 °C, a taloženje je rađeno u ledenom kupatilu, uz konstanto mešanje na magnetnoj mešalici tokom postepenog dodavanja PEG-a. Smeša supernatanta i PEG-a je ostavljena u frižideru preko noći. Enzim je izdvojen centrifugiranjem na 13000 obrtaja/min, 10 min. Dobijeni talog je rastvoren u 20 mM natrijum-acetatnom puferu, pH 5,4, sa dodatkom 0,05 g/L CaCl<sub>2</sub> i 1,0 g/L NaN<sub>3</sub> i dijaliziran u crevu za dijalizu naspram istog pufera. Dijaliza je trajala 1 dan uz 4 izmene pufera. Nakon dijalize,

određena je enzimska aktivnost dekstransaharaze i ukupna koncentracija proteina. Ovako dobijen enzim je korišćen za sintezu dekstrana.

#### 4.3.1.1 *Određivanje koncentracije proteina*

Koncentracija proteina određivana je metodom po Loriju [229].

Princip metode: U reakciji peptidnih veza i bakarnih jona u alkalnoj sredini nastaje kompleks, koji uz oksido-redukcionu reakciju fosfomolibdesko-fosfovolframovog reagensa sa tirozinom daje postojanu boju čija se apsorbanca meri na 500-600 nm.

Potrebni reagensi:

Reagens A: 2% rastvor natrijum-karbonata u 0,1 M natrijum-hidroksidu;

Reagens B: 1% rastvor bakar-sulfata u destilovanoj vodi;

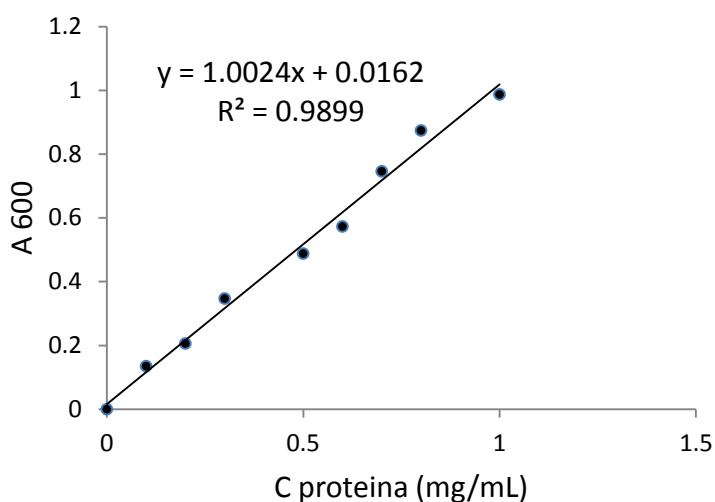
Reagens C: 2% rasvor kalijum, natrijum-tartarata u destilovanoj vodi;

Reagens D: priprema se mešanjem 1 ml reagensa B i 1 ml reagensa C, a zatim se pomešani rastvori dopune reagensom A do 100 ml ukupne zapremine. Reagens D se priprema neposredno pred upotrebu.

Reagens F: Folin-Čikalteov reagens, razblažen destilovanom vodom po uputstvu proizvođača.

Postupak:

U epruvetu se sipa 250  $\mu$ L ispitivanog uzorka i 1 mL reagensa D, vorteksira i sačeka 15 min. Nakon toga se doda 100  $\mu$ L reagensa F i sačeka još 30 min. Apsorbanca je merena na 600 nm, a koncentracija proteina u uzorku je izračunata na osnovu standardne krive. Za pripremu standardne krive korišćen je rastvor goveđeg serum albumina (BSA) poznatih koncentracija, u opsegu 0,1 - 1 mg/mL.



Slika 4.2 Standardna kriva za određivanje koncentracije proteina

#### 4.3.1.2 Određivanje aktivnosti dekstransaharaze

Aktivnost dekstransaharaze je određivana reakcijom redukcije 3,5-dinitrosalicilne kiseline (DNS) u prisustvu fruktoze koja se oslobađa enzimskom hidrolizom saharoze, metodom po Mileru [230]. Dekstransaharza hidrolizuje saharozu na glukozu i fruktozu, pri čemu molekule glukoze ugrađuje u rastući lanac molekula dekstrana dok oslobođena fruktoza reaguje sa DNS reagensom do formiranja obojenog kompleksa koji se detektuje spektrofotometrijski na talasnoj dužini od 540 nm.

#### Reagensi:

- 0,02 M natrijum-acetatni pufer, pH 5,4 – 65 mg natrijum hidroksida je rastvoreno u 80 mL destilovane vode, zatim je dodato 120  $\mu$ L koncentrovane sirćetne kiseline i normalni sud od 100 mL je dopunjen vodom do crte.
- 10% saharoza – 10,0 g saharoze je rastvoreno u 100 mL 0,02 M natrijum-acetatnog pufera pH 5,4.
- DNS reagens – 5,0 g DNS je pomešano sa 8,0 g NaOH u 200 mL destilovane vode. Posebno je izmereno 150,0 g K, Na-tartarata i rastvoreno u 150 mL destilovane vode. U normalnom sudu od 500 ml oba rastvora su pomešana i sud je dopunjen destilovanom vodom do crte.

### Postupak:

Aktivnost dekstransaharaze određivana je u 20 mM natrijum-acetatnom puferu sa 10% saharoze. U 450  $\mu\text{L}$  puferisanog rastvora saharoze dodato je 50  $\mu\text{L}$  enzima. Nakon 5-10 minuta inkubacije na 30 °C reakcija je zaustavljena dodatkom 500  $\mu\text{L}$  DNS reagensa. Paralelno sa uzorkom pripremana je slepa proba u koju je najpre sipano 500  $\mu\text{L}$  DNS reagensa, a zatim 50  $\mu\text{L}$  enzima i 450  $\mu\text{L}$  puferisanog rastvora saharoze. Epruvete sa uzorkom i slepom probom su zagevane 5 minuta na ključalom vodenom kupatilu i nakon hlađenja do sobne temperature u njih je dodato po 5 mL destilovane vode. Količina oslobođenog redukujućeg šećera (fruktoze) je određivana spektrofotometrijski na 540 nm, na osnovu standardne krive. Za pripremu standardne krive korišćen je rastvor fruktoze poznatih koncentracija, u opsegu 0,1 - 2 mg/mL. Aktivnost enzima je izračunata korišćenjem jednačine 4.1:

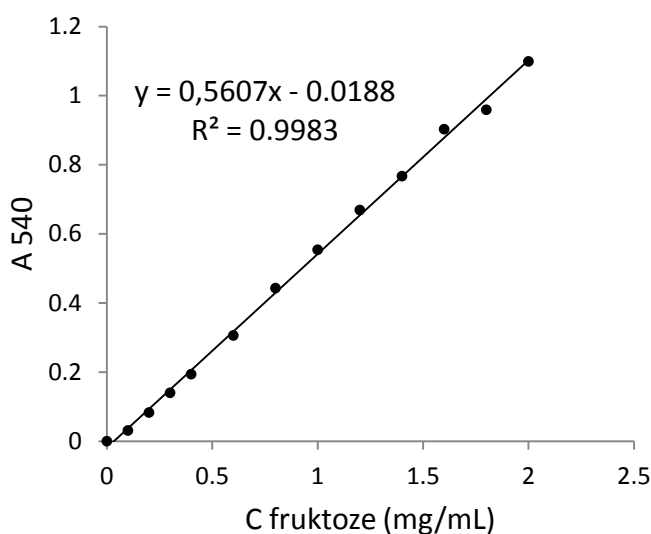
$$\text{Akt (U/ml)} = \frac{n \times V_{rs}}{t \times V_e} \quad (4.1)$$

gde je  $n$  količina oslobođene fruktoze ( $\mu\text{mol}$ ),  $V_{rs}$  zapremina reakcione smeše (mL),  $V_e$  zapremina enzima (mL). Koncentracija oslobođene fruktoze određena je iz nagiba standardne krive za frukozu. Jedna internacionalna jedinica (U) se definiše kao količina enzima koja katalizuje oslobađanje 1  $\mu\text{mol}$  redukujućeg šećera u minutu pod definisanim uslovima.

Specifična aktivnost enzima izračunata je po formuli 4.2:

$$\text{SA (U/mg)} = \text{Akt}/\text{C}_{\text{prot}} \quad (4.2)$$





Slika 4.3 Standardna kriva za određivanje fruktoze

#### 4.3.2 Sinteza dekstrana

Za sintezu dekstrana korišćen je enzim dekstransaharaza, dobijen kako je opisano u poglavlju 4.3.1. U 10 erlenmajera od 300 mL sipano je po 100 mL 20 mM acetatnog pufera, pH 5,4 u koji su dodate soli, da se dobiju navedene koncentracije: 0,05 g/L  $\text{CaCl}_2$  i 1,0 g/L  $\text{NaN}_3$ ; i saharoza, 50 g/L. Zatim je u svaki erlenmajer dodato po 500  $\mu\text{L}$  enzima (20 U/mL, specifična aktivnost 42 U/mg) i erlenmajeri su inkubirani na vazdušnoj tresilici pri 30 °C i 150 obrtaja/min. Sinteza dekstrana je prekinuta nakon 48 h zagrevanjem na ključalom vodenom kupatilu tokom 5 minuta. Nakon hlađenja rastvor dekstrana je dijaliziran naspram destilovane vode preko noći i osušen u sprej sušnici kako je opisano u poglavlju 4.2.1.1.

#### 4.3.3 Karakterizacija dekstrana

##### 4.3.3.1 NMR

Uzorak dekstrana za NMR analizu je rastvoren u  $\text{D}_2\text{O}$  u koncentraciji 15 mg/mL. Rastvaranje je trajalo 24 h na sobnoj temperaturi uz konstantno mešanje. 1D  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR spektri su snimljeni na uređaju Varian Gemini 2000 na sobnoj temperaturi.

Tetrametilsilan (TMS) je korišćen kao spoljašnji standard.  $^1\text{H}$  NMR spektar je snimljen na frekvenciji 200 MHz, a  $^{13}\text{C}$  na 50 MHz.

#### 4.3.3.2 Reološke osobine

Reološke osobine 5%, 10% i 20% rastvora dekstrana određene su na reometru Discovery Hybrid Rheometer HR2 (TA instruments), korišćenjem neoscilatornog smicanja u modu paralelnih ploča (prečnika 25 mm; razmak 1000  $\mu\text{m}$ ). Dinamička viskoznost ( $\eta$ ) i napon smicanja ( $\tau$ ) rastvora mereni su u opsegu brzina smicanja ( $\dot{\gamma}$ ) od 1 – 1000  $\text{s}^{-1}$  na 25 °C. Sva merenja su izvedena u triplikatu. U cilju određivanja tipa protoka rastvora dekstrana, eksperimentalni podaci su fitovani po modelu:  $\tau = K\dot{\gamma}^n$ , gde je  $\tau$  napon smicanja (Pa),  $\dot{\gamma}$  je brzina smicanja ( $\text{s}^{-1}$ ), K je indeks konzistencije (Pa s) i n je indeks toka (bezdimeziona veličina).

#### 4.3.3.3 SEM

SEM analiza je izvršena snimanjem uzorka osušenog dekstrana na elektronskom mikroskopu TESCAN – MIRA3 XMU, Češka. Uzorak je osušen, presvučen zlatom i posmatran na mikroskopu na 10 kV pod uveličanjem od 2000x i 5000x.

### 4.4 Sinteza nanočestica srebra pomoću dekstrana iz *Lc. mesenteroides* T3 i ispitivanje mogućnosti njihove primene

Za sintezu nanočestica srebra (Ag NČ) korišćen je dekstran sintetisan kako je opisano u poglavlju 4.3.2. Dekstran je imao ulogu istovremeno kao redukciono i stabilizaciono sredstvo.

#### 4.4.1 Optimizacija sinteze nanočestica srebra pomoću dekstrana iz *Lc. mesenteroides* T3

Optimizacija postupka za sintezu Ag NČ izvedena je variranjem sledećih parametara:

- koncentracija dekstrana (0,015 – 0,1 %);
- pH vrednost (6 – 12);

- temperatura (20 – 100 °C).

Svi eksperimenti su izvedeni pri konstantnoj koncentraciji jona srebra (0,2 mM). U 100 mL rastvora dekstrana željene koncentracije dodato je 0,34 mL stok rastvora AgNO<sub>3</sub> (10 g/L) i rastvor je mešan na magnetnoj mešalici naredna 3 h da bi se omogućilo da se maksimalna koncentracija Ag<sup>+</sup>- jona redukuje.

Stabilnost Ag NČ sintetisanih pomoću dekstrana praćena je tokom perioda od 3 meseca. UV/Vis apsorpcioni spektri sintetisanih Ag NČ su snimljeni na Thermo Scientific Evolution 600 UV/Vis spektrofotometru. U cilju razumevanja načina vezivanja molekula dekstrana za površinu Ag NČ snimljeni su FTIR spektri na uređaju FTIR; Bomem MB 100, Kanada. TEM analiza je urađena korišćenjem JEOL JEM-2100 LaB<sub>6</sub> instrumenta pri radnom naponu od 220 kV. TEM mikrografije su dobijene kamerom Gatan Orius CCD. Prisustvo kristalne strukture nanočestica Ag određivano je na osnovu difrakcije rendgenskih zraka na instrumentu Rigaku SmartLab sa Cu K $\alpha$  1,2 zračenjem. Intezitet difrakcije meren je u opsegu Bragg-ovih uglova 2 $\theta$  od 10° do 90° sa korakom od 0,01° do 0,7°/min. Uzorci za FTIR and XRD analize su pre merenja osušeni u sprej-sušnici (BÜCHI Mini Spray Dryer B-290, ulazna temperatura 140 °C, izlazna temperatura 70 °C).

#### **4.4.2 Primena nanočestica srebra za detekciju cisteina**

Senzorska sposobnost i osetljivost za detekciju cisteina koloidnog rastvora dekstran/Ag NČ praćena je vizuelno i apsorpcionom spektroskopijom posredstvom promena boje. U 2,7 mL Ag koloida dodato je 0,3 mL rastvora Cys koncentracije u opsegu od 100  $\mu$ M do 1,0 mM. Granica detekcije Cys je izračunata po formuli  $3S_0/S$ , gde je 3 faktor na 99 % nivou pouzdanosti,  $S_0$  je standardna devijacija merenja nule, a  $S$  je nagib kalibracione krive [231].

Optičke osobine dekstran/Ag NČ koloidnog rastvora su ispitane u prisustvu različitih aminokiselina (arginin, alanin, glutamin, glicin, histidin, leucin, metionin i tirozin) kako bi bila potvrđena njegova selektivnost za detekciju Cys. Svi eksperimenti su izvedeni pod istim uslovima: 2,7 mL koloidnog rastvora Ag NČ, koncentracije 0,2 mM, sintetisane prema prethodno opisanoj proceduru, pomešano je sa 0,3 mL rastvora željene aminokiseline koncentracije 1,0 mM.

#### 4.4.3 Primena nanočestica srebra za dobijanje pamučne tkanine sa antimikrobnim svojstvima

Ag NČ su za ovu primenu sintetisane drugom metodom, pomoću mikrotalasa korišćenjem kućne mikrotalasnog pećnice. Prvo je napravljen 0,5% rastvor dekstrana tako što je 0,50 g dekstrana rastvoreno u 100 mL tople destilovane vode (50 °C) uz konstantno mešanje na magnetnoj mešalici. pH vrednost rastvora je podešena na 9 dodatkom par kapi 1 M NaOH. Napravljen je stok rastvor srebro-nitrata koncentracije 10 g/L. U rastvor dekstrana, prethodno ohlađenog na sobnu temperaturu, dodato je 1,7 mL stok rastvora AgNO<sub>3</sub> i rastvor je stavljen u mikrotalasnog pećnicu (10 s, 340 W), kako bi se inicirala redukcija Ag<sup>+</sup>-jona. Promena boje rastvora u žuto-braonkastu ukazivala je na stvaranje metalnih Ag NČ. Koncentracija ovako dobijenog koloidnog rastvora Ag NČ je 1,0 mM. Na isti način su sintetisani i koloidi manje koncentracije (0,5 i 0,2 mM).

Uv-Vis apsorpcioni spektar koloida Ag NČ je snimljen na UV-vis spektrofotometru Varian Cary 100 Scan (Varian, USA).

Veličina molekula dekstrana i Ag NČ određena je metodom dinamičkog rasejanja svetlosti (DLS, od engl. *dynamic light scattering*) na uređaju Zetasizer NanoZS (Malvern Instruments, UK). Pre merenja svi uzorci su razblaženi dejonizovanom vodom da bi se dobio odgovarajući intenzitet rasejanja. Srednji hidrodinamički prečnik ispitivanih uzoraka dobijen je pod uglom od 173° u čistim zeta-ćelijama za jednokratnu upotrebu. Svi eksperimenti izvedeni su na 25 °C.

##### 4.4.3.1 Citotoksičnost

Za određivanje citotoksičnosti Ag NČ prema ćelijama sisara, korišćene su MC3T3-E1 ćelije preosteoblasti (Riken banka). Ćelije su gajene u Dulbeccomodifikovanom Eagle-ovom medijumu (DMEM, Gibco) koji sadrži 1 g/L glukoze, 10% fetalnog goveđeg seruma (Biochrom), i 1% penicilina / streptomocina (Biochrom) na 37 °C u 95% vlažnoj atmosferi sa 5% CO<sub>2</sub>, prema preporukama proizvođača. Medijum za kultivaciju je menjen na svaka 2 dana.

Ćelije su sakupljene korišćenjem tripsin-etilendiamintetrasirćetne kiseline (EDTA) (ATCC-30-2101, 0,25% (w/v) tripsin / 0,53 mM EDTA rastvora u Hank-ovom BSS bez kalcijuma ili magnezijuma) i zasejane u bunarčice mikrotitar-ploče (3×10<sup>4</sup>

ćelija po mL za 24 h). Ćelije su zatim izložene različitim koncentracijama Ag NČ (serijska razblaženja 0,0200; 0,0100; 0,0050; 0,0025; 0,0125; 0,0062; 0,0031 i 0,0016 mmol/L u DMEM) u konačnoj zapremini od 150  $\mu$ L i inkubirane na 37 °C u vlažnoj atmosferi sa 5% CO<sub>2</sub> tokom 24 h. Ćelije bez uzorka su korišćene kao referentne (negativna kontrola - žive ćelije), dok je 10% (w/v) dimetil sulfoksid (DMSO) u kontaktu sa ćelijama korišćen kao pozitivna kontrola (mrtve ćelije). Posle 24 h inkubacije, uzorci su uklonjeni i vijabilnost ćelija je analizirana korišćenjem 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolijum bromida (MTT) testa. MTT test meri aktivnost mitohondrija ćelija, koja odražava broj vitalnih ćelija. U svaki bunarčić se doda svež medijum koji sadrži MTT i posle 2 h inkubacije, kristali MTT se rastvore u DMSO. Rezultujuća optička gustina je merena na 570 nm, koristeći 690 nm kao referentnu talasnu dužinu, a vijabilnost ćelija je računata prema sledećoj jednačini:

$$\text{Vijabilnost ćelija (\%)} = (A_{570-690} \text{ uzorka} / A_{570-690} \text{ negativne kontrole}) \times 100 \quad (4.3)$$

#### 4.4.3.2 *Modifikovanje pamučne tkanine koloidnim rastvorom srebra*

Radi uklanjanja površinskih nečistoća, beljena pamučna tkanina (168 g/m<sup>2</sup>) je oprana u 0,5% rastvoru nejonskog sredstva za pranje Felosan RG-N (Bezema, Švajcarska), pri odnosu tečnosti i tkanine 50:1. Nakon 15 minuta pranja na 50 °C, tkanina je jednom isprana toplom vodom (50 °C) u trajanju od 3 minuta i tri puta hladnom (po 3 minuta), a zatim sušena na sobnoj temperaturi.

Tkanina (1 g) je zatim potopljena u 25 mL koloidnog rastvora Ag NČ i ostavljena 30 min. Nakon sušenja na sobnoj temperaturi i dodatnog sušenja na 100 °C tokom 5 min, uzorci su dva puta isprani dejonizovanom vodom (po 5 min) i osušeni na sobnoj temperaturi.

#### 4.4.3.3 *Karakterizacija pamučne tkanine modifikovane koloidnim rastvorom nanočestica srebra*

Morfološke osobine tkanine modifikovane Ag NČ određene su skenirajućom elektronskom mikroskopijom na uređaju FESEM, Mira3 Tescan, Češka. Uzorci tkanine su pre analize naparavani prevlakom legure Au/Pd (85/15).

Ukupan sadržaj srebra u uzorcima određen je atomskom apsorpcionom spektrometrijom na uređaju Spectra AA 55 B (AAS, Varian). Uzorci su spaljeni i dobijeni pepeo je rastvoren u 5M azotnoj kiselini.

Analiza kristalne strukture Ag NČ na površini pamučne tkanine urađena je metodom XRD spektroskopije na difraktometru Bruker D8 advance, opremljenim primarnim monohromatorom sa fokusirajućim Ge-kristalom (Johanson tip) koji generiše Cu K<sub>α</sub> zračenje (vreme koraka 6 ili 8 s; korak 0,028 ili 0,058).

Koordinate boje tkanine (CIE L\*, a\*, b\*) su određene pomoću Datacolor SF300 UV refleksionog spektrofotometra, koristeći izvor svetlosti D<sub>65</sub> pri standardnom uglu posmatrača od 10°. Pomoću CIE koordinata može se odrediti razlika u obojenju ( $\Delta E^*$ ) prema sledećoj jednačini:

$$\Delta E = \sqrt{(\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2 + (\Delta L^*)^2} \quad (4.4)$$

#### 4.4.3.4 Analiza antimikrobnih svojstava tkanine

Antimikrobna aktivnost tkanine ispitana je primenom indikatorskih sojeva: Gram-negativne bakterije *Escherichia coli* ATCC 25922, Gram-pozitivne bakterije *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 i gljivice *Candida albicans* ATCC 24433, prema standardnoj metodi za određivanje antimikrobne aktivnosti pod dinamičkim kontaktnim uslovima ASTM E 2149-01 [232]. Procenat redukcije mikroorganizama (R%) računat je prema sledećoj formuli:

$$R(\%) = \frac{C_0 - C}{C_0} \cdot 100, \quad (4.5)$$

gde je  $C_0$  (CFU/mL – engl. *colony forming units* u 1 mL) broj kolonija mikroorganizama izraslih nakon kontakta sa kontrolnim uzorkom (netretiranom tkaninom, bez Ag NČ), a  $C$  (CFU/mL) je broj kolonija mikroorganizama izraslih nakon kontakta sa uzorkom pamučne tkanine koja je tretirana sa Ag NČ.

## 4.5 Sinteza jestivih filmova od dekstrana iz *Lc. mesenteroides* T3

Za sintezu jestivih filmova korišćen je dekstran sintetisan kako je opisano u poglavlju 4.3.2. Najpre su pripremljeni vodeni rastvori dekstrana, rastvaranjem

odgovarajuće količine dekstrana (opseg koncentracija 1,5-4,5 masenih %, tabela 5.6) na 50 °C, uz konstantno mešanje na magnetnoj mešalici. Zatim je dodat sorbitol (10-40 masenih %, računato na masu dekstrana, tabela 5.6) i mešanje je nastavljeno još 1 h na sobnoj temperaturi. Rastvori su potom razliveni u silikonske kalupe i ostavljeni da se suše 2 dana na 25 °C. Osušeni filmovi su izvađeni iz kalupa i do analize čuvani na 25 °C i relativnoj vlažnosti vazduha od 50%. Debljina dobijenih filmova je bila 70 µm.

#### 4.5.1 Dizajn eksperimenta optimizacije

U cilju optimizacije formulacija filmova korišćena je statistička metoda odzivnih površina (RSM, od engl. *Response Surface Methodology*) uz pomoć softvera *Design Expert* (Verzija 8, Stat-Ease, Inc., Minneapolis, United States).

RSM je skup matematičkih i statističkih tehnika koje se zasnivaju na prilagođavanju empirijskih modela eksperimentalnim podacima dobijenim u odnosu na eksperimentalni dizajn [233]. Koristi se za modelovanje i analizu procesa u slučajevima gde nekoliko promenljivih utiče na odgovor, a cilj je da se taj odgovor optimizuje [234]. Za opisivanje proučavanog sistema koriste se linearne ili kvadratne polinomne funkcije, u zavisnosti od izabranog eksperimentalnog dizajna [233,234].

U cilju ispitivanja uticaja koncentracije dekstrana i sorbitola na osobine filmova i optimizacije njihovog sastava, izabran je dvo-faktorijski centralni kompozitni dizajn (CCD, od engl. *Central Composite Design*). CCD omogućava određivanje linearnih i kvadratnih modela [235], i jedan je od najčešće korišćenih eksperimentalnih modela za optimizaciju procesa s obzirom na to da se u njemu svaki faktor ispituje na 5 nivoa [236].

Podaci iz CCD-a analizirani su višestrukom regresionom analizom tako da odgovaraju polinomnom regresionom modelu drugog reda. Model jednačina odzivne funkcije (Y) dve procesne promenljive ( $X_1$  i  $X_2$ ) je dat sledećom jednačinom [233,234]:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 \quad (4.6)$$

gde su  $\beta_1$  i  $\beta_2$  linearni,  $\beta_{11}$  i  $\beta_{22}$  kvadratni i  $\beta_{12}$  dvo-faktorski koeficijenti interakcije.

## 4.5.2 Karakterizacija jestivih filmova na bazi dekstrana iz *Lc. mesenteroides* T3

### 4.5.2.1 Mehanička svojstva

Mehanička svojstva jestivih filmova na bazi dekstrana (zatezna čvrstoća, izduženje pri kidanju i Jangov modul elastičnosti) određena su prema ASTM standardnoj metodi D882-10 (ASTM, 2010) na uređaju Instron M1185. Uzorci filma su isečeni u pravougaone trake dužine 50 mm i širine 5 mm. Brzina istezanja podešena je na 2 mm/min.

### 4.5.2.2 Propustljivost vodene pare

Brzina prenosa vodene pare (engl. *water vapor transmission rate* – WVTR) je merena prema ASTM E96 metodi koristeći metalnu čašu prečnika 35 mm. Čaše su napunjene destilovanom vodom (~100% relativna vlažnost unutar ćelije) i stavljene u komoru koja je podešena na temperaturu 25 °C i na relativnu vlažnost od 50%. Mase uzoraka su merene periodično tokom 24 h. WVTR vrednosti su određene iz linearnog grafika zavisnosti promene mase od vremena prema jednačini 4.7:

$$WVTR = \frac{\Delta G}{t \cdot A} \quad (4.7),$$

gde je  $\Delta G$  promena mase (g),  $t$  vreme u kome je došlo do gubitka mase  $\Delta G$  (h),  $A$  testirana površina čaše ( $m^2$ ), a  $\Delta G/t$  je nagib linearnog grafika.

Propustljivost vodene pare (engl. *water vapor permeability* – WVP) izračunat je prema sledećoj jednačini:

$$WVP = \frac{WVTR \cdot L}{\Delta p} \quad (4.8),$$

gde je  $L$  debljina filmova (m) i  $\Delta p$  razlika pritiska vode između obe strane filma (Pa).

### 4.5.2.3 Ugao kvašenja

Ugao kvašenja je određen optičkim tenziometrom (KSV, Attansion Theta). Za svako merenje 5  $\mu$ l ultračiste vode je kanuto na površinu filma i 100 slika je automatski snimljeno u eksperimentalnom vremenu od 60 s pomoću softvera KSV CAM 2008.



Kontaktne uglove su određeni prema standardnoj metodi ASTM D5725-99 (2008) i predstavljaju srednje vrednosti od 5 merenja.

#### *4.5.2.4 Termička svojstva*

Termička stabilnost filmova je određena termogravimetrijskom (TG) analizom. TG analiza urađena je na instrumentu Mettler Thermogravimeter Analyzer Mod. TG 50 (Mettler Toledo Corp., Ciri, Švajcarska). Termička stabilnost uzorka (oko 10 mg) ispitana je u temperaturnom opsegu od 25 - 600 °C pri brzini od 10 °C/min u atmosferi vazduha.

### **4.5.3 Ispitivanje uticaja prevlake na bazi dekstrana na održanje kvaliteta ploda borovnice tokom skladištenja**

Rastvor za premazivanje borovnica pripremljen je rastvaranjem 3,4 g dekstrana u 100 mL destilovane vode uz mešanje i zagrevanje (50 °C) na magnetnoj mešalici. Nakon potpunog rastvaranja dekstrana, rastvoru su dodati sorbitol (0,7 g) i Tween 80 (5%). Po dodatku plastifikatora i surfaktanta rastvor je mešan na magnetnoj mešalici još sat vremena na sobnoj temperaturi.

Borovnice su potopljene u rastvor za oblaganje 30 sekundi i ostavljene da se suše u sušnici sa ventilacijom na 25 °C tokom 10 minuta. Borovnice umočene u destilovanu vodu korišćene su kao kontrola. Uzorci i kontrole su zatim stavljeni u zasebne plastične posude (PET) i skladišteni na 8 °C 21 dan. Pripremljene su tri posude sa po 30 borovnica, za svako vreme uzorkovanja. Plodovi su nasumično uzimani iz svake od posuda i korišćeni za analitička određivanja. Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti  $\pm$  standardna devijacija. Statistička značajnost razlika između srednjih vrednosti  $\pm$  SD određena je sa 95% verovatnoće ( $p < 0,05$ ) primenom analize varijanse sa jednom nezavisnom promenljivom (One way ANOVA).

#### **4.5.3.1 Parametri kvaliteta borovnica**

##### **4.5.3.1.1 Gubitak mase**

Gubitak mase nepremazanih i premazanih borovnica određen je periodičnim merenjem uzoraka na tehničkoj vagi i označen je kao procenat gubitka mase uzoraka u

odnosu na izmerenu početnu masu. Procenat gubitka mase borovnica (WL, od engl. *weight loss*) je izračunat prema sledećoj jednačini:

$$WL(\%) = \frac{W_0 - W_1}{W_0} \times 100 \quad (4.9)$$

gde je:  $W_0$  – masa uzorka pre skladištenja, a  $W_1$  – masa uzorka nakon skladištenja.

#### 4.5.3.1.2 Određivanje sadržaja rastvorne suve materije (ukupnih šećera)

Sadržaj ukupnih šećera je određen merenjem indeksa refrakcije soka borovnice pomoću ručnog refraktometra na 25°C. Rezultati su izraženi u % (°Brix).

#### 4.5.3.1.3 Titracijska kiselost

Titracijska kiselost (TA, od engl. *Titrateable acidity*) je određena metodom kiselo-bazne titracije. Deset grama borovnica samleveno je u blenderu. Dobijen sok (6 g) je homogenizovan sa 50 mL destilovane vode. Dodato je nekoliko kapi fenolftaleina i smeša je titrisana 0,1 M rastvorom NaOH. Završna tačka titracije je dostignuta kada je indikator promenio boju iz bezbojne u ružičastu. Rezultati su izraženi u % (kao broj grama ekvivalenata limunske kiseline na 100 g borovnica). TA je izračunata prema sledećoj jednačini:

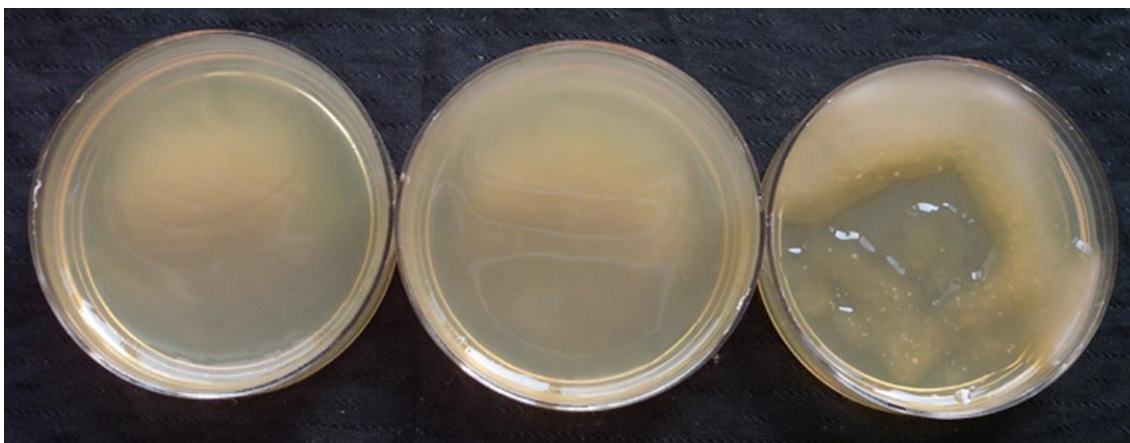
$$TA(\%) = \frac{V(NaOH) \times c(NaOH) \times 0,064}{m} \times 100 \% \quad (4.10)$$

gde je:  $m$  (g) – tačna masa soka od borovnica.

## 5 REZULTATI I DISKUSIJA

### 5.1 Identifikacija sojeva BMK koji sintetišu dekstran

Iz zrna vodenog kefira izolovano je preko 40 mikroorganizama, među kojima je bilo bakterija i kvasaca. Predmet istraživanja ove doktorske teze bile su BMK sa visokim potencijalom za proizvodnju dekstrana. Sa tim ciljem za rad je odabrano 12 bakterija, koje su obeležene oznakama T1 – T12. Svi odabrani izolati su rasli na M17 i MRS agaru na 30 °C. Kolonije ovih bakterija su na površini agarne podloge bele i okrugle. Pregledom mikroskopskih preparata utvrđeno je da su svi izolati Gram-pozitivni, različitih oblika, od sfernog, preko elipsoidnog do štapićastog. Svi izolati su bili katalaza-negativni. Na osnovu ovih preliminarnih rezultata zaključeno je da su svi izolati pripadnici BMK. Skoro svi odabrani sojevi su obrazovali sluzave kolonije na površini MRSs agara, što je ukazivalo da imaju sposobnost sinteze egzopolisaharida u prisustvu saharoze. Tri izolata su se posebno isticala svojim izgledom (T1, T3 i T5, slika 5.1), na osnovu čega su i odabrani za dalji rad. Njihove morfološke i fiziološke karakteristike date su u tabeli 5.1.



Slika 5.1 Izgled izolata BMK gajenih na površini MRSs agara: T1 (levo), T3 (sredina), T5 (desno)

Iz rezultata prikazanih u tabeli 5.1 vidi se da je optimalna temperatura za rast sva tri soja 30 °C. Svi sojevi su rasli na 37 °C, ali nijedan nije rastao na 45 °C. Izolat T3

rastao je i na 15 °C, izolat T5 vrlo slabo, dok izolat T1 nije pokazao rast na ovoj temperaturi. Ispitivanjem sposobnosti rasta u prisustvu natrijum-hlorida, utvrđeno je da su sva tri izolata tolerantna na prisustvo NaCl u koncentracijama 4% i 6,5%, dok je izolat T3 mogao da raste i pri koncentraciji NaCl 9,6%. Sva tri izolovana soja su fermentisala glukozu uz proizvodnju gasa. U cilju određivanja fermentacionog profila izolovanih sojeva urađen je API test i rezultati su prikazani u tabeli 5.2.

Tabela 5.1 Morfološke i fiziološke karakteristike BMK izolata; +: pozitivna reakcija, -: negativna reakcija, ±: slabo pozitivna reakcija


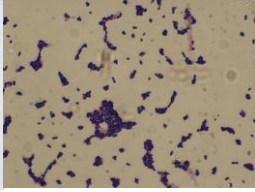
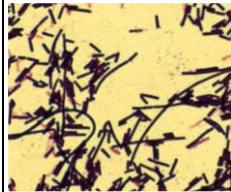
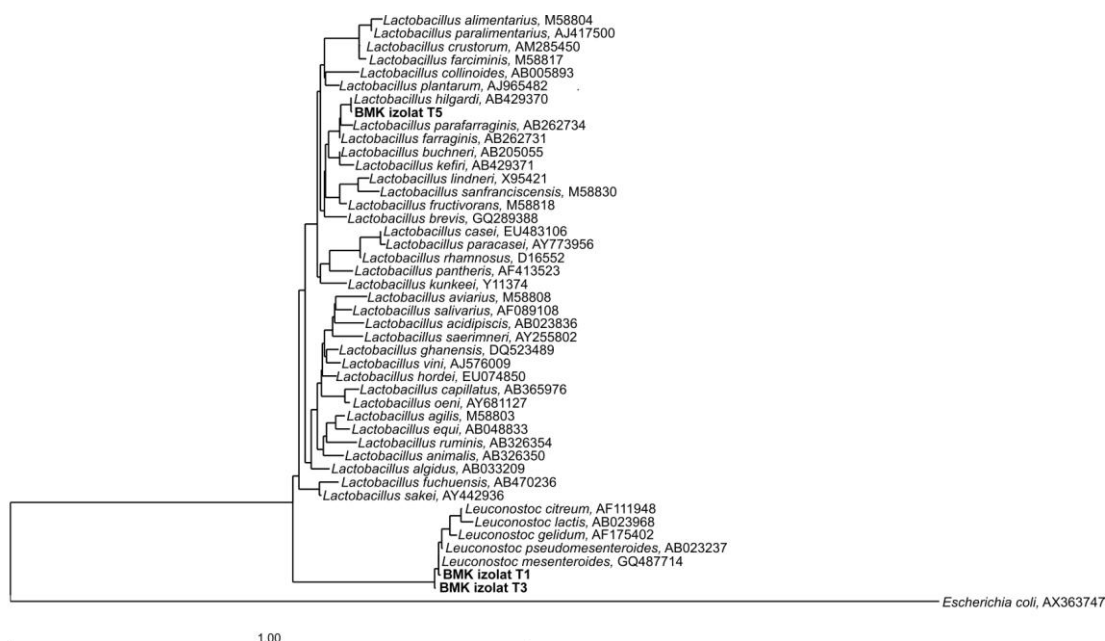
Osobina		Izolat		
		T1	T3	T5
Bojenje po Gramu		+	+	+
Oblik ćelije		Izdužene koke	Izdužene koke	Dugački štapići
Veličina ćelije (µm)		0,76-0,92	0,86-1,00	15,56-18,30
Izgled pod mikroskopom				
Katalaza test		-	-	-
Rast na različitim temperaturama (°C)	15 °C	-	+	±
	30 °C	+	+	+
	37 °C	+	+	+
	45 °C	-	-	-
Rast u prisustvu različite koncentracije NaCl (%)	4%	±	+	±
	6,5%	±	±	±
	9,6%	-	±	-
Fermentacija glukoze /gas		+/+	+/+	+/+
Fermentacija glukonata /gas		-/-	-/-	+/-

Tabela 5.2 Profili fermentacije ugljenih hidrata odabranih sojeva posle 48h inkubacije na 30 °C; +: pozitivna reakcija, -: negativna reakcija, ±: slabo pozitivna reakcija

Šećer	Bakterija			Šećer	Bakterija		
	<i>Lc. mesenteroides</i>		<i>Lb. hilgardii</i>		<i>Lc. mesenteroides</i>		<i>Lb. hilgardii</i>
	T1	T3			T1	T3	
Kontrola	-	-	-	Eskulin	+	+	+
Glicerol	-	-	-	Salicin	+	-	-
Eritrol	-	-	-	D-celibioza	+	+	-
D-arabinoza	-	-	-	D-maltoza	+	+	+
L-arabinoza	-	-	+	D-laktoza	+	-	-
Riboza	-	±	+	D-melibioza	+	-	-
D-ksiloza	-	+	+	D-saharoza	+	+	+
L-ksiloza	-	-	-	D-trehaloza	-	+	-
D-adonitol	-	-	-	Inulin	-	-	-
MetilβD-ksilopiranozid	+	-	-	D-melizitoza	-	-	-
Galaktoza	+	-	-	D-rafinoza	-	-	-
Glukoza	+	+	+	Amidon	±	-	-
Fruktoza	+	+	+	Glikogen	-	-	-
Manoza	-	+	-	Ksilitol	-	-	-
Sorboza	-	-	-	Gentibioza	-	±	-
Ramnoza	-	-	-	D-turanoza	-	+	-
Dulcitol	-	-	-	D-liksoza	-	-	-
Inozitol	-	-	-	D-tagatoza	-	-	-
Manitol	-	±	-	D-fukoza	-	-	-
Sorbitol	-	-	-	L-fukoza	-	-	-
MetilαD-manopiranozid	-	-	-	D-arabitol	-	-	-
MetilαD-glukopiranozid	-	+	-	L-arabitol	-	-	-
N-acetilglukozamin	-	+	-	Natrijum glukonat	-	±	+
Amigdalinalin	+	-	-	2-ketoglukonat	-	-	-
Arbutin	-	-	-	5-ketoglukonat	-	-	-

Izolati T1 i T3 su morfološki veoma slični, ali im se razlikuju profili fermentacije ugljenih hidrata (tabela 5.2). Oba soja fermentišu glukozu, fruktozu, eskulin, celibiozu, maltozu i saharozu. Izolat T1 pored toga fermentiše još i metil $\beta$ -D-ksilopiranozid, galaktozu, amigdalín, glicerol, laktozu i melibiozu, a izolat T3 ksilozu, manozu metil $\alpha$ -D-glukopiranozid, N-acetilglukozamin i trehalozu. Izolat T5 proizvodi kiselinu rastom na sledećim ugljenim hidratima: ribozi, ksilozi, glukozí, fruktozi, eskulinu, maltozi, saharozi i natrijum-glukonatu.

Prema fiziološkim i morfološkim karakteristikama izolati T1 i T3 pripadaju rodu *Leuconostoc*, dok je soj T5, na osnovu Berdžejevog priručnika za sistematsku bakteriologiju [237], preliminarno identifikovan kao *Lactobacillus hilgardii*. Identifikacija sojeva je potvrđena analizom nukleotidne sekvence kojom je kodirana sinteza ribozomalne 16S RNK. Izolati T1 i T3 su identifikovani kao *Leuconostoc mesenteroides* vrste, s obzirom na to da njihove sekvence pokazuju >99% poklapanja sa sekvencom *Lc. mesenteroides* soj NCFB 529 (acc NR\_040817), dok je nukleotidna sekvenca soja T5 najbližnja (>99%) sa *Lactobacillus hilgardii* soj NBRC 15886 (acc NR\_113817.1). Na osnovu nukleotidnih sekvenci BMK izolata i njihovih bliskih rođaka konstruisano je filogenetsko stablo, korišćenjem ARB softvera [238] (slika 5.2).

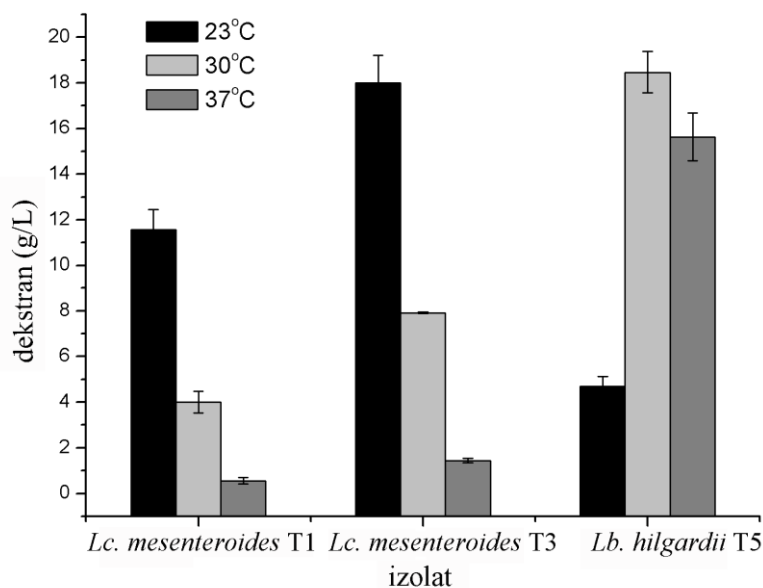


Slika 5.2 Filogenetsko stablo sa pozicijom ispitivanih izolata

Bakterije mlečne kiseline su tipični predstavnici mikrobiote kefirnih zrna, iako njihov mikrobiološki sastav može da se razlikuje među zrnima različitog porekla [65,67,68]. Gulitz (Gulic) i saradnici [67] su ispitivali raznovrsnost mikrobiote u zrnima vodenog kefira tri različita poreka. Pripadnici roda *Lactobacillus* bili su dominantni u dva uzorka, dok je u trećem uzorku najzastupljenija vrsta bila *Leuconostoc mesenteroides*. Sposobnost proizvodnje EPS-a iz saharoze utvrđena je kod sledećih vrsta: *Lb. casei*, *Lb. hordei*, *Lb. nagelii*, *Lb. hilgardii* i *Lc. mesenteroides*. Fels i saradnici [75] su utvrdili da je dekstran najzastupljeniji EPS u vodenom kefiru i zrnima vodenog kefira.

### **5.1.1 Utvrđivanje sposobnosti proizvodnje dekstrana u tečnoj podlozi**

Nakon vizuelnog odabiranja izolovanih bakterija na osnovu izgleda kolonija na čvrstoj podlozi, sposobnost sinteze dekstrana je ispitana i u MRSs bujonu. Temperatura optimalna za sintezu EPS-a često se razlikuje od one na kojoj je bakterijski rast najintenzivniji [239–242]. U cilju određivanja optimalne temperature za sintezu dekstrana, odabrani BMK izolati su gajeni na tri temperature: 23, 30 i 37 °C. Rezultati su prikazani na slici 5.3.



Slika 5.3 Uticaj temperature na prinos dekstrana

Temperatura inkubacije značajno je uticala na prinos dekstrana kod sva tri soja. Izolat *Lb. hilgardii* T5 najveću količinu dekstrana 18,46 g/L sintetiše na temperaturi optimalnoj za rast (30 °C), što je u skladu sa literaturnim podacima [63]. Na temperaturi 37 °C prinos dekstrana je nešto niži, dok je najniži prinos dobijen na 23 °C, što je i očekivano, s obzirom na to da je na toj temperaturi i bakterijski rast najslabiji.

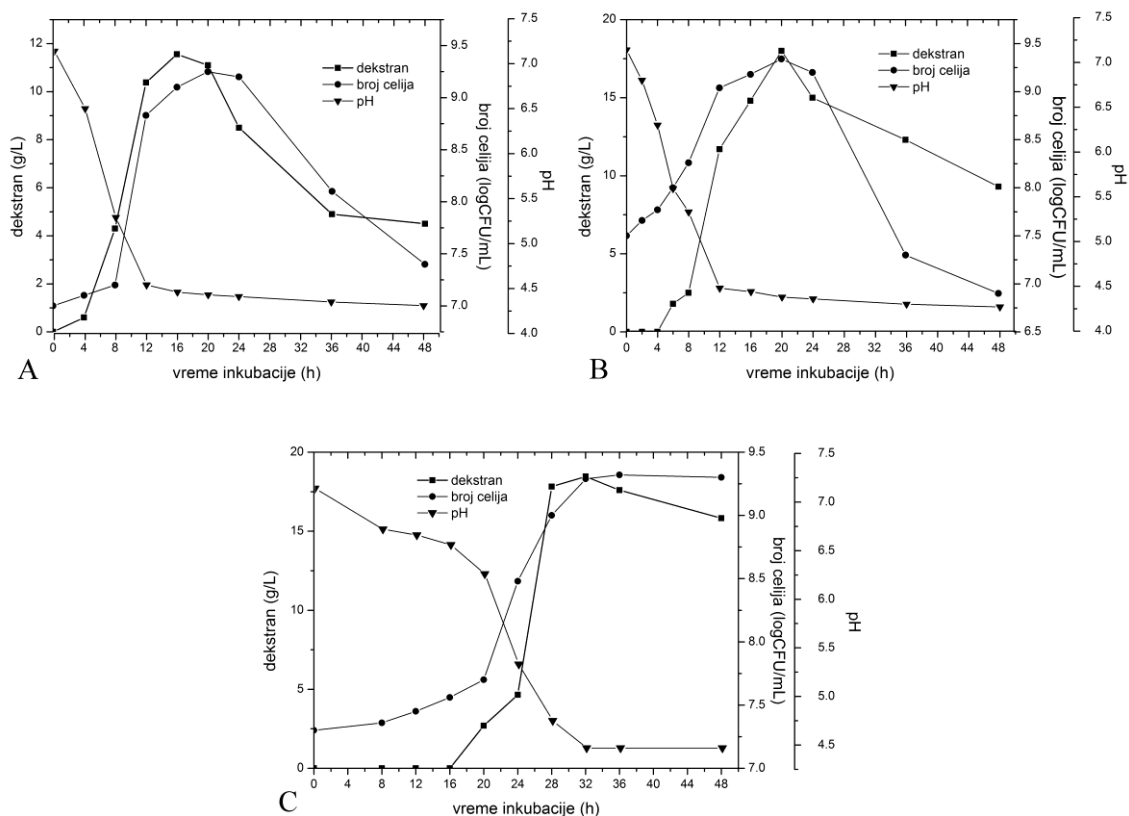
*Lc. mesenteroides* sojevi su najveći prinos dekstrana dali na najnižoj ispitanoj temperaturi (23 °C), soj T1 11,56 g/L, a soj T3 18,00 g/L. Sa porastom temperature prinos dekstrana drastično opada. Prema literaturnim podacima optimalna temperatura za sintezu dekstrana kod *Lc. mesenteroides* sojeva razlikuje se od soja do soja i kreće se između 23 °C i 30 °C [243–245].

Poređenjem sa literaturnim podacima može se zaključiti da izolati iz zrna vodenog kefir *Lc. mesenteroides* T1, *Lc. mesenteroides* T3 i *Lb. hilgardii* T5 sintetišu približno iste ili čak i veće prinose dekstrana u odnosu na BMK iz drugih izvora [243,246–248]. Van der Meulen (Van der Melen) i saradnici [246] su među 174 BMK izolata poreklom iz mlečnih i proizvoda od žitarica, sposobnost produkcije EPS-a utvrdili kod 9, čiji su prinosi bili u opsegu od 0,8–17,2 g/L. Majumder i saradnici [247] su optimizovali uslove za proizvodnju dekstrana pomoću soja *Lc. mesenteroides* NRRL



B-640 i dobili prinos 12 g/L. Ovaj prinos je blizak prinosu koji daje izolat iz zrna vodenog kefira *Lc. mesenteroides* T1, dok soj T3 proizvodi čak 33% više dekstrana iz iste količine saharoze. *Lc. mesenteroides* T3 je konvertovao 36% saharoze u dekstran, što je nešto više od *Lc. mesenteroides* CMG713 (32,5%) [243].

Kinetika sinteze dekstrana praćena je tokom 48 h inkubacije u MRSs bujonu na temperaturi optimalnoj za sintezu dekstrana za svaki soj (23 °C za T1 i T3 sojeve, odnosno 30 °C za soj T5). Rezultati su prikazani na slici 5.4. Sa slike se vidi da se proizvodnja dekstrana odvija paralelno sa bakterijskim rastom, prinos raste tokom ekspanzionarne faze, da bi u stacionarnoj fazi počeo da opada. Maksimalni prinos dekstrana kod soja T1 dostiže se nakon 16 h inkubacije, kod soja T3 za 20 h, dok soj T5 najsporije raste, pa najveću količinu dekstrana sintetiše posle 32 h inkubacije, na ulasku u stacionarnu fazu rasta. Početna pH vrednost fermentacionog bujona je 7,2 i tokom fermentacije opada usled metaboličke aktivnosti izolata, prvenstveno sinteze mlečne kiseline. Zajedničko za sva tri soja je da razgradnja dekstrana počinje kad pH vrednost padne na 4,3, zbog čega je izmeren manji prinos.



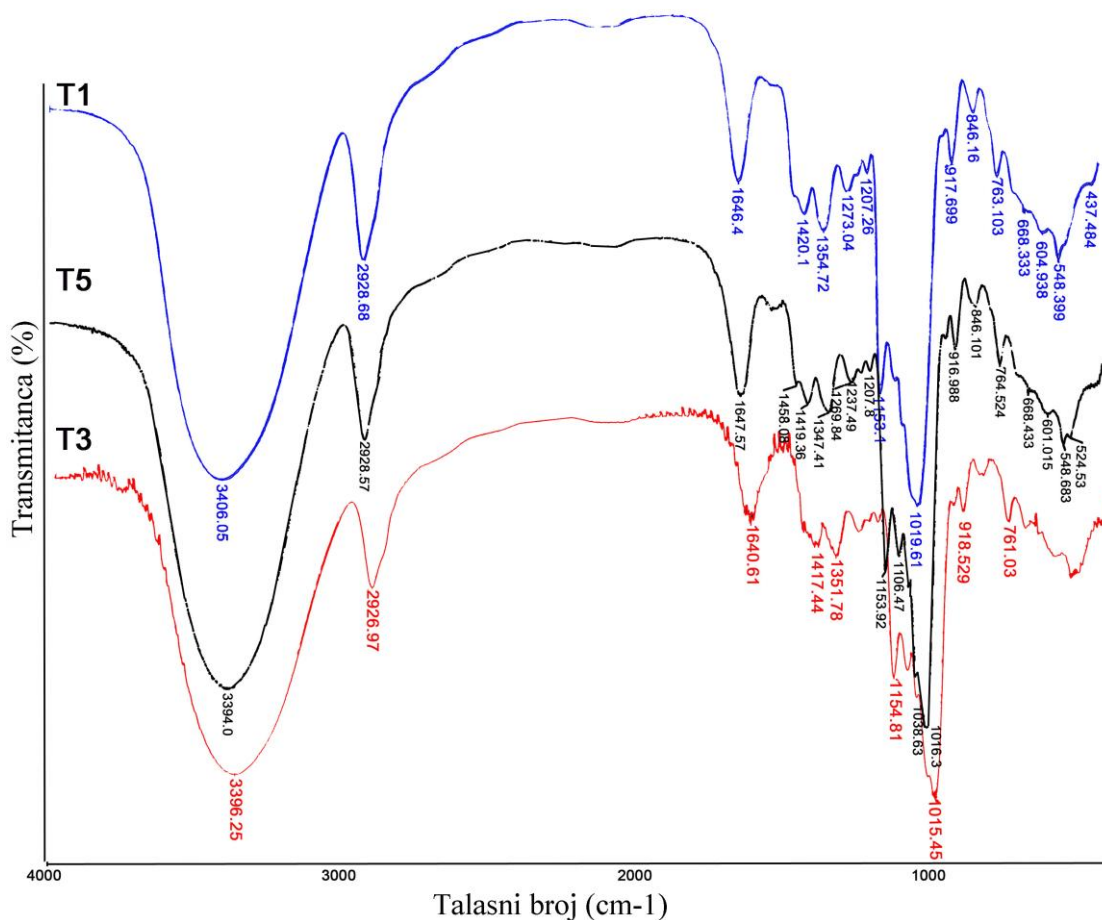
Slika 5.4 Uticaj dužine trajanja inkubacije na prinos dekstrana, pH fermentacionog medijuma i mikrobnu biomasu

Sinteza dekstrana se odvija posredstvom ekstracelularnog enzima dekstransaharaze. Tokom fermentacionog postupka za dobijanje dekstrana paralelno se odvijaju tri procesa: umnožavanje ćelija, sinteza dekstransaharaze i sinteza dekstrana. Zato na proizvodnju dekstrana osim temperature i vremena, mogu uticati i brojni drugi faktori koji stimulišu rast ćelija, odnosno proizvodnju enzima, kao što su koncentracija saharoze, izvor azota, mineralne soli, pH vrednost medijuma i aeracija [247–250].

Tokom fermentacije pH vrednost se menja, što je ključan faktor za enzimsku aktivnost. Početni uslovi pri kojima je pH vrednost blizu neutralne pogoduju sintezi dekstransaharaze [251]. Oslobođeni enzim odmah počinje da sintetiše dekstran, ali se nagli porast prinosa dekstrana primećuje tek pošto pH vrednost padne na 5,5 (slika 5.4), što je blizu vrednosti optimalne za aktivnost dekstransaharaze [63,251].

### 5.1.2 Karakterizacija uzoraka dekstrana

Prvi korak kod analize strukture polisaharida je utvrđivanje njegovog monosaharidnog sastava. Tankoslojnom hromatografijom na papiru utvrđeno je da je glukoza, monosaharidna jedinica, uzoraka egzopolisaharida izolovanih iz sva tri bakterijska soja.



Slika 5.5 FTIR spektri dekstrana T1, T3 i T5

U cilju utvrđivanja detaljnije strukture, uzorci su analizirani FTIR spektroskopijom. Spektri su prikazani na slici 5.5. U oblasti od 2000-4000 cm<sup>-1</sup> spektri sva tri uzorka izgledaju isto, dok se manje razlike uočavaju u oblasti 400-2000 cm<sup>-1</sup>. Široka intenzivna traka u oblasti 3200-3500 cm<sup>-1</sup> potiče od valencionih vibracija O-H veze [252], dok je pik na oko 2927 cm<sup>-1</sup> karakterističan za valencione vibracije C-H

veze. Širok signal u oblasti  $1000 - 1200 \text{ cm}^{-1}$  potiče od C-O-C i C-O veza, što su veze tipične za polisaharide [253]. Najintenzivniji pikovi u ovoj oblasti su kod sva tri uzorka na  $1016-1020 \text{ cm}^{-1}$  i  $1030-1040 \text{ cm}^{-1}$ , što je potvrda da su analizirani uzorci polisaharidi [254]. Karakteristična apsorpcija koja se javlja na talasnoj dužini  $825 - 850 \text{ cm}^{-1}$  ukazuje na  $\alpha$ -konfiguraciju monomernih jedinica [255]. Na osnovu prikazanih FTIR spektara zaključeno je da sva tri BMK izolata proizvode EPS-e iste prirode: homopolisaharide  $\alpha$ -glukoze i sva tri EPSa su identifikovana kao dekstrani.

Pod uslovima optimalnim za sintezu dekstrana sojevi *Lc. mesenteroides* T1 i T3 proizvode dekstran rastvoran u vodi, dok je dekstran iz *Lb. hilgardii* T5 sintetisan pod optimalnim uslovima nerastvoran u vodi, a rastvara se u dimetilsulfoksidu. Poznato je da prisustvo  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3) veza u bočnim lancima dekstrana smanjuje njihovu rastvorljivost u vodi [256]. Brojne studije su pokazale da je *Lb. hilgardii* odgovoran za proizvodnju dekstrana koji obrazuje kefirno zrno [63,64,74]. Glukozne jedinice u ovom dekstranu su povezane  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3) i  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 6) vezama u glavnom lancu, sa dodatnim  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3) vezama u bočnom lancu [256,257].

Za dalji rad odabran je dekstran iz *Lc. mesenteroides* T3 jer je rastvorljiv u vodi, a daje veći prinos u odnosu na soj T1. Dekstran je sintetisan enzimski radi lakšeg kontrolisanja parametara tokom sinteze i izdvajanja čistog proizvoda.

### **5.1.3 Karakterizacija dekstrana sintetisanog pomoću dekstransaharaze izolovane iz BMK izolata *Leuconostoc mesenteroides* T3**

Dekstran je sintetisan pomoću enzima dekstransaharaze, izolovanog iz *Lc. mesenteroides* T3, i okarakterisan u smislu hemijske strukture (NMR spektroskopija), reoloških osobina i morfologije (SEM).

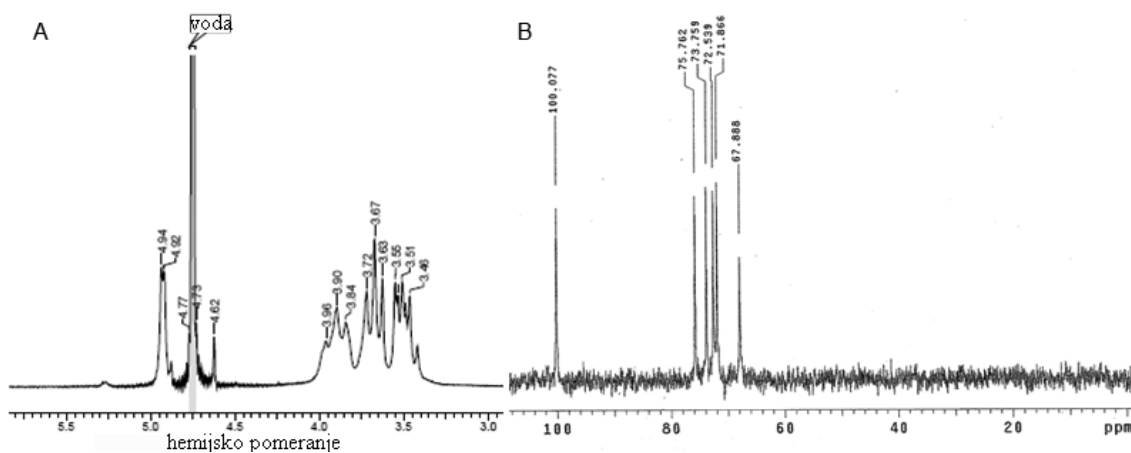
#### *5.1.3.1 NMR spektroskopija*

$^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR spektri dekstrana prikazani su na slici 5.6. U  $^1\text{H}$  NMR spektru dekstrana karakteristični signal poluacetalnog C1 atoma se javlja u regionu 4 – 6 ppm, dok se signali protona sa C atoma 2 – 6 javljaju u oblasti 3 – 4 ppm [258]. Glavne razlike u spektrima dekstrana uočavaju se u anomernom regionu (4 – 6) ppm [259]. Pregledom literature ustanovljeno je da se u  $^1\text{H}$  NMR spektrima linearnih dekstrana

javlja jedan pik (dublet) na 4,9 ppm, dok spektri razgranatih dekstrana imaju dodatne rezonance u oblasti 4,9 – 5,3 ppm [260]. U  $^1\text{H}$  NMR spektru dekstrana iz *Lc. mesenteroides* T3 (slika 5.6a) uočljivi su svi signali karakteristični za linearni molekul.

U  $^{13}\text{C}$  NMR spektru (slika 5.6b) primećuje se šest istaknutih signala na hemijskim pomeranjima 100,09; 73,78; 75,76; 71,89; 72,56 i 67,90 ppm. Generalno, u  $^{13}\text{C}$  NMR spektrima linearnih dekstrana signali se javljaju u oblasti 70 – 75 ppm i oni potiču od drugog, trećeg i četvrtog C-atoma glukoze, koji su kod linearnih dekstrana slobodni. Kod razgranatih dekstrana signali ovih C-atoma se javljaju u oblasti 75 – 85 ppm [261]. Glavni signal u anomernom regionu dekstrana iz *Lc. mesenteroides* T3 javlja se na 100,09 i ukazuje na to da je C-1 vezan, dok je intenzivan signal na 67,90 ppm potvrda da je vezan i C-6 [261,262].

Na osnovu rezultata NMR spektroskopije zaključeno je da je dekstran iz *Lc. mesenteroides* T3 linearan molekul sa  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 6) glikozidnim vezama.

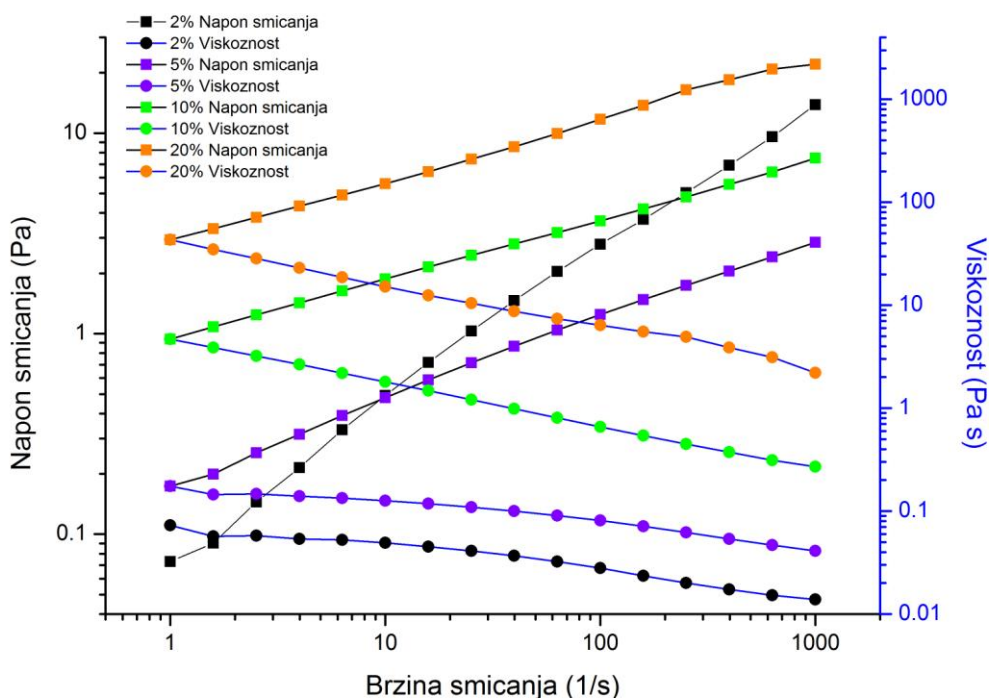


Slika 5.6  $^1\text{H}$  (a) i  $^{13}\text{C}$  (b) NMR spektri dekstrana sintetisanog pomoću dekstransaharaze iz *Lc. mesenteroides* T3

### 5.1.3.2 Reološke osobine

Neoscilatorna merenja smicanja 5%, 10% i 20% rastvora dekstrana pokazuju da viskoznost rastvora dekstrana opada sa porastom brzine smicanja (slika 5.7). Za ovakve rastvore se kaže da pokazuju tipično ne-Njutnovsko pseudoplastično ponašanje. To

znači da molekuli dekstrana postaju sve više uređeni duž toka i manje se opiru Braunovom kretanju, usled čega viskoznost rastvora opada. S druge strane, sa porastom koncentracije dekstrana, viskoznost rastvora se povećava, jer se lanci dekstrana upliću, čime je ograničeno prodiranje vode i smanjena fluidnost molekula. Ovaj rezultat je očekivan, s obzirom na to da reološka svojstva zavise od veličine, oblika i molekularne fleksibilnosti polimera u rastvorima, kao i od interakcije polimer-rastvarač [263].



Slika 5.7 Reološke osobine 5%, 10% i 20% rastvora dekstrana

Indeks reološkog ponašanja toka je pokazatelj fluidnih osobina uzorka, pri čemu vrednost  $n=1$  ukazuje na Njutnovski fluid, dok su za ostale vrednosti  $n$  to ne-Njutnovski fluidi. Stoga, fluidi kod kojih je  $n < 1$  su pseudoplastični fluidi, dok su fluidi kod kojih je vrednost  $n > 1$ , tzv. dilatantni fluidi. Na osnovu rezultata iz tabele 5.3 svi rastvori dekstrana pokazuju ne-Njutnovsku prirodu, i to kao pseudoplastični fluid, pri čemu njihov indeks ponašanja toka raste sa smanjenjem koncentracije rastvora. Ova pojava se objašnjava raskidanjem tercijarne strukture molekula kad se primeni napon smicanja.

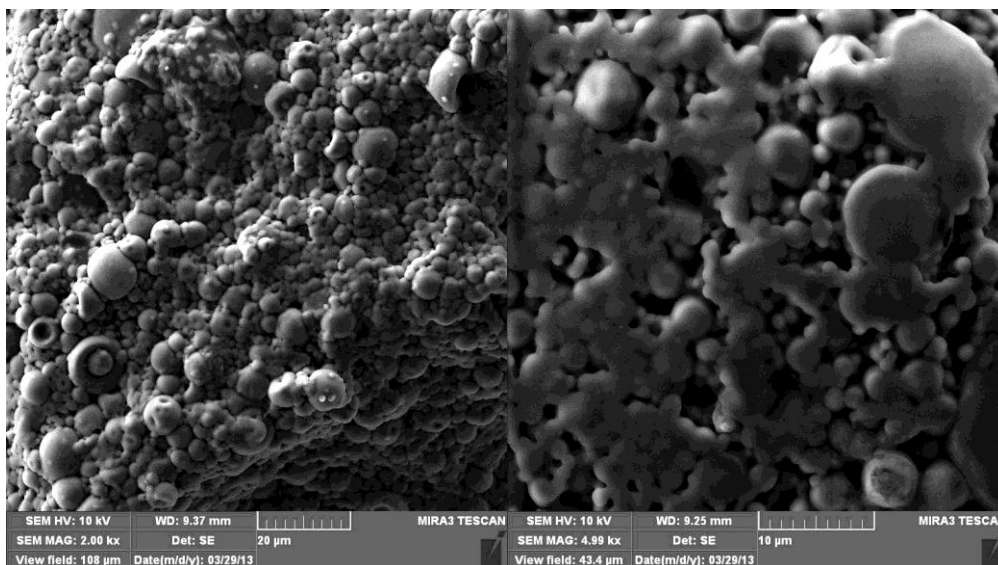
Tabela 5.3 Reološke osobine rastvora dekstrana

Rastvor dekstrana, %	n	K, Pa s
5	0,80	0,19
10	0,58	4,71
20	0,60	40,53

Pseudoplastični hidrokoloide se široko primenjuju za poboljšanje ili modifikaciju teksture hrane. Smanjena viskoznost rastvora obezbeđuje prednost tokom operacija visokog smicanja kao što su pumpanje i punjenje, dok visoka prividna viskoznost daje poželjna svojstva osećaja u ustima [264]. Ovakvi hidrokoloide se u prehrambenoj industriji koriste kao sredstva za geliranje i zgušnjavanje i kao stabilizatori. Dekstran iz *Lc. mesenteroides* T3 je po svojim reološkim svojstvima sličan dekstranima iz drugih *Lc. mesenteroides* sojeva [265,266] i iz *Pediococcus pentosaceus* [267] i pokazuje potencijal za primenu u sintezi filmova.

#### 5.1.3.3 Površinska morfologija

SEM analiza daje podatke o površinskoj morfologiji polimera i ukazuje na njegove karakteristike. SEM mikrografije dekstrana iz *Lc. mesenteroides* T3 prikazane su na slici 5.8. Površinska morfologija polimera zavisi od metode pripreme uzorka, što kasnije utiče i na njegova reološka svojstva [268]. Dekstran iz *Lc. mesenteroides* T3 osušen tehnikom sprej-sušenja ima sfernu strukturu, nalik na mrežu. Zahvaljujući poroznosti može da veže značajnu količinu vode, što obezbeđuje ravnomernu distribuciju vodenih rastvora [269].



Slika 5.8 SEM mikrografija dekstrana iz *Lc. mesenteroides* T3 osušenog primenom tehnike sprej sušenja, uveličanje 2000x (levo) i 5000x (desno)

## 5.2 Primena dekstrana iz *Lc. mesenteroides* T3 za sintezu nanočestica srebra

Svojstvo dekstrana da služi istovremeno kao redukciono sredstvo i stabilizator iskorišćena je za sintezu Ag NČ. Najpre su pronađeni optimalni uslovi sinteze, a zatim su sintetisane Ag NČ primenjene za detekciju cisteina i obradu pamučne tkanine, kako bi se dobio materijal sa antimikrobnim svojstvima.

### 5.2.1 Optimizacija sinteze nanočestica pomoću dekstrana i određivanje njihove stabilnosti

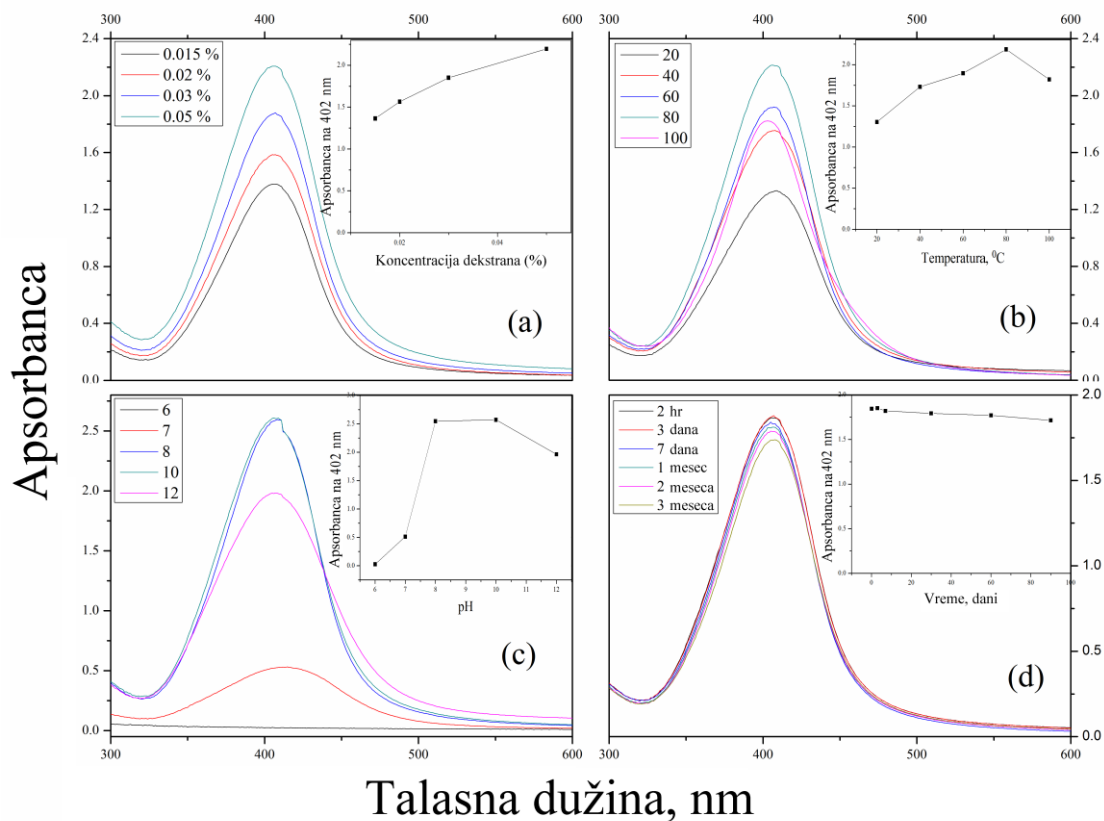
Apsorpcioni spektri sintetisanog koloidnog rastvora srebra u zavisnosti od koncentracije dekstrana pri konstantnim vrednostima ostalih parametara (pH = 9 i temperatura 60 °C) prikazani su na slici 5.9a. Svi spektri su istog oblika i imaju maksimum na 402 nm i traku površinskog plazmona čija širina pika na polovini visine nije veća od 100 nm, ali se ipak primećuje uticaj koncentracije dekstrana. Kada je niska koncentracija dekstrana (0,015%) nema dovoljno hidroksilnih grupa za redukciju Ag<sup>+</sup> jona do Ag<sup>0</sup>. S druge strane, koncentracija dekstrana ne sme da bude veća od 0,1% da bi se pod datim eksperimentalnim uslovima (temperatura od 60 °C) dobio koloidni rastvor,



a ne gel. Kao najpogodnija koncentracija izabrana je 0,03% i korišćena je u svim ostalim eksperimentima. Bankura i saradnici [88] su koristili veću koncentraciju dekstrana (5%) za pripremu nanokompozitnog filma od dekstrana i nanočestica srebra. Ovi autori su dobili široku traku površinskog plazmona sa maksimumom na 423 nm, što je ukazivalo na aglomeraciju Ag NČ.

UV-vis apsorpcioni spektri koloidnih rastvora srebra pripremljenih na različitim temperaturama (20, 40, 60, 80 i 100 °C) prikazani su na slici 5.9b. Svi spektri su snimljeni nakon 3 h od trenutka početka reakcije pri konstantnim vrednostima ostalih parametara (0,03% dekstrana i pH = 9). Sa porastom temperature do 80 °C primećuje se porast intenziteta apsorpcionog maksimuma. Na 100 °C dolazi do pada apsorpcionog pika, praćenog blagim povećanjem polovine širine trake površinskog plazmona. Boja koloidnog rastvora na 100 °C je bila crvenkasta za razliku od ostalih uzoraka koji su bili žuti. Za dalji rad kao optimalna temperatura odabrana je temperatura od 60 °C.

Zavisnost UV-vis apsorpcionog spektra koloidnog rastvora srebra od pH (pri koncentraciji dekstrana 0,03% i T=60 °C) prikazana je na slici 5.9c. Na pH 6 ne dolazi do redukcije jona srebra jer su u kiseloj sredini hidroksilne grupe dekstrana protonovane ( $-\text{OH}_2^+$ ). U baznoj sredini (pH 8 – 10) na oksidovanim jedinicama anhidroglukoze postoje keto- i aldehidne grupe koje imaju redukcionu moć, a s druge strane mogu i da spreče aglomeraciju nanočestica, stabilizacijom formiranih čestica [270]. Dalje povećanje koncentracije  $\text{OH}^-$  jona (pH = 12) dovodi do oksidacije srebra u srebro-oksidi. Kao optimalna pH vrednost pokazala se pH = 9.

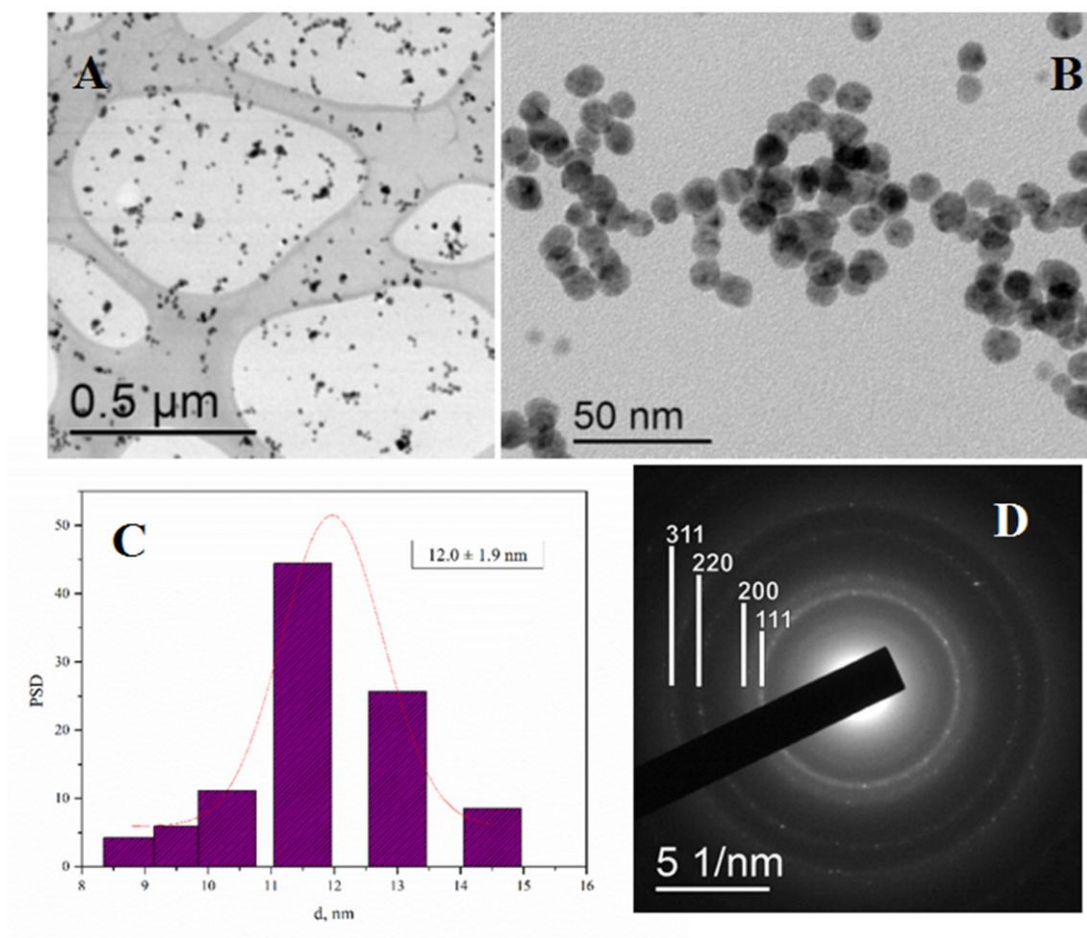


Slika 5.9 UV-vis spektri nanočestica srebra sintetisanih pomoću dekstrana pri različitim eksperimentalnim uslovima: a) koncentracija dekstrana u opsegu od 0,015 – 0,05% (pH = 9,0 i T = 60 °C); b) temperatura u opsegu od 20 – 100 °C (koncentracija dekstrana 0,03% i pH = 9); c) pH u opsegu od 6 – 12 (koncentracija dekstrana 0,03 % i T = 60 °C); d) dugoročna stabilnost koloidnog rastvora Ag NČ pri koncentraciji dekstrana 0,03%, pH = 9 i T = 60 °C)

Stabilnost nanočestica srebra sintetisanih pri optimalnim uslovima (0,03 % dekstrana, pH = 9 i T = 60 °C) tokom vremena od tri meseca određena je takođe UV-vis spektroskopijom (slika 5.9d). Tokom tog vremena koloidni rastvor je čuvan pod standardnim laboratorijskom uslovima. Sa slike se primećuje da je izgled spektra nepromenjen tokom celog perioda, dok je intenzitet apsorpcionog maksimuma nakon tri meseca neznatno smanjen (7,5%) u odnosu na početni. Poznato je da se potpuno raspadanje nezaštićenih nanočestica srebra (bez stabilizatora) dešava u mnogo kraćem vremenskom periodu (nekoliko dana) [271]. Ag NČ sintetisane pomoću pululana kao redukcionog sredstva i stabilizatora takođe su bile stabilne tri meseca, ali je nakon tog

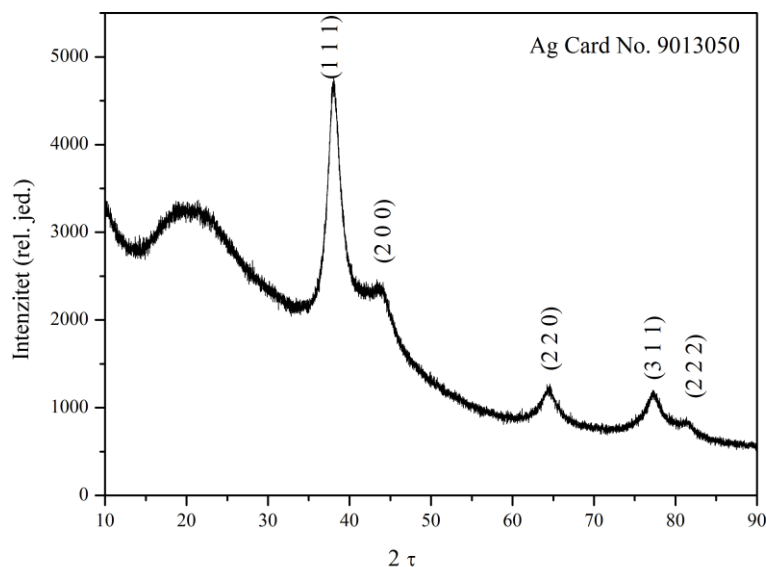
vremena došlo do pomeranja apsorpcionog maksimuma trake površinskog plazmona ka višim talasnim dužinama, kao i do širenja pika [87], što može biti usled veće koncentracije  $\text{AgNO}_3$  koja je korišćena u ovoj studiji. Izgled i položaj trake površinskog plazmona zavisi od veličine i oblika čestica, pa njegova promena može da ukazuje da je došlo do aglomeracije Ag NČ. Produžena stabilnost nanočestica srebra sintetisanih pomoću dekstrana iz *Lc. mesenteroides* T3 je posledica prisustva keto- i aldehidnih grupa na dekstranu u baznoj sredini (pH = 9) koje obezbeđuju redukcionu sredinu i sprečavaju oksidaciju nanočestica srebra. Važno je istaći da je dugoročna stabilnost koloidnog rastvora srebra jedna od bitnih karakteristika, a samim tim i prednost za bilo koju primenu koloida.

Na slici 5.10 prikazane su TEM mikrografije i odgovarajuća raspodela veličina nanočestica srebra sintetisanih pod optimalnim uslovima. Sa slike se vidi da su čestice srebra kristalne, pretežno sfernog oblika. Na slici 5.10b vide se pojedinačne nanočestice srebra, koje su odvojene i relativno uniformne. Prosečna veličina čestica prikazana Gausovom raspodelom je 12 nm (slika 5.10c) određena je iz uzorka od preko 200 čestica, pri čemu standardna devijacija od 1,9 nm ukazuje na visok stepen uniformnosti. Analizom elektronskog difraktograma (slika 5.10d) ustanovljeno je prisustvo difrakcionih prstenova koji odgovaraju (1 1 1), (2 0 0), (2 2 0), (3 1 1) i (2 2 2) ravnima površinski centrirane kubne rešetke srebra.



Slika 5.10 Podaci dobijeni TEM analizom nanočestica srebra sintetisanih pomoću dekstrana: a) i b) TEM mikrografije, c) odgovarajuća raspodela veličine čestica, d) elektronski difraktogram

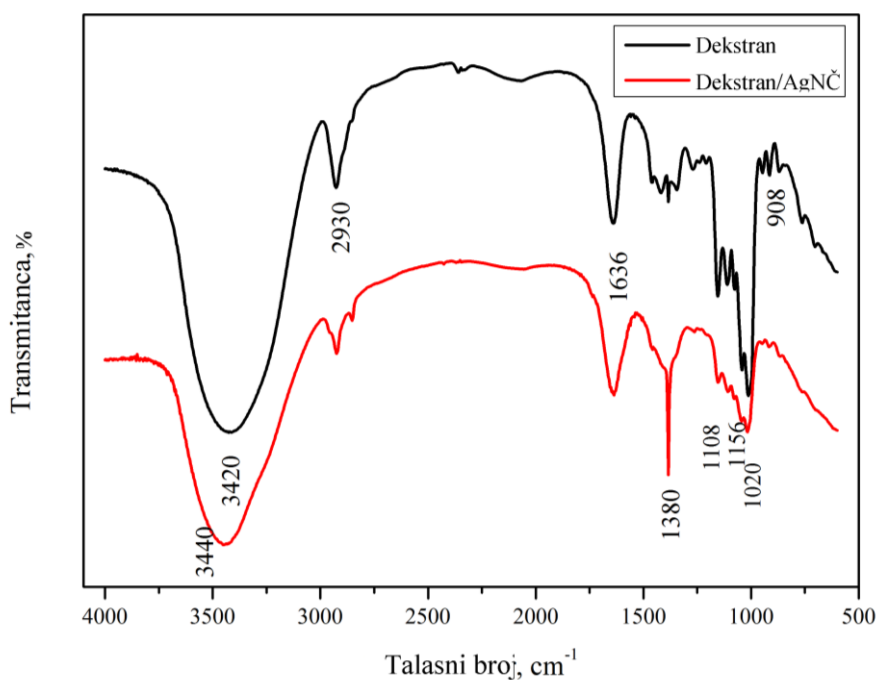
Na slici 5.11 prikazan je difraktogram nanočestica srebra sintetisanih pomoću dekstrana. Poređenjem difraktograma uzorka sa difraktogramom srebra iz elektronske baze podataka (kartica broj 9013050) vidi se da difrakcioni pik na 38,1 stepeni pripada (1 1 1) kristalnoj ravni površinski centrirane kubne rešetke srebra, pik na 43,7 stepeni odgovara (2 0 0) ravni, pik na 64,3 stepena odgovara (2 2 0) ravni, pik na 77,3 stepena odgovara (3 1 1) kristalnoj ravni, dok pik na 80,1 stepeni odgovara (2 2 2) kristalnoj ravni površinski centrirane kubne rešetke srebra. Na osnovu polu-širine difrakcionih pikova i korišćenjem Šererove jednačine, prosečna veličina kristalita procenjena je na oko 3 nm. Ova vrednost je u skladu sa podacima dobijenih TEM-om, gde je par čestica kristalita grupisano tako da čine veću stabilniju česticu (~12 nm).



Slika 5.11 Difraktogram nanočestica srebra sintetisanih pomoću dekstrana

U cilju razumevanja koordinacije između nanočestica srebra sintetisanih pomoću dekstrana i samog polisaharida, snimljeni su i upoređeni njihovi FTIR spektri (slika 5.12). U regionu talasnih dužina između  $850$  i  $1650\text{ cm}^{-1}$  traka na talasnoj dužini  $908\text{ cm}^{-1}$  ukazuje na prisustvo  $\alpha$ -veze. Glavne trake karakteristične za dekstran su traka koja potiče od valencionih vibracija C-O-C veze i glikozidnog mosta na  $1156\text{ cm}^{-1}$ , zatim traka na  $1108\text{ cm}^{-1}$ , koja potiče od valencionih vibracija C-O veze na četvrtom ugljenikovom atomu iz ostatka glukoze i traka na  $1020\text{ cm}^{-1}$ , koja je posledica veće fleksibilnosti molekula dekstrana oko  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 6) glikozidne veze. Traka na  $3420\text{ cm}^{-1}$  se pripisuje valencionim vibracijama OH grupe polisaharida, dok su trake od valencionih vibracija C-H i karboksilne grupe na  $2930$ , odnosno na  $1636\text{ cm}^{-1}$  [272,273]. Smanjenje intenziteta ili potpuno odsustvo traka valencionih vibracija u opsegu od  $900$  do  $1150\text{ cm}^{-1}$  nakon obrazovanja nanočestica srebra indukovano je raskidanjem polimernih lanaca i  $\alpha$ -glikozidnih veza. S druge strane obrazovanje  $\text{COO}^-$  grupa na mestima gde je došlo do prekida lanca dekstrana dovodi do povećanja trake na  $1380\text{ cm}^{-1}$  [274]. Takođe, traka koja odgovara valencionim vibracijama OH grupe u spektru nanočestica srebra sintetisanih pomoću dekstrana ima manji intenzitet nego u spektru čistog dekstrana i pomerena je na  $3440\text{ cm}^{-1}$ . Na osnovu svih ovih zapažanja može se zaključiti da su nanočestice srebra vezane za molekule dekstrana koordinativnom vezom koja se

ostvaruje između atoma srebra sa površine nanočestica i OH grupa dekstrana, mada je moguća i veza preko COO<sup>-</sup> grupa [275].



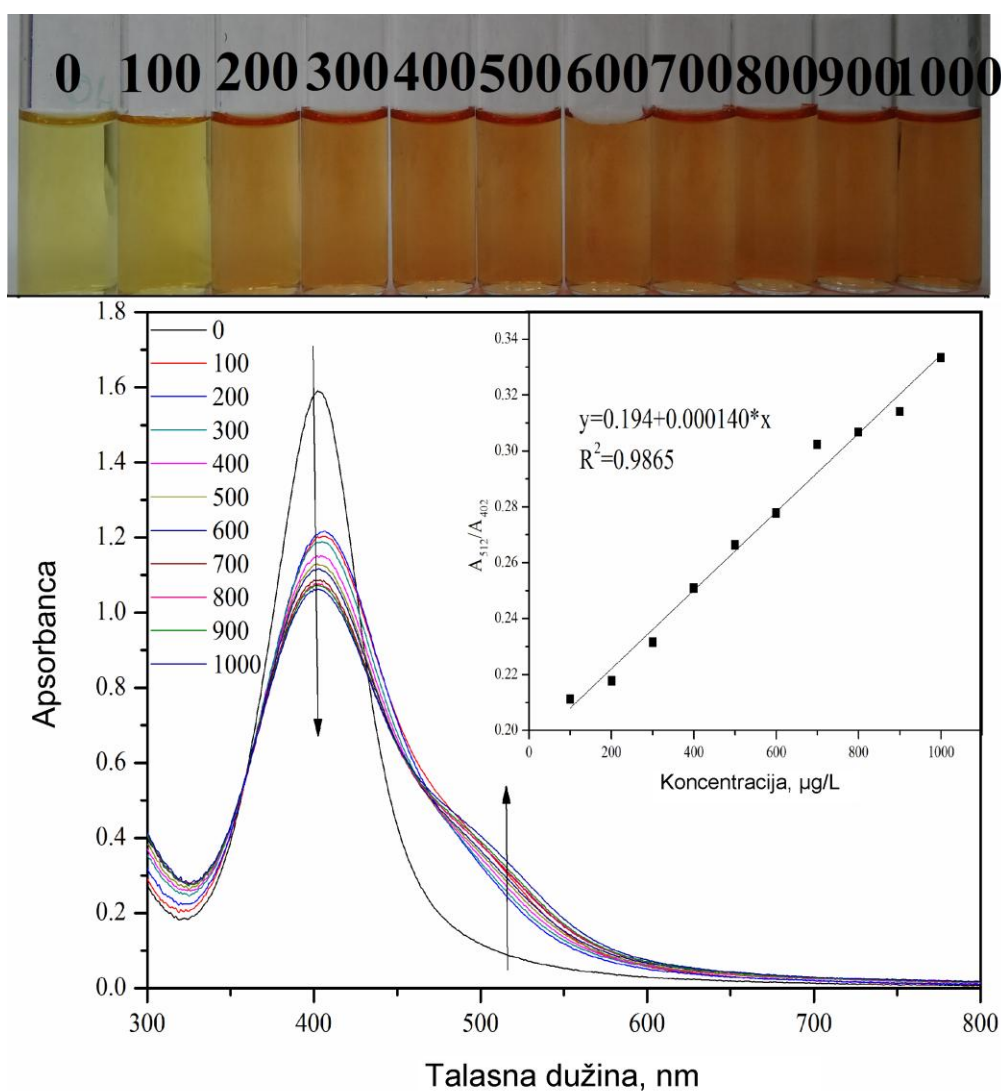
Slika 5.12 FTIR spektri dekstrana i nanočestica srebra sintetisanih pomoću dekstrana

### 5.2.1 Osetljivost i selektivnost nanočestica srebra sintetisanih pomoću dekstrana za detekciju cisteina

Osetljivost koloidnog rastvora nanočestica srebra sintetisanih pomoću dekstrana ispitana je na osnovu pomeranja apsorpcionih spektara po dodatku rastvora cisteina u širokom opsegu koncentracija. Promene su bile uočljive i vizuelno. Rezultati su prikazani na slici 5.13. Na slici se primećuje da u prisustvu cisteina opada intenzitet trake površinskog plazmona sa pikom na 402 nm, dok se pojavljuje nova apsorpciona traka u vidljivom delu spektra na oko 512 nm. Sličnu pojavu zapazili su i drugi autori [128,130] i ona je posledica agregacije nanočestica srebra do koje dolazi po dodatku cisteina. Sa porastom koncentracije Cys linearno je rastao i odnos između apsorbanaci pika na 512 nm i maksimuma na 402 nm (umetak na slici 5.13). Linearna zavisnost odnosa apsorbanaci  $A_{512}/A_{402}$  (y) od koncentracije Cys (x, u  $\mu\text{M}$ ) može se izraziti

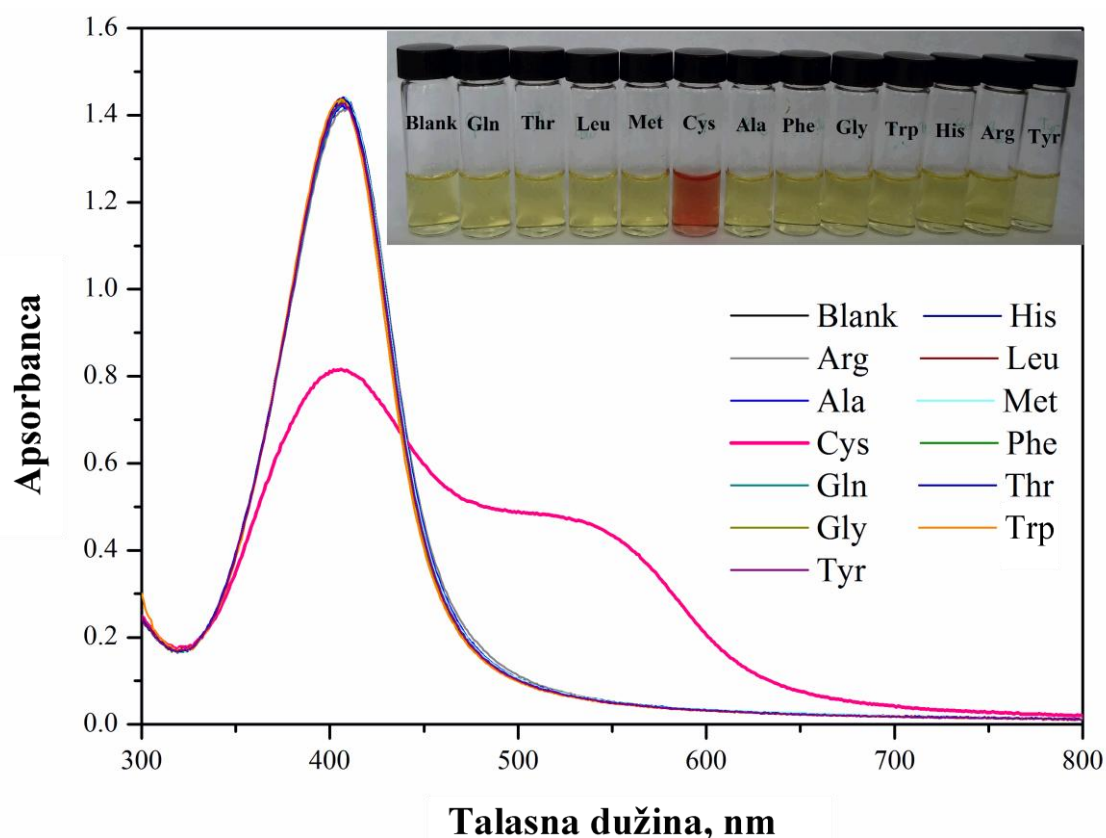
jednačinom linearne regresije:  $y = 0,194 + 0,000140x$ , sa  $R^2 = 0,9865$  i granicom detekcije Cys otprilike  $0,12 \mu\text{M}$ .

Osim na osnovu apsorpcionog spektra, prisustvo Cys se može detektovati i vizuelno i to čak pri veoma niskim koncentracijama od nekoliko ppm (slika 5.13). Po dodatku Cys, koloidni rastvor koji je bio svetlo žute boje, u roku od nekoliko minuta postaje narandžasto-crveno-braon. Promene boje su izraženije sa porastom koncentracije cisteina.



Slika 5.13 UV–vis spektri i fotografije koloidnih rastvora nanočestica srebra sintetisanih pomoću dekstrana u prisustvu različitih koncentracija cisteina (0–1000  $\mu\text{M}$ ); umetak: linearna zavisnost  $A_{512}/A_{402}$  od koncentracije Cys.

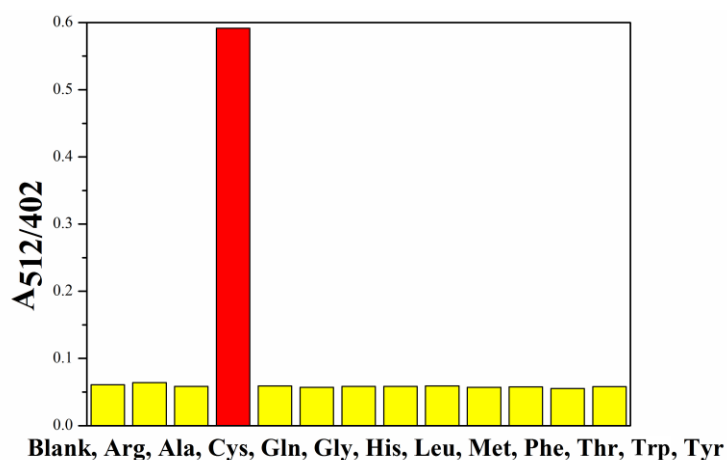
Selektivnost koloidnog rastvora nanočestica srebra sintetisanih pomoću dekstrana za detekciju Cys određena je praćenjem optičkih promena indukovanih dodatkom različitih amino-kiselina (Arg, Ala, Gln, Gly, His, Leu, Met, Phe, Thr, Trp i Tyr) u koloidni rastvor. Apsorpcioni spektri koloidnog rastvora nanočestica srebra sintetisanih pomoću dekstrana u prisustvu jedanaest različitih amino-kiselina prikazani su na slici 5.14. Jasno se vidi da nema nikakvih promena u izgledu apsorpcionog spektra, kao ni u boji koloidnog rastvora, u prisustvu bilo koje od ispitanih amino-kiselina, osim Cys. Dodatkom Cys koloidni rastvor menja boju u crvenu, dok se u vidljivom delu apsorpcionog spektra javlja nova traka, a intenzitet trake na 400 nm opada. S obzirom na to da amino-kiselina metionin, koja u strukturi ima sumporni most, ne indukuje optičke promene, verovatno glavni razlog promene boje nije sam atom sumpora, nego baš tip funkcionalne grupe.



Slika 5.14 UV–vis apsorpcioni spektri koloidnog rastvora nanočestica srebra sintetisanih pomoću dekstrana u prisustvu različitih amino-kiselina (umetak: fotografije odgovarajućih koloidnih rastvora).



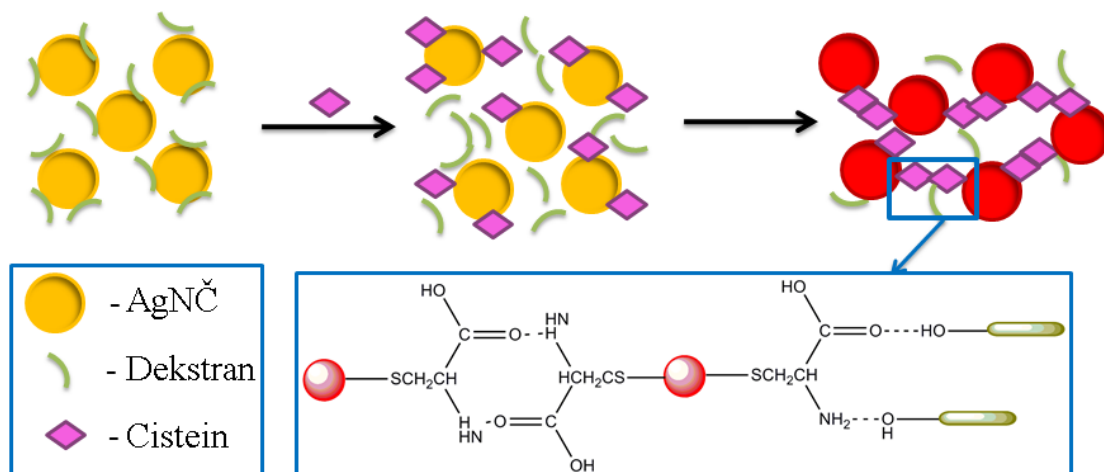
Selektivnost koloidnog rastvora nanočestica srebra sintetisanih pomoću dekstrana za detekciju Cys predstavljena je i u obliku histograma (slika 5.15 Slika 5.) na kome je prikazan odnos apsorbanci na 512 nm i 402 nm za sve ispitane amino-kiseline. Taj odnos je značajno veći za Cys nego za sve ostale amino-kiseline, što je dokaz izuzetne selektivnosti koloida prema ovoj amino-kiselini. U prisustvu ostalih ispitanih amino-kiselina (Arg, Ala, Gln, Gly, His, Leu, Met, Phe, Thr, Trp i Tyr) optičke osobine koloida su nepromenjene, pa su zato i varijacije u vrednostima odnosa  $A_{512}/A_{402}$  skoro zanemarljive.



Slika 5.15 Odnos  $A_{512}/A_{402}$  koloidnog rastvora nanočestica srebra sintetisanih pomoću dekstrana u prisustvu različitih aminokiselina. Koncentracija aminokiselina je bila konstantna (1 mM).

Predložena interakcija između Cys i Ag NČ koja dovodi do promene boje koloidnog rastvora od žute do crvenkasto-smeđe predstavljena je šematski na slici 5.16. Sintetisane Ag NČ su okružene molekulima dekstrana. Dekstran ima veliki broj keto, aldehidnih i hidroksidnih grupa koje obrazuju koordinativne veze sa površinom Ag NČ, čime se sprečava njihova aglomeracija. Istovremeno, dekstran obezbeđuje redukcionu sredinu i sprečava oksidaciju Ag NČ. Međutim, dobro je poznato da tiolna grupa ima jaču interakciju sa metalnim česticama u poređenju sa keto- i aldehidnim grupama [276,277]. Zbog toga, po dodatku Cys u koloidni rastvor, dolazi do zamene molekula dekstrana molekulima Cys na površini Ag NČ (slika 5.16). Aglomeracija Ag NČ, na koju ukazuje promena boje koloidnog rastvora, posledica je uspostavljanja vodoničnih

veza između molekula Cys vezanih za različite Ag NČ. Takođe, postoji i mogućnost stvaranja vodoničnih veza između hidroksil / keto- grupe dekstrana i amino ili karboksilnih grupa Cys.



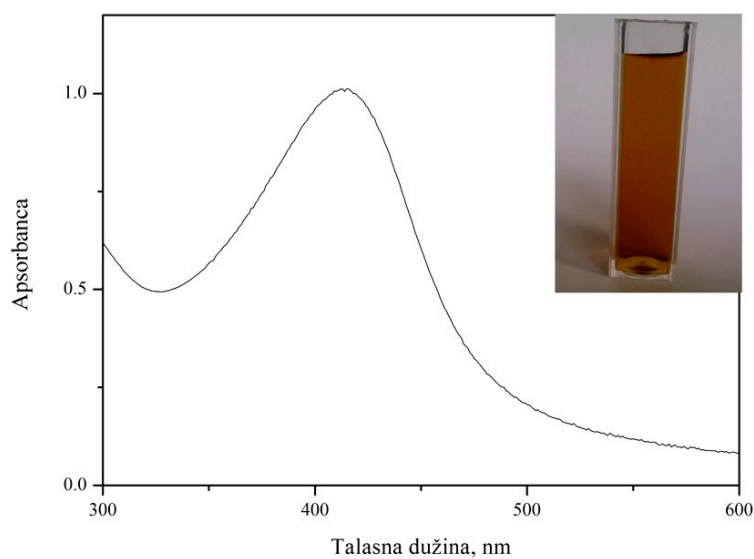
Slika 5.16 Šematski prikaz pretpostavljenog mehanizma interakcije Cys sa nanočesticama srebra sintetisanih pomoću dekstrana

### 5.2.2 Primena nanočestica srebra sintetisanih pomoću dekstrana za dobijanje tkanine sa antimikrobnim svojstvima

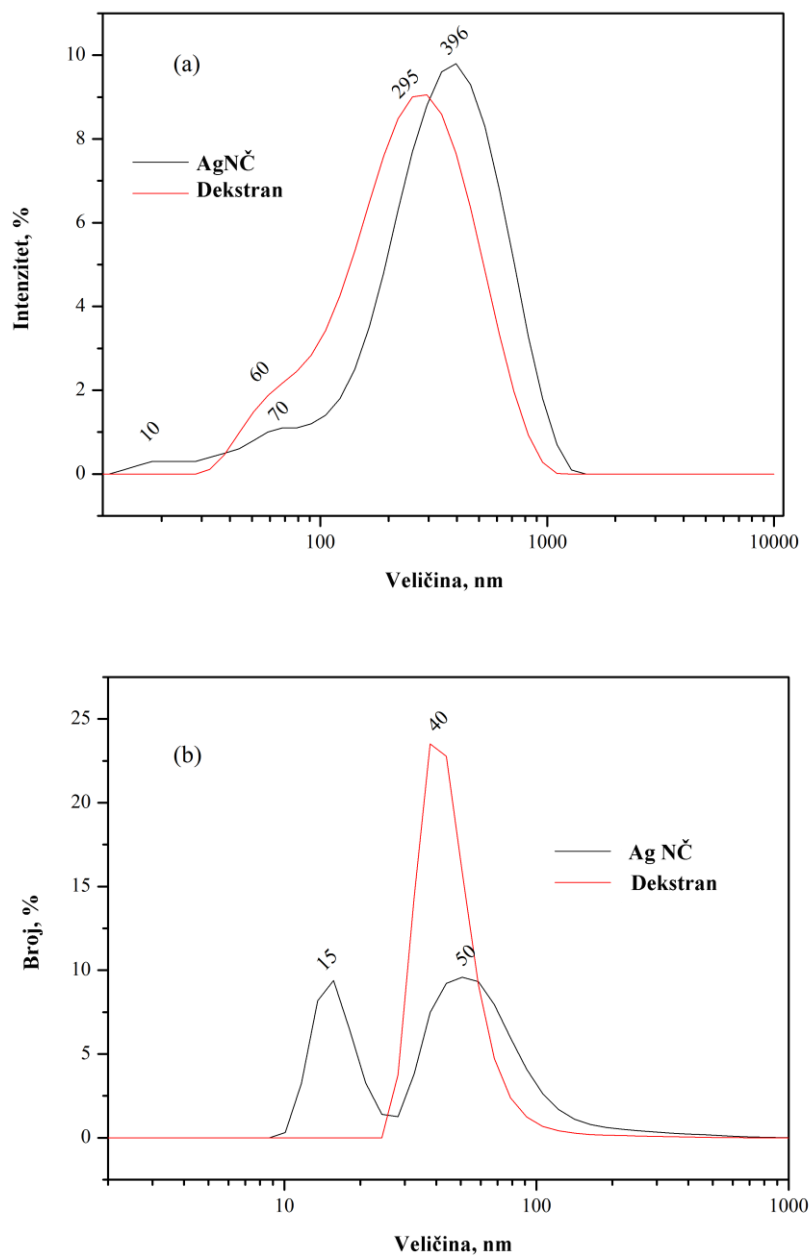
Sinteza Ag NČ pomoću dekstrana, većih koncentracija, u cilju obrade tekstilnih materijala je rađena u mikrotalasnoj pećnici. Tokom procesa grejanja i mikrotalasnog zračenja došlo je do promene boje reakcione smeše u žuto-braon (umetak na slici 5.17), što je vizuelni pokazatelj da je došlo do redukcije jona srebra iz  $Ag^+$  u  $Ag^0$  [91]. UV-Vis apsorpcioni spektar vodenog koloidnog rastvora Ag NČ prikazan je na slici 5.17. Spektar ukazuje na postojanje intenzivne apsorpcione trake površinskog plazmona, sa maksimumom na 415 nm, što je takođe pokazatelj prisustva Ag NČ.

Raspodela veličina čestica dekstrana i Ag NČ određene su metodom dinamičkog rasejanja svetlosti i prikazane su na slici 5.18. Sa slike a, gde je raspodela veličina čestica prikazana preko intenziteta rasejanje svetlosti, vidi se da je veličina čestica dekstrana u rasponu od 30 – 1100 nm sa Z-prosečnom veličinom od 185,5 nm i

indeksom polidisperzije (PDI) 0,369, dok su Ag NČ veličine od 10 – 1060 nm sa Z-prosečnom veličinom od 232,9 nm i indeksom polidisperzije 0,439. Vrednosti PDI od 0,08 – 0,7 se smatraju srednjim vrednostima polidisperzije [278]. Ukoliko se raspodela veličina čestica prikaže u odnosu na ukupan broj čestica u uzorku (što je u nanonauci adekvatniji prikaz), dobija se jasnija slika o frakcijama čestica različitih veličina (slika 5.18b). Sa slike se jasno vidi da najveći broj čestica dekstrana ima veličinu 40 nm sa uskom raspodelom veličine čestica, dok Ag NČ pokazuju bimodalnu raspodelu, odnosno dve glavne frakcije Ag NČ su veličine 15 i 50 nm. Velike čestice-aglomerati koje znatno doprinose višem intenzitetu su prisutne samo u tragovima. Udeo frakcije Ag NČ većih od 190 nm u ukupnoj populaciji čestica je manji od 2,7%. Obrazovanje tako velikih čestica bi moglo biti posledica prisustva aglomerisanih molekula dekstrana, na kojima su nakačene nanočestice metalnog srebra.



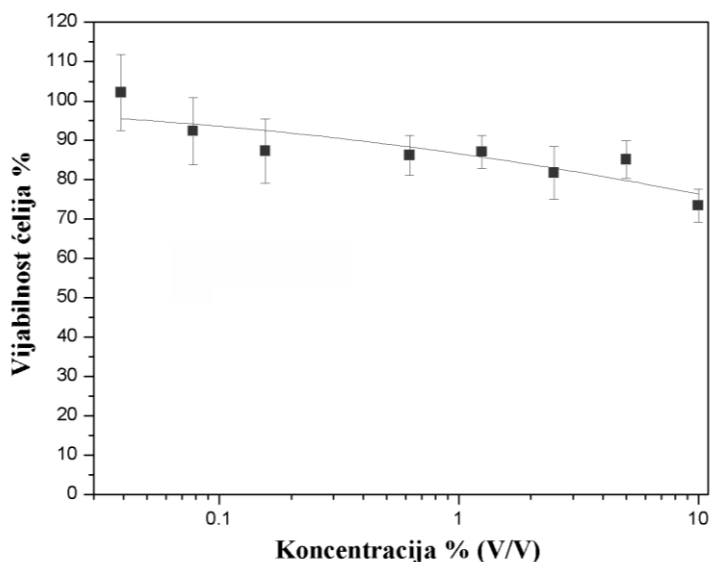
Slika 5.17 Apsorpcioni spektar koloidnog rastvora Ag NČ u prisustvu dekstrana; umetak: fotografija koloidnog rastvora



Slika 5.18. Raspodela veličina nanočestica deskstrana i Ag NČ prikazana preko intenziteta (a) i ukupnog broja nanočestica (b) određena DLS metodom.

Ćitotoksičnost Ag NČ sintetisanih pomoću dekstrana ispitana je prema ćelijama preosteoblastima. Zavisnost % živih ćelija od koncentracije koloidnog rastvora srebra prikazana je na slici 5.19. Generalno je prihvaćeno da je materijal netoksičan ako je broj preživelih ćelija iznad 70%. Sa slike se vidi da broj živih ćelija opada sa povećanjem

koncentracije Ag NČ, ali da je čak i pri najvećoj testiranoj koncentraciji od 0,02 mmol/L broj živih ćelija veći od 70%.

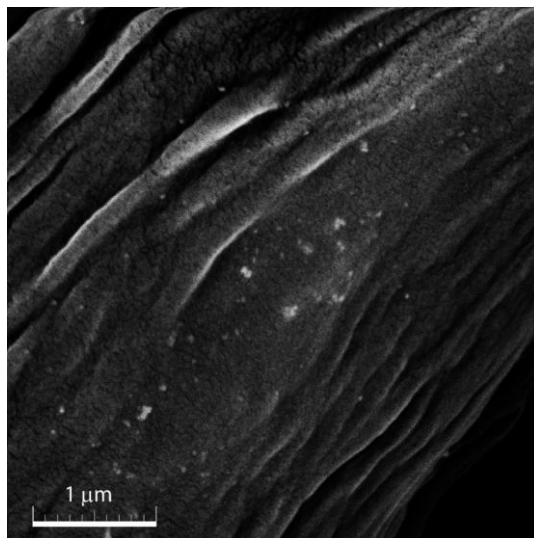


Slika 5.19 Citotoksičnost nanočestica srebra sintetisanih pomoću dekstrana

Citotoksično dejstvo Ag NČ zavisi od brojnih faktora, među kojima značajnu ulogu imaju način sinteze i vrsta korišćenog stabilizatora [279]. Travan i saradnici [280] su pokazali da Ag NČ stabilizovane polisaharidnom oblogom na bazi hitozana ispoljavaju antimikrobno delovanje bez toksičnosti za eukariotske ćelije.

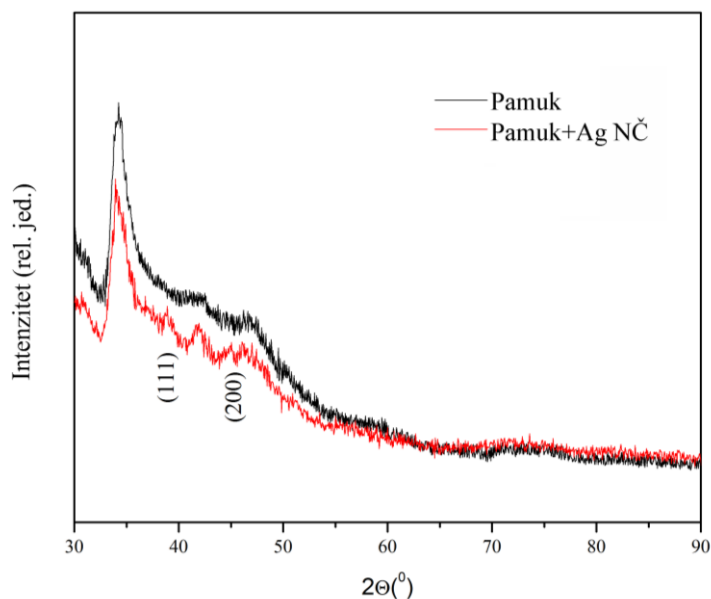
### 5.2.3 Modifikacija pamučne tkanine nanočesticama srebra

Morfologija površine pamučne tkanine obrađene 1,0 mM koloidnim rastvorom Ag NČ utvrđena je metodom skenirajuće elektronske mikroskopije (SEM). Sa slike 5.20 vidi se da su na površini pamučnog vlakna prisutne Ag NČ veličine ispod 100 nm.



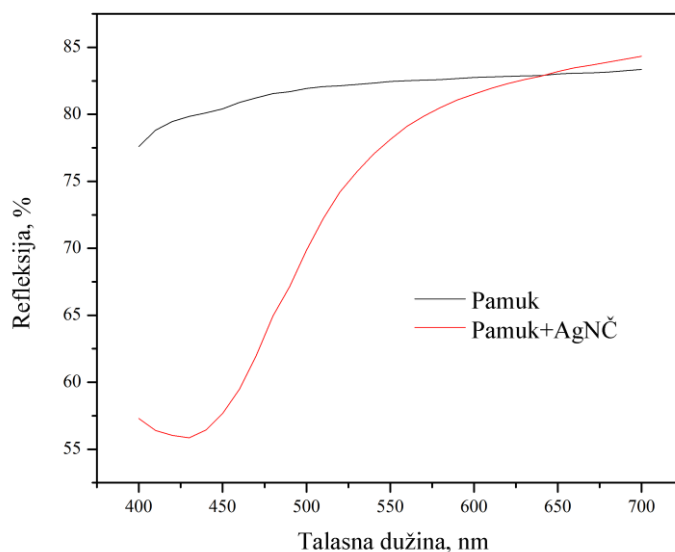
Slika 5.20 SEM mikrografija pamučnog vlakna impregniranog nanočesticama srebra

Kristalna struktura Ag NČ deponovanih na pamučnom vlaknu analizirana je metodom difrakcije X-zraka (XRD). XRD spektri neobrađene pamučne tkanine i uzorka tkanine modificovane Ag NČ prikazani su na slici 5.21. U oba XRD spektra uočavaju se difrakcioni pikovi na  $2\Theta=34,4^\circ$  i  $42,3^\circ$ , kao i širok pik na  $64^\circ$  karakteristični za pamučna vlakna [181]. Difrakcioni pikovi koji se javljaju na  $38,9^\circ$  i  $45,1^\circ$  u difraktogramu uzorka pamučne tkanine modificovane Ag NČ predstavljaju (1 1 1) i (2 0 0) ravni površinski centrirane kubne rešetke srebra [281]. Dobijeni rezultati potvrđuju da je pamučna tkanina uspešno modificovana Ag NČ-icama sintetisanim pomoću dekstrana.



Slika 5.21 XRD Difraktogram neobrađene i obrađene pamučne tkanine sa Ag NČ koloidom koncentracije 1,0 mM

Prisustvo Ag NČ na površini pamučne tkanine potvrđeno je i merenjem refleksionog UV/Vis spektra. Refleksioni spektar je prikazan na slici 5.22. Boja tkanine nakon obrade Ag NČ menja se iz bele u bež-žutu, što je u saglasnosti sa literaturnim podacima [282–284]. Na slici 5.22 se vidi veliki pad intenziteta refleksije na 430 nm koji odgovara traci površinskog plazmona nanočestica srebra, samo je pomeren ka nižim energijama u odnosu na istu traku koloidnog rastvora Ag NČ (415 nm). Ova pojava se pripisuje većoj dielektričnoj konstanti okolne sredine koja je indukovana međusobnim kuplovanjem Ag NČ aglomerisanih na površini pamučnog vlakna [285].



Slika 5.22 Refleksioni spektri pamuka i pamuka obrađenog koloidnim rastvorom srebra koncentracije 1,0 mM

Uticaj koncentracije primenjenog koloidnog rastvora Ag NČ na promenu boje pamučne tkanine određen je pomoću CIE L\*a\*b\* koordinata (tabela 5.4). Promena boje je uočljiva vizuelno kada je razlika u obojenju  $\Delta E$  veća od 1. Promena u obojenju svih uzoraka je bila vizuelno uočljiva i rasla je sa porastom koncentracije koloidnog rastvora kojim je tkanina modifikovana od 7,30 za 0,2 mM, preko 9,92 za 0,5 mM do 13,74 za koloidni rastvor koncentracije 1,0 mM. Ovi rezultati su u skladu sa rezultatima sadržaja srebra u uzorcima. Metodom atomske apsorpcione spektrometrije (AAS) je izmereno 12,51  $\mu\text{g}$  Ag u jednom gramu pamučne tkanine modifikovane 0,2 mM koloidnim rastvorom Ag NČ, 23,54  $\mu\text{g}$  Ag za uzorak modifikovan 0,5 mM koloidnim rastvorom Ag NČ i 44,74  $\mu\text{g}$  Ag u slučaju korišćenja 1,0 mM koloidnog rastvora Ag NČ. Drugim rečima, što je veća koncentracija koloidnog rastvora kojim je modifikovana tkanina, to se više Ag NČ deponovalo na njenoj površini. Osim toga, povećanje b\* vrednosti ukazuje na porast intenziteta žute boje pamučne tkanine modifikovane Ag NČ [286]. Vrednosti parametra b\* su značajno rasle sa porastom koncentracije koloidnog rastvora, što se može pripisati većem sadržaju srebra na pamučnoj tkanini.



Tabela 5.4 Promena obojenja pamučne tkanine obrađene različitim koncentracijama koloidnog rastvora srebra

Uzorak	L*	a*	b*	$\Delta E^*$	Opis
Pamuk	92,72	-0,18	1,36		
Pamuk + 0,2 mM Ag	86,69	0,22	5,45	7,30	Tamniji, manje zelen, žut
Pamuk + 0,5 mM Ag	86,66	0,25	9,21	9,92	Tamniji, manje zelen, žut
Pamuk + 1,0 mM Ag	90,08	-0,23	14,85	13,74	Tamniji, žut

#### 5.2.3.1 Antimikrobna aktivnost pamučne tkanine modifikovane nanočesticama srebra

Antimikrobna aktivnost pamučne tkanine modifikovane različitim koncentracijama koloidnog rastvora nanočestica srebra testirana je na bakterije *E. coli* i *S. aureus* i na gljivicu *C. albicans*. Rezultati su predstavljeni u tabeli 5.5. Uzorci tkanine obrađeni koloidnim rastvorima srebra koncentracija 0,2 mM i 0,5 mM pokazali su dobra antimikrobna svojstva, ali je kompletna mikrobna redukcija postignuta samo prema *S. aureus*.

Maksimalna redukcija broja živih ćelija za sva tri ispitivana soja postignuta je modifikacijom tkanine najvećom korišćenom koncentracijom koloidnog rastvora od 1,0 mM. Koloidni rastvor Ag NČ u koncentraciji većoj od 1,0 mM nije korišćen za modifikaciju pamuka, jer bi se time samo povećala količina nataloženih nanočestica srebra, koje bi se lako sprale sa tkanine i otpustile u vodu kao nepoželjni otpad. Kontrolna pamučna tkanina tretirana samo dekstranom nije pokazala nikakvu antimikrobnu aktivnost iz čega se može zaključiti da antimikrobna aktivnost tkanine potiče samo od deponovanih nanočestica srebra.

Antimikrobna aktivnost obrađene tkanine srazmerna je koncentraciji koloidnog rastvora kojim je obrađena. Ilić i saradnici [282] takođe su primetili da tkanina obrađena koloidnim rastvorom koncentracije 10 ppm u potpunosti redukuje broj živih ćelija *S. aureus*, dok je za kompletnu redukciju broja živih ćelija *E. coli* i *C. albicans* bio potreban koloid koncentracije 50 ppm. Ibrahim i Hasan [287] ispitivali su uticaj i većih koncentracija (1 – 5 mM) koloidnog rastvora Ag na antimikrobna svojstva obrađenog pamuka i utvrdili su da je 1 mM bilo dovoljno za postizanje potpune redukcije rasta *E. coli* i *S. aureus*. Međutim, ovi istraživači su koristili hemijski sintetisane Ag NČ, koje

nisu imale biološki molekul kao stabilizator. Ukoliko su čestice zaštićene stabilizatorom koji onemogućava otpuštanje  $\text{Ag}^+$  jona sa tkanine, potrebna je veća koncentracija upotrebljenog koloidnog rastvora srebra, kako bi se dobili željeni rezultati.

Tabela 5.5 Antimikrobna aktivnost pamučne tkanine modifikovane nanočesticama srebra

Uzorak	Mikroorganizam	Broj mikrobnih kolonija (CFU/mL)	Redukcija (%)
Pamuk + dekstran	<i>E. coli</i>	$1,6 \times 10^5$	
Pamuk + 0,2 mM Ag		$1,9 \times 10^2$	98,8
Pamuk + 0,5 mM Ag		$9,3 \times 10^2$	99,4
Pamuk + 1,0 mM Ag		<10	99,9
Pamuk + dekstran	<i>S. aureus</i>	$2,5 \times 10^4$	
Pamuk + 0,2 mM Ag		45	99,9
Pamuk + 0,5 mM Ag		10	99,9
Pamuk + 1,0 mM Ag		<10	99,9
Pamuk + dekstran	<i>C. albicans</i>	$3,2 \times 10^4$	
Pamuk + 0,2 mM Ag		$8,7 \times 10^3$	63,8
Pamuk + 0,5 mM Ag		$4,6 \times 10^3$	81,0
Pamuk + 1,0 mM Ag		<10	99,9

Razlike u antimikrobnoj aktivnosti tkanine sa manjim sadržajem srebra potiču od razlika u građi ćelija ispitivanih mikroorganizama, kao i njihovih specifičnih mehanizmima odbrane. Poznato je da se toksično dejstvo srebra smanjuje sa usložnjavanjem organizama [169], pa je očekivano da *C. albicans* s obzirom na eukariotsku građu ćelije bude manje osetljiva od prokariotskih organizama *E. coli* i *S. aureus*. Joši i saradnici [288] su pokazali da *E. coli* sintetizuje ekstracelularnu supstancu, kolansku kiselinu, koja štiti bakteriju od toksičnog dejstva  $\text{Ag}^+$ , čime bi se moglo objasniti slabije dejstvo tkanine sa manjim sadržajem srebra na *E. coli* u odnosu na *S. aureus*.

Obradom pamuka koloidnim rastvorom Ag koncentracije 1,0 mM, na tkanini se zadržala veća količina srebra (44,74  $\mu\text{g}$ ), dovoljna da potpuno suzbije rast sva tri

testirana mikroorganizma. U literaturi su opisani brojni mehanizmi putem kojih Ag NČ ispoljavaju svoje antimikrobno dejstvo. Oni se generalno mogu svesti na tri glavna koji obuhvataju: narušavanje strukture i funkcije ćelijske membrane usled direktnog kontakta sa Ag NČ, zatim oštećenje ćelijskog zida usled interakcije sa otpuštenim Ag<sup>+</sup> jonima i promenu metaboličke aktivnosti ćelija usled stvaranja reaktivnih vrsta kiseonika izazvanih Ag NČ-ma. Ova sposobnost da poremeti veliki broj različitih puteva može biti jedan od razloga koji objašnjava antimikrobno delovanje Ag NČ na veoma širok spektar mikroorganizama, u ovom slučaju na po jednu Gram pozitivnu i Gram-negativnu bakteriju i na gljivicu. S obzirom na to da su tokom perioda izloženosti mikroorganizama srebru istovremeno prisutne i Ag NČ i joni srebra, teško je razgraničiti njihov pojedinačni doprinos. Kako su, u ovom konkretnom slučaju, Ag NČ impregnirane na pamučna vlakna unutar tkanine, njihova sposobnost interakcije sa mikrobnim ćelijama je značajno smanjena, pa je verovatnije da su oslobođeni Ag<sup>+</sup> joni uglavnom odgovorni za toksično delovanje.

Imajući u vidu rezultate AAS i činjenicu da je zapremina sistema tokom ispitivanja antimikrobne aktivnosti bila 50 mL, koncentracija Ag kojoj bi mikrobne ćelije bile izložene kada bi se cela količina Ag sa tkanine otpustila, što verovatno nije slučaj, bile bi 0,002 mM za tkaninu obrađenu koloidnim rastvorom koncentracije 0,2 mM; u slučaju primene 0,5 mM koloidnog rastvora ta koncentracija bi bila 0,004 mM i 0,008 mM u slučaju obrade tkanine najkoncentrovanijim koloidnim rastvorom. Kada se ove vrednosti uporede sa rezultatima dobijenim pri ispitivanju citotoksičnosti na ćelije preosteoblasta, prema kojima sintetisane Ag NČ nisu toksične do koncentracije 0,02 mM, što je 2,5 puta veća koncentracija od one koja se dobija obradom tkanine koloidnim rastvorom najveće koncentracije, može se zaključiti da je tkanina obrađena 1,0 mM koloidnim rastvorom Ag NČ sintetisanih pomoću dekstrana bezbedna za upotrebu.

### 5.3 Primena dekstrana iz *Lc. mesenteroides* T3 za sintezu jestivih filmova i premaza

Glavna uloga jestivih filmova je kreiranje modifikovane atmosfere oko prehrambenih proizvoda čime se obezbeđuje održanje njihove svežine tokom skladištenja. S druge strane, filmovi treba da obezbede mehaničku stabilnost upakovanih proizvoda tokom transporta i rukovanja, kako bi upakovana hrana zadržala svoje karakteristike. Zato su najvažnija svojstva jestivih filmova: mehanička i barijerna. Ova svojstva zavise od sastava jestivih filmova, pa optimizacija formulacije filma ima ključnu ulogu za njegovu potencijalnu primenu. Važno je istaći da promene u formulaciji jestivog filma mogu poboljšati jednu grupu svojstava, ali istovremeno imati negativan uticaj na druga. Zato je za optimizaciju sastava jestivog filma na bazi dekstrana i sorbitola u smislu pronalaženja formulacije koja istovremeno ima zadovoljavajuće mehaničke i barijerne karakteristike, primenjena metoda odzivnih površina (RSM, od engl. *Response Surface Methodology*). RSM pruža mogućnost simultanog variranja više različitih faktora, pri čemu je dovoljno uraditi relativno mali broj eksperimenata [233]. Osim toga, primenom metode željene funkcije moguće je istovremeno optimizovati više različitih odgovora [289].

#### 5.3.1 Optimizacija sastava jestivog filma na bazi dekstrana

Uticaj dve nezavisne promenljive, koncentracije dekstrana (parametar A) i koncentracije sorbitola (parametar B) je ispitan na 5 različitih odgovora ( $Y_1 - Y_5$ ): zateznu čvrstoću ( $\sigma$ ), izduženje pri kidanju ( $\epsilon$ ), Jangov modul elastičnosti (E), propustljivost vodene pare (WVP) i kontaktni ugao (WCA, od engl. *Water Contact Angle*) primenom centralnog kompozitnog dizajna (CCD), korišćenjem programa Design Expert 8.0. Granice nezavisnih promenljivih su postavljene na osnovu rezultata preliminarnih eksperimenata, koji su prethodili optimizaciji. Ukupan broj eksperimentalnih ponavljanja kod CCD-a iznosi [236]:

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

gde je  $N$  ukupan broj eksperimenata,  $k$  je broj promenljivih, a  $n_0$  je broj ponavljanja u centralnoj tački (obično 3 ili 5). Izabrano je 5 ponavljanja u centralnoj

tački, pa je program zadao 13 eksperimentalnih uslova, koji su, zajedno sa izmerenim odgovorima, prikazani u tabeli 5.6.

Tabela 5.6 Dizajn eksperimenta i odgovarajući odgovori

Red. br.	Nezavisne promenljive		Odgovori				
	A: [dekstran]	B: [sorbitol]	Y <sub>1</sub> : σ	Y <sub>2</sub> : ε	Y <sub>3</sub> : E	Y <sub>4</sub> : WVP	Y <sub>5</sub> : WCA
	%	%	MPa	%	MPa	10 <sup>12</sup> g/smPa	°
1	3,00	10,0	7,20	1,04	1753,25	5,69	81
2	3,00	25,0	2,14	102,00	52,71	7,44	80
3	1,50	25,0	0,68	89,73	54,82	12,22	74
4	3,00	25,0	2,19	101,89	52,11	7,75	81
5	3,75	32,5	3,15	31,73	312,21	12,05	80
6	4,50	25,0	3,62	29,00	147,90	7,00	88
7	3,75	17,5	7,48	0,97	1755,16	6,79	82
8	3,00	25,0	2,22	103,22	53,48	7,88	79
9	2,25	17,5	1,88	34,40	252,84	8,54	75
10	3,00	40,0	0,72	106,14	36,54	16,74	76
11	2,25	32,5	0,71	134,50	9,05	12,39	72
12	3,00	25,0	2,10	103,00	51,35	7,57	80
13	3,00	25,0	2,28	102,73	52,93	7,69	80

### 5.3.1.1 Adekvatnost modela i analiza odzivnih površina za mehaničke osobine

Za ocenu značajnosti modela drugog reda za mehaničke osobine dekstranskih filmova sa sorbitolom kao plastifikatorom korišćena je analiza varijanse (ANOVA), a rezultati su prikazani u tabeli 5.7. Slaganje modela je provereno računanjem vrednosti koeficijenta determinacije  $R^2$ . Vrednosti  $R^2$  su bliske 1 za sva tri odgovora (0,90 za zateznu čvrstoću, 0,86 za izduženje pri kidanju i 0,84 za modul elastičnosti), što ukazuje na dobro slaganje predviđenih i eksperimentalno dobijenih vrednosti.

Značajnost svakog koeficijenta određena je  $p$ -vrednostima (tabela 5.7), pri čemu niske vrednosti  $p$  ukazuju na značajnost odgovarajućeg koeficijenta. Na osnovu regresione analize utvrđeno je da je linearni koeficijent koncentracije dekstrana u filmu (A) statistički značajan za zateznu čvrstoću i izduženje pri kidanju, dok je linearni koeficijent koncentracije sorbitola (B) statistički značajan za sva tri odgovora.

Kvadratni koeficijent koncentracije dekstrana značajan je za izduženje pri kidanju, a kvadratni koeficijent koncentracije sorbitola je statistički značajan za sve tri mehaničke osobine.

Tabela 5.7 Analiza varijanse (ANOVA) modela drugog reda za zateznu čvrstoću, izduženje pri kidanju i Jangov modul elastičnosti jestivih filmova na bazi dekstrana i sorbitola

	Zatezna čvrstoća ( $Y_1$ )		Izduženje pri kidanju ( $Y_2$ )		Jangov modul elastičnosti ( $Y_3$ )	
	<i>F</i> -vrednost	<i>p</i> -vrednost <i>Prob&gt;F</i>	<i>F</i> -vrednost	<i>p</i> -vrednost <i>Prob&gt;F</i>	<i>F</i> -vrednost	<i>p</i> -vrednost <i>Prob&gt;F</i>
Model	12,58	0,0022 <sup>a</sup>	8,90	0,0061 <sup>a</sup>	7,46	0,0100 <sup>a</sup>
A	19,46	0,0031 <sup>a</sup>	11,39	0,0118 <sup>a</sup>	3,09	0,1222 <sup>b</sup>
B	34,23	0,0006 <sup>a</sup>	19,95	0,0029 <sup>a</sup>	20,42	0,0027 <sup>a</sup>
AB	3,01	0,1264 <sup>b</sup>	2,47	0,1597 <sup>b</sup>	3,36	0,1094 <sup>b</sup>
A <sup>2</sup>	2,18*10 <sup>-4</sup>	0,9887 <sup>b</sup>	6,03	0,0438 <sup>a</sup>	0,066	0,8052 <sup>b</sup>
B <sup>2</sup>	5,73	0,0480 <sup>a</sup>	7,66	0,0278 <sup>a</sup>	9,98	0,0159 <sup>a</sup>
R <sup>2</sup>	0,8999		0,8641		0,8420	

<sup>a</sup>Značajan koeficijent ( $p < 0,05$ ); <sup>b</sup>Neznačajan koeficijent

Odnosi između nezavisnih promenljivih i odgovarajućih odgovora predstavljeni su sledećim jednačinama:

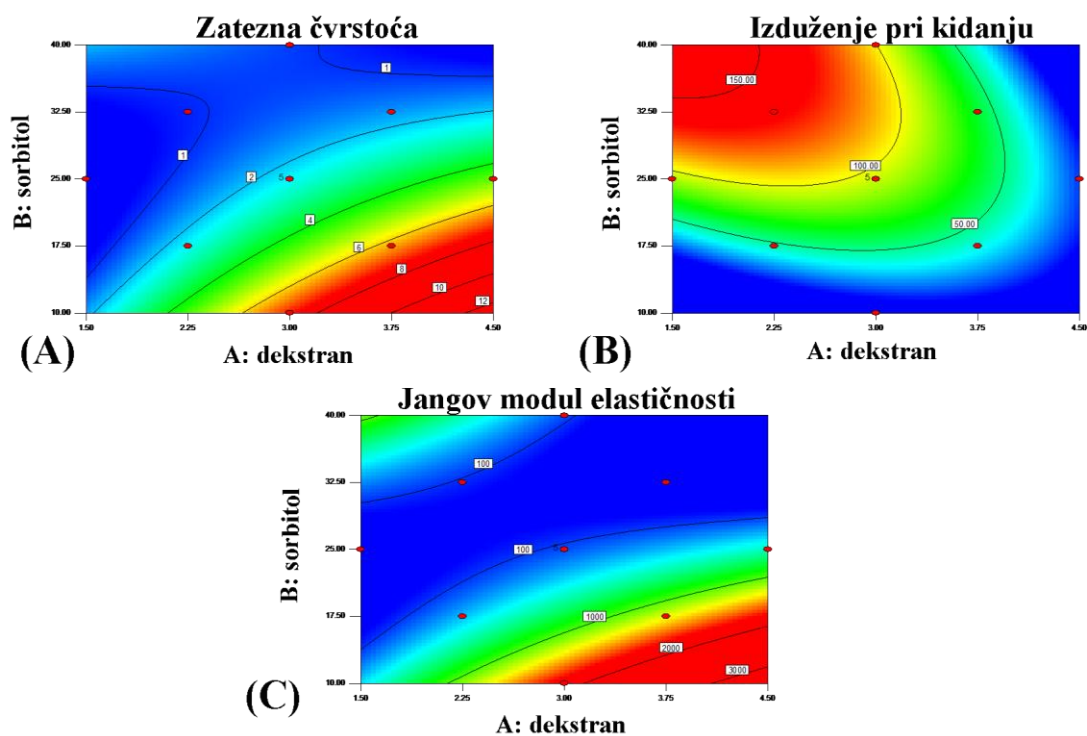
$$Y_1 = 2,37 + 1,16A - 1,54B - 0,79AB + 2,802 \cdot 10^{-3}A^2 + 0,46B^2 \quad (5.1)$$

$$Y_2 = 94,53 - 21,47A + 28,42B - 17,33AB - 11,30A^2 - 12,75B^2 \quad (5.2)$$

$$Y_3 = 137,20 + 165,97A - 426,68B - 299,79AB + 17,5A^2 + 215,89B^2 \quad (5.3).$$

Pozitivan znak u jednačini predstavlja sinergistički efekat promenljivih, dok negativan znak ukazuje na njihov antagonistički efekat. Iz jednačina 5.1 – 5.3 vidi se da koncentracija dekstrana (A) ima pozitivan linearan uticaj na zateznu čvrstoću i elastični modul, a negativni linearni uticaj na izduženje pri kidanju, dok je linearni uticaj sorbitola (B) suprotan. Kvadratni parametri A<sup>2</sup> i B<sup>2</sup> imaju pozitivan uticaj na zateznu čvrstoću i elastični modul, a negativan na izduženje pri kidanju.

Bolji uvid u uticaj nezavisnih promenljivih na odgovore stiče se posmatranjem konturnih grafika koji su prikazani na slici 5.23.



Slika 5.23 Konturni grafici uticaja koncentracija dekstrana i sorbitola na zateznu čvrstoću (A), izduženje pri kidanju (B) i Jangov modul elastičnosti (C)

Koncentracija dekstrana ima najznačajniji uticaj na zateznu čvrstoću ( $p=0,0031$ , tabela 5.7). Sa slike 5.23 se uočava da povećanje koncentracije dekstrana (kada se koncentracija sorbitola ne menja) poboljšava zateznu čvrstoću filma. Koncentracija dekstrana pozitivno utiče i na modul elastičnosti, pa su filmovi sa većom koncentracijom dekstrana mehanički otporniji i čvršći. Istovremeno, visoke koncentracije dekstrana značajno smanjuju elastičnost filмова, na šta ukazuju niže vrednosti izduženja pri kidanju. Ovi rezultati se mogu objasniti uspostavljanjem vodoničnih veza između lanaca dekstrana. S druge strane, povećanje koncentracije sorbitola u formulacijama filмова sa jednakom koncentracijom dekstrana dovodi do povećanja vrednosti izduženja pri kidanju, dok vrednosti zatezne čvrstoće i elastičnog modula opadaju, odnosno povećanjem koncentracije sorbitola dobijaju se elastičniji filmovi.

Vrednosti zatezne čvrstoće dekstranskih filмова kreću se u opsegu 0,68 – 7,48 MPa, dok su vrednosti elastičnog modula 9,05 – 1755,16 MPa (tabela 5.6). Formulacija filma koji je pokazao najveću krutost je sa 3,75% dekstrana i 17,5% sorbitola

(eksperiment pod rednim brojem 7). Što se tiče izduženja pri kidanju vrednosti su u opsegu od 0,97 – 134,50% (tabela 5.6). Najveću elastičnost pokazuju filmovi koji sadrže do 3% dekstrana i više od 25% sorbitola. Međutim, daljim povećanjem sadržaja dekstrana i sorbitola u filmovima, njihova elastičnost opada. Može se dakle zaključiti da odnos dekstrana i sorbitola u filmu igra važnu ulogu u sintezi filmova željenih mehaničkih karakteristika.

Poređenjem mehaničkih svojstava filmova na bazi dekstrana i sorbitola sa literaturnim podacima ustanovljeno je da su dobijene vrednosti zatezne čvrstoće u opsegu vrednosti dobijenih za ostale polisaharidne filmove, dok je njihova elastičnost znatno veća [213,290–293]. Dobijeni rezultati ukazuju na snažno prodiranje sorbitola u dekstranski matriks, što za posledicu ima smanjenje međumolekulskih interakcija između molekula polimera. Dolazi do značajnog povećanja orijentacije i delimične pokretljivosti polimernih lanaca [294], zbog čega su filmovi u kojima je koncentracija sorbitola visoka fleksibilniji i smanjene mehaničke čvrstoće.

### 5.3.1.2 *Adekvatnost modela i analiza odzivnih površina za propustljivost vodene pare i ugao kvašenja*

Višestrukom regresionom analizom je utvrđeno da je kvadratni model najpogodniji za propustljivost vodene pare, dok je za ugao kvašenja program predložio linearni model. Predloženi modeli su značajni ( $p < 0,05$ ), s obzirom na to da su vrednosti  $R^2$  visoke (0,96 za propustljivost vodene pare i 0,86 za ugao kvašenja, tabela 5.8), što ukazuje na dobro slaganje predviđenih i eksperimentalno dobijenih vrednosti.

Odnosi između nezavisnih promenljivih i odgovarajućih odgovora predstavljeni su sledećim jednačinama (5.4 i 5.5):

$$Y_4 = 7,915 \cdot 10^{-12} - 1,044 \cdot 10^{-12}A + 2,601 \cdot 10^{-12}B + 3,525 \cdot 10^{-13}AB + 5,016 \cdot 10^{-13}A^2 + 9,028 \cdot 10^{-13}B^2 \quad (5.4)$$

$$Y_5 = 79,08 + 3,58A - 1,25B \quad (5.5)$$

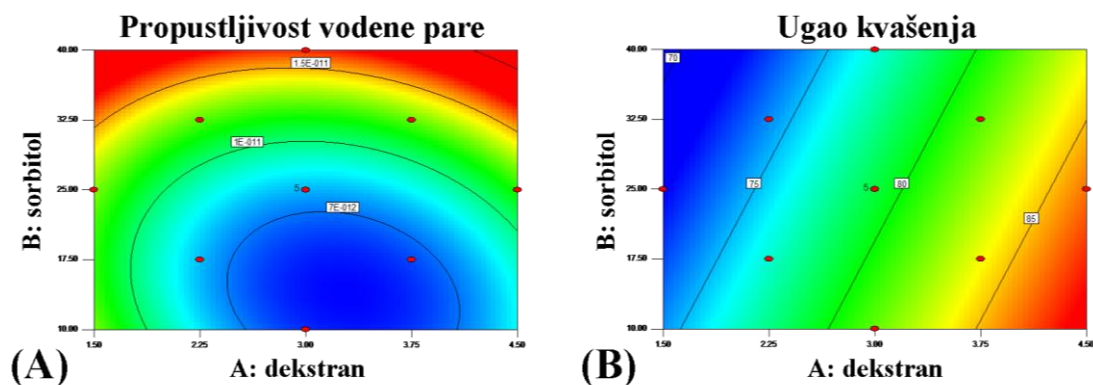


Tabela 5.8 Analiza varijanse (ANOVA) modela za propustljivost vodene pare i ugao kvašenja

	Propustljivost vodene pare ( $Y_4$ )		Ugao kvašenja ( $Y_5$ )	
	$F$ -vrednost	$p$ -vrednost $Prob>F$	$F$ -vrednost	$p$ -vrednost $Prob>F$
Model	34,79	<0,0001 <sup>a</sup>	30,76	<0,0001
A	19,80	0,0030 <sup>a</sup>	54,85	<0,0001 <sup>a</sup>
B	122,87	<0,0001 <sup>a</sup>	6,68	0,0272 <sup>a</sup>
AB	0,75	0,4145 <sup>b</sup>		
A <sup>2</sup>	8,73	0,0213 <sup>a</sup>		
B <sup>2</sup>	28,27	<0,0011 <sup>a</sup>		
R <sup>2</sup>	0,9613		0,8602	

<sup>a</sup> Značajan koeficijent ( $p < 0,05$ ); <sup>b</sup> Neznačajan koeficijent

Na osnovu regresione analize (tabela 5.8) vidi se da linearni koeficijenti koncentracija dekstrana i sorbitola značajno utiču na propustljivost vodene pare i ugao kvašenja. Oba kvadratna parametra A<sup>2</sup> i B<sup>2</sup> su statistički značajni za propustljivost vodene pare.



Slika 5.24 Konturni grafici uticaja koncentracija dekstrana i sorbitola na propustljivost vodene pare (A) i ugao kvašenja (B)

Na slici 5.24 prikazani su konturni grafici uticaja koncentracija dekstrana i sorbitola na propustljivost vodene pare i ugao kvašenja, sa kojih je lako uočljivo da povećanje koncentracije sorbitola dovodi do povećanja propustljivosti vodene pare i smanjenja uglova kvašenja. Ovakvi trendovi su posledica higroskopne prirode plastifikatora, čiji dodatak povećava hidrofilitnost filmova [294].

Imajući u vidu da vlaga značajno utiče na propadanje prehrambenih proizvoda, može se reći da je propustljivost vodene pare najvažnija osobina jestivih filmova. Iz rezultata prikazanih u tabeli 5.6 vidi se da su filmovi sa većim sadržajem sorbitola podložniji propuštanju vodene pare, što je verovatno posledica povećanja slobodne zapremine i pokretljivosti molekula dekstrana u nekim delovima lanca. Usled toga molekuli vodene pare lakše difunduju u dekstranski film. Vrednosti za propustljivost vodene pare uzoraka filmova su u opsegu  $5,69 \times 10^{-12}$  do  $16,74 \times 10^{-12}$  g/msPa (tabela 5.6). Ove vrednosti su za jedan do čak tri reda veličine manje od literaturnih podataka za filmove na bazi drugih hidrokoloida [213,295–298]. Dobijeni rezultati jasno ukazuju da filmovi na bazi dekstrana i sorbitola pokazuju dobre barijerne osobine prema vodenoj pari.

Ugao kvašenja je pokazatelj hidrofilnosti površine filma. Uglovi manji od  $90^\circ$  odgovaraju hidrofilnim površinama, dok je kod hidrofobnih površina ugao kvašenja veći od  $90^\circ$  [299]. Vrednosti uglova kvašenja filmova na bazi dekstrana i sorbitola su u opsegu  $72^\circ$  do  $88^\circ$  (tabela 5.6). Sa povećanjem koncentracije dekstrana povećavaju se uglovi kvašenja, dok se suprotan trend primećuje dodatkom većih koncentracija sorbitola, što je u saglasnosti sa literaturnim podacima, gde je takođe pokazano da dodatak poliola kao plastifikatora smanjuje hidrofobnost polisaharidnih filmova [300–303]. Povećanje hidrofilne prirode dekstranskih filmova sa dodatkom sorbitola potvrđena je i rezultatima za propustljivost vodene pare. Dobijene vrednosti uglova kvašenja su veće u poređenju sa vrednostima za druge hidrokoloide iz literature [300,304,305], što ukazuje na veću hidrofilnost filmova na bazi dekstrana i sorbitola.

### *5.3.1.3 Određivanje optimalnih uslova i validacija modela*

U cilju pronalaženja formulacije filma sa optimalnim svojstvima primenjena je numerička optimizacija, korišćenjem funkcije poželjnosti. Deringerova funkcija poželjnosti je jedan od najčešće korišćenih metoda za optimizaciju procesa u kojima je potrebno simultano optimizovati više različitih odgovora [306]. Prvi korak kod primene ove metode je konstruisanje funkcija poželjnosti za svaki pojedinačan odgovor [233,306]. Pri tome je neophodno definisati svrhu optimizacije (maksimiziranje, minimiziranje ili dostizanje ciljne vrednosti). Ovi ciljevi će odrediti koja se funkcija transformacije mora koristiti za postizanje pojedinačnih poželjnosti ( $d_i$ ), čije vrednosti

mogu da budu u intervalu od 0 (nepoželjan odgovor) do 1 (potpuno poželjan odgovor). Na osnovu pojedinačnih poželjnosti, može se dobiti ukupna funkcija poželjnosti ( $D$ ), koja se računa kao geometrijska sredina pojedinačnih poželjnosti, prema formuli

$$D = \sqrt[m]{d_1 d_2 \dots d_m}$$

gde je  $m$  broj odgovora uzetih u obzir u procesu optimizacije.

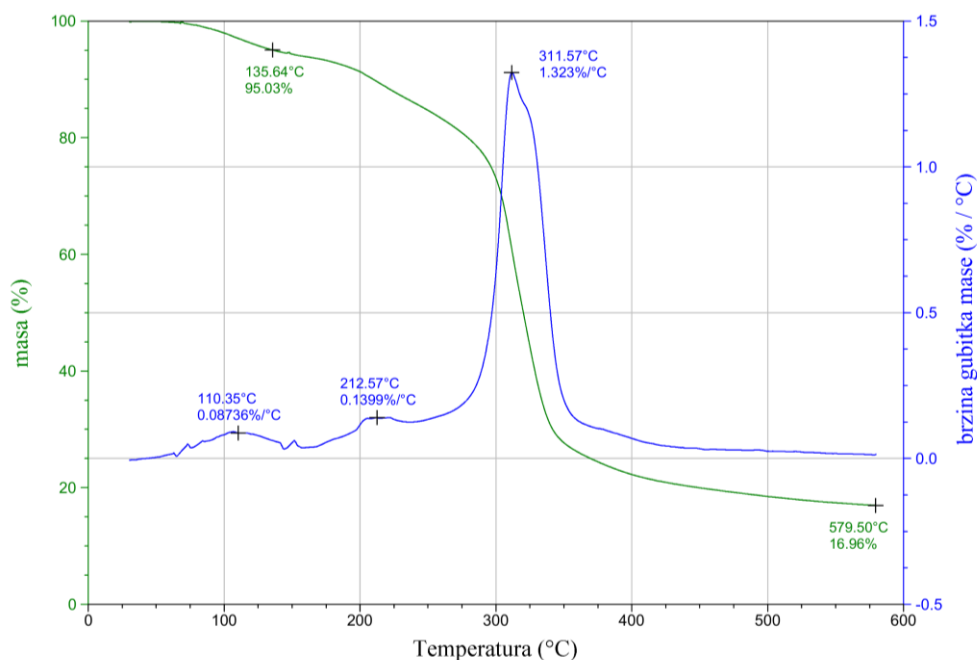
Da bi moglo da ispuni svoju glavnu funkciju – održanje integriteta upakovane hrane tokom rukovanja, pakovanje treba da ima visoke vrednosti zatezne čvrstoće i izduženja pri kidanju. Generalno, materijali visoke mehaničke čvrstoće su kruti i manje elastični, tako da je najbolji način dizajniranja jestivog filma sa zadovoljavajućim mehaničkim svojstvima nalaženje kompromisa između čvrstine filma i njegove elastičnosti. Istovremeno, poželjno je da propusnost vodene pare kroz jestive filmove bude što manja. Na osnovu ovoga postavljeni su sledeći kriterijumi: zatezna čvrstoća u opsegu 4,00–7,48 MPa, izduženje pri kidanju u opsegu 60,0–134,5% i propustljivost vodene pare u opsegu  $5,69 \times 10^{-12}$ – $9,00 \times 10^{-12}$  g/smPa. Jangov modul elastičnosti i ugao kvašenja su, kao manje bitne osobine, isključene iz optimizacije, jer nije bilo moguće dobiti visoke vrednosti funkcije poželjnosti sa svih 5 odgovora. Softver je ponudio 25 rešenja sa vrednostima funkcije poželjnosti 1, koja su bila slična, pa je za validaciju modela izabrano jedno. Na osnovu predviđanja modela, željene osobine ima film sastava 3,40% dekstrana i 20,43% sorbitola. Film je pripremljen i analiziran. Dobijene su sledeće vrednosti izlaznih promenljivih: zatezna čvrstoća 4,12 MPa, izduženje pri kidanju 60,82% i propustljivost vodene pare  $6,87 \times 10^{-12}$  g/smPa. Izmerene vrednosti za sve parametre uklapaju se u interval predviđanja od 95% i veoma su blizu predviđenim vrednostima (4,36 MPa za zateznu čvrstoću, 63,47% za izduženje pri kidanju i  $6,56 \times 10^{-12}$  g/smPa za propustljivost vodene pare), što ukazuje da je model pouzdan.

### 5.3.2 Ispitivanje termičke stabilnosti jestivih filmova

Nakon pronalaženja optimalne formulacije jestivog filma, ispitana je njegova termička stabilnost. Ova osobina je bitna sa tehnološkog aspekta, s obzirom na to da se tokom sinteze i procesuiranja materijala često primenjuju visoke temperature. Termička

stabilnost filma na bazi dekstrana ispitana je neizoternom termogravimetrijom. Termogram (TG) i diferencijalni termogram (DTG) prikazani su na slici 5.25.

Sa slike se vidi da se degradacija dekstranskog filma odvija u tri koraka. Prvi korak degradacije se dešava na temperaturi do 110 °C i predstavlja isparavanje slobodne vode. Drugi korak razgradnje u opsegu 200 °C – 250 °C povezan je sa hidrolitičkom reakcijom opisanom kao stvaranje dekstrina niske viskoznosti u atmosferi vazduha. U ovom temperaturnom opsegu odvija se istovremena depolimerizacija i ponovno uspostavljanje veza u drugim položajima [307]. Gubitak mase u ovom stupnju degradacije je oko 20%. Najveći gubitak mase od oko 75% dešava se tokom trećeg koraka, na temperaturama od 250 °C do 350 °C i pripisuje se degradaciji glavnih lanaca dekstrana [308]. Ukupna masa izgubljena na 600 °C je oko 80–85%.



Slika 5.25 TG (—) i DTG (—) krive jestivog filma na bazi dekstrana i sorbitola

### 5.3.1 Uticaj jestivog filma na bazi dekstrana i sorbitola na održivost kvaliteta borovnice tokom skladištenja

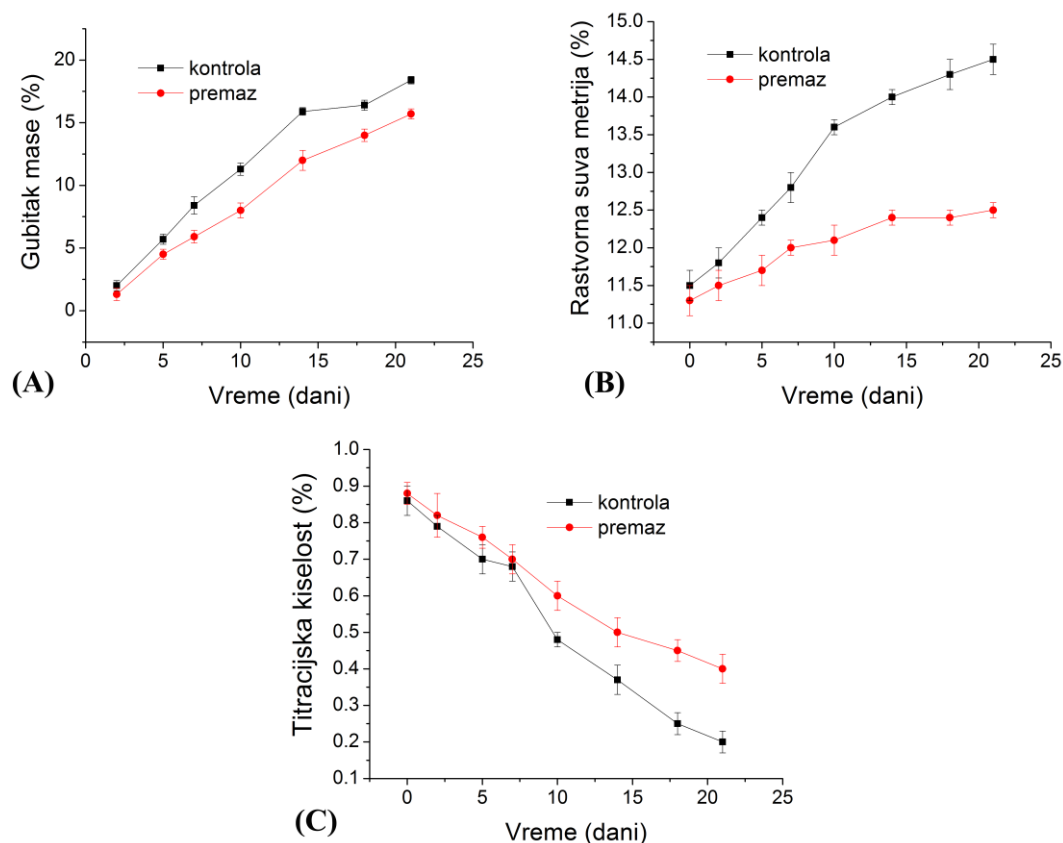
Sveže voće je podložno propadanju ne samo zbog fizičkih oštećenja do kojih može doći tokom transporta i skladištenja, već i zbog biohemijskih procesa koji se

odvijaju u plodu, pa je uloga jestivog premaza pored mehaničke zaštite ploda i kontrola tih procesa u smislu usporavanja zrenja, a sve u cilju produženja roka trajanja. Rok trajanja voća zavisi od različitih faktora kao što su zrelost, sorta, način berbe i uslovi skladištenja. Rok trajanja svežih borovnica obično je u rasponu od 10-40 dana [216].

U ovoj disertaciji ispitan je uticaj premaza na bazi dekstrana i sorbitola, čija je formulacija prethodno optimizovana, na kvalitet ploda borovnice tokom skladištenja 21 dan na 8 °C. Kao parametri koji ukazuju na kvalitet ploda određivani su gubitak vlage, sadržaj rastvorne suve materije i titracijska kiselost.

Gubitak mase svežeg voća je posledica gubitka vode, do kojeg dolazi usled procesa transpiracije i respiracije i jedan je od najvažnijih uzroka gubitka kvaliteta plodova [309]. Gubitak mase premazanih i nepremazanih uzoraka borovnica tokom skladištenja prikazan je na slici 5.26a. Prvobitno se uočava mala promena mase i kod uzorka sa premazom i kod kontrole, ali ima rastući trend u oba slučaja, pri čemu se tokom celog perioda skladištenja manji gubitak primećuje kod premazanih borovnica. Već od petog dana gubitak mase je statistički značajno manji ( $p < 0,05$ ) kod premazanih borovnica nego kod kontrolnih. Nakon skladištenja 21 dan, nepremazani plodovi su izgubili 18,4% mase, a premazani 15,7%. S obzirom na to da su rezultati propustljivosti vodene pare dekstranskih filmova pokazali da ovi filmovi imaju izuzetno dobra barijerna svojstva, o čemu je prethodno bilo reči, očekivano je da dekstran bude efikasan i u obliku premaza.

Mannozi (Manoci) i saradnici [216,310] su ispitivali uticaj različitih polisaharidnih premaza na kvalitet borovnica i nisu primetili značajnu razliku u gubitku mase kod premazanih plodova u odnosu na nepremazane. Ovi autori su međutim ustanovili da je za 14 dana skladištenja izgubljeno samo 4,5% mase. Isti procenat gubitka mase premazanih borovnica su dobili Chiabrando i Giacalone (Kiabrando i Đakalone) [311] nakon 45 dana skladištenja. Tokom uobičajenih uslova skladištenja borovnice obično izgube oko 9-10% mase [312]. Veće vrednosti gubitka mase borovnica dobijene za premaze na bazi dekstrana i sorbitola u odnosu na podatke iz literature verovatno su posledica različite zrelosti plodova [312]. Još jedan razlog može biti i duže vreme koje je prošlo od trenutka branja borovnica do premazivanja, na šta ukazuju veće vrednosti dobijene i za kontrole.



Slika 5.26 Uticaj premaza na bazi dekstrana i sorbitola na parametre kvaliteta ploda borovnica tokom skladištenja na 8 °C: procenat gubitka mase (A), sadržaj ukupne rastvorne suve materije (B) i titracijsku kiselost (C)

Ukupna rastvorna suva materija, koju najvećim delom čine šećeri, je pokazatelj zrelosti ploda. Sazrevanjem ploda složeni ugljeni-hidrati hidrolizuju do prostijih šećera, kao što su glukoza, saharoza i fruktoza. Ovi šećeri su rastvorni u vodi, pa je očekivano da dođe do povećanja procenta rastvorne suve materije.

Rezultati sadržaja ukupne rastvorne suve materije uzoraka borovnica dobijeni merenjem ručnim refraktometrom na 25 °C prikazani su na slici 5.26b. Sa slike se vidi da sadržaj šećera raste tokom perioda skladištenja i kod premazanih i kod nepremazanih borovnica, ali je kod kontrolnih plodova značajno veći ( $p < 0,05$ ). Najveći porast sadržaja suve materije uočava se između 10-og i 14-og dana, što je verovatno posledica činjenice da je najveći gubitak vlage takođe u ovom periodu (slika 5.26a). Sadržaj šećera kod nepremazanih borovnica raste od 11% do 14% tokom prvih 14 dana skladištenja na 8

°C i zadržava se oko te vrednosti do 21. dana. U slučaju premazanih borovnica porast sadržaja šećera je značajno manji i od početnih 11% nakon 21 dan dostiže 12,5%.

Premazi modifikuju unutrašnju atmosferu gasova smanjenjem koncentracije kiseonika i/ili povećanjem nivoa ugljen-dioksida, čime se smanjuje intenzitet disanja ploda i njegove metaboličke aktivnosti [313]. Manje vrednosti sadržaja ukupne rastvorne suve materije premazanih borovnica u poređenju sa nepremazanim ukazuju na efikasnost premaza na bazi dekstrana i sorbitola da uspori respiraciju, a samim tim i hidrolizu ugljenih hidrata, čime doprinosi očuvanju kvaliteta borovnica tokom skladištenja.

Uticaj premaza na titracijsku kiselost borovnica prikazan je na slici 5.26c. Sa slike se vidi da titracijska kiselost opada tokom vremena skladištenja i kod premazanih i kod nepremazanih borovnica, pri čemu su vrednosti kiselosti veće kod premazanih plodova. Titracijska kiselost borovnica izmerena na početku eksperimenta je 0,84%, a nakon 21 dan skladištenja na 8 °C opala je na 0,2% kod kontrolnih borovnica, odnosno na 0,4% kod premazanih.

Smanjenje vrednosti titracijske kiselosti tokom vremena rezultat je promene sadržaja limunske kiseline u plodovima borovnica [314]. Sadržaj limunske kiseline je različit za svaku sortu. Limunska kiselina je supstrat u mnogim enzimski katalizovanim reakcijama tokom procesa aerobne respiracije u biljnim ćelima. Kao rezultat tih reakcija voće postaje relativno slatko. Smanjenje kiselosti je pokazatelj zrenja voća, pri čemu brži pad ukazuje na brže sazrevanje. Premazi različitog sastava imaju različit uticaj na proces zrenja. Prema rezultatima koje su objavili Chiabrando i Giacalone [311] premaz na bazi hitozana i alginata uticao je na održanje visokih vrednosti titracijske kiselosti borovnica tokom skladištenja, odnosno usporio je proces respiracije, dok je preamaz od samog alginata imao suprotno dejstvo. Ubrzano sazrevanje premazanih u poređenju sa nepremazanim borovnicama primetili su i Abugoh (Abuho) i saradnici [314]. Kako je kod uzoraka borovnica premazanih dekstranom titracijska kiselost značajno veća ( $p < 0,05$ ) nego kod nepremazanih, može se zaključiti da premaz na bazi dekstrana i sorbitola efikasno utiče na usporavanje procesa zrenja borovnica.

## 6 ZAKLJUČAK

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

- Zrno vodenog kefir predstavlja izvor bakterija mlečne kiseline koje proizvode dekstran, iz koga su izolovana i metodom sekvencioniranja 16S rRNK kodirajuće genomske sekvence identifikovana dva *Leuconostoc mesenteroides* soja i jedan soj *Lactobacillus hilgardii*.
- Izolat *Leuconostoc mesenteroides* T1 na 23 °C nakon 16 h inkubacije u MRSs bujonu proizvodi 11,56 g/L dekstrana.
- Izolat *Leuconostoc mesenteroides* T3 gajen na 23 °C nakon 20 h inkubacije u MRSs bujonu proizvodi 18,00 g/L dekstrana.
- Izolat *Lactobacillus hilgardii* T5 na 30 °C nakon 32 h inkubacije u MRSs bujonu proizvodi 18,46 g/L dekstrana.
- Dekstran sintetisan pomoću dekstransaharaze izolovane iz soja *Leuconostoc mesenteroides* T3 je linearan molekul sa  $\alpha$ -(1→6) glikozidnim vezama.
- Rastvori dekstrana pokazuju tipično ne-Njutnovsko pseudoplastično ponašanje.
- Dekstran iz *Lc. mesenteroides* T3 osušen tehnikom sprej-sušenja ima sfernu, poroznu strukturu.
- Optimalni uslovi za sintezu nanočestica srebra pomoću dekstrana iz *Lc. mesenteroides* T3 su: 0,03% dekstrana, pH=9 i temperatura 60 °C, pri koncentraciji srebra 0,2 mM.
- Nanočestice srebra sintetisane pomoću dekstrana iz *Lc. mesenteroides* T3 su kristalne, pretežno sfernog oblika, relativno uniformne, sa prosečnom veličinom 12 nm.
- Razvijena je selektivna i osetljiva metoda za detekciju cisteina pomoću koloidnog rastvora nanočestica srebra sintetisanih pomoću dekstrana iz *Lc. mesenteroides* T3 sa granicom detekcije 12  $\mu$ M.
- Nanočestice srebra sintetisane pomoću dekstrana ne pokazuju citotoksično dejstvo prema ćelijama preosteoblastima u koncentraciji 0,02 mM.
- Obradom pamuka koloidnim rastvorom nanočestica srebra sintetisanih pomoću dekstrana iz *Lc. mesenteroides* T3 dobijena je tkanina sa antimikrobnim



svojstvima prema Gram-negativnoj bakteriji *Escherichia coli*, Gram-pozitivnoj bakteriji *Staphylococcus aureus* i gljivici *Candida albicans*.

- Optimizacijom sastava jestivog filma na bazi dekstrana iz *Leuconostoc mesenteroides* T3 i sorbitola primenom metode odzivnih površina, utvrđeno je da najbolje mehaničke osobine (zateznu čvrstoću 4,12 Mpa i izduženje pri kidanju 60,82%) i barijerne (propustljivost vodene pare  $6,87 \times 10^{-12}$  g/smPa) ima formulacija sa 3,40% dekstrana i 20,43% sorbitola.
- Jestivi film na bazi dekstrana i sorbitola je stabilan do temperature 200 °C.
- Premaz na bazi dekstrana i sorbitola pomaže očuvanju kvaliteta ploda borovnice, a samim tim produžava rok trajanja, s obzirom na to da efikasno utiče na smanjenje gubitka vlage, usporavanje procesa respiracije i hidrolize ugljenih hidrata, odnosno procesa zrenja borovnica tokom skladištenja na 8 °C

Naučni doprinos ove disertacije ogleda se u izolaciji i karakterizaciji novog soja, *Leuconostoc mesenteroides* T3, izolata iz zrna vodenog kefir, sa sposobnošću sinteze visokih prinosa dekstrana. Dobijeni dekstran se pokazao kao pogodan redukcion i stabilizujuć agens u sintezi nanočestica srebra. Na osnovu prikazanih rezultata i detaljnog pregleda literature, sintetisane nanočestice srebra imaju potencijal za primenu u tekstilnoj industriji za proizvodnju tkanine sa antimikrobnim svojstvima i u medicinskoj dijagnostici za razvoj biosenzora za detekciju cisteina. Takođe, preliminarni rezultati uticaja dekstranskog filma na održanje kvaliteta borovnica, ukazuju na mogućnost primene dekstrana za proizvodnju jestivih filmova i premaza.

## 7 LITERATURA

- [1] R.S. Dassanayake, S. Acharya, N. Abidi, Biopolymer-Based Materials from Polysaccharides: Properties, Processing, Characterization and Sorption Applications, in: *Adv. Sorption Process Appl.*, IntechOpen, 2018: pp. 1–24.
- [2] J. Liu, S. Willför, C. Xu, A review of bioactive plant polysaccharides: Biological activities, functionalization, and biomedical applications, *Bioact. Carbohydrates Diet. Fibre.* 5 (2015) 31–61. doi:10.1016/j.bcdf.2014.12.001.
- [3] Y. Yu, M. Shen, Q. Song, J. Xie, Biological activities and pharmaceutical applications of polysaccharide from natural resources: A review, *Carbohydr. Polym.* 183 (2018) 91–101. doi:10.1016/j.carbpol.2017.12.009.
- [4] F. Freitas, V.D. Alves, M.A.M. Reis, Advances in bacterial exopolysaccharides: From production to biotechnological applications, *Trends Biotechnol.* 29 (2011) 388–398. doi:10.1016/j.tibtech.2011.03.008.
- [5] P. Ruas-Madiedo, J. Hugenholtz, P. Zoon, An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria, in: *Int. Dairy J.*, 2002. doi:10.1016/S0958-6946(01)00160-1.
- [6] A.N. De Belder, Medical applications of dextran and its derivatives, in: D.S.M. Dekker (Ed.), *Polysaccharides Med. Appl.*, New York, 1996: pp. 505–523.
- [7] J.C. Janson, On the history of the development of Sephadex®, *Chromatographia.* 23 (1987) 361–365. doi:10.1007/BF02316183.
- [8] L.A. Haff, R.L. Easterdav, Sephacryl Gels: Physical Properties and Evaluation of Performance in Gel Filtration, *J. Liq. Chromatogr.* 1 (1978) 811–832. doi:10.1080/01483917808060036.
- [9] U. Hellberg, J.-P. Ivarsson, B.-L. Johansson, Characteristics of Superdex® prep grade media for gel filtration chromatography of proteins and peptides, *Process Biochem.* 31 (1996) 163–172. doi:10.1016/0032-9592(95)00044-5.
- [10] M. Naessens, A. Cerdobbel, W. Soetaert, E.J. Vandamme, Leuconostoc dextransucrase and dextran: Production, properties and applications, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 80 (2005) 845–860. doi:10.1002/jctb.1322.
- [11] S. Patel, A. Majumder, A. Goyal, Potentials of Exopolysaccharides from Lactic Acid Bacteria, *Indian J. Microbiol.* 52 (2012) 3–12. doi:10.1007/s12088-011-0148-8.
- [12] G. DA Jay JM, Loessner MJ, *Modern food microbiology*, 7th edn, 2008.
- [13] F.J. Carr, D. Chill, N. Maida, The lactic acid bacteria: A literature survey, *Crit. Rev. Microbiol.* 28 (2002) 281–370. doi:10.1080/1040-840291046759.
- [14] U. Schillinger, W.H. Holzapfel, Culture media for lactic acid bacteria, in: J.E.L. Corry, G.D.W. Curtis, R.M. Baird (Eds.), *Prog. Ind. Microbiol.*, Elsevier Science B.V., 2003: pp. 127–140. doi:10.1016/S0079-6352(03)80011-5.
- [15] S.B. Zafar, N.N. Siddiqui, F. Shahid, S.A.U. Qader, A. Aman, Bioprospecting of indigenous resources for the exploration of exopolysaccharide producing lactic acid bacteria, *J. Genet. Eng. Biotechnol.* 16 (2018) 17–22. doi:10.1016/j.jgeb.2017.10.015.
- [16] L. De Vuyst, B. Degeest, Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: Technological bottlenecks and practical solutions, *Macromol. Symp.* (1999). doi:10.1002/masy.19991400105.
- [17] P.J. Looijesteijn, L. Trapet, E. De Vries, T. Abee, J. Hugenholtz, Physiological function of exopolysaccharides produced by *Lactococcus lactis*, *Int. J. Food Microbiol.* (2001). doi:10.1016/S0168-1605(00)00437-2.
- [18] A. Laws, Y. Gu, V. Marshall, Biosynthesis, characterisation, and design of bacterial exopolysaccharides from lactic acid bacteria, *Biotechnol. Adv.* 19 (2001) 597–625. doi:10.1016/S0734-9750(01)00084-2.
- [19] P. Monsan, S. Bozonnet, C. Albenne, G. Joucla, R.M. Willemot, M. Remaud-Siméon, Homopolysaccharides from lactic acid bacteria, *Int. Dairy J.* 11 (2001) 675–685.

- doi:10.1016/S0958-6946(01)00113-3.
- [20] L. De Vuyst, F. De Vin, F. Vaningelgem, B. Degeest, Recent developments in the biosynthesis and applications of heteropolysaccharides from lactic acid bacteria, in: *Int. Dairy J.*, 2001: pp. 687–707. doi:10.1016/S0958-6946(01)00114-5.
- [21] I.W. Sutherland, Microbial exopolysaccharide synthesis, in: P.A. Sanford, A. Laskin (Eds.), *Extracell. Microb. Polysaccharides*, Am. Chem. Soc., 1977: pp. 40 – 57.
- [22] M. Dols-Lafargue, R.M. Willemot, P.F. Monsan, M. Remaud-Simeon, Factors affecting  $\alpha$ ,-1,2 glucooligosaccharide synthesis by *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299 dextransucrase, *Biotechnol. Bioeng.* (2001). doi:10.1002/bit.1141.
- [23] M. Gänzle, C. Schwab, Ecology of Exopolysaccharide Formation by Lactic Acid Bacteria: Sucrose Utilization, Stress Tolerance, and Biofilm Formation, in: *Bact. Polysaccharides Curr. Innov. Futur. Trends*, 2009.
- [24] S.A.F.T. van Hijum, S. Kralj, L.K. Ozimek, L. Dijkhuizen, I.G.H. van Geel-Schutten, Structure-Function Relationships of Glucansucrase and Fructansucrase Enzymes from Lactic Acid Bacteria, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* (2006). doi:10.1128/mmr.70.1.157-176.2006.
- [25] B. Henrissat, A. Bairoch, Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases., *Biochem. J.* (1996).
- [26] S. Kralj, G.H. van Geel-Schutten, M.M.G. Dondorff, S. Kirsanovs, M.J.E.C. van der Maarel, L. Dijkhuizen, Glucan synthesis in the genus *Lactobacillus*: Isolation and characterization of glucansucrase genes, enzymes and glucan products from six different strains, *Microbiology.* (2004). doi:10.1099/mic.0.27321-0.
- [27] S. Kralj, G.H. Van Geel-Schutten, M.J.E.C. Van Der Maarel, L. Dijkhuizen, Efficient screening methods for glucosyltransferase genes in *Lactobacillus* strains, in: *Biocatal. Biotransformation*, 2003. doi:10.1080/10242420310001618519.
- [28] V. Monchois, R.M. Willemot, P. Monsan, Glucansucrases: Mechanism of action and structure-function relationships, *FEMS Microbiol. Rev.* (1999). doi:10.1016/S0168-6445(98)00041-2.
- [29] M. Tiekling, S. Kaditzky, R. Valcheva, M. Korakli, R.F. Vogel, M.G. Gänzle, Extracellular homopolysaccharides and oligosaccharides from intestinal lactobacilli, *J. Appl. Microbiol.* (2005). doi:10.1111/j.1365-2672.2005.02638.x.
- [30] G.H. Van Geel-Schutten, F. Flesch, B. Ten Brink, M.R. Smith, L. Dijkhuizen, Screening and characterization of *Lactobacillus* strains producing large amounts of exopolysaccharides, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* (1998). doi:10.1007/s002530051353.
- [31] A.M. Hashem, A.A. Gamal, N.M. Mansour, B.M. Salama, N.M. Hassanein, G.E.A. Awad, M.A. Esawy, Optimization of *Enterococcus faecalis* Esawy KR758759 dextransucrase and evaluation of some dextran bioactivities, *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 15 (2018) 348–358. doi:10.1016/j.cbab.2018.06.008.
- [32] R. Shukla, A. Goyal, Purified dextransucrase from *Pediococcus pentosaceus* CRAG3 as food PubMed Commons, *Indian J. Exp. Biol.* (2014) 2–3.
- [33] M. Amari, L.F.G. Arango, V. Gabriel, H. Robert, S. Morel, C. Moulis, B. Gabriel, M. Remaud-Siméon, C. Fontagné-Faucher, Characterization of a novel dextransucrase from *Weissella confusa* isolated from sourdough, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* (2013). doi:10.1007/s00253-012-4447-8.
- [34] M.S. Bounaix, H. Robert, V. Gabriel, S. Morel, M. Remaud-Siméon, B. Gabriel, C. Fontagné-Faucher, Characterization of dextran-producing *Weissella* strains isolated from sourdoughs and evidence of constitutive dextransucrase expression, *FEMS Microbiol. Lett.* 311 (2010) 18–26. doi:10.1111/j.1574-6968.2010.02067.x.
- [35] M. Vuillemin, F. Grimaud, M. Claverie, A. Rolland-Sabaté, C. Garnier, P. Lucas, P. Monsan, M. Dols-Lafargue, M. Remaud-Siméon, C. Moulis, A dextran with unique rheological properties produced by the dextransucrase from *Oenococcus kitaharae* DSM 17330, *Carbohydr. Polym.* 179 (2018) 10–18. doi:10.1016/j.carbpol.2017.09.056.
- [36] C. Scheiber, Investigation on the nature of the gelatinous excretion (so-called frogs'

- spawn) which is observed in production of beet-sugar juice, *Zeitschrift Fur Versuches-Wes. Dtsch. Zucker-Industrie.* 24 (1874) 309–319.
- [37] L. Pasteur, On the viscous fermentation and the butyrous fermentation, *Bull. Soc. Chim. Fr.* (1861) 30–31.
- [38] P. Van Tieghem, On sugar-mill gum, *Ann Sci Nat. Bot Biol Veg.* (1878) 180–203.
- [39] J.F. Robyt, Mechanisms in the glucansucrase synthesis of polysaccharides and oligosaccharides from sucrose, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 51 (1995) 133–168. doi:10.1016/S0065-2318(08)60193-6.
- [40] B. Guggenheim, Enzymatic hydrolysis and structure of water-insoluble glucan produced by glycosyltransferases from a strain of *Streptococcus mutans*, *Helv. Odontol. Acta.* 14 (1970) 89–109.
- [41] A. Wiater, M. Pleszczyńska, K. Próchniak, J. Szczodrak, Structural diversity of streptococcal mutans synthesized under different culture and environmental conditions and its effect on mutanase synthesis, *Molecules.* 17 (2012) 11800–11815. doi:10.3390/molecules171011800.
- [42] S. Hamada, H.D. Slade, Biology, immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*, *Microbiol. Rev.* 44 (1980) 331–84.
- [43] S.M. Colby, R.R.B. Russell, Sugar metabolism by mutans streptococci, *J. Appl. Microbiol.* 83 (1997) 80S-88S. doi:10.1046/j.1365-2672.83.s1.9.x.
- [44] W.H. Bowen, H. Koo, Biology of streptococcus mutans-derived glucosyltransferases: Role in extracellular matrix formation of cariogenic biofilms, *Caries Res.* 45 (2011) 69–86. doi:10.1159/000324598.
- [45] J.A. Banas, M.M. Vickerman, Glucan-binding proteins of the oral streptococci, *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 14 (2003) 89–99. doi:10.1177/154411130301400203.
- [46] G.L. Côté, J.F. Robyt, Isolation and partial characterization of an extracellular glucansucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1355 that synthesizes an alternating (1→6), (1→3)- $\alpha$ -D-glucan, *Carbohydr. Res.* 101 (1982) 57–74. doi:10.1016/S0008-6215(00)80795-8.
- [47] X. Meng, J.M. Dobruchowska, G.J. Gerwig, J.P. Kamerling, L. Dijkhuizen, Synthesis of oligo- and polysaccharides by *Lactobacillus reuteri* 121 reuteransucrase at high concentrations of sucrose, *Carbohydr. Res.* 414 (2015) 85–92. doi:10.1016/j.carres.2015.07.011.
- [48] E. Newbrun, S. Baker, Physico-chemical characteristics of the levan produced by *Streptococcus salivarius*, *Carbohydr. Res.* 6 (1968) 165–170. doi:10.1016/S0008-6215(00)81506-2.
- [49] R. Dedonder, Levansucrase from *Bacillus subtilis*, in: E.F. Neufeld, V. Ginsburg (Eds.), *Methods Enzymol.*, Academic Press, New York, 1966: pp. 500–505. doi:10.1016/0076-6879(66)08091-1.
- [50] J.F. Robyt, *Essentials of Carbohydrate Chemistry*, 1998. doi:10.1007/978-1-4612-1622-3.
- [51] V. Olivares-Illana, C. Wachter-Rodarte, S. Le Borgne, A. López-Munguía, Characterization of a cell-associated inulosucrase from a novel source: A *Leuconostoc citreum* strain isolated from Pozol, a fermented corn beverage of mayan origin, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 28 (2002) 112–117. doi:10.1038/sj/jim/7000224.
- [52] T. Charoenwongpaiboon, T. Sitthiyotha, P.P. Na Ayutthaya, K. Wangpaiboon, S. Chunsriviro, M. Hengsakul Prousoontorn, R. Pichyangkura, Modulation of fructooligosaccharide chain length and insight into the product binding motif of *Lactobacillus reuteri* 121 inulosucrase, *Carbohydr. Polym.* 209 (2019) 111–121. doi:10.1016/j.carbpol.2018.12.078.
- [53] M. Xiangzhao, L. Xiaotong, W. Shu, D. Wei, X. Yanlong, W. Hualei, G. Lizhong, W. Dongzhi, Enhanced production of intracellular dextran dextrinase from *Gluconobacter oxydans* using statistical experimental methods, *African J. Biotechnol.* 9 (2016) 1180–1189. doi:10.5897/ajb09.1760.

- [54] M. Naessens, A. Cerdobbel, W. Soetaert, E.J. Vandamme, Dextran dextrinase and dextran of *Gluconobacter oxydans*, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 32 (2005) 323–334. doi:10.1007/s10295-005-0259-5.
- [55] X. Mao, S. Wang, F. Kan, D. Wei, F. Li, A novel dextran dextrinase from *Gluconobacter oxydans* DSM-2003: Purification and properties, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 168 (2012) 1256–1264. doi:10.1007/s12010-012-9854-x.
- [56] I.M. Sims, A. Thomson, U. Hubl, N.G. Larsen, R.H. Furneaux, Characterisation of polysaccharides synthesised by *Gluconobacter oxydans* NCIMB 4943, *Carbohydr. Polym.* 45 (2001) 285–292. doi:10.1016/S0144-8617(00)00262-9.
- [57] J. Sadahiro, H. Mori, W. Saburi, M. Okuyama, A. Kimura, Extracellular and cell-associated forms of *Gluconobacter oxydans* dextran dextrinase change their localization depending on the cell growth, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 456 (2015) 500–505. doi:10.1016/j.bbrc.2014.11.115.
- [58] T. Kakuchi, A. Kusumo, M. Miura, H. Kaga, Cationic ring-opening polymerization of 1,6-anhydro-2,3,4-tri-O-allyl- $\beta$ -D-glucopyranose as a convenient synthesis of dextran, *Macromol. Rapid Commun.* 21 (2000) 1003–1006. doi:10.1002/1521-3927(20001001)21:15<1003::AID-MARC1003>3.0.CO;2-N.
- [59] T. Heinze, L. Brigitte, H. Stephanie, K. Polysaccharidforschung, F. Jena, Functional Polymers Based on Dextran, in: D. Klemm (Ed.), *Polysaccharides II*, © Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2006: pp. 199–291.
- [60] D. Kim, J.F. Robyt, S.Y. Lee, J.H. Lee, Y.M. Kim, Dextran molecular size and degree of branching as a function of sucrose concentration, pH, and temperature of reaction of *Leuconostoc mesenteroides* B-512FMCM dextranase, *Carbohydr. Res.* 338 (2003) 1183–1189. doi:10.1016/S0008-6215(03)00148-4.
- [61] A. Morin, Screening of polysaccharide-producing microorganisms, factors influencing the production and recovery of microbial polysaccharides, in: S. Dumitriu (Ed.), *Polysaccharides – Struct. Divers. Funct. Versatility*, Marcel Dekker Inc. Publication, New York, 1998: pp. 275–296.
- [62] X. Gao, B. Li, Chemical and microbiological characteristics of kefir grains and their fermented dairy products: A review, *Cogent Food Agric.* 2 (2016). doi:10.1080/23311932.2016.1272152.
- [63] F.W. Waldherr, V.M. Doll, D. Meißner, R.F. Vogel, Identification and characterization of a glucan-producing enzyme from *Lactobacillus hilgardii* TMW 1.828 involved in granule formation of water kefir, *Food Microbiol.* 27 (2010) 672–678. doi:10.1016/j.fm.2010.03.013.
- [64] M. Pidoux, The microbial flora of sugary kefir grain (the gingerbeer plant): biosynthesis of the grain from *Lactobacillus hilgardii* producing a polysaccharide gelFlore microbienne du grain de kefir sucré (plant de la bière de gingembre): biosynthèse du grain par Lact, *MIRCEN J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 5 (1989) 223–238. doi:10.1007/bf01741847.
- [65] A. Galli, E. Fiori, L. Franzetti, M.A. Pagani, G. Ottogalli, Composizione microbiologica e chimica dei granuli di Kefir «di frutta», *Ann. Microbiol. Enzimol.* 45 (1995) 85–95.
- [66] L. Franzetti, A. Galli, M.A. Pagani, I. De Noni, Microbiological and Chemical Investigations on “Sugar Kefir” Drink, *Ann. Microbiol.* 48 (1998) 67–80.
- [67] A. Gulitz, J. Stadie, M. Wenning, M.A. Ehrmann, R.F. Vogel, The microbial diversity of water kefir, *Int. J. Food Microbiol.* 151 (2011) 284–288. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2011.09.016.
- [68] M.G. da C.P. Miguel, P.G. Cardoso, K.T. Magalhães, R.F. Schwan, Profile of microbial communities present in tibico (sugary kefir) grains from different Brazilian States, *World J. Microbiol. Biotechnol.* 27 (2011) 1875–1884. doi:10.1007/s11274-010-0646-6.
- [69] T. Pogačić, S. Šinko, Š. Zamberlin, D. Samaržija, Microbiota of kefir grains, *Mljekarstvo.* 63 (2013) 3–14.
- [70] C. Garofalo, A. Osimani, V. Milanović, L. Aquilanti, F. De Filippis, G. Stellato, S. Di

- Mauro, B. Turchetti, P. Buzzini, D. Ercolini, F. Clementi, Bacteria and yeast microbiota in milk kefir grains from different Italian regions, *Food Microbiol.* 49 (2015) 123–133. doi:10.1016/j.fm.2015.01.017.
- [71] G.L. Garrote, A.G. Abraham, G.L. De Antoni, Chemical and microbiological characterisation of kefir grains., *J. Dairy Res.* 68 (2001) 639–52.
- [72] H. Radhouani, C. Gonçalves, F.R. Maia, J.M. Oliveira, R.L. Reis, Kefiran biopolymer: Evaluation of its physicochemical and biological properties, *J. Bioact. Compat. Polym.* 33 (2018) 461–478. doi:10.1177/0883911518793914.
- [73] Y. Wang, Z. Ahmed, W. Feng, C. Li, S. Song, Physicochemical properties of exopolysaccharide produced by *Lactobacillus kefiranofaciens* ZW3 isolated from Tibet kefir, *Int. J. Biol. Macromol.* 43 (2008) 283–288. doi:10.1016/j.ijbiomac.2008.06.011.
- [74] M. Pidoux, J.M. Brillouet, B. Quemener, Characterization of the polysaccharides from a *Lactobacillus brevis* and from sugary kefir grains, *Biotechnol. Lett.* 10 (1988) 415–420. doi:10.1007/BF01087442.
- [75] L. Fels, F. Jakob, R.F. Vogel, D. Wefers, Structural characterization of the exopolysaccharides from water kefir, *Carbohydr. Polym.* 189 (2018) 296–303. doi:10.1016/j.carbpol.2018.02.037.
- [76] J.M. Campelo, D. Luna, R. Luque, J.M. Marinas, A.A. Romero, Sustainable preparation of supported metal nanoparticles and their applications in catalysis, *ChemSusChem.* 2 (2009) 18–45. doi:10.1002/cssc.200800227.
- [77] K.M.M. Abou El-Nour, A. Eftaiha, A. Al-Warthan, R.A.A. Ammar, Synthesis and applications of silver nanoparticles, *Arab. J. Chem.* 3 (2010) 135–140. doi:10.1016/j.arabjc.2010.04.008.
- [78] S. Ahmed, M. Ahmad, B.L. Swami, S. Ikram, A review on plants extract mediated synthesis of silver nanoparticles for antimicrobial applications: A green expertise., *J. Adv. Res.* 7 (2016) 17–28. doi:10.1016/j.jare.2015.02.007.
- [79] S. Kundu, V. Maheshwari, S. Niu, R.F. Saraf, Polyelectrolyte mediated scalable synthesis of highly stable silver nanocubes in less than a minute using microwave irradiation, *Nanotechnology.* 19 (2008). doi:10.1088/0957-4484/19/6/065604.
- [80] J.H. Jung, H. Cheol Oh, H. Soo Noh, J.H. Ji, S. Soo Kim, Metal nanoparticle generation using a small ceramic heater with a local heating area, *J. Aerosol Sci.* 37 (2006) 1662–1670. doi:10.1016/j.jaerosci.2006.09.002.
- [81] T. Tsuji, T. Kakita, M. Tsuji, Preparation of nano-size particles of silver with femtosecond laser ablation in water, *Appl. Surf. Sci.* 206 (2003) 314–320. doi:10.1016/S0169-4332(02)01230-8.
- [82] M.M. Oliveira, D. Ugarte, D. Zanchet, A.J.G. Zarbin, Influence of synthetic parameters on the size, structure, and stability of dodecanethiol-stabilized silver nanoparticles, *J. Colloid Interface Sci.* 292 (2005) 429–435. doi:10.1016/j.jcis.2005.05.068.
- [83] P. Singh, Y.J. Kim, D. Zhang, D.C. Yang, Biological Synthesis of Nanoparticles from Plants and Microorganisms, *Trends Biotechnol.* 34 (2016) 588–599. doi:10.1016/j.tibtech.2016.02.006.
- [84] D. Sharma, S. Kanchi, K. Bisetty, Biogenic synthesis of nanoparticles: A review, *Arab. J. Chem.* (2015). doi:10.1016/j.arabjc.2015.11.002.
- [85] A.K. Shukla, S. Iravani, Metallic nanoparticles: green synthesis and spectroscopic characterization, *Environ. Chem. Lett.* 15 (2017) 223–231. doi:10.1007/s10311-017-0618-2.
- [86] G. Sathiyarayanan, K. Dineshkumar, Y.H. Yang, Microbial exopolysaccharide-mediated synthesis and stabilization of metal nanoparticles, *Crit. Rev. Microbiol.* 43 (2017) 731–752. doi:10.1080/1040841X.2017.1306689.
- [87] P. Kanmani, S.T. Lim, Synthesis and characterization of pullulan-mediated silver nanoparticles and its antimicrobial activities, *Carbohydr. Polym.* 97 (2013) 421–428. doi:10.1016/j.carbpol.2013.04.048.
- [88] K.P. Bankura, D. Maity, M.M.R. Mollick, D. Mondal, B. Bhowmick, M.K. Bain, A.

- Chakraborty, J. Sarkar, D. Chattopadhyay, Synthesis, characterization and antimicrobial activity of dextran stabilized silver nanoparticles in aqueous medium, *Carbohydr. Polym.* 89 (2012) 1159–1165.
- [89] M. Alsawafta, Optical properties of metallic nanoparticles and metallic nanocomposite materials, Concordia University, 2012.
- [90] U. Bogdanović, Sinteza, karakterizacija i primena nanočestica bakra i zlata i njihovih kompozita sa polianilinom, Univerzitet u Beogradu, 2016.
- [91] I. Khan, K. Saeed, I. Khan, Nanoparticles: Properties, applications and toxicities, *Arab. J. Chem.* (2017). doi:10.1016/j.arabjc.2017.05.011.
- [92] S. Upstone, Ultraviolet/visible light absorption spectrophotometry in clinical chemistry, in: *Encycl. Anal. Chem.*, 2000: pp. 1699–1714. doi:10.1002/9780470027318.a0547.
- [93] K.N. Thakkar, S.S. Mhatre, R.Y. Parikh, Biological synthesis of metallic nanoparticles, *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* 6 (2010) 257–262. doi:10.1016/j.nano.2009.07.002.
- [94] X.M. Liu, G.P. Sheng, H.W. Luo, F. Zhang, S.J. Yuan, J. Xu, R.J. Zeng, J.G. Wu, H.Q. Yu, Contribution of extracellular polymeric substances (EPS) to the sludge aggregation, *Environ. Sci. Technol.* 44 (2010) 4355–4360. doi:10.1021/es9016766.
- [95] G.A. Martínez-Castañón, N. Niño-Martínez, F. Martínez-Gutierrez, J.R. Martínez-Mendoza, F. Ruiz, Synthesis and antibacterial activity of silver nanoparticles with different sizes, *J. Nanoparticle Res.* 10 (2008) 1343–1348. doi:10.1007/s11051-008-9428-6.
- [96] Y. Sun, Y. Xia, Shape-controlled synthesis of gold and silver nanoparticles, *Science.* 298 (2002) 2176–2179. doi:10.1126/science.1077229.
- [97] C.J. Murphy, T.K. Sau, A.M. Gole, C.J. Orendorff, J. Gao, L. Gou, S.E. Hunyadi, T. Li, Anisotropic Metal Nanoparticles: Synthesis, Assembly, and Optical Applications, *J. Phys. Chem. B.* 109 (2005) 13857–13870. doi:10.1021/jp0516846.
- [98] S. Mukherji, S. Bharti, G. Shukla, S. Mukherji, Synthesis and characterization of size- and shape-controlled silver nanoparticles, *Phys. Sci. Rev.* 4 (2018) 1–73. doi:10.1515/psr-2017-0082.
- [99] S. Agnihotri, S. Mukherji, S. Mukherji, Size-controlled silver nanoparticles synthesized over the range 5–100 nm using the same protocol and their antibacterial efficacy, *RSC Adv.* 4 (2014) 3974–3983. doi:10.1039/C3RA44507K.
- [100] X. Dong, X. Ji, J. Jing, M. Li, J. Li, W. Yang, Synthesis of triangular silver nanoprisms by stepwise reduction of sodium borohydride and trisodium citrate, *J. Phys. Chem. C.* 114 (2010) 2070–2074. doi:10.1021/jp909964k.
- [101] E. Roy, S. Patra, S. Saha, R. Madhuri, P.K. Sharma, Shape-specific silver nanoparticles prepared by microwave-assisted green synthesis using pomegranate juice for bacterial inactivation and removal, *RSC Adv.* 5 (2015) 95433–95442. doi:10.1039/c5ra18575k.
- [102] J.B. Hall, M.A. Dobrovolskaia, A.K. Patri, S.E. McNeil, Characterization of nanoparticles for therapeutics, *Nanomedicine.* 2 (2007) 789–803. doi:10.2217/17435889.2.6.789.
- [103] A. Bootz, V. Vogel, D. Schubert, J. Kreuter, Comparison of scanning electron microscopy, dynamic light scattering and analytical ultracentrifugation for the sizing of poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 57 (2004) 369–375. doi:10.1016/S0939-6411(03)00193-0.
- [104] P.C. Lin, S. Lin, P.C. Wang, R. Sridhar, Techniques for physicochemical characterization of nanomaterials, *Biotechnol. Adv.* 32 (2014) 711–726. doi:10.1016/j.biotechadv.2013.11.006.
- [105] M.A. Dobrovolskaia, A.K. Patri, J. Zheng, J.D. Clogston, N. Ayub, P. Aggarwal, B.W. Neun, J.B. Hall, S.E. McNeil, Interaction of colloidal gold nanoparticles with human blood: effects on particle size and analysis of plasma protein binding profiles, *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* 5 (2009) 106–117. doi:10.1016/j.nano.2008.08.001.

- [106] S. Sanyasi, R.K. Majhi, S. Kumar, M. Mishra, A. Ghosh, M. Suar, P.V. Satyam, H. Mohapatra, C. Goswami, L. Goswami, Polysaccharide-capped silver Nanoparticles inhibit biofilm formation and eliminate multi-drug-resistant bacteria by disrupting bacterial cytoskeleton with reduced cytotoxicity towards mammalian cells, *Sci. Rep.* 6 (2016). doi:10.1038/srep24929.
- [107] D.K. Carpenter, *Dynamic Light Scattering with Applications to Chemistry, Biology, and Physics* (Berne, Bruce J.; Pecora, Robert), *J. Chem. Educ.* 54 (2009) A430. doi:10.1021/ed054pa430.1.
- [108] N. Chouhan, *Silver Nanoparticles: Fabrication, Characterization and Applications*, in: K. Maaz (Ed.), *Silver Nanoparticles - Fabr. Charact. Appl.*, IntechOpen, 2018: pp. 21–57. doi:10.5772/intechopen.71247.
- [109] N.L. Rosi, C.A. Mirkin, Nanostructures in biodiagnostics, *Chem. Rev.* 105 (2005) 1547–1562. doi:10.1021/cr030067f.
- [110] D. Vilela, M.C. González, A. Escarpa, Sensing colorimetric approaches based on gold and silver nanoparticles aggregation: Chemical creativity behind the assay. A review, *Anal. Chim. Acta.* 751 (2012) 24–43. doi:10.1016/j.aca.2012.08.043.
- [111] H. Su, H. Fan, S. Ai, N. Wu, H. Fan, P. Bian, J. Liu, Selective determination of melamine in milk samples using 3-mercapto-1-propanesulfonate-modified gold nanoparticles as colorimetric probe, *Talanta.* 85 (2011) 1338–1343. doi:10.1016/j.talanta.2011.06.017.
- [112] Z. Chen, Y. Huang, X. Li, T. Zhou, H. Ma, H. Qiang, Y. Liu, Colorimetric detection of potassium ions using aptamer-functionalized gold nanoparticles, *Anal. Chim. Acta.* 787 (2013) 189–192. doi:10.1016/j.aca.2013.05.020.
- [113] X.H. Yang, J. Ling, J. Peng, Q.E. Cao, Z.T. Ding, L.C. Bian, A colorimetric method for highly sensitive and accurate detection of iodide by finding the critical color in a color change process using silver triangular nanoplates, *Anal. Chim. Acta.* 798 (2013) 74–81. doi:10.1016/j.aca.2013.08.037.
- [114] K.B. Narayanan, S.S. Han, Colorimetric detection of manganese(II) ions using alginate-stabilized silver nanoparticles, *Res. Chem. Intermed.* 43 (2017) 5665–5674. doi:10.1007/s11164-017-2954-z.
- [115] H.I. Peng, B.L. Miller, Recent advancements in optical DNA biosensors: Exploiting the plasmonic effects of metal nanoparticles, *Analyst.* 136 (2011) 436–447. doi:10.1039/c0an00636j.
- [116] P.D. Selid, H. Xu, E.M. Collins, M.S. Face-Collins, J.X. Zhao, Sensing mercury for biomedical and environmental monitoring, *Sensors.* 9 (2009) 5446–5459. doi:10.3390/s90705446.
- [117] H. Guan, J. Yu, D. Chi, Label-free colorimetric sensing of melamine based on chitosan-stabilized gold nanoparticles probes, *Food Control.* 32 (2013) 35–41. doi:10.1016/j.foodcont.2012.11.041.
- [118] S. Pandey, G.K. Goswami, K.K. Nanda, Green synthesis of biopolymer-silver nanoparticle nanocomposite: An optical sensor for ammonia detection, *Int. J. Biol. Macromol.* 51 (2012) 583–589. doi:10.1016/j.ijbiomac.2012.06.033.
- [119] S. Pandey, G.K. Goswami, K.K. Nanda, Green synthesis of polysaccharide/gold nanoparticle nanocomposite: An efficient ammonia sensor, *Carbohydr. Polym.* 94 (2013) 229–234. doi:10.1016/j.carbpol.2013.01.009.
- [120] L.P. Osman, S.C. Mitchell, R.H. Waring, Cysteine, its Metabolism and Toxicity, *Sulfur Reports.* 20 (1997) 155–172. doi:10.1080/01961779708047918.
- [121] W. Dröge, V. Hack, R. Breitkreutz, E. Holm, G. Shubinsky, E. Schmid, D. Galter, Role of cysteine and glutathione in signal transduction, immunopathology and cachexia, in: *BioFactors*, 1998: pp. 97–102. doi:10.1002/biof.5520080117.
- [122] W. Wang, O. Rusin, X. Xu, K.K. Kim, J.O. Escobedo, S.O. Fakayode, K.A. Fletcher, M. Lowry, C.M. Schowalter, C.M. Lawrence, F.R. Fronczek, I.M. Warner, R.M. Strongin, Detection of homocysteine and cysteine, *J. Am. Chem. Soc.* 127 (2005) 15949–15958.



- doi:10.1021/ja054962n.
- [123] L. El-Khairi, P.M. Ueland, H. Refsum, I.M. Graham, S.E. Vollset, Plasma Total Cysteine as a Risk Factor for Vascular Disease, *Circulation*. 103 (2001) 2544–2549. doi:10.1161/01.cir.103.21.2544.
- [124] S. Jongjinakool, K. Palasak, N. Bousod, S. Teepoo, Gold nanoparticles-based colorimetric sensor for cysteine detection, in: *Energy Procedia*, 2014: pp. 10–18. doi:10.1016/j.egypro.2014.07.126.
- [125] N. Ohshima, H. Nagase, T. Koshino, M. Miyamasu, M. Yamaguchi, K. Hirai, K. Yamamoto, T. Fujisawa, N. Nakagawa, K. Kishikawa, Y. Morita, A functional study on CysLT 1 receptors in human eosinophils, *Int. Arch. Allergy Immunol.* 129 (2002) 67–75. doi:10.1159/000065175.
- [126] Z. Csoma, S.A. Kharitonov, B. Balint, A. Bush, N.M. Wilson, P.J. Barnes, Increased leukotrienes in exhaled breath condensate in childhood asthma, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 166 (2002) 1345–1349. doi:10.1164/rccm.200203-233OC.
- [127] S.A. McFadden, Phenotypic variation in xenobiotic metabolism and adverse environmental response: Focus on sulfur-dependent detoxification pathways, in: *Toxicology*, 1996: pp. 43–65. doi:10.1016/0300-483X(96)03392-6.
- [128] C. Han, K. Xu, Q. Liu, X. Liu, J. Li, Colorimetric sensing of cysteine using label-free silver nanoparticles, *Sensors Actuators, B Chem.* 202 (2014) 574–582. doi:10.1016/j.snb.2014.05.139.
- [129] J.S. Lee, P.A. Ulmann, M.S. Han, C.A. Mirkin, A DNA - Gold nanoparticle-based colorimetric competition assay for the detection of cysteine, *Nano Lett.* 8 (2008) 529–533. doi:10.1021/nl0727563.
- [130] A. Ravindran, V. Mani, N. Chandrasekaran, A. Mukherjee, Selective colorimetric sensing of cysteine in aqueous solutions using silver nanoparticles in the presence of Cr<sup>3+</sup>, *Talanta*. 85 (2011) 533–540. doi:10.1016/j.talanta.2011.04.031.
- [131] Z. Chen, S. Luo, C. Liu, Q. Cai, Simple and sensitive colorimetric detection of cysteine based on ssDNA-stabilized gold nanoparticles, *Anal. Bioanal. Chem.* 395 (2009) 489–494. doi:10.1007/s00216-009-2982-7.
- [132] J.S. Lee, A.K.R. Lytton-Jean, S.J. Hurst, C.A. Mirkin, Silver nanoparticle - Oligonucleotide conjugates based on DNA with triple cyclic disulfide moieties, *Nano Lett.* 7 (2007) 2112–2115. doi:10.1021/nl071108g.
- [133] M. Rai, A. Yadav, A. Gade, Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials, *Biotechnol. Adv.* 27 (2009) 76–83. doi:10.1016/j.biotechadv.2008.09.002.
- [134] M. Valodkar, P.S. Rathore, R.N. Jadeja, M. Thounaojam, R. V. Devkar, S. Thakore, Cytotoxicity evaluation and antimicrobial studies of starch capped water soluble copper nanoparticles, *J. Hazard. Mater.* (2012). doi:10.1016/j.jhazmat.2011.11.077.
- [135] T.H.D. Nguyen, B. Vardhanabhuti, M. Lin, A. Mustapha, Antibacterial properties of selenium nanoparticles and their toxicity to Caco-2 cells, *Food Control*. 77 (2017) 17–24. doi:10.1016/j.foodcont.2017.01.018.
- [136] P.A. Tran, N. O'Brien-Simpson, E.C. Reynolds, N. Pantarat, D.P. Biswas, A.J. O'Connor, Low cytotoxic trace element selenium nanoparticles and their differential antimicrobial properties against *S. aureus* and *E. coli*, *Nanotechnology*. 27 (2015). doi:10.1088/0957-4484/27/4/045101.
- [137] E. Lima, R. Guerra, V. Lara, A. Guzmán, Gold nanoparticles as efficient antimicrobial agents for *Escherichia coli* and *Salmonella typhi*, *Chem. Cent. J.* 7 (2013). doi:10.1186/1752-153X-7-11.
- [138] Y. Zhang, T.P. Shareena Dasari, H. Deng, H. Yu, Antimicrobial Activity of Gold Nanoparticles and Ionic Gold, *J. Environ. Sci. Heal. - Part C Environ. Carcinog. Ecotoxicol. Rev.* 33 (2015) 286–327. doi:10.1080/10590501.2015.1055161.
- [139] S. Prabhu, E.K. Poulouse, Silver nanoparticles: mechanism of antimicrobial action, synthesis, medical applications, and toxicity effects, *Int. Nano Lett.* 2 (2012). doi:10.1186/2228-5326-2-32.

- [140] C. Wang, X. Gao, Z. Chen, Y. Chen, H. Chen, Preparation, characterization and application of polysaccharide-based metallic nanoparticles: A review, *Polymers (Basel)*. 9 (2017). doi:10.3390/polym9120689.
- [141] K.S. Siddiqi, A. Husen, R.A.K. Rao, A review on biosynthesis of silver nanoparticles and their biocidal properties, *J. Nanobiotechnology*. 16 (2018). doi:10.1186/s12951-018-0334-5.
- [142] O. Choi, Z. Hu, Size dependent and reactive oxygen species related nanosilver toxicity to nitrifying bacteria, *Environ. Sci. Technol.* 42 (2008) 4583–4588. doi:10.1021/es703238h.
- [143] O. Choi, K.K. Deng, N.J. Kim, L. Ross, R.Y. Surampalli, Z. Hu, The inhibitory effects of silver nanoparticles, silver ions, and silver chloride colloids on microbial growth, *Water Res.* 42 (2008) 3066–3074. doi:10.1016/j.watres.2008.02.021.
- [144] L. Salvioni, E. Galbiati, V. Collico, G. Alessio, S. Avvakumova, F. Corsi, P. Tortora, D. Prosperi, M. Colombo, Negatively charged silver nanoparticles with potent antibacterial activity and reduced toxicity for pharmaceutical preparations, *Int. J. Nanomedicine*. 12 (2017) 2517–2530. doi:10.2147/IJN.S127799.
- [145] S. Agnihotri, S. Mukherji, S. Mukherji, Immobilized silver nanoparticles enhance contact killing and show highest efficacy: Elucidation of the mechanism of bactericidal action of silver, *Nanoscale*. 5 (2013) 7328–7340. doi:10.1039/c3nr00024a.
- [146] B. Le Ouay, F. Stellacci, Antibacterial activity of silver nanoparticles: A surface science insight, *Nano Today*. 10 (2015) 339–354. doi:10.1016/j.nantod.2015.04.002.
- [147] G. Franci, A. Falanga, S. Galdiero, L. Palomba, M. Rai, G. Morelli, M. Galdiero, Silver nanoparticles as potential antibacterial agents, *Molecules*. 20 (2015) 8856–8874. doi:10.3390/molecules20058856.
- [148] S. Silver, Bacterial silver resistance: Molecular biology and uses and misuses of silver compounds, *FEMS Microbiol. Rev.* 27 (2003) 341–353. doi:10.1016/S0168-6445(03)00047-0.
- [149] Y. Matsumura, K. Yoshikata, S. ichi Kunisaki, T. Tsuchido, Mode of bactericidal action of silver zeolite and its comparison with that of silver nitrate, *Appl. Environ. Microbiol.* 69 (2003) 4278–4281. doi:10.1128/AEM.69.7.4278-4281.2003.
- [150] F. Mirzajani, A. Ghassempour, A. Aliahmadi, M.A. Esmaeili, Antibacterial effect of silver nanoparticles on *Staphylococcus aureus*, *Res. Microbiol.* 162 (2011) 542–549. doi:10.1016/j.resmic.2011.04.009.
- [151] E. Imam, Z. Tomass, H. Assefa, A. Yalew, Antibacterial Activity of Argemone mexicana Seeds Extract Against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, *J. Biol. Act. Prod. from Nat.* 1 (2011) 332–339. doi:10.1080/22311866.2011.10719101.
- [152] K.J. Woo, C.K. Hye, W.K. Ki, S. Shin, H.K. So, H.P. Yong, Antibacterial activity and mechanism of action of the silver ion in *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, *Appl. Environ. Microbiol.* 74 (2008) 2171–2178. doi:10.1128/AEM.02001-07.
- [153] J.S.J.H.J.S.J.H. Kim, E. Kuk, K.N. Yu, J.S.J.H.J.S.J.H. Kim, S.J. Park, H.J. Lee, S.H. Kim, Y.H.Y.K. Park, Y.H.Y.K. Park, C.Y. Hwang, Y.K. Kim, Y.S. Lee, D.H. Jeong, M.H. Cho, Antimicrobial effects of silver nanoparticles, *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* 3 (2007) 95–101. doi:10.1016/j.nano.2006.12.001.
- [154] Q.L. Feng, J. Wu, G.Q. Chen, F.Z. Cui, T.N. Kim, J.O. Kim, A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, *J. Biomed. Mater. Res.* 52 (2000) 662–668. doi:10.1002/1097-4636(20001215)52:4<662::AID-JBM10>3.0.CO;2-3.
- [155] I. Sondi, B. Salopek-Sondi, Silver nanoparticles as antimicrobial agent: A case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria, *J. Colloid Interface Sci.* 275 (2004) 177–182. doi:10.1016/j.jcis.2004.02.012.
- [156] L. Wang, C. Hu, L. Shao, The antimicrobial activity of nanoparticles: Present situation and prospects for the future, *Int. J. Nanomedicine*. 12 (2017) 1227–1249. doi:10.2147/IJN.S121956.

- [157] M. Danilczuk, A. Lund, J. Sadlo, H. Yamada, J. Michalik, Conduction electron spin resonance of small silver particles, *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 63 (2006) 189–191. doi:10.1016/j.saa.2005.05.002.
- [158] D. Li, Z. Liu, Y. Yuan, Y. Liu, F. Niu, Green synthesis of gallic acid-coated silver nanoparticles with high antimicrobial activity and low cytotoxicity to normal cells, *Process Biochem.* 50 (2015) 357–366. doi:10.1016/j.procbio.2015.01.002.
- [159] S. Pal, Y.K. Tak, J.M. Song, Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the gram-negative bacterium *Escherichia coli*, *Appl. Environ. Microbiol.* 73 (2007) 1712–1720. doi:10.1128/AEM.02218-06.
- [160] E.Z. Gomaa, Silver nanoparticles as an antimicrobial agent: A case study on *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* as models for gram-positive and gram-negative bacteria, *J. Gen. Appl. Microbiol.* 63 (2017) 36–43. doi:10.2323/jgam.2016.07.004.
- [161] S.F. Musa, T.S. Yeat, L.Z.M. Kamal, Y.M. Tabana, M.A. Ahmed, A. El Ouweini, V. Lim, L.C. Keong, D. Sandai, Pleurotus sajor-caju can be used to synthesize silver nanoparticles with antifungal activity against *Candida albicans*, *J. Sci. Food Agric.* 98 (2018) 1197–1207. doi:10.1002/jsfa.8573.
- [162] M. Qasim, B.R. Singh, A.H. Naqvi, P. Paik, D. Das, Silver nanoparticles embedded mesoporous SiO<sub>2</sub> nanosphere: An effective anticandidal agent against *Candida albicans* 077, *Nanotechnology.* 26 (2015). doi:10.1088/0957-4484/26/28/285102.
- [163] L. Guo, W. Yuan, Z. Lu, C.M. Li, Polymer/nanosilver composite coatings for antibacterial applications, *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 439 (2013) 69–83. doi:10.1016/j.colsurfa.2012.12.029.
- [164] S.U. Khan, T.A. Saleh, A. Wahab, M.H.U. Khan, D. Khan, W.U. Khan, A. Rahim, S. Kamal, F.U. Khan, S. Fahad, Nanosilver: New ageless and versatile biomedical therapeutic scaffold, *Int. J. Nanomedicine.* 13 (2018) 733–762. doi:10.2147/IJN.S153167.
- [165] F. Faedmaleki, F.H. Shirazi, A.A. Salarian, H.A. Ashtiani, H. Rastegar, Toxicity effect of silver nanoparticles on mice liver primary cell culture and HepG2 cell line, *Iran. J. Pharm. Res.* 13 (2014) 235–242.
- [166] M.E. Samberg, S.J. Oldenburg, N.A. Monteiro-Riviere, Evaluation of silver nanoparticle toxicity in skin in vivo and keratinocytes in vitro, *Environ. Health Perspect.* 118 (2010) 407–413. doi:10.1289/ehp.0901398.
- [167] A.R. Gliga, S. Skoglund, I. Odnevall Wallinder, B. Fadeel, H.L. Karlsson, Size-dependent cytotoxicity of silver nanoparticles in human lung cells: The role of cellular uptake, agglomeration and Ag release, *Part. Fibre Toxicol.* 11 (2014). doi:10.1186/1743-8977-11-11.
- [168] C.L. Huang, I.L. Hsiao, H.C. Lin, C.F. Wang, Y.J. Huang, C.Y. Chuang, Silver nanoparticles affect on gene expression of inflammatory and neurodegenerative responses in mouse brain neural cells, *Environ. Res.* 136 (2015) 253–263. doi:10.1016/j.envres.2014.11.006.
- [169] R. Vazquez-Muñoz, B. Borrego, K. Juárez-Moreno, M. García-García, J.D. Mota Morales, N. Bogdanchikova, A. Huerta-Saquero, Toxicity of silver nanoparticles in biological systems: Does the complexity of biological systems matter?, *Toxicol. Lett.* 276 (2017) 11–20. doi:10.1016/j.toxlet.2017.05.007.
- [170] N.R. Chowdhury, M. MacGregor-Ramiasa, P. Zilm, P. Majewski, K. Vasilev, ‘Chocolate’ silver nanoparticles: Synthesis, antibacterial activity and cytotoxicity, *J. Colloid Interface Sci.* 482 (2016) 151–158. doi:10.1016/j.jcis.2016.08.003.
- [171] M. Ahamed, M. Karns, M. Goodson, J. Rowe, S.M. Hussain, J.J. Schlager, Y. Hong, DNA damage response to different surface chemistry of silver nanoparticles in mammalian cells, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 233 (2008) 404–410. doi:10.1016/j.taap.2008.09.015.

- [172] A.R. Silva, G. Unali, Controlled silver delivery by silver-cellulose nanocomposites prepared by a one-pot green synthesis assisted by microwaves, *Nanotechnology*. 22 (2011). doi:10.1088/0957-4484/22/31/315605.
- [173] S. Shankar, J.W. Rhim, Amino acid mediated synthesis of silver nanoparticles and preparation of antimicrobial agar/silver nanoparticles composite film, *Carbohydr. Polym.* 130 (2015) 353–363. doi:10.1016/j.carbpol.2015.05.018.
- [174] V. Ilić, Z. Šaponjić, V. Vodnik, D. Mihailović, P. Jovančić, J. Nedeljković, M. Radetić, The study of coloration and antibacterial efficiency of corona activated dyed polyamide and polyester fabrics loaded with Ag nanoparticles, *Fibers Polym.* 10 (2009) 650–656. doi:10.1007/s12221-010-0650-3.
- [175] H.J. Lee, S.H. Jeong, Bacteriostasis and Skin Innoxiousness of Nanosize Silver Colloids on Textile Fabrics, *Text. Res. J.* 75 (2005) 551–556. doi:10.1177/0040517505053952.
- [176] T. Yuranova, A.G. Rincon, A. Bozzi, S. Parra, C. Pulgarin, P. Albers, J. Kiwi, Antibacterial textiles prepared by RF-plasma and vacuum-UV mediated deposition of silver, *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* 161 (2003) 27–34. doi:10.1016/S1010-6030(03)00204-1.
- [177] N. Durán, P.D. Marcato, G.I.H. De Souza, O.L. Alves, E. Esposito, Antibacterial effect of silver nanoparticles produced by fungal process on textile fabrics and their effluent treatment, *J. Biomed. Nanotechnol.* 3 (2007) 203–208. doi:10.1166/jbn.2007.022.
- [178] D. Pohle, C. Damm, J. Neuhof, A. Rösch, H. Münstedt, Antimicrobial properties of orthopaedic textiles after in-situ deposition of silver nanoparticles, *Polym. Polym. Compos.* 15 (2007) 357–363.
- [179] M. Radetić, V. Ilić, V. Vodnik, S. Dimitrijević, P. Jovančić, Z. Šaponjić, J.M. Nedeljković, Antibacterial effect of silver nanoparticles deposited on corona-treated polyester and polyamide fabrics, *Polym. Adv. Technol.* 19 (2008) 1816–1821. doi:10.1002/pat.1205.
- [180] M. Milošević, Z. Šaponjić, T. Nunney, C. Deeks, M. Radoičić, M. Mitrić, T. Radetić, M. Radetić, In situ photoreduction of Ag<sup>+</sup> ions on the surface of titania nanotubes deposited on cotton and cotton/PET fabrics, *Cellulose*. 24 (2017) 1597–1610. doi:10.1007/s10570-017-1207-z.
- [181] M. Milošević, M. Radoičić, Z. Šaponjić, T. Nunney, C. Deeks, V. Lazić, M. Mitrić, T. Radetić, M. Radetić, In situ photoreduction of Ag<sup>+</sup> ions by TiO<sub>2</sub> nanoparticles deposited on cotton and cotton/PET fabrics, *Cellulose*. 21 (2014) 3781–3795. doi:10.1007/s10570-014-0373-5.
- [182] V. Ilić, Z. Šaponjić, V. Vodnik, B. Potkonjak, P. Jovančić, J. Nedeljković, M. Radetić, The influence of silver content on antimicrobial activity and color of cotton fabrics functionalized with Ag nanoparticles, *Carbohydr. Polym.* 78 (2009) 564–569. doi:10.1016/j.carbpol.2009.05.015.
- [183] M. Gorjanc, F. Kovač, M. Gorenšek, The influence of vat dyeing on the adsorption of synthesized colloidal silver onto cotton fabrics, *Text. Res. J.* 82 (2012) 62–69. doi:10.1177/0040517511420754.
- [184] M. Radetić, Functionalization of textile materials with silver nanoparticles, *J. Mater. Sci. Sci.* 48 (2013) 95–107. doi:10.1007/s10853-012-6677-7.
- [185] Y. Wu, Y. Yang, Z. Zhang, Z. Wang, Y. Zhao, L. Sun, Fabrication of cotton fabrics with durable antibacterial activities finishing by Ag nanoparticles, *Text. Res. J.* 89 (2019) 867–880. doi:10.1177/0040517518758002.
- [186] T. Baygar, N. Sarac, A. Ugur, I.R. Karaca, Antimicrobial characteristics and biocompatibility of the surgical sutures coated with biosynthesized silver nanoparticles, *Bioorg. Chem.* 86 (2019) 254–258. doi:10.1016/j.bioorg.2018.12.034.
- [187] M. Balamurugan, S. Saravanan, T. Soga, Coating of green-synthesized silver nanoparticles on cotton fabric, *J. Coatings Technol. Res.* 14 (2017) 735–745. doi:10.1007/s11998-016-9894-1.
- [188] K.M.F. Hasan, M.N. Pervez, M.E. Talukder, M.Z. Sultana, S. Mahmud, M.M. Meraz, V.

- Bansal, C. Genyang, A novel coloration of polyester fabric through green silver nanoparticles (G-AgNPs@PET), *Nanomaterials*. 9 (2019). doi:10.3390/nano9040569.
- [189] Shahid-ul-Islam, B.S. Butola, A. Gupta, A. Roy, Multifunctional finishing of cellulosic fabric via facile, rapid in-situ green synthesis of AgNPs using pomegranate peel extract biomolecules, *Sustain. Chem. Pharm.* 12 (2019). doi:10.1016/j.scp.2019.100135.
- [190] Shahid-ul-Islam, B.S. Butola, D. Verma, Facile synthesis of chitosan-silver nanoparticles onto linen for antibacterial activity and free-radical scavenging textiles, *Int. J. Biol. Macromol.* 133 (2019) 1134–1141. doi:10.1016/j.ijbiomac.2019.04.186.
- [191] V. Trinetta, Definition and Function of Food Packaging, in: *Ref. Modul. Food Sci.*, Elsevier Inc., 2016: pp. 1–2. doi:10.1016/b978-0-08-100596-5.03319-9.
- [192] J.W. Han, L. Ruiz-Garcia, J.P. Qian, X.T. Yang, Food Packaging: A Comprehensive Review and Future Trends, *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 17 (2018) 860–877. doi:10.1111/1541-4337.12343.
- [193] Plastics Europe, PLASTICS IN PACKAGING, (n.d.). <https://www.plasticseurope.org/en/about-plastics/packaging> (accessed August 5, 2019).
- [194] Plastics Europe, Plastics - the Fact 2018, Brussels, 2018. doi:10.1016/j.marpolbul.2013.01.015.
- [195] Plastics Europe, Plastics - the Facts 2015, Brussels, 2015. doi:10.1016/j.marpolbul.2013.01.015.
- [196] Plastics Europe, Plastic Packaging: Born to protect, Brussels, 2012.
- [197] A.R.V. Ferreira, V.D. Alves, I.M. Coelho, Polysaccharide-based membranes in food packaging applications, *Membranes (Basel)*. 6 (2016) 1–17. doi:10.3390/membranes6020022.
- [198] R. Geyer, J.R. Jambeck, K.L. Law, Production, use, and fate of all plastics ever made, *Sci. Adv.* 3 (2017). doi:10.1126/sciadv.1700782.
- [199] D. Plackett, Introductory overview, in: *Biopolym. New Mater. Sustain. Film. Coatings*, Wiley, Chichester, UK, 2011: pp. 1–14.
- [200] F. Galgano, N. Condelli, F. Favati, V. Di Bianco, G. Perretti, M.C. Caruso, Biodegradable packaging and edible coating for fresh-cut fruits and vegetables, *Ital. J. Food Sci.* 27 (2015) 1–20.
- [201] G. Mensitieri, E. Di Maio, G.G. Buonocore, I. Nedi, M. Oliviero, L. Sansone, S. Iannace, Processing and shelf life issues of selected food packaging materials and structures from renewable resources, *Trends Food Sci. Technol.* 22 (2011) 72–80. doi:10.1016/j.tifs.2010.10.001.
- [202] R.K. Dhall, Application of Edible Coatings on Fruits and Vegetables, in: *Biobased Environ. Benign Coatings*, 2016: pp. 87–119. doi:10.1002/9781119185055.ch4.
- [203] I.G. Donhowe, O. Fennema, Edible films and coatings: characteristics, formation, definitions, and testing methods, in: J.M. Krochta, E.A. Baldwin, M. Nisperos-Carriedo, P.A. Lanchaster (Eds.), *Edible Coatings Films to Improv. Food Qual.*, Technomic Publishing Company, 1994: pp. 1–24.
- [204] J.H. Han, New technologies in food packaging : overview, in: J.H. Han (Ed.), *Innov. Food Packag.*, Elsevier Science & Technology Books, 2005: pp. 3–11.
- [205] K. Dangan, P.M. Tomasula, P. Qi, Structure and Function of Protein-Based Edible Films and Coatings, in: K.C. Huber, M.E. Embuscado (Eds.), *Edible Film. Coatings Food Appl.*, Springer New York, New York, NY, 2009: pp. 25–56. doi:10.1007/978-0-387-92824-1.
- [206] M. Lacroix, Mechanical and Permeability Properties of Edible Films and Coatings for Food and Pharmaceutical Applications, in: K.C. Huber, M.E. Embuscado (Eds.), *Edible Film. Coatings Food Appl.*, Springer New York, New York, NY, 2009: pp. 347–366. doi:10.1007/978-0-387-92824-1.
- [207] P. Cazón, G. Velazquez, J.A. Ramírez, M. Vázquez, Polysaccharide-based films and coatings for food packaging: A review, *Food Hydrocoll.* 68 (2017) 136–148. doi:10.1016/j.foodhyd.2016.09.009.

- [208] V. Siracusa, P. Rocculi, S. Romani, M.D. Rosa, Biodegradable polymers for food packaging: a review, *Trends Food Sci. Technol.* 19 (2008) 634–643. doi:10.1016/j.tifs.2008.07.003.
- [209] P.K. Dutta, S. Tripathi, G.K. Mehrotra, J. Dutta, Perspectives for chitosan based antimicrobial films in food applications, *Food Chem.* 114 (2009) 1173–1182. doi:10.1016/j.foodchem.2008.11.047.
- [210] M.G.A. Vieira, M.A. Da Silva, L.O. Dos Santos, M.M. Beppu, Natural-based plasticizers and biopolymer films: A review, *Eur. Polym. J.* 47 (2011) 254–263. doi:10.1016/j.eurpolymj.2010.12.011.
- [211] Z. Berk, *Food Process Engineering and Technology*, Elsevier, 2009. doi:10.1016/B978-0-12-373660-4.X0001-4.
- [212] O. Skurtys, C. Acevedo, F. Pedreschi, J. Enronoe, F. Osorio, J.M.M. Aguilera, Food hydrocolloid edible films and coatings, *Food Hydrocolloid Edible Film. Coatings.* (2011) 1–66.
- [213] A. Nešić, Ružić Jovana, M. Gordić, S. Ostojić, D. Micić, A. Onjia, Pectin-polyvinylpyrrolidone films: A sustainable approach to the development of biobased packaging materials, *Compos. Part B.* 110 (2017) 56–61.
- [214] A. Nešić, M. Gordić, S. Davidović, Ž. Radovanović, J. Nedeljković, I. Smirnova, P. Gurikov, Pectin-based nanocomposite aerogels for potential insulated food packaging application, *Carbohydr. Polym.* 195 (2018). doi:10.1016/j.carbpol.2018.04.076.
- [215] A.C. Oluwaseun, A. Arowora Kayode, F.O. Bolajoko, A.J. Bunmi, A.R. Olagbaju, Effect of edible coatings of carboxy methyl cellulose and corn starch on cucumber stored at ambient temperature, *Asian J. Agric. Biol.* 1 (2013) 133–140.
- [216] C. Mannozi, J.P. Cecchini, U. Tylewicz, L. Siroli, F. Patrignani, R. Lanciotti, P. Rocculi, M. Dalla Rosa, S. Romani, Study on the efficacy of edible coatings on quality of blueberry fruits during shelf-life, *LWT - Food Sci. Technol.* 85 (2017) 440–444. doi:10.1016/j.lwt.2016.12.056.
- [217] H.M. Hamzah, A. Osman, F. Mohamad Ghazali, C.P. Tan, Quality changes of papaya (*Carica papaya* L. 'Eksotika') as affected by different concentrations of chitosan and glycerol, in: *Acta Hort.*, International Society for Horticultural Science, 2013: pp. 439–444. doi:10.17660/ActaHortic.2013.1012.56.
- [218] K. V. Sucharitha, A.M. Beulah, K. Ravikiran, Effect of chitosan coating on storage stability of tomatoes (*Lycopersicon esculentum* Mill), *Int. Food Res. J.* 25 (2018) 93–99.
- [219] C. Ribeiro, A.A. Vicente, J.A. Teixeira, C. Miranda, Optimization of edible coating composition to retard strawberry fruit senescence, *Postharvest Biol. Technol.* 44 (2007) 63–70. doi:10.1016/j.postharvbio.2006.11.015.
- [220] I. Malagurski, S. Levic, A. Nestic, M. Mitric, V. Pavlovic, S. Dimitrijevic-Brankovic, Mineralized agar-based nanocomposite films: Potential food packaging materials with antimicrobial properties, *Carbohydr. Polym.* 175 (2017). doi:10.1016/j.carbpol.2017.07.064.
- [221] K. Kraśniewska, I. Ścibisz, M. Gniewosz, M. Mitek, K. Pobiega, A. Cendrowski, Effect of Pullulan Coating on Postharvest Quality and Shelf-Life of Highbush Blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.), *Materials (Basel)*. 10 (2017) 965. doi:10.3390/ma10080965.
- [222] M. Ghasemlou, F. Khodaiyan, A. Oromiehie, M.S. Yarmand, Development and characterisation of a new biodegradable edible film made from kefir, an exopolysaccharide obtained from kefir grains, *Food Chem.* 127 (2011) 1496–1502. doi:10.1016/j.foodchem.2011.02.003.
- [223] M.B. Nieto, Structure and Function of Polysaccharide Gum-Based Edible Films and Coatings, in: K.C. Huber, M.E. Embuscado (Eds.), *Edible Film. Coatings Food Appl.*, Springer New York, New York, NY, 2009: pp. 57–112. doi:10.1007/978-0-387-92824-1.
- [224] P. Varela, S.M. Fiszman, Hydrocolloids in fried foods. A review, *Food Hydrocoll.* 25 (2011) 1801–1812. doi:10.1016/j.foodhyd.2011.01.016.

- [225] M. Lacroix, C. Le Tien, Edible films and coatings from non-starch polysaccharides, in: J.H. Han (Ed.), *Innov. Food Packag.*, Elsevier Science & Technology Books, 2005: pp. 338–361.
- [226] G.I. Olivas, G. V. Barbosa-Cánovas, Edible Films and Coatings for Fruits and Vegetables, in: K.C. Huber, M.E. Embuscado (Eds.), *Edible Film. Coatings Food Appl.*, Springer New York, New York, NY, 2009: pp. 211–244. doi:10.1007/978-0-387-92824-1.
- [227] J.A. Quezada Gallo, A. Gramin, C. Pattyn, M.R. Díaz Amaro, F. Debeaufort, A. Voilley, Biopolymers used as edible coating to limit water transfer, colour degradation and aroma compound 2-pentanone lost in mexican fruits, in: *Acta Hortic.*, 2005: pp. 1709–1716. doi:10.17660/ActaHortic.2005.682.228.
- [228] M. Dubois, K.A. Gilles, J.K. Hamilton, P.A. Rebers, F. Smith, Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances, *Anal. Chem.* 28 (1956) 350–356. doi:10.1021/ac60111a017.
- [229] O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall, Protein measurement with the Folin phenol reagent., *J. Biol. Chem.* 193 (1951) 265–75.
- [230] G.L. Miller, Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar, *Anal. Chem.* 31 (1959) 426–428. doi:10.1021/ac60147a030.
- [231] X. Zhu, I. Yuri, X. Gan, I. Suzuki, G. Li, Electrochemical study of the effect of nano-zinc oxide on microperoxidase and its application to more sensitive hydrogen peroxide biosensor preparation, *Biosens. Bioelectron.* 22 (2007) 1600–1604. doi:10.1016/j.bios.2006.07.007.
- [232] E 2149-01. Method-standard test method for determining the antimicrobial activity of immobilized antimicrobial agents under dynamiccontact conditions. ASTM Designation, (2001).
- [233] M.A. Bezerra, R.E. Santelli, E.P. Oliveira, L.S. Villar, L.A. Escaleira, Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry, *Talanta.* 76 (2008) 965–977. doi:10.1016/j.talanta.2008.05.019.
- [234] D.C. Montgomery, G.C. Runger, *Applied Statistics and probability for engineers*, John Wiley & Sons, Inc., 2002.
- [235] S.L.C. Ferreira, R.E. Bruns, E.G.P. da Silva, W.N.L. dos Santos, C.M. Quintella, J.M. David, J.B. de Andrade, M.C. Breitkreitz, I.C.S.F. Jardim, B.B. Neto, Statistical designs and response surface techniques for the optimization of chromatographic systems, *J. Chromatogr. A.* 1158 (2007) 2–14. doi:10.1016/j.chroma.2007.03.051.
- [236] E. Del Castillo, *Process Optimization: A Statistical Approach*, Springer, 2007. doi:10.1080/00224065.2008.11917740.
- [237] P. De Vos, G.M. Garrity, D. Jones, N.R. Krieg, W. Ludwig, F.A. Rainey, K.H. Schleifer, W. W.B., No Title, in: *Bergey's Man. Syst. Bacteriol.*, Springer, Dordrecht, Heidelberg, London, New York, 2009.
- [238] W. Ludwig, O. Strunk, R. Westram, L. Richter, H. Meier, A. Yadhukumar, A. Buchner, T. Lai, S. Steppi, G. Jacob, W. Förster, I. Brettske, S. Gerber, A.W. Ginhart, O. Gross, S. Grumann, S. Hermann, R. Jost, A. König, T. Liss, R. Lüßmann, M. May, B. Nonhoff, B. Reichel, R. Strehlow, A. Stamatakis, N. Stuckmann, A. Vilbig, M. Lenke, T. Ludwig, A. Bode, K.H. Schleifer, ARB: A software environment for sequence data, *Nucleic Acids Res.* 32 (2004) 1363–1371. doi:10.1093/nar/gkh293.
- [239] M. Dueñas, A. Munduate, A. Perea, A. Irastorza, Exopolysaccharide production by *Pediococcus damnosus* 2.6 in a semidefined medium under different growth conditions, *Int. J. Food Microbiol.* 87 (2003) 113–120. doi:10.1016/S0168-1605(03)00060-6.
- [240] A.A. Bengoa, M.G. Llamas, C. Iraporda, M.T. Dueñas, A.G. Abraham, G.L. Garrote, Impact of growth temperature on exopolysaccharide production and probiotic properties of *Lactobacillus paracasei* strains isolated from kefir grains, *Food Microbiol.* 69 (2018) 212–218. doi:10.1016/j.fm.2017.08.012.
- [241] N. Gorret, J.L. Maubois, J.M. Engasser, M. Ghoul, Study of the effects of temperature,

- pH and yeast extract on growth and exopolysaccharides production by *Propionibacterium acidi-propionici* on milk microfiltrate using a response surface methodology, *J. Appl. Microbiol.* 90 (2001) 788–796. doi:10.1046/j.1365-2672.2001.01310.x.
- [242] B. Rabha, R.-S. Nadra, B. Ahmed, Effect of Some Fermentation Substrates and Growth Temperature on Exopolysaccharide Production by *Streptococcus thermophilus* BN1, *Int. J. Biosci. Biochem. Bioinforma.* (2012) 44–47. doi:10.7763/ijbbb.2012.v2.67.
- [243] F. Sarwat, S.A.U. Qader, A. Aman, N. Ahmed, Production & characterization of a unique dextran from an indigenous *Leuconostoc mesenteroides* CMG713, *Int. J. Biol. Sci.* 4 (2008) 379–386. doi:10.7150/ijbs.4.379.
- [244] A. Aman, N.N. Siddiqui, S.A.U. Qader, Characterization and potential applications of high molecular weight dextran produced by *Leuconostoc mesenteroides* AA1, *Carbohydr. Polym.* 87 (2012) 910–915. doi:10.1016/j.carbpol.2011.08.094.
- [245] E.J. Hehre, J.Y. Sugg, Serologically reactive polysaccharides produced through the action of bacterial enzymes: I. dextran of *Leuconostoc mesenteroides* from sucrose, *J. Exp. Med.* 75 (1942) 339–353. doi:10.1084/jem.75.3.339.
- [246] R. Van der Meulen, S. Grosu-Tudor, F. Mozzi, F. Vaningelgem, M. Zamfir, G. Font de Valdez, L. De Vuyst, Screening of lactic acid bacteria isolates from dairy and cereal products for exopolysaccharide production and genes involved, *Int. J. Food Microbiol.* 118 (2007) 250–258. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2007.07.014.
- [247] A. Majumder, S. Bhandari, R.K. Purama, S. Patel, A. Goyal, Enhanced production of a novel dextran from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-640 by response surface methodology, *Ann. Microbiol.* 59 (2009) 309–315. doi:10.1007/BF03178333.
- [248] A. Majumder, A. Singh, A. Goyal, Application of response surface methodology for glucan production from *Leuconostoc dextranicum* and its structural characterization, *Carbohydr. Polym.* 75 (2009) 150–156. doi:10.1016/j.carbpol.2008.07.014.
- [249] S.D. Sawale, S.S. Lele, Statistical optimization of media for dextran production by *Leuconostoc* sp., Isolated from fermented Idli batter, *Food Sci. Biotechnol.* 19 (2010) 471–478. doi:10.1007/s10068-010-0066-2.
- [250] P. Kanmani, R. Satish kumar, N. Yuvaraj, K.A. Paari, V. Pattukumar, V. Arul, Production and purification of a novel exopolysaccharide from lactic acid bacterium *Streptococcus phocae* PI80 and its functional characteristics activity in vitro, *Bioresour. Technol.* 102 (2011) 4827–4833. doi:10.1016/j.biortech.2010.12.118.
- [251] M.G. Miljković, S.Z. Davidović, S. Kralj, S.S. Šiler-Marinković, M.D. Rajilić-Stojanović, S.I. Dimitrijević-Branković, Characterization of dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* T3, water kefir grains isolate, *Hem. Ind.* 71 (2017). doi:10.2298/HEMIND160421046M.
- [252] K.J. Howe, K.P. Ishida, M.M. Clark, Use of ATR FTIR to study fouling in natural waters.pdf, *Desalination.* 147 (2002) 251–255.
- [253] P.J. Bremer, G.G. Geesey, An evaluation of biofilm development utilizing non-destructive attenuated total reflectance fourier transform infrared spectroscopy, *Biofouling.* 3 (1991) 89–100. doi:10.1080/08927019109378165.
- [254] S. Nataraj, R. Schomäcker, M. Kraume, I.M. Mishra, A. Drews, Analyses of polysaccharide fouling mechanisms during crossflow membrane filtration, *J. Memb. Sci.* 308 (2008) 152–161. doi:10.1016/j.memsci.2007.09.060.
- [255] R.G. Zhabankov, V.M. Andrianov, M.K. Marchewka, Fourier transform IR and Raman spectroscopy and structure of carbohydrates, *J. Mol. Struct.* 436–437 (1997) 637–654. doi:10.1016/S0022-2860(97)00141-5.
- [256] M. Pidoux, G.A. De Ruyter, B.E. Brooker, I.J. Colquhoun, V.J. Morris, Microscopic and chemical studies of a gelling polysaccharide from *Lactobacillus hilgardii*, *Carbohydr. Polym.* 13 (1990) 351–362. doi:10.1016/0144-8617(90)90035-Q.
- [257] M. Horisberger, Structure of the dextran of the Tibi grain, *Carbohydr. Res.* 10 (1969) 379–385. doi:10.1016/S0008-6215(00)80897-6.



- [258] R.L. Sidebotham, Dextrans, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 30 (1974) 371–444.
- [259] F.R. Seymour, R.D. Knapp, S.H. Bishop, Correlation of the structure of dextrans to their <sup>1</sup>H-N.M.MR Spectra, *Carbohydr. Res.* 74 (1979) 77–92. doi:10.1016/S0008-6215(00)84766-7.
- [260] W. Pasika, L. Cragg, The detection and estimation of branching in dextran by proton magnetic resonance spectroscopy, *Can. J. Chem.* 41 (1963) 293–299.
- [261] F.R. Seymour, R.D. Knapp, S.H. Bishop, Determination of the Structure of Dextran by <sup>13</sup>C-Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, *Carbohydr. Res.* 51 (1976) 179–194.
- [262] G.L. Côté, C.D. Skory, S.M. Unser, J.O. Rich, The production of glucans via glucansucrases from *Lactobacillus satsumensis* isolated from a fermented beverage starter culture, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97 (2013) 7265–7273. doi:10.1007/s00253-012-4606-y.
- [263] G.L. Peres, D.C. Leite, N.P. Da Silveira, Ultrasound effect on molecular weight reduction of amylopectin, *Starch/Staerke.* 67 (2015) 407–414. doi:10.1002/star.201400230.
- [264] M. Marcotte, A.R.T. Hoshahili, H.S. Ramaswamy, Rheological properties of selected hydrocolloids as a function of concentration and temperature, *Food Res. Int.* 34 (2001) 695–703. doi:10.1016/S0963-9969(01)00091-6.
- [265] R.K. Purama, P. Goswami, A.T. Khan, A. Goyal, Structural analysis and properties of dextran produced by *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-640, *Carbohydr. Polym.* 76 (2009) 30–35. doi:10.1016/j.carbpol.2008.09.018.
- [266] A. Majumder, A. Goyal, Rheological and gelling properties of a novel glucan from *Leuconostoc dextranicum* NRRL B-1146, *Food Res. Int.* 42 (2009) 525–528. doi:10.1016/j.foodres.2009.01.003.
- [267] S. Patel, N. Kasoju, U. Bora, A. Goyal, Structural analysis and biomedical applications of dextran produced by a new isolate *Pediococcus pentosaceus* screened from biodiversity hot spot Assam, *Bioresour. Technol.* 101 (2010) 6852–6855. doi:10.1016/j.biortech.2010.03.063.
- [268] S. Netsopa, S. Niamsanit, D. Sakloetsakun, N. Milintawisamai, Characterization and Rheological Behavior of Dextran from *Weissella confusa* R003, *Int. J. Polym. Sci.* 2018 (2018) 1–10. doi:10.1155/2018/5790526.
- [269] N.N. Siddiqui, A. Aman, A. Silipo, S.A.U. Qader, A. Molinaro, Structural analysis and characterization of dextran produced by wild and mutant strains of *Leuconostoc mesenteroides*, *Carbohydr. Polym.* 99 (2014) 331–338. doi:10.1016/j.carbpol.2013.08.004.
- [270] M.C. Coll Ferrer, N.J. Hickok, D.M. Eckmann, R.J. Composto, Antibacterial biomimetic hybrid films, *Soft Matter.* 8 (2012) 2423–2431.
- [271] V. V. Vukovic, J.M. Nedeljkovic, Surface modification of nanometer-scale silver particles by imidazole, *Langmuir.* 9 (1993) 980–983.
- [272] R.K. Purama, P. Goswami, A.T. Khan, A. Goyal, Structural analysis and properties of dextran produced by *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-640, *Carbohydr. Polym.* 76 (2009) 30–35. doi:10.1016/j.carbpol.2008.09.018.
- [273] R.Z. Ahmed, K. Siddiqui, M. Arman, N. Ahmed, Characterization of high molecular weight dextran produced by *Weissella cibaria* CMGDEX3, *Carbohydr. Polym.* 90 (2012) 441–446. doi:10.1016/j.carbpol.2012.05.063.
- [274] P.K. Rastogi, V. Ganesan, S. Krishnamoorthi, Microwave assisted polymer stabilized synthesis of silver nanoparticles and its application in the degradation of environmental pollutants, *Mater. Sci. Eng. B.* 177 (2012) 456–461. doi:10.1016/j.mseb.2012.02.012.
- [275] Y. Xiang, D. Chen, Preparation of a novel pH-responsive silver nanoparticle/poly(HEMA-PEGMA-MAA) composite hydrogel, *Eur. Polym. J.* 43 (2007) 4178–4187. doi:10.1016/j.eurpolymj.2007.08.005.
- [276] Y. Luo, Z. Shen, P. Liu, L. Zhao, X. Wang, Facile fabrication and selective detection for cysteine of xylan/Au nanoparticles composite, *Carbohydr. Polym.* 140 (2016) 122–128.

- doi:10.1016/j.carbpol.2015.12.033.
- [277] E. Csapó, R. Patakfalvi, V. Hornok, L.T. Tóth, Á. Sipos, A. Szalai, M. Csete, I. Dékány, Effect of pH on stability and plasmonic properties of cysteine-functionalized silver nanoparticle dispersion, *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 98 (2012) 43–49. doi:10.1016/j.colsurfb.2012.03.036.
- [278] K. Kundu, S. Bardhan, S. Banerjee, G. Chakraborty, S.K. Saha, B.K. Paul, Influence of chemical architecture of oils and ionic liquid on the physicochemical and thermodynamic properties and microenvironment of anionic surfactant based microemulsion, *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 469 (2015) 117–131. doi:10.1016/j.colsurfa.2015.01.018.
- [279] M. Akter, M.T. Sikder, M.M. Rahman, A.K.M.A. Ullah, K.F.B. Hossain, S. Banik, T. Hosokawa, T. Saito, M. Kurasaki, A systematic review on silver nanoparticles-induced cytotoxicity: Physicochemical properties and perspectives, *J. Adv. Res.* 9 (2018) 1–16. doi:10.1016/j.jare.2017.10.008.
- [280] A. Travan, C. Pelillo, I. Donati, E. Marsich, M. Benincasa, T. Scarpa, S. Semeraro, G. Turco, R. Gennaro, S. Paoletti, Non-cytotoxic silver nanoparticle-polysaccharide nanocomposites with antimicrobial activity, *Biomacromolecules*. 10 (2009) 1429–1435. doi:10.1021/bm900039x.
- [281] I. Vukoje, V. Lazić, V. Vodnik, M. Mitrić, B. Jokić, S. Phillip Ahrenkiel, J.M. Nedeljković, M. Radetić, The influence of triangular silver nanoplates on antimicrobial activity and color of cotton fabrics pretreated with chitosan, *J. Mater. Sci.* 49 (2014) 4453–4460. doi:10.1007/s10853-014-8142-2.
- [282] V. Ilić, Z. Šaponjić, V. Vodnik, B. Potkonjak, P. Jovančić, J. Nedeljković, M. Radetić, The influence of silver content on antimicrobial activity and color of cotton fabrics functionalized with Ag nanoparticles, *Carbohydr. Polym.* 78 (2009) 564–569. doi:10.1016/j.carbpol.2009.05.015.
- [283] V. Ilić, Z. Šaponjić, V. Vodnik, D. Mihailović, P. Jovančić, J. Nedeljković, M. Radetić, The study of coloration and antibacterial efficiency of corona activated dyed polyamide and polyester fabrics loaded with Ag nanoparticles, *Fibers Polym.* 10 (2009) 650–656. doi:10.1007/s12221-010-0650-3.
- [284] M. Radetić, V. Ilić, V. Vodnik, S. Dimitrijević, P. Jovančić, Z. Šaponjić, J.M. Nedeljković, *Polymers for advanced*, *Polym. Adv. Technol.* 19 (2008) 1816–1821.
- [285] Z. V Saponjic, R. Csencsits, T. Rajh, N.M. Dimitrijevic, Self-Assembly of TOPO-Derivatized Silver Nanoparticles into Multilayered Film, *Chem. Mater.* 15 (2003) 4521–4526. doi:10.1021/cm030381q.
- [286] M.H. El-rafie, H.B. Ahmed, M.K. Zahran, Characterization of nanosilver coated cotton fabrics and evaluation of its antibacterial efficacy, *Carbohydr. Polym.* 107 (2014) 174–181. doi:10.1016/j.carbpol.2014.02.024.
- [287] H.M.M. Ibrahim, M.S. Hassan, Characterization and antimicrobial properties of cotton fabric loaded with green synthesized silver nanoparticles, *Carbohydr. Polym.* 151 (2016) 841–850. doi:10.1016/j.carbpol.2016.05.041.
- [288] N. Joshi, B.T. Ngwenya, C.E. French, Enhanced resistance to nanoparticle toxicity is conferred by overproduction of extracellular polymeric substances, *J. Hazard. Mater.* 241–242 (2012) 363–370. doi:10.1016/j.jhazmat.2012.09.057.
- [289] L. Vera Candiotti, M.M. De Zan, M.S. Cámara, H.C. Goicoechea, Experimental design and multiple response optimization. Using the desirability function in analytical methods development, *Talanta*. 124 (2014) 123–138. doi:10.1016/j.talanta.2014.01.034.
- [290] A.C.S. Alcântara, M. Darder, P. Aranda, A. Ayral, E. Ruiz-Hitzky, Bionanocomposites based on polysaccharides and fibrous clays for packaging applications, *J. Appl. Polym. Sci.* 133 (2016) 1–14. doi:10.1002/app.42362.
- [291] M. Avella, E. Di Pace, B. Immirzi, G. Impallomeni, M. Malinconico, G. Santagata, Addition of glycerol plasticizer to seaweeds derived alginates: Influence of microstructure on chemical-physical properties, *Carbohydr. Polym.* 69 (2007) 503–511.

- doi:10.1016/j.carbpol.2007.01.011.
- [292] I. Malagurski, S. Levic, A. Nestic, M. Mitric, V. Pavlovic, S. Dimitrijevic-Brankovic, Mineralized agar-based nanocomposite films: Potential food packaging materials with antimicrobial properties, *Carbohydr. Polym.* 175 (2017) 55–62. doi:10.1016/j.carbpol.2017.07.064.
- [293] D. Suput, V. Lazic, L. Pezo, S. Popovic, N. Hromis, S. Bulut, The effects of glycerol and guar-xanthan mixture on mechanical and barrier properties of starch based edible films - chemometric analysis, *Hem. Ind.* 70 (2016) 739–744. doi:10.2298/HEMIND150819010S.
- [294] N. Khazaei, M. Esmaili, Z.E. Djomeh, M. Ghasemlou, M. Jouki, Characterization of new biodegradable edible film made from basil seed (*Ocimum basilicum* L.) gum, *Carbohydr. Polym.* 102 (2014) 199–206. doi:10.1016/j.carbpol.2013.10.062.
- [295] A. Nestic, M. Gordic, A. Onjia, S. Davidovic, M. Miljkovic, S. Dimitrijevic-Brankovic, Chitosan-triclosan films for potential use as bio-antimicrobial bags in healthcare sector, *Mater. Lett. J.* 186 (2017) 368–371.
- [296] G.I. Olivas, G. V. Barbosa-Cánovas, Alginate-calcium films: Water vapor permeability and mechanical properties as affected by plasticizer and relative humidity, *LWT - Food Sci. Technol.* 41 (2008) 359–366. doi:10.1016/j.lwt.2007.02.015.
- [297] T.D. Phan, F. Debeaufort, D. Luu, A. Voilley, Functional properties of edible agar-based and starch-based films for food quality preservation, *J. Agric. Food Chem.* 53 (2005) 973–981. doi:10.1021/jf040309s.
- [298] S. Rivero, M.A. García, A. Pinotti, Correlations between structural, barrier, thermal and mechanical properties of plasticized gelatin films, *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 11 (2010) 369–375. doi:10.1016/j.ifset.2009.07.005.
- [299] Y. Yuan, T.R. Lee, Contact angle and wetting properties, in: G. Bracco, B. Holst (Eds.), *Surf. Sci. Tech.*, Springer, Verlag Berlin Heidelberg, 2013: pp. 3–34. doi:10.1007/978-3-642-34243-1\_1.
- [300] R. Ahmadi, A. Kalbasi-Ashtari, A. Oromiehie, M.S. Yarmand, F. Jahandideh, Development and characterization of a novel biodegradable edible film obtained from psyllium seed (*Plantago ovata* Forsk), *J. Food Eng.* 109 (2012) 745–751. doi:10.1016/j.jfoodeng.2011.11.010.
- [301] M. Jouki, N. Khazaei, M. Ghasemlou, M. Hadinezhad, Effect of glycerol concentration on edible film production from cress seed carbohydrate gum, *Carbohydr. Polym.* 96 (2013) 39–46. doi:10.1016/j.carbpol.2013.03.077.
- [302] S. Seyedi, A. Koocheki, M. Mohebbi, Y. Zahedi, *Lepidium perfoliatum* seed gum: A new source of carbohydrate to make a biodegradable film, *Carbohydr. Polym.* 101 (2014) 349–358. doi:10.1016/j.carbpol.2013.09.072.
- [303] N.E. Suyatma, L. Tighzert, A. Copinet, C. Veronique, Effects of hydrophilic plasticizers on mechanical, thermal, and surface properties of chitosan films, *J. Agric. Food Chem.* 53 (2005) 3950–3957. doi:10.1021/jf048790+.
- [304] A.M. Slavutsky, M.A. Bertuzzi, Improvement of water barrier properties of starch films by lipid nanolamination, *Food Packag. Shelf Life.* 7 (2016) 41–46. doi:10.1016/j.fpsl.2016.01.004.
- [305] F. Tihminlioglu, I.D. Atik, B. Özen, Water vapor and oxygen-barrier performance of corn-zein coated polypropylene films, *J. Food Eng.* 96 (2010) 342–347. doi:10.1016/j.jfoodeng.2009.08.018.
- [306] M.A. Bezerra, S.L.C. Ferreira, C.G. Novaes, A.M.P. dos Santos, G.S. Valasques, U.M.F. da Mata Cerqueira, J.P. dos Santos Alves, Simultaneous optimization of multiple responses and its application in Analytical Chemistry – A review, *Talanta.* 194 (2019) 941–959. doi:10.1016/j.talanta.2018.10.088.
- [307] K. Gekko, Thermal analysis of low molecular weight dextran, *Agric. Biol. Chem.* 42 (1978) 1287–1288. doi:10.1080/00021369.1978.10863149.
- [308] D. Kothari, J.M.R. Tingirikari, A. Goyal, In vitro analysis of dextran from *Leuconostoc*

- mesenteroides NRRL B-1426 for functional food application, *Bioact. Carbohydrates Diet. Fibre.* 6 (2015) 55–61. doi:10.1016/j.bcdf.2015.08.001.
- [309] F. Dong, S. Li, Z. Liu, K. Zhu, X. Wang, C. Jin, Improvement of quality and shelf life of strawberry with nanocellulose/chitosan composite coatings, *Bangladesh J. Bot.* 44 (2015) 709–717. doi:10.1177/1756285609359317.
- [310] C. Mannozi, U. Tylewicz, F. Chinnici, L. Siroli, P. Rocculi, M. Dalla Rosa, S. Romani, Effects of chitosan based coatings enriched with procyanidin by-product on quality of fresh blueberries during storage, *Food Chem.* 251 (2018) 18–24. doi:10.1016/j.foodchem.2018.01.015.
- [311] V. Chiabrando, G. Giacalone, Quality evaluation of blueberries coated with chitosan and sodium alginate during postharvest storage, *Int. Food Res. J.* 24 (2017) 1553–1561.
- [312] V. Chiabrando, C. Peano, G. Beccaro, G. Bounous, L. Rolle, Postharvest quality of highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) cultivars in relation to storage methods, in: *Acta Hortic.*, 2006: pp. 545–551.
- [313] M. Petriccione, F. Mastrobuoni, M. Pasquariello, L. Zampella, E. Nobis, G. Capriolo, M. Scortichini, Effect of Chitosan Coating on the Postharvest Quality and Antioxidant Enzyme System Response of Strawberry Fruit during Cold Storage, *Foods.* 4 (2015) 501–523. doi:10.3390/foods4040501.
- [314] L. Abugoch, C. Tapia, D. Plasencia, A. Pastor, O. Castro-Mandujano, L. López, V.H. Escalona, Shelf-life of fresh blueberries coated with quinoa protein/chitosan/sunflower oil edible film, *J. Sci. Food Agric.* 96 (2016) 619–626. doi:10.1002/jsfa.7132.

## **Biografija**

Sladana Davidović je rođena 28. juna 1983. godine u Beogradu, Republika Srbija, gde je završila osnovnu školu i gimnaziju "Sveti Sava".

Školske 2002/2003. godine upisala je Hemijski fakultet Univerziteta u Beogradu, studijski program Biohemija. Diplomirala je 2009. godine na Katedri za biohemiju, čime je stekla zvanje Diplomirani biohemičar.

Školske 2010/2011 upisala je Master akademske studije na Tehnološko-metalurškom fakultetu Univerziteta u Beogradu u okviru studijskog programa Biohemijsko inženjerstvo i biotehnologija, smer: Tehnologija hrane. Završni master rad pod nazivom „Izolacija i preliminarna karakterizacija mikroflora vodenog i mlečnog kefira“ odbranila je sa ocenom 10 i prosečnom ocenom tokom master studija 9,25, čime je stekla zvanje Master inženjer tehnologije.

Doktorske akademske studije je upisala školske 2011/2012. godine na Tehnološko-metalurškom fakultetu Univerziteta u Beogradu, na Katedri za biohemijsko inženjerstvo i biotehnologiju, gde je od 01.10. 2011. godine zaposlena kao istraživač na projektu Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije pod nazivom „Primena biotehnoloških metoda u održivom iskorišćenju nus-proizvoda agroindustrije“ (evidencioni broj projekta TR 31035) kojim rukovodi prof. dr Suzana Dimitrijević-Branković. Završni ispit na doktorskim studijama pod nazivom: „Fermentativna produkcija egzopolisaharida bakterija mlečne kiseline i mogućnost njihove primene u proizvodnji jestivih filmova“ odbranila je 10. oktobra 2013. godine. U zvanje istraživač saradnik reizabrana je 31. maja 2018. godine.

# Izjava o autorstvu

Ime i prezime autora Sladana Davidović

Broj indeksa 4008/2011

## Izjavljujem

daje doktorska disertacija pod naslovom

**Primena dekstrana iz bakterija mlečne kiseline za sintezu nanočestica srebra i  
proizvodnju jestivih filmova**

---

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada;
- da disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za sticanje druge diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova;
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio/la autorska prava i koristio/la intelektualnu svojinu drugih lica.

## Potpis autora

U Beogradu, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

# Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora Sladana Davidović

Broj indeksa 4008/2011

Studijski program Biohemijsko inženjerstvo i biotehnologija

Naslov rada **Primena dekstrana iz bakterija mlečne kiseline za sintezu nanočestica srebra i proizvodnju jestivih filmova**

Mentor Dr Suzana Dimitrijević-Branković, redovni profesor Tehnološko-metalurškog fakulteta

Izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la radi pohranjena u **Digitalnom repozitorijumu Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog naziva doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

**Potpis autora**

U Beogradu, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

## Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

### **Primena dekstrana iz bakterija mlečne kiseline za sintezu nanočestica srebra i proizvodnju jestivih filmova**

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim prilogima predao/la sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u digitalnom repozitorijumu Univerziteta u Beogradu i dostupnu u otvorenom pristupu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo (CC BY)
2. Autorstvo – nekomercijalno (CC BY-NC)
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerada (CC BY-NC-ND)
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima (CC BY-NC-SA)
5. Autorstvo – bez prerada (CC BY-ND)
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima (CC BY-SA)

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci.  
Kratak opis licenci je sastavni deo ove izjave).

### **Potpis autora**

U Beogradu, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_



1. **Autorstvo.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence, čak i u komercijalne svrhe. Ovo je najslobodnija od svih licenci.
2. **Autorstvo – nekomercijalno.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.
3. **Autorstvo – nekomercijalno – bez prerada.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način odeređen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela. U odnosu na sve ostale licence, ovom licencom se ograničava najveći obim prava korišćenja dela.
4. **Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada.
5. **Autorstvo – bez prerada.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način odeređen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.
6. **Autorstvo – deliti pod istim uslovima.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način odeređen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada. Slična je softverskim licencama, odnosno licencama otvorenog koda.