УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
ТЕХНОЛОШКО-МЕТАЛУРШКИ ФАКУЛТЕТ

Верица М. Љубић

ЕГЗОПОЛИСАХАРИДИ ИЗ БАКТЕРИЈСКИХ СОЈЕВА *LACTOBACILLUS REUTERI* B2 И *KLEBSIELLA OXYTOCA* J7: ИЗОЛОВАЊЕ, КАРАКТЕРИЗАЦИЈА И ПРИМЕНА ЗА УКЛАЊАЊЕ ТЕШКИХ МЕТАЛА ИЗ ВОДЕ

ДОКТОРСКА ДИСЕРТАЦИЈА

Београд, 2026.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF TECHNOLOGY AND METALLURGY

Verica M. Ljubić

EXOPOLYSACCHARIDES FROM BACTERIAL STRAINS *LACTOBACILLUS REUTERI* B2 AND *KLEBSIELLA OXYTOCA* J7: ISOLATION, CHARACTERIZATION AND APPLICATION FOR THE REMOVAL OF HEAVY METALS FROM WATER

DOCTORAL DISSERTATION

Belgrade, 2026.

Ментори:

Проф. др Катарина Тривунац, ванредни професор
Универзитет у Београду, Технолошко-металуршки факултет

Др Слободан Цветковић, виши научни сарадник
Универзитет у Београду, Институт за хемију, технологију и металургију, Институт од националног значаја за Републику Србију

Чланови комисије:

Проф. др Рада Петровић, редовни професор
Универзитет у Београду, Технолошко-металуршки факултет

Проф. др Милан Миливојевић, ванредни професор
Универзитет у Београду, Технолошко-металуршки факултет

Др Маријана Стојановић, научни саветник
Универзитет у Београду, Институт за биолошка истраживања "Синиша Станковић", Институт од националног значаја за Републику Србију

Датум одбране:

Захвалница

Изражавам велику захвалност др Мини Поповић, ванредном професору Факултета за Екологију и заштиту животне средине, Универзитета Унион „Никола Тесла”, која је током развоја ове дисертације била мој водич и ментор и чија је идеја о изолацији, карактеризацији и примени егзополисахарида из бактеријских ћелија поставила темељ за цео рад. Захваљујући њеном менторству и нашем заједничком раду, из резултата ове тезе проистекла су два научна рада категорије М21 која потврђују научни допринос и актуелност дисертације.

Искрено се захваљујем мојим актуелним менторима, проф. др Катарини Тривунац и др Слободану Цветковићу, на стручној помоћи, корисним саветима, континуираној подршци и усмеравању током израде докторске дисертације. Захваљујем и члановима комисије, проф. др Ради Петровић, др Маријани Стојановић и проф. др Милану Миливојевићу, на издвојеном времену, пажљивом разматрању рада и конструктивним сугестијама које су допринеле да тезу обликујем и успешно приведем крају.

Велику захвалност дугујем свим колегама и сарадницима који су учествовали у реализацији ове дисертације и допринели својим знањем и искуством. Пре свега, захваљујем најближим сарадницима са Института за хемију, технологију и металургију Универзитета у Београду, Технолошко-металуршког факултета Универзитета у Београду (Катедре за хемијско инжењерство, Катедре за општу и неорганску хемију, Катедре за органску хемију) и сарадницима са Института за вирусологију, вакцине и серуме ’’Торлак’’ у Београду, који су омогућили извођење кључних експеримената и реализацију најзначајнијих анализа у оквиру дисертације. Захвалност дугујем и колегама и сарадницима са Рударско-геолошког факултета Универзитета у Београду (Катедре за кристалографију), Хемијског факултета Универзитета у Београду (Катедре за аналитичку хемију), Института за молекуларну биологију и генетичко инжењерство у Београду и Факултета биотехнологије и развоја лијекова Свеучилишта у Ријеци, који су својим доприносом омогућили извођење додатних анализа и тиме употпунили ову дисертацију.

Највећу захвалност дугујем мојој породици за безусловну љубав, разумевање и охрабрење - мојим родитељима, мом брату и његовој породици, мом супругу, а посебно мојој ћерки која је током израде ове дисертације ушла у мој живот и донела ми највреднију животну титулу. Управо је моја породица била највећи ослонац кроз све године рада и изазова, највећи извор снаге и среће и представља прави смисао мог успеха.

„Успех је добити оно што желимо.
Срећа је желети оно што добијемо.'"
-Дејл Карнеги

Сажетак

Егзополисахариди (ЕПС) добијени из бактеријских ћелија привлаче све већу пажњу научника због својих повољних карактеристика као што су биоразградивост, нетоксичност и биокомпатибилност. Ове особине чине их погодним за различите примене у индустрији (претежно прехрамбеној и фармацеутској индустрији, као и у процесима пречишћавања отпадних вода). Циљ овог истраживања био је изолација нових ЕПС из два јединствена бактеријска соја, *Lactobacillus reuteri* B2 и *Klebsiella oxytoca* J7, карактеризација добијених ЕПС и испитивање могућности њихове примене као биосорбената за уклањање тешких метала (Ni^{2+} јона) из воде. Изоловани ЕПС су окарактерисани коришћењем FTIR, SEM, XRD, NMR, MALDI-TOF-MS и TGA/DTG метода анализе. Надаље, анализирана је и биолошка активност. ЕПС из оба соја испитани су на цитотоксичност (MTT тест), док је ЕПС из пробиотског соја *Lactobacillus reuteri* B2 додатно испитан на антиоксидативну активност (ABTS тест). На MRC-5 линији хуманих фибробласта је показано да оба ЕПС, у концентрацијама од 0,5 до 2,0 $mgmL^{-1}$, нису цитотоксична. Способност ЕПС добијеног из пробиотског соја *L. reuteri* B2 да уклања слободне радикале је 76 % при концентрацији од 2,0 $mgmL^{-1}$. У биосорпционој студији адсорпциони капацитети према јонима Ni^{2+} из воденог раствора при pH 8,0 износили су 161,00 mgg^{-1} за ЕПС из *L. reuteri* B2, односно 270,0 mgg^{-1} при pH 5,5 за ЕПС из *K. oxytoca* J7. Према резултатима овог истраживања, нови ЕПС изолован из бактеријског соја *K. oxytoca* J7 се може сматрати обећавајућим биоматеријалом за потенцијалну примену у третману отпадних вода, док би ЕПС изолован из пробиотског соја *L. reuteri* B2 могао наћи примену и шире, у медицини, фармацији и прехрамбеној индустрији.

Наслов: Егзополисахариди из бактеријских сојева *Lactobacillus reuteri* B2 и *Klebsiella oxytoca* J7: изоловање, карактеризације и примена за уклањање тешких метала из воде

Кључне речи: егзополисахариди, биосорпције, биосорбенти, тешки метали, уклањање Ni^{2+} јона, *L. reuteri* B2, *K. oxytoca* J7

Научна област: Технолошко инжењерство

Ужа научна област: Хемијско инжењерство

УДК број:

Abstract

Exopolysaccharides (EPS) obtained from bacterial cells are increasingly in the focus of scientists due to their favorable characteristics, such as biodegradability, non-toxicity and biocompatibility. These properties make them suitable for applications in various industries (mainly in food, pharmaceutical, as well as in wastewater treatment). The aim of this research was the isolation of novel EPS from two unique bacterial strains, *Lactobacillus reuteri* B2 and *Klebsiella oxytoca* J7, characterization of the obtained EPS and investigation of the possibility of their application as biosorbents for the removal of heavy metals (Ni^{2+} ions) from water. The isolated EPS were characterized using FTIR, SEM, XRD, NMR, MALDI-TOF-MS and TGA/DTG analysis methods. Furthermore, an analysis of biological activity was performed. EPS from both strains were tested for cytotoxicity (by MTT test), while EPS from the probiotic strain *L. reuteri* B2 was additionally tested for antioxidant activity (ABTS test). It was shown on the MRC-5 human fibroblast line that EPS isolated from both bacterial strains were not cytotoxic to human cells, at concentrations from 0.5 to 2.0 $mgmL^{-1}$. The ability of EPS isolated from probiotic strain *L. reuteri* B2 to remove free radicals was 76 % at a concentration of 2.0 $mgmL^{-1}$. In the biosorption study, the adsorption capacities toward Ni^{2+} ions from the aqueous solution, at pH 8.0 was 161.00 mgg^{-1} for EPS from *L. reuteri* B2 and 270.0 mgg^{-1}, at pH 5.5 for EPS from *K. oxytoca* J7. According to the results from this research, the novel EPS isolated from the bacterial strain *K. oxytoca* J7 can be considered as a very promising biomaterial for potential application in wastewater treatment, while the EPS isolated from the probiotic strain L. reuteri B2 could be used more widely in medicine, pharmacy, and the food industry.

Title: Exopolysaccharides from bacterial strains *Lactobacillus reuteri* B2 and *Klebsiella oxytoca* J7: isolation, characterization and application for the removal of heavy metals from water

Keywords: exopolysaccharides, biosorption, biosorbents, heavy metals, Ni^{2+} ion removal, *L. reuteri* B2, *K. oxytoca* J7

Scientific field: Technological engineering

Narrow scientific field: Chemical engineering

UDC number:

Садржај:

1 УВОД 1

2 ТЕОРИЈСКИ ДЕО 4

2.1 ЕГЗОПОЛИСАХАРИДИ 4

2.1.1 Порекло ЕПС 4

2.1.2 Састав и структура ЕПС 5

2.1.3 Биосинтеза ЕПС 9

2.1.4 Изоловање и пречишћавање ЕПС 13

2.1.5 Технике за карактеризацију ЕПС 15

2.1.6 Функционални значај ЕПС 16

2.2 Примена ЕПС 16

2.2.1 Биолошка улога и потенцијал ЕПС БМК у медицини, биотехнологији и прехрамбеној индустрији 17

2.2.2 Биотехнолошки потенцијал ЕПС из патогених сојева 19

2.2.3 Примена ЕПС као биосорбената тешких метала 22

2.2.4 Значај никла 31

3 ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО 32

3.1 План експеримента 32

3.2 Добијање ЕПС из бактеријских сојева *L. reuteri B2* и *K. oxytoca J7* 34

3.2.1 Екстракција и делимично пречишћавање ЕПС из *L. reuteri* B2 и *K.oxytoca* J7 . 34

3.3 Карактеризација ЕПС из *L. reuteri* B2 и *K. oxytoca* J7 36

3.3.1 Одређивање морфологије и микроструктуре ЕПС скенирајућом електронском микроскопијом (SEM) 36

3.3.2 Одређивање структуре ЕПС FTIR спектроскопијом 36

3.3.3 Одређивање структуре ЕПС NMR методом 36

3.3.4 Одређивање молекулске масе ЕПС MALDI TOF/TOF-MS методом 37

3.3.5 Одређивање кристалиничности ЕПС рендгенском дифракционом анализом (XRD) 37

3.3.6 Одређивање термостабилности ЕПС термогравиметријском (TGA) методом 37

3.3.7 Одређивање тачке нултог наелектрисања ЕПС 37

3.4 Биолошка својства ЕПС ... 38
3.4.1 Одређивање цитотоксичих својстава ЕПС МТТ тестом ... 38
3.4.2 Одређивање антиоксидативних својстава ЕПС добијеног из бактеријског соја *L. reuteri* B2 ABTS тестом ... 39
3.5 Биосорпциона студија ... 40
3.5.1 Одређивање утицаја процесних параметара на адсорпцију Ni^{2+} јона ... 41
4 РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА ... 42
4.1 Принос ЕПС из *L.* reuteri B2 и *K. oxytoca* J7 ... 42
4.2 Карактеризација ЕПС из *L. reuteri* B2 и *K. oxytoca* J7 ... 45
4.2.1 Одређивање микроструктуре и морфологије скенирајућом електронском микроскопијом ... 45
4.2.2 Одређивање структуре FTIR спектроскопијом ... 48
4.2.3 Одређивање структуре NMR методом ... 51
4.2.4 MALDI-TOF-MS анализа ... 55
4.2.5 Одређивање кристалиничности XRD анализом ... 64
4.2.6 Одређивање термостабилности TGA методом ... 67
4.2.7 Одређивање тачке нултог наелектрисања ЕПС из *L. reuteri* B2 и *K. oxytoca* J7 71
4.3 Биолошка својства ЕПС из *L. reuteri* B2 и *K. oxytoca* J7 ... 72
4.3.1 Цитотоксични ефекат ЕПС из *L. reuteri* B2 на ћелијску линију MRC-5 ... 72
4.3.2 Антиоксидативна својства ЕПС из *L. reuteri* B2 ... 73
4.3.3 Цитотоксични ефекат ЕПС из *K. oxytoca* J7 на ћелијску линију MRC-5 ... 75
4.4 Биосорпциона студија ... 76
4.4.1 Адсорпција Ni^{2+} из водених раствора на ЕПС из *L. reuteri* B2 ... 76
4.4.2 Адсорпција Ni^{2+} јона на ЕПС из *K. oxytoca* J7 ... 90
4.4.3 Анализа могућих механизама адсорпције ... 100
4.4.4 Поређење ЕПС из *L. reuteri* B2 и *K. oxytoca* J7 као биосорбената за уклањање Ni^{2+} јона из водених раствора ... 103
4.4.5 Перспектива примене ЕПС из *L. reuteri* B2 и *K. oxytoca* J7 ... 105
5 ЗАКЉУЧАК ... 107
6 ЛИТЕРАТУРА ... 111

1 УВОД

Неминовно загађење животне средине, како воде, тако и земљишта и ваздуха, као последица све већег развоја индустрије и повећања броја становништва, постало је главни проблем последњих неколико деценија у свету. Међу главним загађујућим материјама у животној средини су тешки метали, који нису биоразградиви и као такви се акумулирају у животној средини, али и у људском телу, што утиче на појаву различитих обољења (Oladimeji и сар., 2024). Олово, арсен, жива, бакар, никл, хром и кадмијум су најприсутнији тешки метали у животној средини и познато је да се, као последица њихове акумулације у организму, могу развити тешка обољења, као што су: карциноми, болести бубрега, болести кардиоваскуларног система, гастроинтестинални и неуролошки поремећаји (Briffa и сар., 2020). Ранији покушаји решавања овог глобалног проблема обухватили су испитивања примене различитих материјала добрих адсорпционих особина, али су ови материјали са собом носили и недостатке у погледу мале ефикасности и неекономичности.

Веома значајан правац истраживања последњих година јесте откривање и добијање нових, обновљивих и високоефикасних биоматеријала који могу наћи примену у процесима адсорпција тешких метала. Велики значај у овој области имају егзополисахариди (ЕПС), биополимери велике молекулске масе које производе и излучују различити микроорганизми у циљу опстанка у неповољним спољним условима. Ови биополимери, првенствено бактеријски, тренутно су изузетно атрактивна тема у научним истраживањима због природног порекла, доступности и специфичних физичко-хемијских својстава. Због присуства различитих функционалних група могу се користити и као измењивачи јона. ЕПС су јефтини, нетоксични, могу се регенерисати и поново користити, што омогућава њихову употребу у дужем временском периоду. С обзиром да се излучују у спољну средину, није потребна употреба хемијских агенаса за разарање ћелијске структуре ради њихове екстракције, те су и еколошки прихватљиви. Као нетоксични, биоразградиви и биокомпатибилни полимери, бактеријски ЕПС нашли су примену у различитим гранама индустрије. У досадашњим истраживањима бактеријски ЕПС добијени су из бактерија изолованих из различитих извора: ферментисаних млечних и месних производа (Derdak и сар., 2022; Miao и сар., 2015; Wang и сар., 2010), укишељеног поврћа, пива, вина (Dimopoulou и сар., 2021; Özpınar и сар 2024; Ye и сар., 2018), патогених и непатогених бактерија које су део људске и животињске микробиоте (Giordani и сар., 2023; Koo и сар., 2013; Sims и сар., 2011), телесних излучевина људи и животиња (Hyrslova и сар., 2023; Jin и сар., 2019; Ren и сар., 2023) и патогених и непатогених бактерија присутних у природним стаништима (Flemming и сар., 2025) и др.

Посебно значајна група бактерија која може да производи ЕПС јесу бактерије млечне киселине (БМК), међу којима се издвајају пробиотски сојеви чији су ЕПС опште признати као безбедни (*Generally recognized as safe* - GRAS) и стога могу имати биомедицински потенцијал (Abid и сар., 2018). Као такви, ЕПС пробиотских БМК су посебно интересантни за истраживања. Поред примене у прехрамбеној, фармацеутској и хемијској индустрији, ЕПС БМК све више налазе место и у третману вода. БМК се најчешће изолују из контролисано или неконтролисано ферментисане хране и пића, зато што је управо ова група бактерија одговорна за ферментацију у овим производима. Такође, БМК су део нормалне микрофлоре црева људи и животиња, те се често изолују из људских и животињских излучевина. Сојеви БМК који производе ЕПС припадају врстама *Lactobacillus spp*., *Sttreptococcus spp*., *Leoconostoc spp*., *Weissellale spp*. и *Pediococcus spp.*(Sharma и сар., 2024).

Циљ овог истраживања је добијање и карактеризација ЕПС из два јединствена бактеријска соја, пробиотског *(Lactobacillus reuteri* B2) и патогеног (*Klebsiella oxytoca* J7), изолованих из фецеса C57BL/6 миша (Поповић и сар., 2021). У том контексту одређени су приноси у којима се могу добити, испитана је њихова структура, токсичност и могућност примене као адсорбената тешких метала (Ni^{2+}) из воде. Одабир два бактеријска соја из истог извора, а са различитим функционалним карактеристикама и метаболичким потенцијалима, омогућава директну упоредивост њихових метаболита (ЕПС) у погледу састава, структуре и могућности примене као адсорбената.

Адсорптивни капацитет ЕПС је испитан према јонима никла који су свеприсутни и неизбежни у животној средини због честе примене у различитим гранама индустрије. Никл, као кофактор појединих ензима, је биолошки значајан метал, а при хроничној изложености или вишим концентрацијама је токсичан (Begum и сар., 2022). Одабир никла оправдан је и чињеницом да у литератури још увек нема довољно података о адсорпцији јона никла са бактеријским ЕПС (Gupta сар., 2017), што резултатима ове дисертације даје потенцијал да допринесу бази података и послуже као референтни у будућим истраживањима. Адсорпциона истраживања обављена су у шаржним условима, уз испитивање оптималних процесних параметара који могу имати значајан утицај на процес уклањања тешких метала из раствора: почетна концентрација јона никла, pH вредност, време контакта, температура и маса адсорбента. Добијени ЕПС су окарактерисани инфрацрвеном спектроскопијом са Фуријеовом трансформацијом (FTIR), скенирајућом електронском микроскопијом (SEM), рендгенском дифракцијом (XRD), нуклеарном магнетном резонанцом (NMR), термогравиметријом (TGA) и масеном спектроскопијом базираној на мерењу брзине кретања честица добијених ласерском десорпцијом/јонизацијом потпомогнутом матриксом (MALDI-TOF MS).

Дисертацијом је обухваћено следеће:

- добијање почетног материјала: изоловање, пречишћавање, лиофилизација и складиштење добијених ЕПС;
- одређивање приноса ЕПС;
- карактеризација добијених биоматеријала: одређивање структуре, микроструктуре и морфологије ЕПС; одређивање потенцијалног састава и просечне молекулске масе; одређивање кристалиничности и термостабилности ЕПС;
- испитивање биолошких својстава добијених ЕПС: цитотоксична својства и антиоксидативна својства;
- испитивање ефикасности ЕПС као биосорбента, у погледу уклањања јона никла из водених раствора и испитивање параметара који утичу на процес адсорпције: време контакта између адсорбата и адсорбента, однос количине адсорбата и адсорбента, pH вредност раствора, температура;
- одређивање кинетичких параметара адсорпционог процеса и избор кинетичког модела адсорпције; обрада експерименталних резултата различитим моделима адсорпционих изотерми за одређивање адсорпционих капацитета и механизама адсорпције; испитивање термодинамике процеса адсорпције;
- дискусија и закључци о приносу, потенцијалном саставу/структури ЕПС, потенцијалној примени.

2 ТЕОРИЈСКИ ДЕО

2.1 ЕГЗОПОЛИСАХАРИДИ

2.1.1 Порекло ЕПС

У савременом свету је све већа потражња за биополимерима који би у различитим областима заменили хемијски синтетисане полимере. Биополимери имају извесне предности, пре свега обновљив природни извор, лаку доступност, биокомпатибилност и биодеградибилност. Због добрих механичких својстава, термо-механичке стабилности, могућности једноставног хемијског модификовања и грађења композита ради побољшања својстава, имају широку могућност примене (Benalaya и сар., 2024; George и сар., 2020; Iñiguez-Moreno и сар., 2021). Најзаступљенији биополимери јесу полисахариди, формирани од истих или различитих угљенохидратних јединица, комбинованих на различите начине. Полисахариде производе различите групе прокариотских и еукариотских организама (биљке, животиње, алге, бактерије, квасци и гљиве), током свог раста и метаболизма. Предност примене микробних полисахарида у односу на полисахариде другог порекла огледа се у брзом расту њиховог извора, услед чега микробни полисахариди под контролисаним условима могу бити произведени у већој количини за краће време. Микробни полисахариди се могу изоловати из микроорганизама који расту на различитим стаништима и у различитим условима (Doyle и сар., 2013). Индустријски и пољопривредни отпад може се користити као медијум за раст микроба који синтетишу корисне ЕПС и на тај начин, делимично, може се решити питање отпада. Микробни ЕПС не захтевају, као што је случај код биљних полисахарида, додатну обраду за уклањање непожељних нечистоћа, већ се добијају релативно једноставним поступком са високим степеном чистоће. Екстракција микробних ЕПС, осим што је једноставна, није скупа, врши се из обновљивих извора и еколошки је прихватљива. Микробни ЕПС би могли делимично да замене ограничено доступне биљне полисахариде који се углавном синтетишу сезонски и дужи временски период, јер је за синтезу микробних ЕПС потребно свега неколико дана при одговарајућим условима (Song и сар., 2023).

Микроби производе два типа полисахарида, у зависности од њиховог положаја у односу на ћелију: интрацелуларне и екстрацелуларне полисахариде. Екстрацелуларни полисахариди се лакше изолују, бројнији су и у широј су употреби, а могу постојати у два облика: као капсуларни полисахариди и као слободни полисахариди - егзополисахариди. Капсуларни екстрацелуларни полисахариди окружују ћелију у виду ковалентно везаног кохезивног слоја, док су ЕПС слузаве материје лабаво везане за ћелијску површину или их микроби потпуно излучују у спољну средину (Häffele и сар., 2022). Ови секундарни метаболити имају првенствено заштитну улогу за микробе који

их продукују. Синтетишу се током касне експоненцијалне (log) фазе и током стационарне фазе раста микроорганизама, при чему се највећа продукција ЕПС се дешава у стационарној фази раста (Veena и сар., 2021).

Од првог ЕПС идентификованог још у 19. веку, декстрана изолованог из бактеријског соја *Leuconostoc mesenteroides*, до данас је објављено много радова у којима су проучавани састав, својства и структура ових биомолекула. Број ових истраживања је знатно порастао последњих деценија и у даљем је порасту, с обзиром да се јавља све већа потреба за еколошки прихватљивим биополимерима у различитим индустријама. Интензивна истраживања су усмерена на потенцијалну примену нових биоматеријала на бази ЕПС, због њихових јединствених својстава која су пожељна у прехрамбеној индустрији, фармацеутској индустрији, медицини, нафтној индустрији, пољопривреди, текстилној индустрији и у области заштите животне средине (Suryawanshi и сар., 2022; Waoo и сар., 2023).

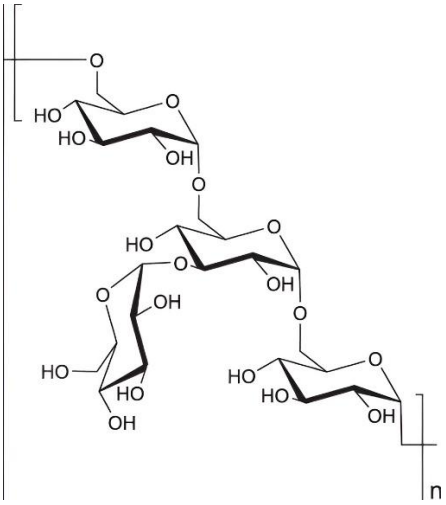
Бактеријски ЕПС имају неколико предности у односу на ЕПС изоловане из других микробних организама. Бактерије се брзо размножавају, производња њихових ЕПС је брза и није ограничена временским условима и годишњим добима. Изолација у лабораторијским условима не захтева употребу скупих и токсичних хемикалија и једноставна је, с обзиром да су, као екстрацелуларни метаболити, ЕПС лако одвојиви од ћелија. Велики број функционалних група које поседују бактеријски ЕПС погодан је за различите хемијске модификације, с циљем побољшања њихових својстава, у зависности од њихове будуће намене (Netrusov и сар., 2023). Осим тога, принос бактеријских ЕПС је могуће побољшати оптимизацијом услова производње и генетичким инжењерингом бактеријске врсте. Широк спектар бактеријских врста, Грам позитивних и Грам негативних, у стању је да произведе ЕПС различитог састава. Велика разноликост бактеријских ЕПС омогућава њихову категоризацију на основу хемијске структуре, врсте веза међу сахаридним јединицама, молекулске масе и функционалности. Осим бактерија, способност синтетисања ЕПС имају и алге, микроалге, квасци, печурке и базидиомицете (Mishra и сар., 2013).

2.1.2 Састав и структура ЕПС

Дефинисање структуре ЕПС укључује дефинисање састава и конформације сахаридних јединица у молекулу ЕПС, гликозидних веза међу сахаридним јединицама, положај веза и њихове конформације, понављајућих блокова у молекулу и молекулске масе (Wang и сар., 2023a). ЕПС су макромолекули, једињења велике молекулске масе од $0{,}5x10^6$ до $2x10^6$ Da (Flemming и сар., 2010). Њихов састав је сложен и разнолик, што утиче на њихова функционална својства. Структура ЕПС зависи, пре свега, од извора, односно микробне врсте, затим од састава медијума, извора угљеника и азота, затим и од осталих услова раста (Nouha и сар., 2018). ЕПС се састоје од мономерних сахаридних јединица

повезаних гликозидним везама. Везе између мономерних јединица у главном ланцу ЕПС најчешће су 1,4-β- или 1,3-β- гликозидне везе, које карактерише велика крутост, док је други тип веза, 1,2-α- или 1,6-α-гликозидне везе, флексибилнији (Nwodo и сар., 2012). Молекуларно уређење моносахаридних јединица и углови између гликозидних веза доприносе јединственим физичким карактеристикама сваког ЕПС.

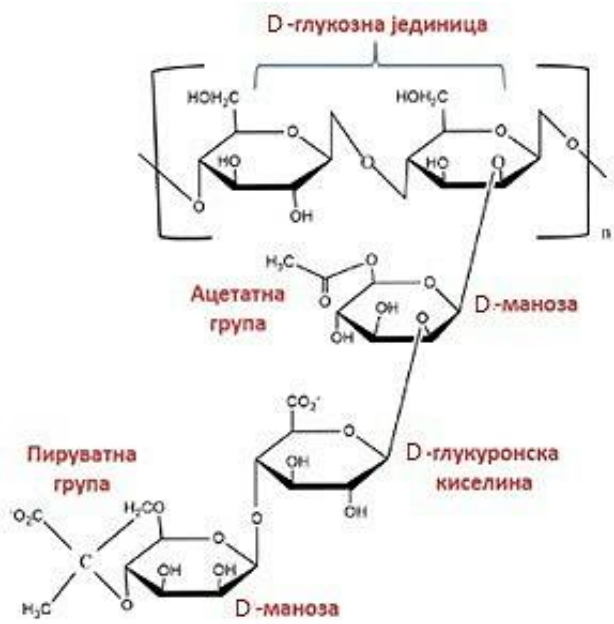
У зависности од моносахаридног састава, ЕПС могу бити хомополимерни или хетерополимерни. Структурно могу бити линеарни или разгранати (Veena и сар., 2021). Хомоегзополисахариди (хомоЕПС) су изграђени најчешће од D-глукозе или D-фруктозе и, у зависности од типа веза и моносахаридних јединица, даље се могу класификовати као: α-D-глукани, β-D-глукани, фруктани и галактани (Bajpai и сар., 2016; Nwodo и сар., 2012). БМК већином синтетишу хомоЕПС. Декстран, леван, кефиран и хијалуронска киселина су комерцијални хомоЕПС изоловани из култура БМК. Декстран, први идентификовани ЕПС, састављен је од D-глукозних јединица повезаних α-1,6-гликозидном везом у главном ланцу, док су бочни ланци за главни ланац повезани α-1,3-гликозидним везама. Структура декстрана приказана је на слици 1.



Слика 1: Пример структуре хомоЕПС – декстран (Delattre и сар., 2007)

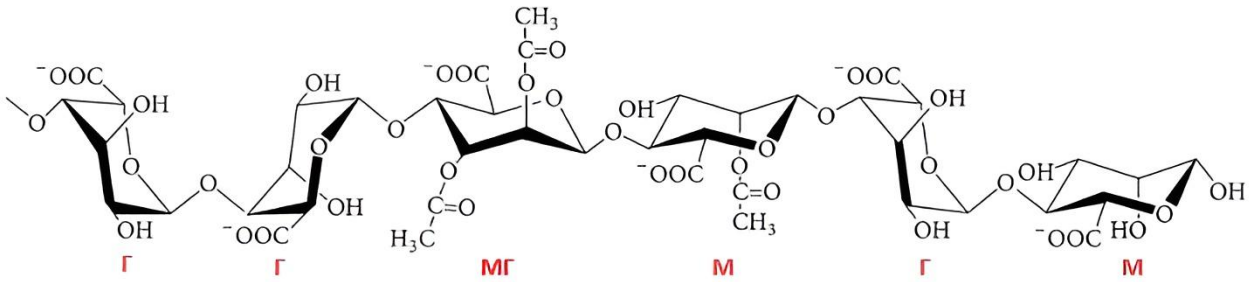
Хетероегзополисахариди (хетероЕПС) се састоје од понављајућих јединица сачињених од два до осам различитих, повезаних моносахарида (Sajna и сар., 2021). Ови хетерополимери могу садржати пентозе (D-арабинозу, D-рибозу, D-ксилозу, L-фруктозу), хексозе (D-глукозу, D-галактозу, L-рамнозу, D-манозу, L-фукозу), уронске киселине (D-глукуронску киселину, L-глукуронску киселину, D-мануронску киселину) и N-ацетиламино шећере (D-глукозамин, D-галактозамин) (Donot и сар., 2012).

Осим сахаридних јединица, хетерополисахариди могу садржати несахаридне компоненте органске природе (протеини, липиди, нуклеинске киселине, ацетати, пирувати, сукцинати, глицерол, хидроксибутаноат, поједине аминокиселине) и неорганске супстанце (фосфати, сулфати) (Casillo и сар., 2018; Sutherland и сар., 2009). Пример комерцијалног хетероЕПС је ксантан гума, чија је структура приказана на слици 2.



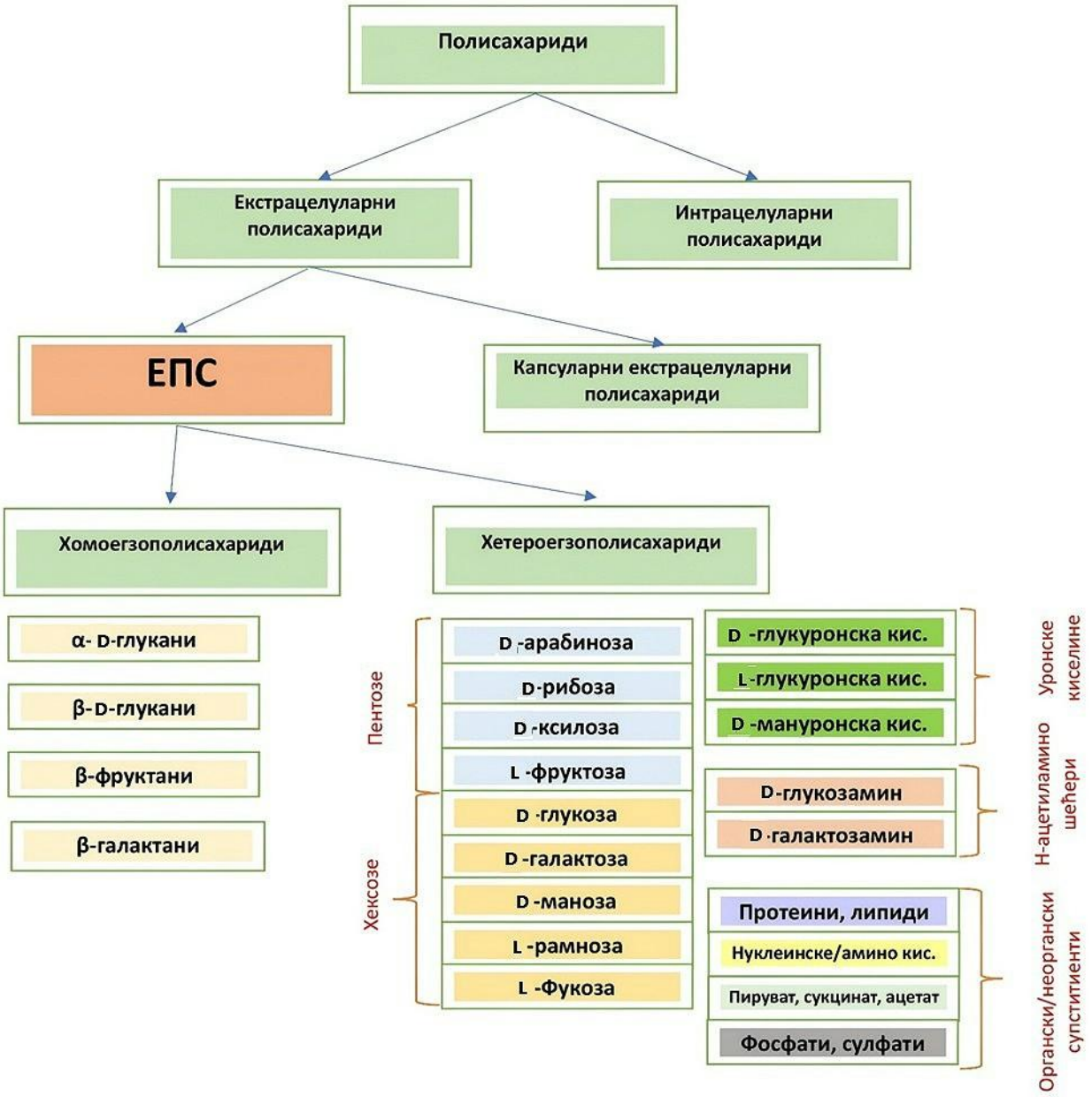
Слика 2: Пример структуре хетероЕПС - ксантан гума (Jadav и сар., 2023)

Поједини аутори (Mishra и сар., 2013) поред хомо- и хетероЕПС спомињу и трећу групу - ЕПС са нерегуларном структуром, као што је алгинат. Алгинат се може састојати од М блокова (узастопно везане (1-4)-β-D-мануронске киселине), Г блокова (узастопно везане α-L-глукуронске киселине) или од МГ блокова (наизменично везане (1-4)-β-D-мануронска киселина и α-L-глукуронска киселина) (Urtuvia и сар., 2017). Структура алгината приказана је на слици 3.



Слика 3: Структура алгината (Urtuvia и сар., 2017)

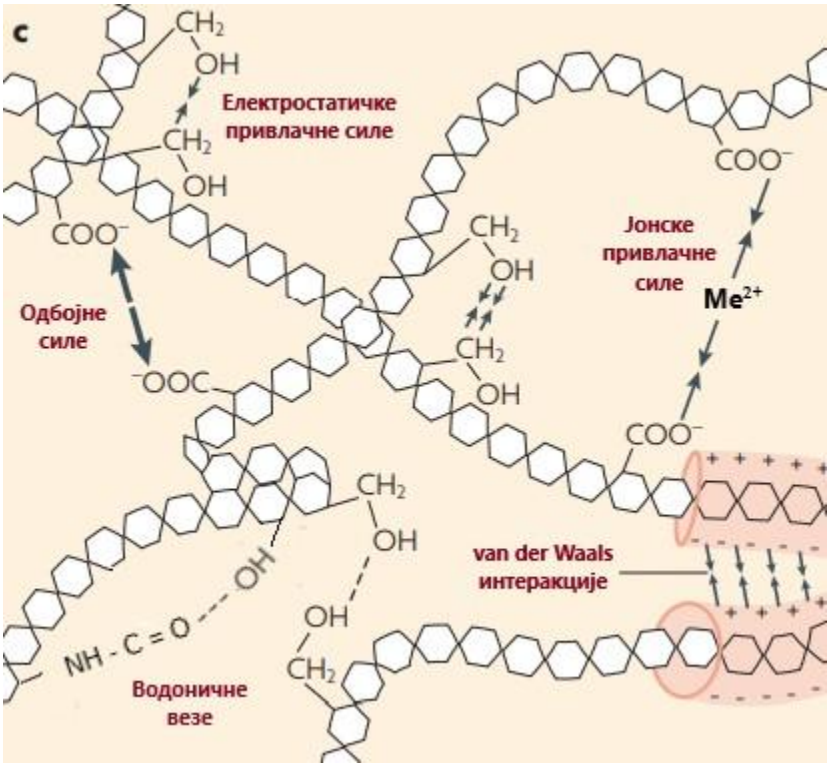
Класификација ЕПС у зависности од моносахаридног састава приказана је на слици 4.



Слика 4: Класификација ЕПС у зависности од структуре и састава (аутор)

Структура и функционална својства ЕПС зависе, осим од моносахаридног састава и типова веза између њих, и од дужине, степена разгранатости и просторне организације полисахаридног ланца. Дужи и разгранатији ланци су флексибилнији, имају више функционалних група које могу допринети различитим интермолекулским и интрамолекулским интеракцијама између делова полисахаридног ланца (слика 5), али и

проузроковати стерне сметње које могу дестабилизовати молекул ЕПС. Сви поменути фактори могу утицати на уређеност ланца и на термичку стабилност ЕПС.



Слика 5: Типови молекулских интеракција у структури ЕПС (Flemming и сар., 2010)

2.1.3 Биосинтеза ЕПС

Разумевање механизма биосинтезе ЕПС значајно је са становишта оптимизације процеса њиховог добијања, повећања приноса, побољшања својстава производа у чијој производњи се користе ЕПС и дизајна нових ЕПС-продукујућих сојева (Ates и сар., 2015). ЕПС се углавном, осим неколико изузетака (декстран, леван, мутан), синтетишу унутар ћелије, а затим излучују изван ћелије у спољну средину (Schmid и сар., 2015). До сада су позната четири механизма синтезе бактеријских ЕПС, три интрацелуларна и један екстрацелуларни (Schmid и сар., 2015):

1. Механизам синтезе зависан од ензима флипазе (Wzk) и полимеразе (Wzy), којим се интрацелуларно синтетишу хетероЕПС. У овом биосинтетичком путу неколико ензима глукозилтрансфераза, користећи нуклеотид-активиране моносахариде, синтетише олигосахаридне јединице на липидном носачу који се налази на унутрашњој страни ћелијске мембране. Одатле се појединачне олигосахаридне јединице (понављајући блокови полисахаридног ланца) транспортују кроз

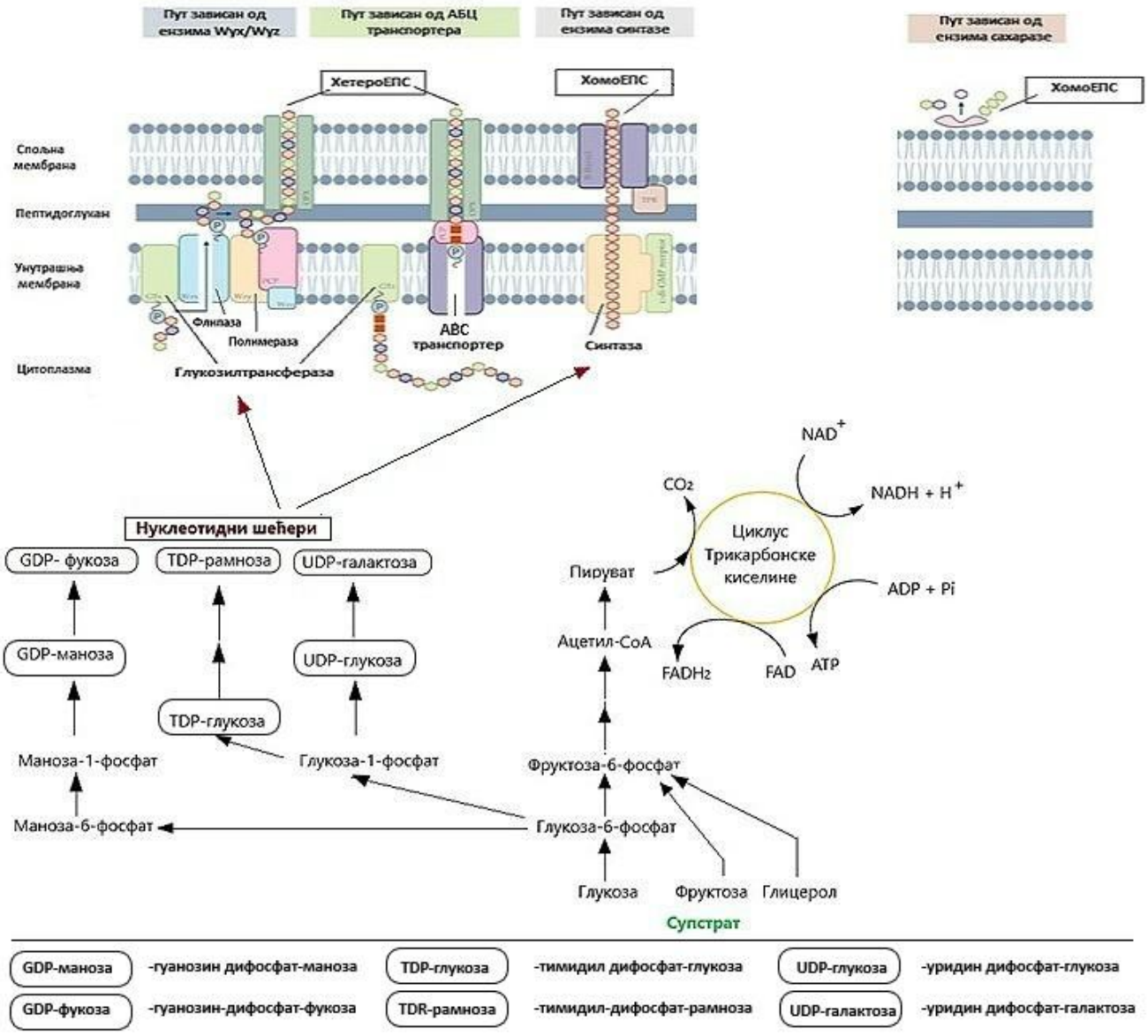
ћелијску (цитоплазматичну) мембрану помоћу ензима флипазе (Wzk), а затим се у периплазматичном простору врши полимеризација помоћу ензима полимеразе (Wzy) и коначно, излучивање насталог полимера у спољну средину (Sajna и сар., 2021). Већина Грам негативних бактерија синтетише хетероЕПС овим механизмом (Ates и сар., 2015), као и родови Грам позитивних бактерија *Streptococcus*, *Lactobacillus*, и *Leuconostoc* (Bibi и сар., 2021).

2. Механизам синтезе зависан од АВС (eng. *ATP-binding casette*) -транспортера којим се интрацелуларно синтетишу капсуларни и хетроЕПС. У цитоплазми, ензими глукозилтрансферазе додају моносахаридне јединице настале из нуклеотид-активираних моносахарида на растући полисахаридни ланац, без коришћења липидног носача. Транспорт комплетно синтетисаног полисахарида кроз ћелијску (цитоплазматичну) мембрану у спољну средину обавља се посредством мембранског АВС- транспортера (Siya и сар., 2021).

3. Механизам синтезе зависан од мембранског ензима синтазе, специфичног олигомерног комплекса који је јединствен за одређени тип хомоЕПС (Siya и сар., 2021) (нпр. леван-синтаза, декстран-синтаза), који се интрацелуларно синтетишу. Ензим синтаза истовремено врши полимеризацију моносахаридних јединица насталих из нуклеотид-активираних моносахарида, интрацелуларно, и транспорт растућег полисахаридног ланца кроз ћелијску (цитоплазматичну) мембрану у спољашњу средину.

4. Механизам синтезе директно из спољног сахарозног супстрата, посредством ензима глукозилтрансферазе или фруктозилтрансферазе који су зависни од сахарозе. Екстрацелуларно се супстрат-сахароза ензимски хидролизује до глукозе и фруктозе које се потом, без синтезе нуклеотид-сахаридних прекурсора, директно уграђују у растући ланац хомоЕПС (Siya и сар., 2021). Посредством глукозилтрансферазе настају хомоЕПС типа глукана (декстран, мутан), а посредством ензима фруктозилтрансферазе настају хомоЕПС типа фруктана (инулин, леван). Овај пут синтезе користе, рецимо, бактеријски родови *Pediococcus*, *Leuconostoc*, и *Weissella* (Bibi и сар., 2021).

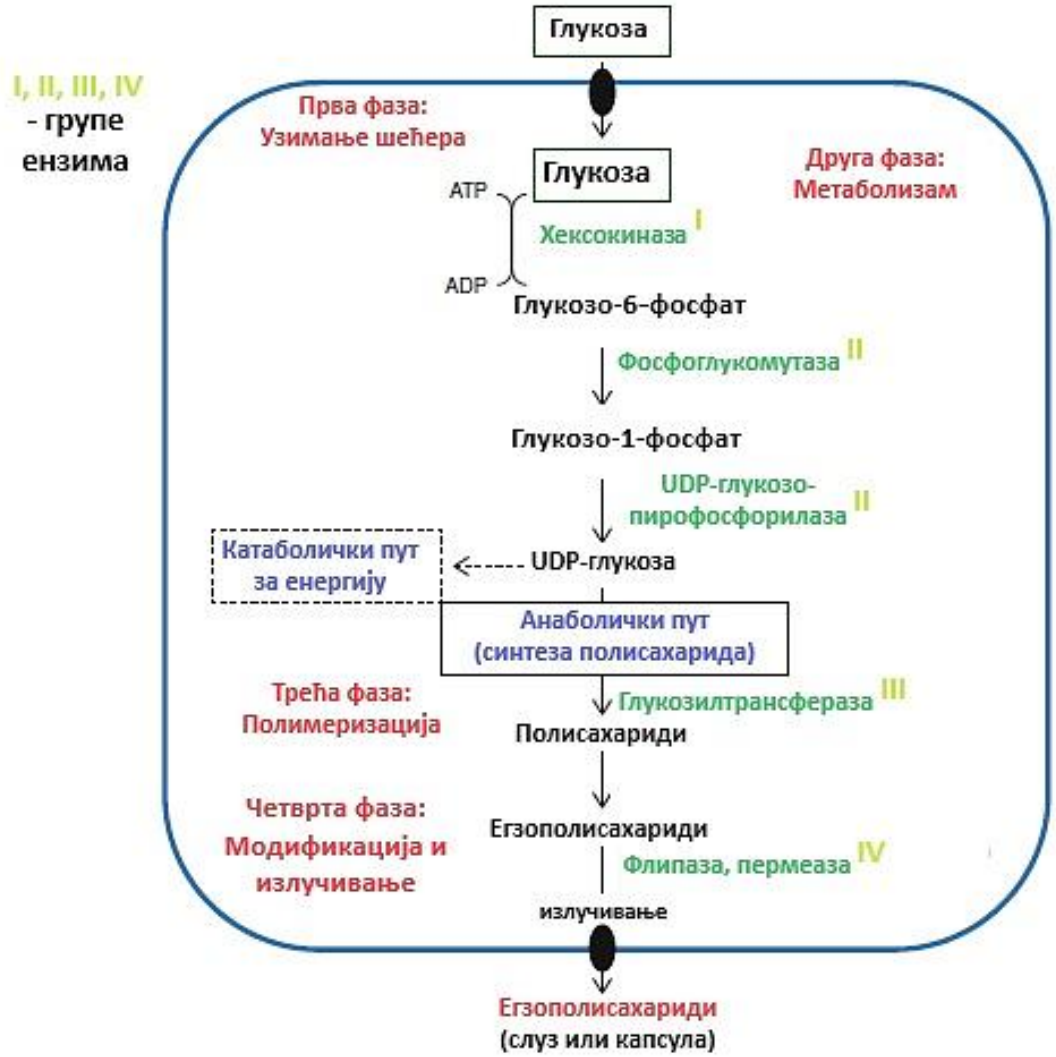
Механизми синтезе ЕПС приказани су на слици 6.



Слика 6: Механизми биосинтезе ЕПС (аутор)

ХомоЕПС се могу синтетисати интрацелуларно или екстрацелуларно (Schmid и сар., 2015), док се хетероЕПС синтетишу искључиво интрацелуларно, а затим преносе у спољну средину. Процес синтезе хетероЕПС је сложенији од синтезе хомоЕПС, али су основне фазе интрацелуларног формирања прекурсора полисахарида исти код оба типа ЕПС синтетисаних унутар ћелије.

На слици 7 приказана је општа шема метаболизма глукозе као супстрата (примарног извора угљеника) током процеса интрацелуларне синтезе хомоЕПС и хетероЕПС, уз примере ензима који учествују у биосинтези.



Слика 7: Шема метаболизма глукозе као супстрата током интрацелуларне синтезе микробних ЕПС (Mishra и сар., 2013)

Прва фаза подразумева преузимање глукозе из спољног супстрата и транспорт из спољне средине у цитоплазму посредством специфичних транспортера (ABC транспортер, фосфорилациони траспорт, мембрански транспортни протеини)(Jeckelmann and Erni 2020). У другој фази долази до метаболизма глукозе, при чему се глукоза фосфорилише посредством ензима типа хексокиназе у глукозо-6-фосфат, који се затим преводи у глукозо-1-фосфат посредством ензима типа фосфоглукомутазе. Даље се, посредством ензима типа UDP-глукозопирофосфорилазе,

глукозо-1-фосфат преводи у UDP-глукозу, донор моносахаридног остатка и прекурсор полисахарида. У трећој фази ензими типа глукозилтрансфераза катализују полимеризацију растућег полисахаридног ланца. Четврта фаза обухвата постсинтетску модификацију (ацилација, метилација, сулфонација, ацетилација, итд.) и транспорт синтетисаног полисахарида у спољну средину путем једног од механизама приказаних на слици 6 (Jurášková и сар., 2022; Mishra и сар., 2013; Schmid и сар., 2015; Welman и сар., 2003).

2.1.4 Изоловање и пречишћавање ЕПС

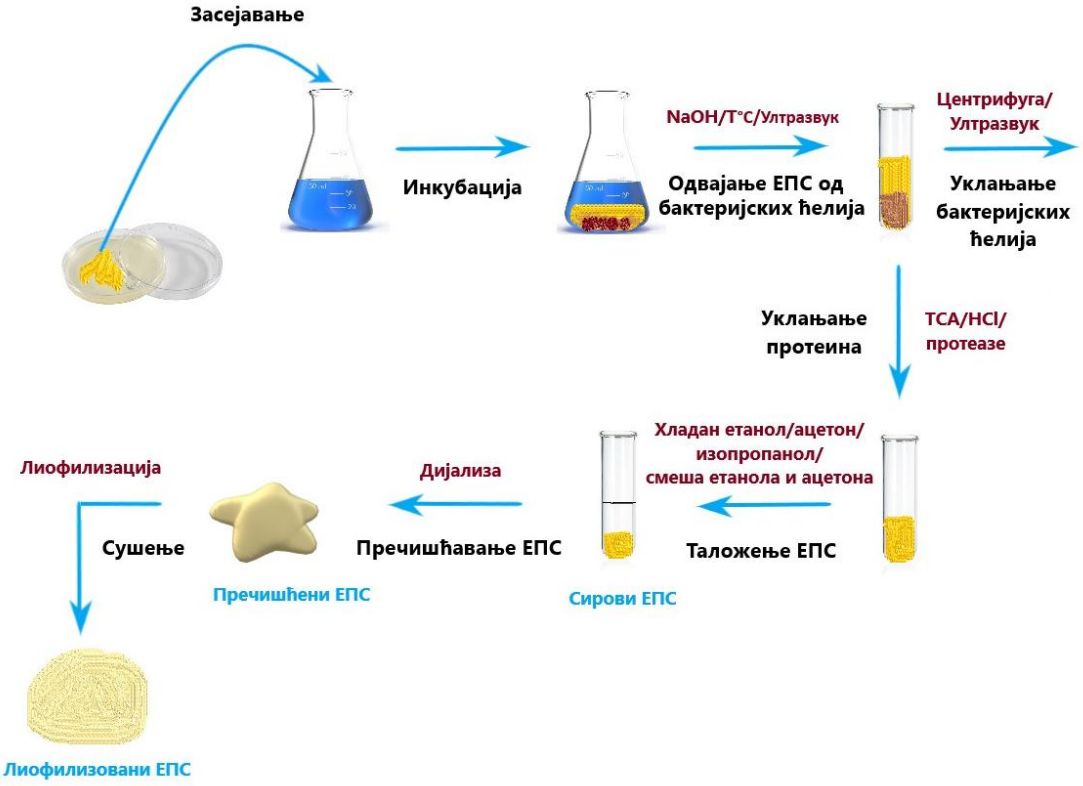
У лабораторијским условима, бактеријски ЕПС се могу добити у захтеваном обиму без обзира на годишње доба и временске услове. Лако се ослобађају из ћелија у околину због чега је њихова производња прилично једноставна и исплатива (Netrusov и сар., 2023). Услови узгоја микроорганизама (температура, pH медијума, количина кисеоника, тип биореактора, време култивације, извори угљеника и азота и њихов однос (C/N)), утичу на биосинтезу ЕПС, њихову структуру, физичко-хемијска својства и принос (Netrusov и сар., 2023). За микроорганизме који производе ЕПС, главни извор угљеника, као и енергије, јесу сахариди, а извори азота су амонијумове соли и аминокиселине (Rana и сар., 2020). За већину микроорганизама који производе ЕПС, однос C/N при коме се постиже максимални принос јесте 10:1 (Netrusov и сар., 2023; Rana и сар., 2020). Осим овог односа, на принос ЕПС утичу запремина инокулума, састав супстрата, проток ваздуха, температура, pH средине и брзина мешања (Ghanaim и сар., 2025).

БМК које производе ЕПС у лабораторијским условима се најчешће узгајају на MRS (Man Rogosa Sharpe) подлогама, чији је састав: 10,0 gL^{-1} пептон, 10,0 gL^{-1} месни екстракт, 5,0 gL^{-1} екстракт квасца, 20,0 gL^{-1} глукоза, 2,0 gL^{-1} амонијум-цитрат, 5,0 gL^{-1} натријум-ацетат, 1,0 mLL^{-1} полисорбат 80 (Tween 80), 2,0 gL^{-1} калијум-хидрогенфосфат, 0,2% тиамонијум-цитрат, 0,1 gL^{-1} магнезијум-сулфат хептахидрат, 0,05 gL^{-1} манган-сулфат тетрахидрат и 1,0% агар. Такође, могу се узгајати и на Триптон соја агар подлогама, чији је састав: 15,0 gL^{-1} триптон, 0,5 gL^{-1} соја пептон, 0,5 gL^{-1} натријум-хлорид и 12,0 gL^{-1} агар. Развијене су различите технике изолације и пречишћавања ЕПС и оне обухватају физичке, хемијске и/или ензимске методе. Од физичких метода за изолацију ЕПС примењују се загревање, третман ултразвуком и центрифугирање (Nouha и сар., 2018). Од хемијских метода најчешће се примењују јонска измена, екстракција са EDTA и екстракција са NaOH (Nouha и сар., 2018). Физички третмани који се користе при изоловању ЕПС мање доприносе лизи ћелије, али обично су мање ефикасни од хемијских метода у погледу приноса ЕПС. Из овог разлога, најчешће се у процедурама изолације ЕПС комбинују физичке и хемијске методе.

Уопштено, производња и изоловање ЕПС обухватају следеће кораке (Prete и сар., 2021):

(1) Засејавање бактеријског соја;
(2) Инкубација бактеријског соја до стационарне фазе;
(3) Одвајање ЕПС од бактеријских ћелија;
(4) Уклањање бактеријских ћелија из суспензије;
(5) Уклањање протеина из суспензије;
(6) Пречишћавање изолованих ЕПС;
(7) Сушење ЕПС и складиштење.

На слици 8 је приказана шема процеса изолације ЕПС из бактеријске културе.



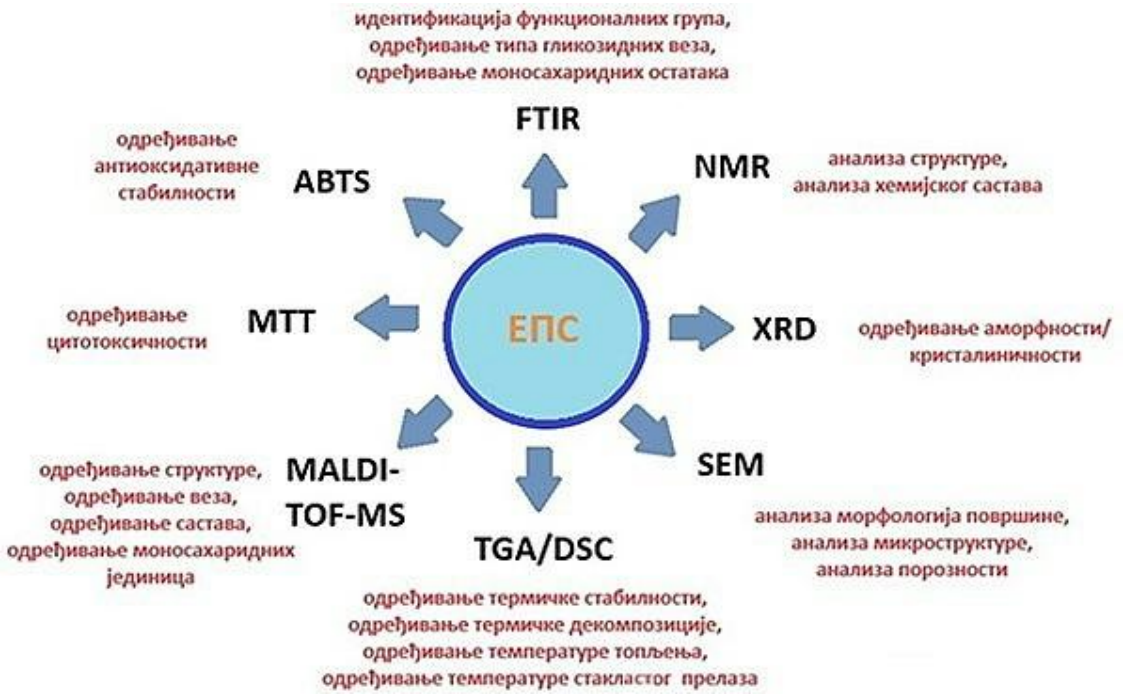
Слика 8: Шема процеса изолације ЕПС из бактеријске културе (аутор)

За производњу ЕПС потребно је обезбедити оптималне услове за раст бактеријске културе. Раст културе се прати до стационарне фазе, односно до фазе најинтензивније синтезе ЕПС. Одвајање ЕПС од бактеријских ћелија у медијуму врши се посредством топлоте, јаких база (NaOH) или ултразвука. Загревањем се инактивирају и потенцијално присутни ензими (Lynch и сар., 2018). У следећем кораку се бактеријске ћелије и коагулисани протеини уклањају из суспензије центрифугирањем (Lynch и сар., 2018;

Nachtigall и сар., 2021). Депротеинизација се обавља најчешће применом трихлорсирћетне (TCA) киселине, уобичајено до финалне концентрације TCA 10-20%, јаке киселине (HCl) или ензимски, применом протеаза (Lynch и сар., 2018; Nachtigall и сар., 2021). Таложење ЕПС у медијуму врши се хладним етанолом или, ређе, ацетоном, изопропанолом или смешом етанола и ацетона (Leroy и сар., 2016; Lynch и сар., 2018). Додатно пречишћавање исталоженог ЕПС се обавља дијализом наспрам дестиловане воде, чиме се уклањају угљени хидрати мале молекулске масе. Сушење се обавља лиофилизацијом, што ће уклонити влагу и олакшати складиштење ЕПС (Nachtigall и сар., 2021).

2.1.5 Технике за карактеризацију ЕПС

Карактеризација ЕПС обухвата низ аналитичких процедура којима се добијају подаци о морфологији и саставу ових биополимера, што надаље олакшава усмеравање истраживања која се односе на могућност њихове примене. За карактеризацију ЕПС стандардно се примењују методе као што су: FTIR, NMR, XRD, MALDI-TOF, HPLC, GC-MS, електронска микроскопија и термичке методе. Поред тога, карактеризација може укључити и одређивање тачке нултог наелектрисања и испитивање цитотоксичности и антиоксидативне активности. На слици 9 приказане су методе коришћене за карактеризацију ЕПС у овом истраживању и параметри који се одређују овим методама.



Слика 9: Коришћене методе за карактеризацију ЕПС (аутор)

2.1.6 Функционални значај ЕПС

ЕПС имају значајну улогу у микро- и макро окружењу микроорганизама. Као екстрацелуларне материје, ЕПС посредују у интеракцији ћелије са околином, имају улогу у комуникацији између две ћелије (размена гена и метаболита) и у симбиози микроба и биљака. Због способности задржавања воде и адсорпције органских и неорганских материја из окружења, ЕПС представљају извор хранљивих материја и имају улогу у исхрани ћелија (Nwodo и сар., 2012; Schmid и сар., 2015; Shukla и сар., 2019). Велика група микроорганизама синтетише ЕПС као одговор на различите стресне факторе из околине: високе температуре, ултраљубичасто зрачење, висок салинитет итд. Основна улога ЕПС је заштитна, при чему ЕПС штите микроорганизме (и њихове споре) од исушивања, осмотског стреса[1], напада бактериофага, лизозима, токсичних једињења и хемијских агенаса (антибиотика, тешких метала, оксиданаса), чиме омогућавају њихову адаптацију и опстанак у неповољним спољним условима (Arayes и сар., 2023; Donot и сар., 2012). ЕПС имају значајну улогу у преживљавању микроорганизама у екстремним условима, с обзиром да их производе и екстремофилни и екстремотолерантни микроорганизми (Nicolaus и сар., 2010; Wang и сар., 2019). ЕПС доприноси лакшој агрегацији ћелија, колонизацији сојева и формирању биофилмова, на чију механичку стабилност директно утичу. Ово је значајно при колонизацији епитела домаћина, како за пробиотске сојеве тако и за патогене сојеве. Поред заштитне функције у односу на ћелију која га производи, ЕПС је значајан за адхезију ћелије на чврсту површину, биотичку и абиотичку, што објашњава значај ЕПС у патогенези болести (Werning и сар., 2022). Поједини аутори класификовали су ЕПС по њиховој функционалности (Flemming и сар., 2010) као: конструктивне, сорптивне, површински активне, редокс-активне, хранљиве и информативне.

2.2 Примена ЕПС

Због већ поменутих повољних својстава, микробни ЕПС имају потенцијал за примену различитим гранама индустрије (хемијска, прехрамбена, фармацеутска, козметичка и амбалажна), пољопривреди и медицини. Поједини ЕПС су већ нашли комерцијалну примену (алгинат, декстран, леван, ксантан гума, курдлан, кефиран, карагенан, гелан, емулзан, велан, хијалуронска киселина, итд.). Ксантан, гелан, декстран и курдлан заменили су до недавно коришћене биљне и ЕПС макроалги (Ates и сар., 2015). Велики потенцијал у медицинским и биолошким истраживањима имају ЕПС БМК, док је примена ЕПС патогених сојева у овој области, за сада, ограничена и више усмерена на индустрију и екологију.

[1] **Осмотски стрес** настаје када је концентрација растворених супстанци (соли, шећера, итд.) већа или мања изван ћелије него у ћелији, због чега долази до уласка воде у ћелију, односно изласка воде из ћелије, што последично може довести до пуцања, односно до исушивања ћелије.

2.2.1 Биолошка улога и потенцијал ЕПС БМК у медицини, биотехнологији и прехрамбеној индустрији

Због своје безбедности и биоактивних својстава ЕПС БМК су најчешће проучавани у биолошким и медицинским истраживањима и показали су велики потенцијал за будуће примене у превенцији и лечењу различитих болести и за побољшање људског здравственог стања уопште. Досадашња истраживања су показала да ЕПС БМК могу имати антивирусна, антибактеријска, антикоагулантна и антиоксидативна својства (Netrusov и сар., 2023). Поред тога, ЕПС ове групе бактерија могу испољавати антитуморску, имуномодулаторну и антиинфламаторну активност и повољно утицати на регулацију нивоа холестерола и шећера у крви (Netrusov и сар., 2023; 2019; Welman и сар., 2003). Због поменутих својстава поједини аутори предлажу ЕПС БКМ као потенцијалне носаче лекова (Kalimuthu и сар., 2023; 2021; Tabernero и сар., 2020), материјале погодне за брже зарастање рана (Teymoorian и сар., 2024; Trabelsi и сар., 2017) и као биоматеријале погодне за инжењеринг ткива (Bagnol и сар., 2022; Cai и сар., 2019). Примену имају и у прехрамбеној индустрији.

Механизми антимикробног дејства ЕПС још увек нису у потпуности разјашњени. Генерално, БМК активирају урођени имунски одговор домаћина, стимулишу раст корисних, пробиотских култура које су успешне у компетицији са патогеним сојевима, инхибирају раст и стварање биофилма патогених бактерија и спречавају адхезију патогена на епител црева домаћина (Werning и сар., 2022). У прегледном раду Abdalla (Abdalla и сар., 2021) сумирани су потенцијални механизми антимикробног дејства ЕПС. Између осталог, наводи се да позитивно наелектрисање површине ЕПС вероватно олакшава интеракцију са Грам негативним бактеријама, као и да ЕПС разграђују ћелијски зид патогених бактерија чиме спречавају њихов раст и инхибирају стварање биофилма. ЕПС БМК често показују антиоксидативно својство, односно способност да инактивирају слободне радикале. Антиоксидативна стабилност ЕПС је повезана са хидроксилним групама у молекулу, али и неким другим групама, као што су фосфатна, сулфатна и ацетатна (Werning и сар., 2022). Антиоксидативни капацитет зависи не само од функционалних група у молекулу ЕПС, већ и од дужине ланца, молекулске масе, конформације и врсте гликозидних веза. Активирањем Б ћелија, Т ћелија, макрофага и ћелија природних убица, ЕПС БМК изазивају хуморални и ћелијски имунски одговор и доприносе одбрани организма од инфекције (Jaseera и сар., 2021). Имуномодулаторна активност ЕПС се постиже њиховом интеракцијом са специфичним рецепторима на имунским ћелијама (Jaseera и сар., 2021). Имуномодулатурна активност ЕПС зависи од његове структуре, наелектрисања, слободних амино и карбоксилних група у понављајућим блоковима полисахаридног ланца. ЕПС БМК могу имати снажно антиинфламаторно дејство, *in vitro* и *in vivo* (Gangalla и сар., 2014.; Sun и сар., 2020; Wang и сар., 2023), што их чини потенцијалним средствима за превенцију болести које настају као последица различитих запаљенских процеса, као што је Алцхајмерова болест (Selim

и сар., 2023). Могући механизми антиинфламаторног дејства ЕПС су (Sun и сар., 2020): инхибиција продукције азотног оксида и проинфламаторних цитокина (интерлеукин 1β, интерлеукин 6), као и појачане производње антиинфламаторних цитокина. Антиоксидативно, антимикробно и антиинфламаторно дејство ЕПС БМК, свеобухватно их чини потенцијалним биоматеријалима погодним за зарастање рана (Teymoorian и сар., 2024), где антимикробно својство доприноси формирању баријере против микробне контаминације, а антиоксидативно својство доприноси зарастању ране неутрализацијом слободних радикала. Поред тога, ЕПС могу убрзати зарастање повређеног ткива стимулишући пролиферацију фибробласта и испољавајући антиинфламаторно дејство (Teymoorian и сар., 2024). Поједина истраживања су показала да ЕПС појединих сојева БМК могу инхибирати раст и пролиферацију различитих ћелија рака. Wu и сарадници (Wu и сар., 2021) предлажу неколико механизама антиканцерогеног дејства ЕПС: антипролиферативни ефекат, промовисање апоптозе ћелија рака, инхибиција ангиогинезе, инхибиција мутагенезе и ублажавање инфламације. На снагу антиканцерогене активности ЕПС утичу молекулска маса, моносахаридни састав, степен гранања полисахаридног ланца и тип веза између моносахаридних јединица. Због овог својства предложена је употреба ЕПС у одређеним антитуморским терапијама (Waoo и сар., 2023). Антикоагулантни ефекат ЕПС БМК зависи од концентрације, дистрибуције и положаја сулфатних група (сулфатног естра) у полисахаридном молекулу, као и од моносахаридног састава ЕПС (Li и сар., 2015, Hu и сар., 2021). Ово својство ЕПС може помоћи у превенцији можданог удара и срчане исхемије. Осим наведених активности, у литератури се наводи да ЕПС БМК могу имати антивирусни (Talbi и сар., 2023), антиулцерозни и антигастритични ефекат и да могу бити коришћени у превенцији болести изазваних дејством бактерије *Helicobacter pylori*, чији развој и раст доказано инхибирају (Hu и сар., 2021).

У прехрамбеној индустрији, ЕПС БМК су, као дијететска влакна, постали веома тражени. Користе се као средства за промену реолошких својстава, средства за побољшање сензорних својстава (укуса и текстуре) хране и пића, згушњивачи, емулгатори, стабилизатори и средства за желирање (Arserim Ucar D. K. и сар., 2021). ЕПС пробиотских бактеријских култура могу да утичу на пробиотска својства (као пребиотици), текстуру, мирис и укус готових ферментисаних производа. Познато је да пекарски производи направљени од киселог теста (посредством БМК култура) имају пунији, лепши укус, мекоћу и текстуру, што је директна заслуга БМК ЕПС произведених током процеса ферментације. Последњих година популарни су у производњи кондиторских производа са ниским садржајем калорија, ниским садржајем масноћа и без глутена. ЕПС БМК често улазе у састав функционалне хране и хране погодне за посебне кориснике попут вегана и особа нетолерантних на глукозу и глутен. Истраживања су показала (Werning и сар., 2022) да ЕПС БМК имају способност да инхибирају апсорпцију холестерола у телу домаћина, чиме се смањује његово таложење у крвним судовима, што последично може смањити ризик од развоја кардиоваскуларних болести. Механизам

који доводи до овог ефекта није потпуно разјашњен. Korcz и сарадници (Korcz и сар., 2021) претпостављају да у основи механизма лежи стимулација лучења жучних соли, што доводи до бржег катаболизма холестерола у хепатоцитима. Осим тога, ЕПС БМК могу утицати и на смањење садржаја шећера у крви домаћина, инхибицијом активности ензима α-амилазе и α-гликозидазе (Werning и сар., 2022). Због свега наведеног потенцијал ЕПС БМК долази све више до изражаја у нутриционизму и биомедицини, због чега је очекивано да ће тржишна вредност ЕПС расти у наредним годинама.

Декстран, леван, кефиран и хијалуронска киселина су ЕПС изоловани из БМК који су нашли комерцијалну примену.

Декстран је имао прву примену за повећање запремине крвне плазме (Rana и сар., 2020). Данас се користи у пекарској индустрији за побољшање текстуре, свежине, мекоће и волумена производа, као дијететски суплемент - замена за глутен у пекарским производима, што је значајно за кориснике који болују од целијаклије (Kothari и сар., 2014). У кондиторској индустрији користи се као средство за желирање и за инхибицију кристализације шећера при производњи желеа и гумених бомбона, млечних напитака и глазура (Kothari и сар., 2014). Декстран се користи као криопротектант при производњи сладоледа, за побољшање укуса ферментисаних млечних производ и производа са редукованим садржајем масноћа, као и за очување смрзнуте хране (Kothari и сар., 2014). У козметици се користи као антиинфламаторно средство, средство за затезање коже, и као средство за одржавање влаге коже и косе (Kothari и сар., 2014).

Познато је да се **хијалуронска киселина** користи увелико у фармацеутским и козметичким производима, као и у савременим козметичким третманима. Може имати различите примене као лубрикант и током оперативних захвата. У офтамологији се користи као додатак вештачким сузама и за ткивни инжењеринг рожњаче ока (Pérez-Morales и сар., 2024).

2.2.2 Биотехнолошки потенцијал ЕПС из патогених сојева

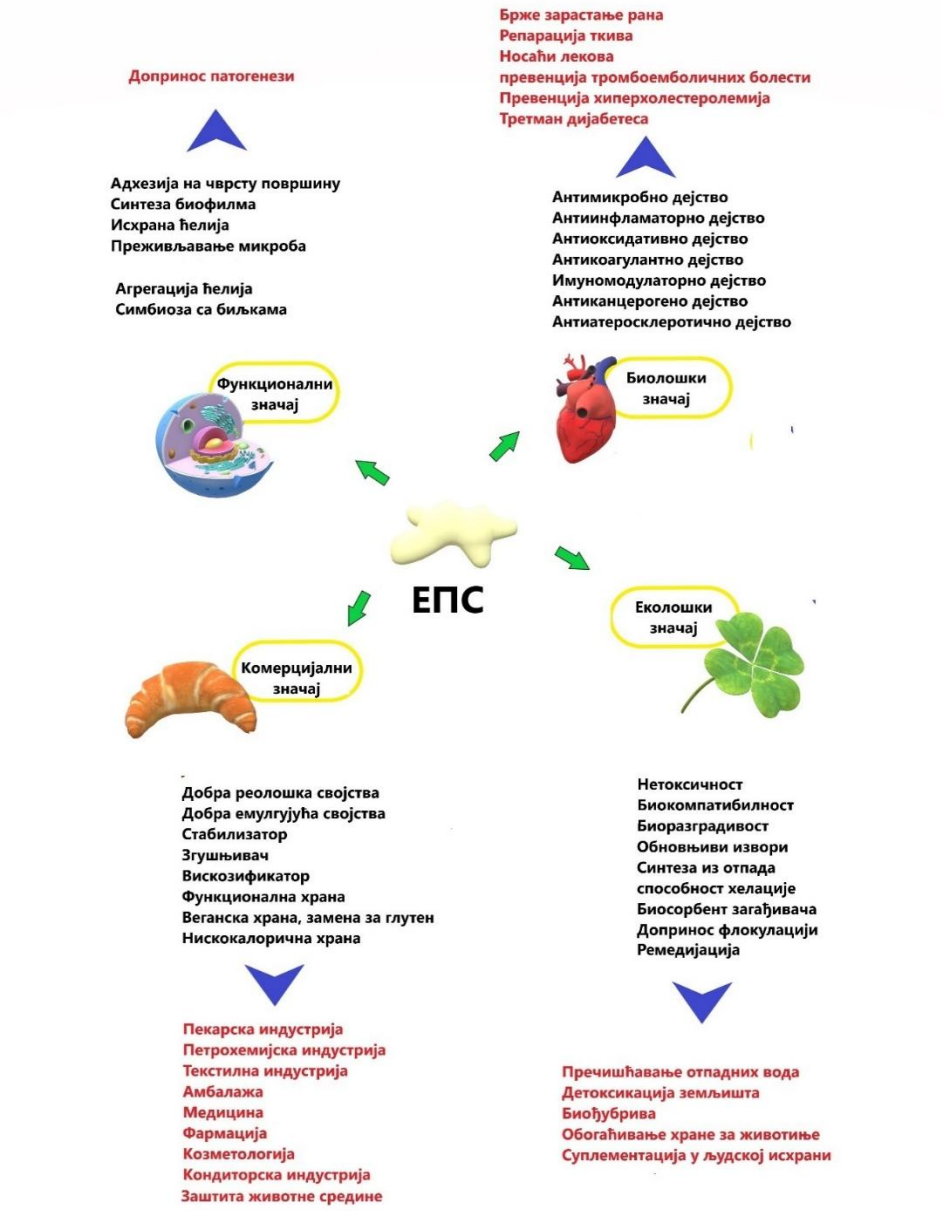
ЕПС патогених сојева такође могу имати антиоксидативно и имуномодулаторно својство (Ghanaim и сар., 2025) као ЕПС БМК, али су ова својства код патогених сојева окренута у корист саме бактерије, обезбеђујући им заштиту од имунског одговора домаћина и преживљавање. Иако ЕПС патогених бактерија нису нужно небезбедни по здравље људи, због могуће контаминације бактеријским токсинима, они немају директну примену у прехрамбеној индустрији и фармацији али јесу предмет медицинских и биолошких истраживања (Freitas и сар., 2011). ЕПС патогених сојева омогућавају опстанак патогених култура и имају улогу у патогенези, вируленцији и "маскирању" пред имунским ћелијама домаћина, што их чини моћним и оружјем и штитом у исто време. Примена ЕПС патогених сојева у експерименталним условима

помаже разумевању механизама имунског одговора на одређени патоген и омогућава развој нових приступа за превенцију и лечење инфективних болести (Zhang и сар., 2024). Такође, ЕПС патогених бактерија се користите за испитивање утицаја антибиотика, ензима и нових биоматеријала на формирање биофилма патогених култура. Применом метода генетског инжињеринга које омогућавају „пренос" генског кластера одговорног за синтезу ЕПС из једне у другу бактеријску врсту, може се обезбедити производња ЕПС патогених бактерија у непатогеним бактеријским сојевима чиме се значајно повећава могућност њихове биомедицинске примене (Schmid и сар., 2015).

Састав ЕПС патогених сојева је обично разноврснији од састава ЕПС БМК. ЕПС патогених бактерија садрже више типова функционалних група које им дају специфична функционална својстава и омогућавају интеракције са различитим материјама из окружења, добро везивање воде и јона метала. Због ових својстава ЕПС патогених сојева могу наћи примену у пољопривреди за регулацију протока воде и хранљивих материја из тла, регенерацију и агрегацију земљишта, што последично може подстаћи раст биљака (Kambourova и сар., 2015), побољшање квалитета и повећање приноса усева (Talbi и сар., 2023). Последњих деценија ЕПС патогених бактерија, као и ЕПС БМК, налазе примену и у индустрији воде и рециклажи (Mehta и сар., 2021).

Примери комерцијалних ЕПС добијених из патогених сојева су алгинат, курдлан и ксантан (Netrusov и сар., 2023). Ксантан и курдлан су метаболити фитопатогених бактеријских сојева, непатогених за човека, због чега имају ширу примену у прехрамбеној индустрији. Алгинат је ЕПС опортунистичког бактеријског патогена, због чега му је примена, за сада, ограничена на лабораторијску примену и истраживања, док се у прехрамбеној индустрији користи алгинат добијен из морских алги.

На слици 10 дат је преглед значајних карактеристика ЕПС БМК и патогених сојева и њихове потенцијалне примене у различитим гранама индустрије.



Слика 10: Значај и потенцијална примена ЕПС БМК и патогених сојева (аутор)

Ксантан гума има комерцијалну примену у прехрамбеној индустрији као згушњивач. У индустрији кондиторских производа је постала популарна задњих година. Користи се за производњу функционалне хране, веганских производа, производа са ниским садржајем масноћа, производа без глутена, производа са ниским гликемијским индексом и производа са ниском калоријском вредношћу (Arserim Ucar D. K. и сар., 2021). Користи се и као замена за јаја у прехрамбеној индустрији, за побољшање укуса сладоледа и млечних шејкова (Vaishnav и сар., 2021) и за стабилизацију цеђених сокова са воћном пулпом (Suryawanshi и сар., 2022). У фармацеутској индустрији ксантан гума

се користи као стабилизатор и емулгатор у лосионима, кремама, шампонима, дезодорансима, пастама за зубе. У петрохемијској индустрији, ксантан гума се користи за извлачење веће количине нафте из бушотина јер смањује вискозитет нафте, чиме олакшава њен проток. Такође, користи се и за чишћење нафтовода и за опоравак нафте (Rana и сар., 2020). Због способности везивања воде, ксантан гума може бити примењива у пољопривреди - додаје се земљишту како би се побољшала способност земљишта да задржава влагу (Arserim Ucar D. K. и сар., 2021).

Курдлан се користи у прехрамбеној индустрији за повећање вискозности, стабилности хране и добијање кремастије конзистенције хране (Rana и сар., 2020). У пољопривреди се користи као кондиционер земљишта, за продужавање задржавања воде у земљишту (Rana и сар., 2020). У индустрији месних производа се користи за добијање производа са смањеним садржајем масноћа (Waoo и сар., 2023). Има примену као додатак за побољшање механичких својстава папира за паковање (Arserim Ucar D. K. и сар., 2021).

Алгинат се користи у прехрамбеној индустрији у производњи дресинга за салате, џемова, желеа, сладоледа, за побољшање текстуре производа са редукованим садржајем масти (Arserim Ucar D. K. и сар., 2021). Користи се за продужење рока трајања прехрамбених производа (Arserim Ucar D. K. и сар., 2021).

2.2.3 Примена ЕПС као биосорбената тешких метала

Глобални светски проблем последњих деценија постало је загађење воде, земљишта и ваздуха. Ова загађења се јављају као последица природних и људских фактора и сматра се да урбанизација, непланска индустријализација и отпадне воде драстично доприносе овом проблему (Yingkong и сар., 2019). Главне загађујуће материје у животној средини, поред микропластике, индустријских боја, радионуклида, јесу тешки метали, као неизбежни и трајно присутни у природи. Добро су растворни у води, нису биоразградиви, а одређени услови средине погодују њиховој трансформацији у токсичнија стања, што све заједно доприноси њиховој одрживости у животној средини (Gupta и сар., 2017). Тешки метали циркулишу у животној средини кроз различите природне и антропогене процесе (слика 11).

Слика 11: Кружење тешких метала у животној средини (аутор)

Слика 11 приказује кретање тешких метала од антропогених извора, попут фабрика и природних извора, преко водених токова до животиња и биљака, те начин на који људи бивају директно изложени овим токсичним металима путем контаминиране воде и посредно кроз ланац исхране. Токсичност тешких метала потиче од њихове способности да се у организмима везују за протеине чиме спречавају репликацију ДНК молекула и даље ремете ћелијске процесе (Duruibe и сар., 2016). С обзиром да нису биоразградиви, тешки метали се акумулирају, најпре у животној средини а затим и у живим организмима (Pushkar и сар., 2021). Уклањање метала из индустријских отпадних вода класичним методама (таложење (Pohl и сар., 2020), електрохемијско таложење (Kuleyin и сар., 2020), јонска размена и мембранско одвајање (Zdujić и сар., 2021)), показало се као неисплативо због високе цене ових процеса и потенцијалног секундарног загађења. Предност над овим техникама временом су добили адсорпциони процеси, док последњих деценија постаје веома атрактивна биосорпција тешких метала - уклањање тешких метала биолошким методама. Уопштено, биосорпција је својство неживе биомасе и представља физичко-хемијски процес, независан од ћелијског метаболизма, који обухвата различите механизме. Процес је брз, реверзибилан, одвија се на самој

површини биосорбента, а чини га везивање јона или молекула адсорбата за функционалне групе на површини биосорбента (Filote и сар., 2021). Биосорбент је чврста фаза у процесу биосорпције, нежив или инактивиран биолошки материјал, док су адсорбати који се везују за биосорбент органске или неорганске супстанце у облику раствора (Fomina и сар., 2014; Gadd и сар., 2009). У потрази за ефикасним биосорбентима, са што бољим карактеристикама са становишта цене, исплативости, еколошке прихватљивости и безбедности по здравље људи, истраживања су у фокус ставила нетоксичне и биокомпатибилне ЕПС.

Бактеријске ЕПС карактерише присуство великог броја функционалних група, претежно анјонских (хидроксилна, карбоксилна, карбонилна, ацетатна, сулфатна, фосфатна група), које дају кумулативно негативно наелектрисање ЕПС. Анјонска природа ЕПС омогућава интеракцију и грађење стабилних (хелатних) комплекса са катјонима метала. Такође, ове групе омогућавају различите модификације у циљу проширења могућност и оптимизације примене ЕПС (Netrusov и сар., 2023). Бактеријски ЕПС поседују стабилност у широком опсегу температура и pH вредности што, уз способност агрегације, омогућава потенцијалну примену у детоксикацији земљишта и третману отпадних вода (Maddela и сар., 2021).

До сада су у многобројним радовима потврђена добра адсорпциона својства ЕПС различитог порекла, према јонима различитих метала из воде, земље и хране (Bach и сар., 2005; Concórdio-Reis и сар., 2020; Cui и сар., 2020; El-naggar и сар., 2008; Gupta и сар., 2017; Gupta и сар., 2015; Li и сар., 2020; Liu и сар., 2001). Према Concórdio-Reis и сарадницима ЕПС изолован из бактеријског соја *Enterobacter* A47, богат анјонским групама, у киселој средини најефикасније везује јоне олова, а везује и јона бакра, кобалта и цинка. Слично запажање објавили су Morillo-Pérez и сарадници (Morillo-Pérez и сар., 2008). Они су показали да ЕПС изолован из GRAS бактерије *Paenibacillus jamilae*, састављен од неутралних шећера и уронских киселина, има највећи афинитет према Pb(II) у поређењу са јонима Cd(II), Co(II), Ni(II), Cu(II), Zn(II), Fe(II) и Fe(III). Претходна истраживања (Munir Ahamed и сар., 2024) обухватила су испитивање адсорпционог потенцијала ЕПС изолованих из четири термофилна бактеријска соја, *Exiguobacterium aquaticum*, *Mammaliicoccus sciuri*, *Micrococcus luteus* и *Jeotgalicoccus huakuii*, према јонима Pb(II), Cd(II), Co(II), Ni(II), Cu(II), Cr(VI) и As(V) у воденом раствору и показала да, у датим условима, ЕПС сва четири термофилна соја у високом проценту уклањају јоне Cd(II), Ni(II), Cu(II) и As(V).

У Табели 1 је приказан преглед појединих истраживања у којима су испитивана адсорпциона својства ЕПС из различитих извора према различитим тешким металима.

Табела 1. Литературни преглед предложених нових ЕПС за адсорпцију тешких метала

ЕПС из микроорганизама	Метали	Референце
Enterobacter A47	Pb, Co, Zn, Cu	(Concórdio-Reis и сар., 2020)
Exiguobacterium aquaticum *Mammaliicoccus sciuri* *Micrococcus luteus* *Jeotgalicoccus huakuii*	As, Cd, Cr, Co, Cu, Pb, Ni	(Munir Ahamed и сар., 2024)
Enterobacter cancerogenus	Hg, Cd, Sr, Co, As, U	(Dhanya и сар., 2021)
Paenibacillus jamilae	Pb, Cd, Co, Ni, Zn, Cu	(Morillo Pérez и сар., 2008)
Azotobacter chroococcum XU1	Pb, Hg	(Rasulov, Yili, Aisa, 2013)
Oceanobacillus profundus	Pb, Zn	(Mwandira и сар., 2020)
Haloferax mediterranei	Cr, Ni, Pb, Zn	(Popescu и сар., 2009)
Anoxybacillus sp. R4-33	Cd , Zn	(Zhao и сар., 2014)
Bacillus cereus KMS3-1	Cd, Pb	(Krishnamurthy и сар., 2020)
Alteromonas sp. JL2810	Cu, Ni, Cr	(Zhang и сар., 2017)
Bacillus vallismortis	Zn	(Li и сар., 2019)
Agrobacterium tmefaciens F2	Cr(VI)	(Pi и сар., 2021)
Rhodococcus opacus *Rhodococcus rhodochrous*	Cd, Pb, Ni, Co, Cr(VI)	(Dobrowolski и сар., 2017)
Lactobacillus fermentum 6b	Pb, Cd	(Kermanshahi и сар., 2023)
Pseudomonas sp. W6	Pb	(Kalita и сар., 2017)
Lactobacillus acidophilus ATCC 4356	Pb, Cd	**(Massoud и сар., 2020)**

И у процесима адсорпција тешких метала, пажња је посвећена и ЕПС БМК, од којих су најчешће коришћени сојеви из рода *Lactobacillus*. Kermanshahi и сарадници (Kermanshahi и сар., 2023) проучили су адсорпциона својства ЕПС изолованог из *Lactobacillus fermentum* 6b, при чему су експерименти обухватили уклањање јона олова и

кадмијума из воденог раствора. ЕПС се у оптимизованим условима показао као добар адсорбент ових катјона, што је објашњено интеракцијом карбоксилне, хидроксилне, фосфатне и амино групе на површини ЕПС са јонима метала. Слично, у компаративној студији Anchal и сарадника (Anchal и сар., 2021), ЕПС из сојева *Lactobacillus reuteri* и *Lactobacillus plantarum* показали су се као солидни адсорбенти јона кадмијума и олова, при чему је ЕПС из *L. reuteri* дао боље резултате. За сада је доступан ограничен број публикација које се баве истраживањем адсорпције јона никла са ЕПС БМК.

Потенцијал ЕПС патогених сојева за уклањање тешких метала из окружења такође је испитиван у различитим истраживањима. ЕПС из патогеног соја *Bacillus cereus* KMS3-1, састављен претежно од неутралних шећера, показао је потенцијал за адсорпцију тешких метала, конкретно јона Cd и Pb (Krishnamurthy и сар., 2020). ЕПС изолован из патогеног соја *Enterobacter cancerogenus* YU16-RN5, састављен од неутралних шећера, уронских киселина и протеина, истражен је у погледу адсорпције тешких метала (Hg, Cd, Sr, Co, As, U) где је показао најбољи афинитет према јонима Cd (Dhanya и сар., 2021). Добијени резултати објашњени су стварањем стабилних комплекса и хелата са хидроксилним и карбоксилним групама ЕПС, као и јонским радијусом јона кадмијума.

Иако је последњих година процес адсорпције тешких метала из воде постао економски и еколошки прихватљива алтернатива стандардним третманима отпадних вода, истраживања у овој области су и даље актуелна јер још увек нису превазиђени сви изазови и техничке баријере. Изазови се односе на обављање експеримената у реалним условима и са реалним узорком, на имплементацију поступака у специфичним индустријским оквирима и комерцијализацију (Michalak и сар., 2013; Torres и сар., 2020). Главно ограничење примене бактеријских ЕПС у процесима адсорпција тешких метала је мали принос у производњи ЕПС (Li и сар., 2022), посебно у случају ЕПС БМК и других пробиотских сојева. Изазов који и даље постоји у истраживањима ЕПС јесте како повећати њихов принос, без додатне употребе штетних и скупих хемикалија. Повећање приноса ЕПС може се постићи метаболичким инжењерингом (Siya и сар., 2021), оптимизацијом раста бактеријске културе и оптимизацијом изолације ЕПС. Свакако се треба осврнути на чињеницу да ове метаболите ћелије појачано излучују онда када су услови средине стресни за ћелију, између осталог, и у погледу присуства тешких метала изнад прихватљиве количине. ЕПС су, због функционалних група на површини, киселог карактера. Ради побољшања адсорпционих својстава ЕПС се неретко модификују хемијским путем, што обухвата процесе метилације, ацетилације, карбоксиметилације, сулфонилације, фосфорилације и друго. Ови процеси мењају површину ЕПС у циљу бољег везивања супстанци од интереса. Из истог разлога синтетишу се различити биокомпозитни материјали од ЕПС и других материјала, ради добијања новог биоматеријала са побољшаним карактеристикама (Adewuyi и сар., 2020).

2.2.3.1 Механизми адсорпције и фактори који утичу на адсорпцију јона метала на ЕПС

Адсорпција јона метала се састоји од неколико корака (Naja и сар., 2011):

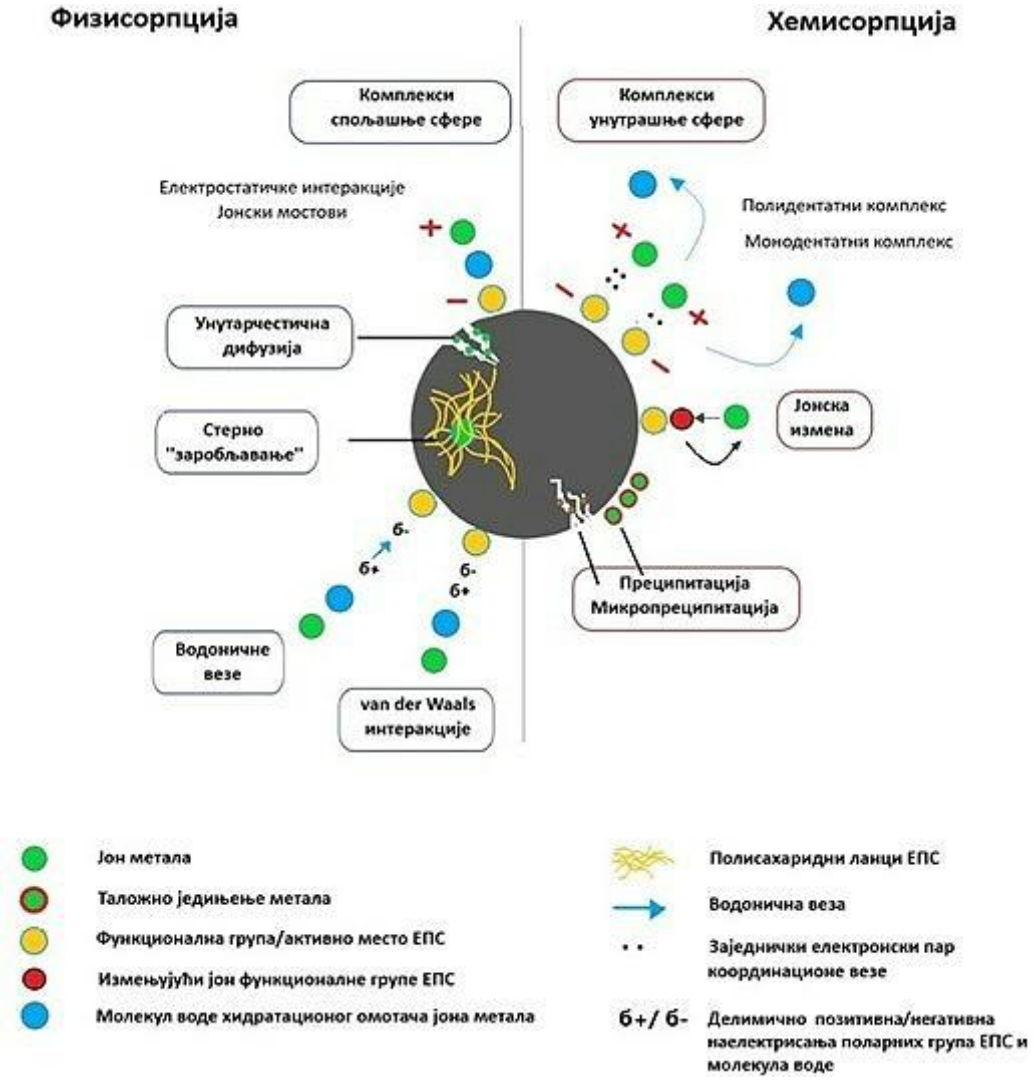
- транспорт јона метала кроз раствор до површине граничног слоја између адсорбента и раствора,
- дифузија метала кроз гранични слој око површине биосорбента,
- интрачестична дифузија унутар пора биосорбената и
- везивање јона метала на активна места биосорбента.

Укупну брзину адсорпције одређује најспоријији корак, најчешће дифузија кроз поре.

Адсорпциони капацитет ЕПС према тешким металима и механизам адсорпције зависи од састава и хемијске структуре ЕПС, од карактеристика јона метала који се адсорбује и од услова средине. Моносахаридни састав ЕПС, конформације моносахаридних јединица и типови гликозидних веза међу моносахаридним јединицама одређују тродимензионалну структуру и утичу на степен порозности (величина и распоред пора). Мезопорозност материјала доприноси повећању капацитета адсорпције, док га микропорозност материјала смањује. Линеарни полисахаридни ланци и неутрални моносахариди (хексозе, пентозе, 6-дезокси шећери) у саставу ЕПС дају мање порозан материјал, док разгранати ланци са више хидрофилних и киселих група ($-COO^-$, $-SO_3^-$, $-PO_4^{3-}$) доприносе мрежастој структури ЕПС, са више изражених пора, што повећава специфичну површину материјала. У зависности од природе и јачине интеракција које се остварују између јона метала и функционалних група ЕПС механизми адсорпције могу се сврстати под хемисорпцију или физисорпцију (слика 12).

Основу хемисорпционог механизма чине јаке, специфичне ковалентне или координационе везе. Јон метала успоставља везу директно са функционалном групом ЕПС у виду комплекса унутрашње сфере, при чему губи воду из хидратационог омотача. Формирани комплекси са јонима метала могу бити монодентатни (једноструко везани јони) или полидентатни (хелати). Комплексација се може остварити координативно-ковалентним везама између катјона метала и -COOH, -OH, $-NH_2$, $-PO_4^{3-}$ група ЕПС, чији се атоми O и N понашају као лиганди и донирају заједнички електронски пар. Уколико се координативна веза јона метала остварује истовремено са више лиганада из више функционалних група, веза се остварује грађењем стабилнијег комплекса – хелата. Директне интеракције између јона метала и функционалних група ЕПС могу бити и типа јонске измене и микропреципитације. За јонску измену погодне су -COOH, -OH и $-PO_4^{3-}$ групе на површини ЕПС (Gadd и сар., 2009; Torres и сар., 2020). Микропреципитација доводи до грађења нерастворних једињења метала (Kanamarlapudi и сар., 2017), соли или хидроксида, на површини ЕПС и непожељан је механизам хемисорпције зато што може смањити ефикасност адсорпције или дати

лажне резултате о ефикасности адсорпције. Због егзотермне природе успостављања веза, процес хемисорпције је углавном енталпијски покренут, док јачина везе доприноси уређености система и смањењу ентропије.



Слика 12: Механизми адсорпције јона метала на ЕПС (аутор)

Хемисорпциони механизми су типични за ЕПС који садржи функционалне групе које се могу у одређеним условима средине депротоновати ($-COO^-$, $-SO_3^-$, $-PO_4^{3-}$) и бити доступне за директну интеракцију са јонима метала. Слабије и реверзибилне интеракције (механизам физисорпције) типичне су за ЕПС који је претежно састављен од неутралних моносахарида или у условима средине када функционалне групе остају у протонованом облику. Када ЕПС нема доступне депротоноване групе (што зависи од pH окружења) нема ни слободних електронских парова за директну координацију са јонима метала. Тада јон метала остаје у свом хидратисаном облику и не остварује

интеракције директно са функционалним групама ЕПС, већ посредством молекула воде из хидратационог омотача, грађењем комплекса спољашње сфере. У основи физисорпционог механизма је углавном електростатичко привлачење супротно наелектрисаних функционалних група ЕПС и хидратисаних јона метала. На овај начин се могу формирати водоничне везе са -OH и -NH_2 групама, неспецифичне van der Waals-ове интеракције и јонски мостови. Овакав тип веза има углавном ендотерман карактер и смањује уређеност система, те је механизам адсорпције ентропијски покренут. Поред поменутих интеракција, механизми физисорпције обухватају и процесе унутарчестичне дифузије, задржавање јона метала у порама, физичко "заробљавање" јона метала у микропросторима и микроканалима између ланаца ЕПС формираним услед просторне организације ЕПС ланца и стерних ефеката ("стерно заробљавање").

Испитивање оптималних услова за процес адсорпције има значај за потенцијалну индустријску примену. Фактори окружења који утичу на процес адсорпције су pH, температура, доза ЕПС, концентрација јона метала, јонска јачина, време контакта и др. pH вредност окружења у коме се биосорпција одвија је најважнији параметар који има утицај на хемијско понашање ЕПС, наелектрисање функционалних група и кумулативно наелектрисање ЕПС. На вишим pH вредностима функционалне групе су депротоноване и повећан је афинитет према катјонима метала, док при pH изнад оптималне вредности може доћи до непожељне микропреципитације. Нижа pH вредност окружења може допринети конкуренцији са присутним H^+ за активна места на биосорбенту, што смањује капацитет адсорпције. Повишење температуре ће имати различити утицај на ефикасност адсорпције. Код ендотермних процеса, што је уобичајено за процес хемисорпције, повишење температуре ће довести до повећања ефикасности везивања јона метала за ЕПС, а снижење температуре може фаворизовати процес десорпције. Код егзотермних процеса ће повишење температуре смањивати ефикасност адсорпције (Torres и сар., 2020), што је чест случај код физисорпције. Повећање ефикасности адсорпције дешава се због веће доступности активних места, услед депротонизација група, промене конформације ЕПС, губитка воде и раскидање слабих веза које настају са повишењем температуре. У вишекомпонентним системима постојаће компетиција других јонских врста у раствору са катјонима метала за активна места на ЕПС (Michalak и сар., 2013; Park и сар., 2010; Torres и сар., 2020), што последично смањује ефикасност адсорпције. Ниске почетне концентрације јона метала у раствору условиће високу ефикасност уклањања јона метала, због тога што је довољно слободних активних места на ЕПС за све јоне у раствору. У случају почетне високе концентрације јона метала долази до попуњавања свих активних места и бржег засићења ЕПС са јонима метала, што ће утицати на смањење ефикасности адсорпције и на повећање адсорпционог капацитета. Са мањом почетном концентрацијом адсорбата већа је вероватноћа да ће бити довољно места за везивање свих јона из раствора. Због тога ће ефикасност адсорпције бити висока, док ће капацитет адсорпције имати нижу вредност. Већа концентрација (доза) ЕПС значиће и већи број активних места за везивање, због чега

већа концентрација ЕПС утиче на повећање ефикасност адсорпције. Брзина мешања ће интензивирати пренос масе и до момента успостављања равнотеже већа брзина мешања ће утицати на већу брзину адсорпције и брже успостављање равнотеже. Након успостављања равнотеже, већа брзина може да убрза процес десорпције. Треба имати у виду и да превелика турбуленција може оштетити биосорбент, те је потребно оптимизовати брзину мешања. Утицај времена контакта на ефикасност адсорпције ЕПС и јона метала је веома значајан. У почетку се везивање јона метала за активна места на површини ЕПС дешава брзо, углавном механизмом физисорпције, а временом се број лако доступних активних места смањује и углавном се адсорпција одвија механизмом хемисорпције. Након успостављања динамичке равнотеже време контакта нема значајан утицај на ефикасност адсорпције. Утицај на ефикасност адсорпције имаће и електронегативност, јонски радијус и хидратациони радијус јона метала. Функционалне групе ЕПС ће градити стабилније комплексе са јонима електронегативнијих метала (Hancock и сар., 1996), зато што ови јони имају већу тенденцију да везују заједнички електронски пар из координационе везе. Такође, електронегативније метале ће везивати боље N и S из -NH_2 и -SO_3H група, док ће атоми O из -COOH и -OH група градити боље везе са мање електронегативним јонима метала (Hancock и сар., 1996). Из тог разлога, ЕПС богат аминошећерима боље ће везивати електронегативније метале, а ЕПС богат уронским киселинама ће боље везивати мање електронегативне метале. Поредбени низ електронегативности тешких метала је: $Pb^{2+} > Hg^{2} > Cu^{2+} > Fe^{2+} > Ni^{2+} > Cd^{2+} > Zn^{2+}$. Јонски радијус метала свакако има утицај на адсорпцију на порозним материјалима, при чему јони мањег радијуса могу лакше да дифундују кроз поре ЕПС и да се везују за мање доступне функционалне групе. Мањи јони већег наелектрисања имаће јача електрична поља и јаче ће привлачити електронски пар. Такође, јони мањег јонског радијуса и већег наелектрисања јаче ће везивати молекуле воде и имаће већи хидратациони радијус, што може отежати дифузију кроз ситније поре и приступ функционалним групама. Поредбене величине јонских радијуса тешких метала приказани су у низу: $Pb^{2+} > Cd^{2+} > Cu^{2+} > Ni^{2+} > Cr^{3+} > Zn^{2+} > Fe^{2+} > Hg^{2+}$.

Због сложене структуре ЕПС не може се говорити само о једном механизму адсорпције тешких метала, већ је за адсорпцију одговорна комбинација више различитих механизама. Комбинација више механизама свакако доприноси већој ефикасности адсорпције. Према Wei и сарадницима (Wei и сар., 2016) главни механизам адсорпције Pb(II) са ЕПС изолованим из Грам-негативног бактеријског соја *Klebsiella sp.* J1 је јонска измена. Pagliaccia и сарадници (Pagliaccia и сар., 2022) као механизме биосорпције јона Cu^{2+}, Ni^{2+}, Zn^{2+} и Pb^{2+} на ЕПС изолованим из зрнастог муља наводе комбинацију комплексирања и јонске измене. Zanetti и сарадници (Zanetti и сар., 2022) предлажу механизме јонске измене и преципитације за адсорпцију јона Cu^{2+} и Ni^{2+} са ЕПС из Грам-негативне бактерије *Serratia plymuthica*.

2.2.4 Значај никла

Све веће присуство никла (Ni) у отпадним водама условило је истраживања усмерена на уклањање једињења никла из контаминираних токова, како би се избегла акумулација никла у људском телу и његов негативан утицај на здравље људи. У складу са токсичним и негативним утицајем никла на здравље људи при хроничној изложености, Светска здравствена организација (eng. *World Health Organization - WHO*) је прописала да је прихватљива граница присуства Ni^{2+} у води за пиће 0,01 mgL^{-1} (WHO, 2005). Директива 2020/2184 Европског парламента и Савета о квалитету воде намењене за људску потрошњу прописује максималну дозвољену концентрацију никла у водама за пиће 20 μgL^{-1} (EU, 2020), што је усвојено и у Србији, Правилником о хигијенској исправности воде за пиће ("Сл. лист СФРЈ", бр. 42/98 и 44/99 и "Сл. Гласник РС", бр. 28/2019).

Никл у животну средину доспева из различитих индустријских постројења. Никл се користи при изради накита, новчића, батерија, као облога других метала ради заштите од корозије, део је легура од нерђајућег челика, део легура са хромом у уређајима који користе топлоту, користи се за заваривање (Briffa и сар., 2020). У мањим концентрацијама се може наћи у отпадним водама фармацеутске и биотехнолошке производње. Осим из антропогених извора, никл доспева у природу и као последица ерозија стена и вулканских активности.

Уколико су биљке, људи и животиње хронично изложени једињењим никла у количинама изнад дозвољених граница то се може штетно одразити на њихово здравље. Код људи, једињења никла могу имати канцерогено дејство, што је у вези са различитим механизмима који доводе до оксидативних оштећења ДНК и протеина (Guo и сар., 2019). Једињења никла могу довести до поремећаја у раду бубрега и изазвати плућну фиброзу, астму, бронхитис, рак респираторног тракта, болести кардиоваскуларног система и контактни дерматитис, који је најчешћи негативан утицај никла (Begum и сар., 2022; Genchi и сар., 2020). Индиректно, никл може бити одговоран за чир на желуцу, будући да је важан кофактор, неопходан за функционисање ензима уреазе бактерије *Helicobacter pylori* (Witkowska и сар., 2022) који јој омогућава опстанак у киселој средини желуца.

Никл је интересантан зато што, осим штетног дејства има и биолошку улогу. Важан је микронутријент неопходан за раст и развој биљака, утиче на апсорпцију гвожђа и клијање семена (Begum и сар., 2022). Никл улази у састав и значајан је за активност никло-ензима (уреаза, хидрогеназа, Ni-супероксид дизмутаза, CO-дехидрогеназа, и др.) који имају есенцијалну улогу за неке бактерије, гљиве, бескичмењаке и биљке. Никл је биолошки значајан као кофактор групе ензима у којима заузима централно, активно место где је повезан углавном са аминокиселинским остацима (најчешће са хистидином и цистеином) или молекулима воде чиме стабилизује структуру ензима и има улогу катализатора. Користи се као део никл-нитрилоацетат смоле (Ni-NTA) у афинитетној хроматографији за пречишћавање рекомбинантних протеина (Hassan и сар., 2023).

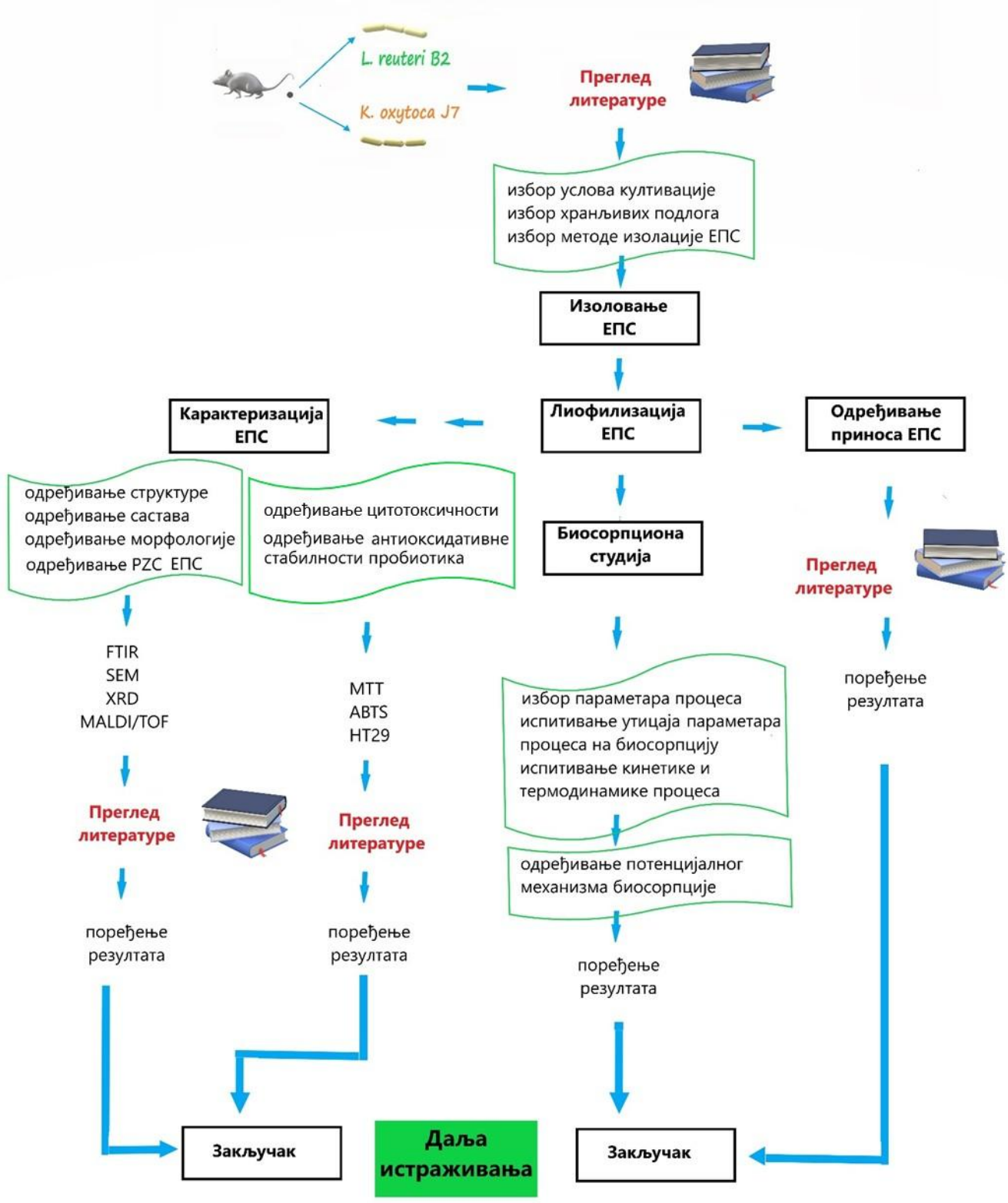
3 ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО

3.1 План експеримента

Циљ истраживања ове докторске дисертације био је добијање нових биоматеријала на бази ЕПС из два јединствена бактеријска соја, једног пробиотског соја и једног патогеног, и испитивање могућности њихове примене као ефикасних, еколошких и економичних биосорбената за уклањање тешких метала (Ni^{2+} јона) из водених раствора.

У складу са остваривањем циља овог истраживања постављен је план експерименталног истраживања (слика 13) који је обухватио следеће фазе:

- екстракцију и делимично пречишћавање ЕПС добијених из јединствених бактеријских сојева, *Lactobacillus reuteri* B2 (пробиотски сој) и *Klebsiella oxytoca* J7 (патогени сој) изолованих из фецеса C57BL/6 миша и идентификованих у претходним истраживањима (Popović и сар., 2021).
- лиофилизацију добијених ЕПС и одређивање приноса ЕПС;
- анализу добијених ЕПС инструменталним методама: FTIR, SEM, TGA/DTG, XRD, NMR, MALDI-TOF-MS, са циљем што боље карактеризације нових биоматеријала;
- испитивање биолошких својстава ЕПС *L. reuteri* B2 и *K. oxytoca* J7: одређивање цитотоксичности ЕПС добијених из оба бактеријска соја (MTT тест), одређивање антиоксидативног капацитета ЕПС добијеног из пробиотског соја *Lactobacillus reuteri* B2 (ABTS тест);
- испитивање ефикасности нових биоматеријала на бази ЕПС као биосорбената, у погледу уклањања јона тешких метала (Ni^{2+} јона) из водених раствора, и испитивање утицаја различитих параметара на процес адсорпције: pH, температура, време контакта, количина биосорбента и почетна концентрација адсорбата (Ni^{2+} јона);
- одређивање кинетике процеса испитиваних адсорпција, односно времена потребног да испитивани системи достигну равнотежу, применом кинетичких модела псеудо-првог реда (Lagergreen модел) и псеудо-другог реда (Ho-McKay модел), као и Weber-Morris-овог модела;
- описивање процеса адсорпција у равнотежном стању Ленгмировим (Langmuir) и Фројндлиховим (Freundlich) моделима адсорпционих изотерми;
- одређивање термодинамичких параметара за процесе адсорпције;
- одређивање могућег механизма процеса адсорпција;
- поређење резултата испитиваних адсорпција са подацима из литературе и разматрање ефикасности и могућности примене нових биоматеријала на бази ЕПС.



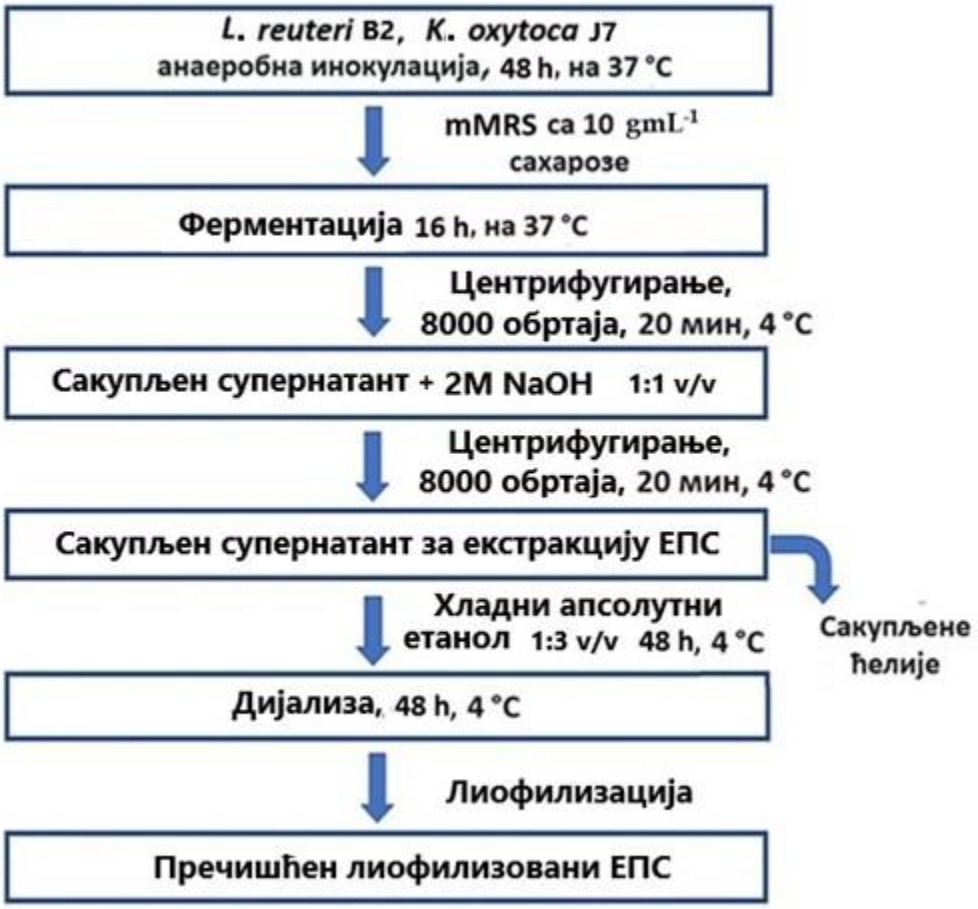
Слика 13: Шема плана истраживања (аутор)

3.2 Добијање ЕПС из бактеријских сојева *L. reuteri B2* и *K. oxytoca J7*

За добијање ЕПС у овој дисертацији коришћени су бактеријски сојеви *L. reuteri* B2 и *K. oxytoca* J7 претходно изоловани из фецеса C57BL/6 миша и идентификовани методом секвенцирања 16S рДНК у истраживању Поповић и сарадника (Popović и сар., 2021).

3.2.1 Екстракција и делимично пречишћавање ЕПС из *L. reuteri* B2 и *K.oxytoca* J7

Екстракција и делимично пречишћавање ЕПС добијених из сојева *L. reuteri* B2 и *K.oxytoca* J7 изведени су по узору на процедуру Bajpai и сарадника (Bajpai и сар., 2016), уз поједине модификације. Шема добијања и пречишћавања ЕПС из бактеријских сојева *L. reuteri* B2 и *K. oxytoca* J7 представљена је на слици 14. Фазе екстракције обухватају: раст бактерија (инокулацију), ферментацију, сакупљање биомасе (жетву) и екстракцију ЕПС.



Слика 14: Шема изолације и екстракције ЕПС из бактеријских сојева *L. reuteri* B2 и *K. oxytoca* J7

Иницијално умножавања *L. reuteri* B2 рађено је на MRS агару (48 h, 37 °C) у анаеробним условима. За обезбеђивање анаеробних услова коришћене су AnaeroGen кесе (Fluka, Ст. Луис, Мисури, САД) и AnaeroJar тегле (Fisher, Хемптон, Њу Хемпшир, САД), а ниво кисеоника (<1 %) је праћен помоћу индикаторских трака (Fisher, Хамптон, Њу Хемпшир, САД). Добијена култура *L. reuteri* B2 је даље коришћена за ферментацију (16 h, на 37 °C) у модификованом MRS медијуму (mMRS) који је био следећег састава: пептон, 10,0 gL^{-1}; говеђи екстракт, 10,0 gL^{-1}; K_2HPO_4, 2,0 gL^{-1}; NaCl, 5,0 gL^{-1}; Na-ацетат, 2,5 gL^{-1}; $MgSO_4$, 1,1 gL^{-1}; $MnSO_4$, 0,2 gL^{-1}; Tween 80, 1,0 gL^{-1}, 20,0 gL^{-1} сахарозе, без глукозе и екстракта квасца у медијуму, pH = 6,5 (Sims и сар., 2011). Модификација у односу на стандардну MRS подлогу је обухватала додатак сахарозе и NaCl и изостављање глукозе и екстракта квасца.

Култура *K. oxytoca* J7 је култивисана (48 h, 37 °C) у медијуму следећег састава: пептон 10,0 gL^{-1}, говеђи екстракт 3,0 gL^{-1} и NaCl 5,0 gL^{-1}, pH = 7,0 (Yang и сар., 2015). Добијена култура је потом инокулисана (10 % (v/v)) у ферментациони медијум (ФМ) чији је састав приказан у Табели 2 (Yang и сар., 2015) и инкубирана 16 h на 37 °C у анаеробним условима. K_2HPO_4, NaCl, Na-ацетат, $MgSO_4$, $MnSO_4$, Tween 80 су набављени од Sigma-Aldrich (Ст. Луис, Мисури, САД), пептон и говеђи екстракти су добијени из Института за вирусологију, вакцине и серуме "Торлак" (Београд, Србија).

Табела 2. Хемијски састав ферментационог медијума (ФМ) за производњу ЕПС из бактеријског соја *K. oxytoca* J7

Састојак	**Количина (gL^{-1})**
Глукоза	10,0
Екстракт квасца	0,50
K_2HPO_4	5,00
KH_2PO_4	2,00
NaCl	0,10
$MgSO_4$	0,20

Након култивације у одговарајућим ферментационим медијумима, бактеријске културе су центрифугиране на 8000 обртаја/min, 20 минута на 4 °C (3K18 Sigma Laboratory Centrifuge, Osterode, Немачка), супернатанти су сакупљени и у њих је додата еквивалентна запремина 2 M NaOH (1:1 v/v) да би се денатурисали протеини. Након хомогенизације у шејкеру, на 90 обртаја током 30 мин, коју је затим пратило центрифугирање на 8000 обртаја током 20 мин, на 4 °C, протеини су уклоњени. Затим, сакупљени супернатанти су исталожени у двоструко већој запремини хладног апсолутног етанола (1:2 v/v), на 4 °C, током 48 h. Након тога, ЕПС су поново исталожени у хладном апсолутном етанолу, током 24 h. Талог је потом пребачен у кесу за дијализу

(*cut off* молекулска маса MWCO 12-14 kD, Spectrum™ Labs Spectra/Por™2 12–14 kD MWCO Standard RC Dry Dialysis Kits Fisher Scinetific) и дијализован наспрам дестиловане воде на 4 °C током 48 h, да би се уклониле соли и други молекули мањи од ~ 13 kD (моносахариди или мањи олигосахариди, остаци протеина, органске киселине). Добијени ЕПС су лиофилизовани и измерени. Делимично пречишћени ЕПС су чувани на -80 °C за даљу анализу.

3.3 Карактеризација ЕПС из *L. reuteri* B2 и *K. oxytoca* J7

3.3.1 Одређивање морфологије и микроструктуре ЕПС скенирајућом електронском микроскопијом (SEM)

Скенирајући електронски микроскоп коришћен је за анализу морфологије лиофилизованих ЕПС, микроструктуре, униформности, степена порозности и степена агрегације. Узорци лиофилизованих ЕПС (5 mg) су напарени златом и анализирани на уређају Tescan Mira3 XMU FE-SEM, при напону од 10 kV. Слике површине ЕПС снимљене су у насумично одабраним пољима.

3.3.2 Одређивање структуре ЕПС FTIR спектроскопијом

Анализа структурних карактеристика, идентификација функционалних група и типа гликозидних веза између моносахаридних јединица ЕПС извршена је помоћу FTIR спектроскопије. FTIR спектри лиофилизованих узорака добијени су у режиму пригушене тоталне рефлексије (ATR) са дијамантом као елементом унутрашње рефлексије (IRE). Снимање узорка је обављено на ATR-FTIR Nicolet iS10 (Thermo Scientific) спектрометру у опсегу 4000-500 cm^{-1}, са резолуцијом од 4 cm^{-1}, на собној температури.

3.3.3 Одређивање структуре ЕПС NMR методом

NMR анализа је коришћена за одређивање примарне структуре ЕПС, врсте, форме и конфигурације моносахаридних јединица у саставу ЕПС. У овој дисертацији, ^{1}H-NMR спектри су били снимљени у DMSO-d6 на Bruker Avance III 500 спектрометру опремљеним широкопојасном директном сондом на 500 MHz. Спектри су снимљени на собној температури. Хемијски прелази су дати на скали у односу на тетраметилсилан (TMS), као интерни стандард. Јединице за константе спреге биле су у Hz.

3.3.4 Одређивање молекулске масе ЕПС MALDI TOF/TOF-MS методом

MALDI-TOF-MS анализа коришћена је за одређивање просечне молекулске масе ЕПС, састава и структуре понављајућег блока ЕПС (Nielen и сар., 1999.; Richel и сар., 2012). Просечна молекулска маса ЕПС одређена је помоћу MALDI TOF/TOF-MS, према процедури Gonzales–Gil (Gonzalez-Gil и сар., 2015), уз извесне измене. Лиофилизовани ЕПС су растворени у дејонизованој води у концентрацији 1 $mgmL^{-1}$, а затим су помешани са матриксом - 2,5-дихидроксибензоевом киселином (DHB) у односу 1:1 (v/v). 2 µL ових мешавина постављено је на Anchor Chip ATP тањирић и осушено на ваздуху. За добијање масеног спектра ЕПС коришћен је 4800 Plus MALDI TOF/TOF анализатор (Applied Biosystem In., Фостер Сити, Калифорнија, САД), опремљен са 200 Hz 355nm Nd/YAG ласером. У опсегу од 2000 до 4000 m/z инструмент је радио у позитивно-јонском режиму рефлектора.

3.3.5 Одређивање кристалиничности ЕПС рендгенском дифракционом анализом (XRD)

Ова метода је коришћена за испитивање присуства аморфних и кристалних области у ЕПС и степена уређености молекула. ЕПС су испитани на Rigaku SmartLab рендгенском дифрактометру за прах, на собној температури, коришћењем Bragg-Brentano геометрије и Cu-Kα зрачења. Дифрактометар је радио на 40 kV и 30 mA, док је опсег скенирања био од 5-60 °2θ, са величином корака од 0,01 °2θ и брзином скенирања од 5 $°2\theta min^{-1}$.

3.3.6 Одређивање термостабилности ЕПС термогравиметријском (TGA) методом

За процену термичке стабилност ЕПС и процену састава ЕПС коришћена је термогравиметријска (TGA) метода. Термичка анализа је изведена у инструменту SDT Q600. Термограм је добијен у опсегу температура од 20-450 °C у атмосфери азота, при протоку од 100 $mLmin^{-1}$, при брзини загревања од 20 $°Cmin^{-1}$. Лиофилизовани ЕПС (≈ 8 mg) су постављени у Al_2O_3 лончић. Током овог периода праћен је губитак масе ЕПС са порастом температуре.

3.3.7 Одређивање тачке нултог наелектрисања ЕПС

pH вредност при којој је површина ЕПС електрично неутрална, јесте тачка нултог наелектрисања (PZC). При pH = PZC су у равнотежи концентрације протонованих и депротонованих функционалних група, те је кумулативни ефекат електронеутрална површина. На pH < PZC, долази до протоновања функционалних група ЕПС (-NH_2 до -NH_3^+, -COOH и -OH остају у протонованим облицима) због чега површина ЕПС има

кумулативно позитивно наелектрисање; при pH > PZC је обрнуто, долази до депротоновања -NH_3^+, -COOH и -OH група због чега површина ЕПС има кумулативно негативно наелектрисање. Састав и структура ЕПС утиче на укупно наелектрисање површине ЕПС: ЕПС састављени од претежно неутралних шећера или аминошећера имају PZC приближно неутралном pH или нешто виши од неутралног pH; ЕПС који у свом саставу садржи и уронске киселине или друге киселе групе имаће нижи PZC од неутралне pH вредности. Познавање вредности PZC може помоћи при процени интеракција ЕПС са различитим јонима из окружења.

PZC оба узорка ЕПС је у овом истраживању одређена методом коју су предложили Mustafa и сарадници (Mustafa и сар., 2002). Укратко, PZC вредност је одређена у 0,1 M раствору $NaNO_3$ (Sigma Aldrich) на собној температури. 40 mL 0,1 M $NaNO_3$ (Sigma Aldrich) је пренето у различите ерленмајере. pH вредности раствора су подешене на 2, 4, 6, 8, 10 и 12 коришћењем раствора HNO_3 (Sigma Aldrich) и NaOH (Sigma Aldrich). Почетни pH раствора ЕПС забележен је лабораторијским pH-метром InoLab 730 (WTW GmbH), са тачношћу од ± 0,01 pH јединица. Око 0,2 g узорка је додато у сваки ерленмајер и инкубирано 24 h у купатилу са мешалицом. Након 24 h, забележена је коначна pH вредност раствора. Разлика између почетне и крајње pH вредности (ΔpH) је уцртана у график у односу на почетне pH вредности. Вредност PZC је одређена као pH за ΔpH = 0 тј. почетни pH је једнак коначном pH.

3.4 Биолошка својства ЕПС

3.4.1 Одређивање цитотоксичих својстава ЕПС МТТ тестом

За већину антиканцерогених лекова је доказано да су токсични и за ћелије рака и за здраве ћелије, због чега су истраживачи у сталној потрази за ефикасним алтернативним антиканцерогеним лековима. Са овог становишта, тест цитотоксичности је значајан при карактеризацији нових ЕПС, поготово ЕПС пробиотских бактерија, који су, као нетоксична природна једињења, део све већег броја истраживања у биомедицини и фармакологији. Потенцијална медицинска примена ЕПС захтева одређивање опсега концентрација ЕПС у коме (не) испољавају цитотоксичан ефекат према испитиваним ћелијским линијама. У овој дисертацији цитотоксичност ЕПС је процењена МТТ [3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолијум бромид] тестом на ћелијској линији хуманих фибробласта MRC-5. ЕПС добијен из *L. reuteri* B2 је тестиран у концентрацијама 0,5, 1,0 и 2,0 $mgmL^{-1}$. Као референтне су коришћене ћелије које су под истим условима (концентрација ћелија, медијум, температура, временски период) инкубиране без присуства ЕПС. Хумани фибробласти, MRCHHT-5 (CCL-171™, American Type Culture Collection), култивисани су у Dulbecco-модификованом Eagle медијуму (DMEM) суплементираном са 2 mM L-глутамина и Roswell Park Memoria Institute медијума (RPMI) 1640 који садржи 10 % феталног говеђег серума (Hyclone, Thermo Fisher Scientific). Медијуми за раст су садржали антибиотике, 100 $IUmL^{-1}$ пеницилина и 100 μgmL^{-1}

стрептомицина (Gibco, Life Technologies). Ћелије су постављене на густину од $1x10^4$ ћелија/бунарчићу на микроплочи са 96 бунарчића и третиране су са различитим концентрацијама ЕПС (0; 0,5; 1,0 и 2,0 $mgmL^{-1}$). Услови за раст ћелија били су следећи: 37 °C у влажној атмосфери, у присуству 5 % CO_2, током 24 h и 48 h. Након третмана, ћелије су испране PBS пуфером и додат је MTT (Serva, Electrophoresis GmbH, Хајделберг, Немачка) растворен у медијуму, у коначној концентрацији од 0,5 $mgmL^{-1}$. Након 4 h инкубације, на 37 °C са 5% CO_2, медијум је аспириран и додато је 100 μL DMSO да би се растворио формазан. На таласној дужини од 570 nm, апсорбанца је била мерена читачем микроплоча (Tecan Austria GmbH, Гродиг, Аустрија). Експеримент је поновљен три пута и извршена су три мерења. Проценат инхибиције (*IR*) израчунат је коришћењем следеће формуле (1):

$$IR\ (\%) = [1 - (A_{\text{контроле}})/(A_{\text{узорка}})] \times 100 \qquad (1)$$

где су:

$A_{\text{контроле}}$ - апсорбанца у контролном бунарчићу,

$A_{\text{узорка}}$ - апсорбанца у бунарчићу са узорком.

Резултат је представљен као проценат живих ћелија у односу на нетретиране контролне ћелије (0 $mgmL^{-1}$ ЕПС; 100 %).

3.4.2 Одређивање антиоксидативних својстава ЕПС добијеног из бактеријског соја *L. reuteri* B2 ABTS тестом

Антиоксидативно својство је значајна карактеристика ЕПС која представља основ за њихову потенцијалну примену у превенцији различитих болести и чини их драгоценим материјалом у медицинским истраживањима. Антиоксидативна активност ЕПС зависи од различитих фактора, као што су молекулска маса ЕПС, конформација гликозидних веза, конформација ланаца, функционалне групе, начин изоловања и екстракције ЕПС (Wang и сар., 2015). ABTS (2,2'-азино-бис (3-етилбензотиазолин-6-сулфонска киселина) тест је коришћен за одређивање антиоксидативне способности ЕПС пробиотског бактеријског соја, која се мери као способност ЕПС да при реакцији са $ABTS^+$ катјон радикалом смањи интензитет његове боје, односно обезбоји га, што је пропорционално количини антиоксиданаса у узорку. $ABTS^+$ катјон је хромофора интензивне плаво-зелене боје, са максимумом апсорпције на 734 nm, која се генерише у присуству јаког оксиданса, најчешће $K_2C_2O_8$. ABTS тест је изведен методом из литературе уз одређене модификације (Milošević и сар., 2020; Prior и сар., 2005). Укратко, $ABTS^+$ катјон радикала је припремљен мешањем 7,8 mM матичног раствора $ABTS^+$ са 2,45 mM раствора $K_2C_2O_8$. Раствор катјон радикала је остављен 12-16 h, на собној температури, у мраку, док се реакција не заврши, а затим је разблажен метанолом да би се добила

апсорбанца од 0,700±0,020 на 734 nm. По 20 µL раствора ЕПС у DMSO, различитих концентрација (0,05; 0,1; 0,25; 0,5; 1,0; 2,0 $mgmL^{-1}$), је додато у 2,8 mL раствора $ABTS^{\cdot+}$. Као контролни узорак је коришћен раствор добијен додавањем 20 µL раствора чистог DMSO у 2,8 mL $ABTS^{\cdot+}$ раствора. Након инкубације 30 минута на собној температури, у мраку, апсорбанца је забележена на 734 nm. Као контрола за одређивање антиоксидативне активности је коришћена аскорбинска киселина. Сва мерења су поновљена три пута. Антиоксидативна активност израчуната је коришћењем једначине (2):

$$\text{Антиоксидативна активност (\%)} = (A_{\text{контроле}} - A_{\text{узорка}})/(A_{\text{контроле}}) \times 100 \qquad (2)$$

где су:

$A_{\text{контроле}}$ - апсорбанца $ABTS^{\cdot+}$ на 734 nm за контролни раствор,

$A_{\text{узорка}}$ - апсорбанца $ABTS^{\cdot+}$ на 734 nm за узорак.

3.5 Биосорпциона студија

Да би се проценила способност ЕПС за везивање Ni^{2+} јона у воденим растворима, спроведена је серија експеримената. За испитивање адсорпције коришћен је шаржни поступак, уравнотеживањем раствора јона Ni^{2+} и ЕПС добијених из два бактеријска соја, у термостату са шејкероом при 120 удара/min. Водени раствори Ni^{2+} јона припремљени су у лабораторијским условима. Основни раствор је припремљен од комерцијалног стандарда никла АА, 1000 μgmL^{-1} (Accustandard) у двоструко дестилованој (дд) H_2O. Радни раствори су припремљени разблаживањем основних раствора до жељених концентрација. pH вредност је подешавана коришћењем 0,1 M NaOH и 0,1 M HNO_3 (Sigma Aldrich) и мерењем на pH-метру InoLab 730 (WTW GmbH), са тачношћу од ± 0,01 pH јединица. Након адсорпције, раствори узорака су филтрирани кроз шприц филтер са најлонском мембраном (величина пора 0,22 µm), а концентрације Ni^{2+} јона у воденим растворима након адсорпције мерене су на атомском апсорпционом спектроскопу (Perkin Elmer PinAAcle 900T, САД), при таласној дужини 230 nm. У шаржним експериментима, испитана је ефикасност адсорпције при различитим условима pH вредности, температуре, дозе биосорбента, почетних концентрација адсорбата. Добијени експериментални резултати описани су адсорпционим изотермама, кинетика адсорпције моделом псеудо-првог и псеудо-другог реда (Li и сар., 2020) и моделом унутарчестичне дифузије. Одређени су термодинамички параметри: Гибсова слободна енергија адсорпције (ΔG), ентропија адсорпције (ΔS) и енталпија адсорпције (ΔH).

Капацитет адсорпције (q_e; mgg^{-1}) израчунат је према једначини (Li и сар., 2020) (3):

$$q_e = \frac{Ci - Ce}{V} \cdot m \qquad (3)$$

где су:

q_e – маса адсорбата адсорбована по граму адсорбента (mgg^{-1});

C_i – почетна концентрација адсорбата у раствору (mgL^{-1});

C_e – равнотежна концентрација адсорбата у раствору (mgL^{-1});

V – запремина медијума (L);

m – маса биосорбента коришћена у процесу адсорпције (g).

Ефикасност адсорпције R (%) изражава се једначином (4) (Wang и сар., 2022):

$$R = \frac{Ci - Ce}{Ci} \cdot 100 \quad (4)$$

Већина биосорбената има коначан број адсорпционих места, тако да је могуће дефинисати максималан капацитет адсорпције q_{max} (mgg^{-1}) (Chojnacka и сар., 2010).

3.5.1 Одређивање утицаја процесних параметара на адсорпцију Ni^{2+} јона

Утицај pH на процес адсорпције одређен је на температури од 25 °C, током 60 минута, са почетном концентрацијом Ni^{2+} јона од 10 mgL^{-1} различитих pH вредности у опсегу 2–12 (2, 4, 6, 8, 10 и 12). Остали експерименти рађени су на pH вредности која је одабрана у односу на одређену вредност PZC ЕПС.

Утицај времена контакта испитиван је у интервалима од 5 до 120 минута, при температури 25 °C, са почетном концентрацијом Ni^{2+} јона од 10 mgL^{-1}, pH вредности 8,0 за ЕПС из *L. reuteri* B2, односно 5,5 за ЕПС из *K. oxytoca* J7 и концентрацијама ЕПС од 135 mgL^{-1}.

Утицај концентрације ЕПС испитиван је за различите концентрације ЕПС (65, 135, 170 и 200 mgL^{-1}), на температури 25 °C, током 60 минута, са почетном концентрацијом Ni^{2+} јона од 10 mgL^{-1}, pH вредности 8,00 за ЕПС из *L. reuteri* B2, односно 5,5 за ЕПС из *K. oxytoca* J7.

Утицај температуре испитан је у температурном опсегу између 25-65 °C (25, 35, 45, 55, и 65 °C), са почетном концентрацијом Ni^{2+} јона од 10 mgL^{-1}, при pH вредности 8,0 за *L. reuteri* B2, односно 5,5 за ЕПС из *K. oxytoca* J7 и концентрацијама ЕПС од 135 mgL^{-1}, у трајању од 60 минута.

4 РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

4.1 Принос ЕПС из *L.* reuteri B2 и *K. oxytoca* J7

Принос ЕПС из *L. reuteri* B2 је био 1,084 g по граму сувих бактеријских ћелија, односно 216 mg по литри ферментационог медијума (216 mgL^{-1}). У табели 3 приказан је литературни преглед добијених приноса ЕПС из различитих сојева *L. reuteri*.

Табела 3. Поређење приноса ЕПС из различитих сојева бактеријске врсте *L. reuteri*

Порекло ЕПС	Принос (gg^{-1} бактеријске ћелије)	Принос (mgL^{-1} ферментационог медијума)	Референца
L. reuteri ATCC 55730	0 – 1,4	/	(Årsköld и сар., 2007)
L. reuteri B1/1	/	0	(Fedorová и сар., 2018)
L. reuteri 4/2		15,80±1,09	
L. reuteri 2/3		121,20±1,01	
L. reuteri 2/5		18,20±0,97	
L. reuteri 2/5		130,20±0,97	
L. reuteri B6/1		158,70±0,95	
L. reuteri 2/6		267,95±1,00	
L. reuteri L26		650,70±1,00	
L. reuteri BR120	/	3100±0,0	(Ju и сар., 2023)
L. reuteri EC01		4300±0,1	
L. reuteri B2	1,084	216	Ово истраживање

Према Årsköld и сарадницима (Årsköld и сар., 2007) приноси ЕПС добијени из соја *L. reuteri* ATCC 55730 изражени по граму суве масе бактеријских ћелија, након оптимизације процеса достигли су нешто већу вредност него у овом истраживању, без оптимизације. Fedorova и сарадници (Fedorová и сар., 2018) су објавили ниже приносе ЕПС из сојева *L. reuteri* B1/1, *L. reuteri* 4/2, *L. reuteri* 2/3, *L. reuteri* 2/5, *L. reuteri* B6/1 и више приносе ЕПС из сојева *L. reuteri* 2/6 и *L. reuteri* L26 (табела 4). Услови инокулације и

ферментације били су слични као у овој дисертацији (подлога са 10% сахарозе, 16 h инкубације, анаеробни услови), ЕПС су такође изоловани таложењем хладним апсолутним етанолом, дијализирани 72 h коришћењем кеса за дијализу MWCO 12-14kDa, док је таложење протеина вршено коришћењем TCA уместо са NaOH. Веома високе приносе ЕПС имали су мутагени сојеви *L. reuteri* BR120 и *L. reuteri* EC01 у истраживању Ju и сарадника (Ju и сар., 2023), који су оптимизовали услове ферментације у погледу услова аерације, брзине мешања, температуре и pH вредности.

ЕПС из пробиотских сојева примарно има биолошки значај, доприноси адхезији на епител црева домаћина и имуномодулацији ради заштите домаћина. Самим пробиотским бактеријама, за опстанак није неопходна продукција ЕПС у великим количинама (Castro-Bravo и сар., 2018; Osita Eze и сар., 2023). Због тога приноси ЕПС из пробиотских сојева углавном нису високи. У том смислу и у поређењу са подацима из литературе, сој *L. reuteri* B2, као пробиотски, има солидан принос ЕПС, у датим, неоптимизованим условима.

Принос ЕПС *K. oxytoca* J7 је био 1,105 g по граму бактеријских ћелија суве тежине, приближно приносу ЕПС из бактеријског соја *L. reuteri B2*. По литри ферментационог медијума принос је био 152 mgL^{-1}, нижи него у случају *L. reuteri* B2. Приноси ЕПС из различитих сојева *K. oxytoca* приказани су у табели 4.

Табела 4. Поређење приноса ЕПС из различитих сојева бактеријске врсте *K. oxytoca*

Порекло ЕПС	Принос (mgL^{-1} ферментационог медијума)	Референца
K. oxytoca	960	(Bannwart и сар., 2022)
K. oxytoca KY498625	1200-4600	(Hayet и сар., 2021)
K. oxytoca ICCF419	1650	(Tomulescu и сар., 2021)
K. oxytoca J7	152	Ово истраживање

У литератури (Bannwart и сар., 2022) су забележени виши приноси ЕПС из бактеријског соја *K. oxytoca*. Виши приноси ЕПС из соја *K. oxytoca* KY498625 добијени су у

истраживањима Hayet и сарадника (Hayet и сар., 2021). Такође, знатно виши принос имао је *K. oxytoca ICCF419* након оптимизације састава хранљиве подлоге (Tomulescu и сар., 2021)

Према приказаним литературним подацима у табели, сој *K. Oxytoca*, евидентно има потенцијал за више приносе ЕПС (по литри ферментационог медијума). За разлику од пробиотских сојева, сојеви патогених култура углавном имају већу продукцију ЕПС, неретко и капсуларних, зато што је њихова примарна функција заштита и опстанак културе. Принос од око 1,1 g ЕПС по граму бактеријских ћелија суве масе (DCW) би се могао сматрати умереним, иако може бити и неколико пута виши при оптимизованим условима (Krishnamurthy и сар., 2020). Овај резултат показује да, при датим условима ферментације, раст биомасе није фаворизован на уштрб производње ЕПС и да бактерије не троше хранљиву подлогу и не усмеравају метаболизам претежно на пораст биомасе, већ се и ЕПС синтетише у датим условима. Међутим, умерен принос ЕПС по граму бактеријских ћелија (суве масе) а низак принос ЕПС по литри ферментационог медијума би могао да укаже да је мање биомасе израсло у датим условима ферментације. Већи број бактерија може да подстакне интензивнију производњу ЕПС, путем *quorum sensing* – а[2], начина којим бактерије комуницирају (Lv и сар., 2024). Са повећањем броја бактерија (густине популације) повећава се и концентрација сигналних молекула (карактеристичних за бактеријски сој) које бактерије производе. Када сигнални молекули достигну праг који сигнализира (sensing) бактеријама да их је довољно (quorum) за формирање биофилма и да је синтеза ЕПС исплатива, долази до активације експресије гена који су одговорни за синтезу ЕПС и до интензивније продукције ЕПС (Steiner и сар., 2022). Дакле, виши принос ЕПС би могао да се оствари или повећањем броја бактерија (густине популације) или већим подстицајем продукције ЕПС. Недовољан раст биомасе, у овом случају, би могао да укаже да састав ферментационог медијума и/или избор радних параметара (pH, температура, аерација, време инкубације) нису погодовали расту бактерија и омогућили њихову већу бројност која би даље допринела интензивнијој продукцији ЕПС. Ферментациони медијум за *K. oxytoca* J7 садржао је 10 % глукозе као извор угљеника и 0,5 % екстракта квасца као извор азота. Однос C/N од око 20) би се могао сматрати оптималним за умножавање ове бактеријске врсте, али би још већи однос могао да преокрене метаболизам више у правцу синтезе ЕПС, на уштрб пораста биомасе, као у истраживању Tomulescu и сарадника (Tomulescu и сар., 2021), где је оптималан однос C/N био ~ 25. Може се претпоставити да је количина додатог шећера хранљивој подлози, у датим условима, била брзо исцрпљена и недовољна за даљу синтезу ЕПС или глукоза, као извор угљеника, није била довољно

[2] **Quorum sensing** је вид комуникације између бактерија у популацији којим свака појединачно детектује (помоћу малих сигналних молекула) достизање одговарајуће густине популације, услед чега синхроно активирају експресију гена чиме заједнички покрећу процесе значајне за опстанак читаве популације, као што су формирање биофилма, синтеза метаболита, регулација вируленције и слично. На овај начин бактерије покрећу процесе онда када сматрају да их је довољно да потрошња енергије за дати процес буде исплатива.

стимулативна за синтезу ЕПС. Оптимизација производње ЕПС из соја *K. oxytoca* ICCF419 показала је да је највећи принос ЕПС добијен у ферментационом медијуму који садржи 40% глукозе (Tomulescu и сар., 2021), док је за ЕПС из *K. oxytoca* KY498625 највећи принос достигнут са 20 g сахарозе по литри ферментационог медијума (Hayet и сар., 2021). Време инкубације може имати значајну улогу код приноса ЕПС. ЕПС се производи најинтензивније при крају експоненцијалне фазе и током стационарне фазе раста, које временски варирају од соја до соја, зависе од састава хранљиве подлоге и од услова средине. Код сојева *Klebsiella sp.* стационарна фаза почиње око тринаестог сата инкубације (Mohamed и сар., 2024). У том смислу, постоји могућност да период ферментације од 16 часова (у овом истраживању), у датим условима, није био довољан да се достигне максималан принос ЕПС из *K. oxytoca* J7. Hayet и сарадници (Hayet и сар., 2021) утврдили су да се принос ЕПС из соја *K. oxytoca* KY498625 повећавао након 16 часова ферментације и био константан у периоду 48 до 96 сати, након чега је започела деградација ЕПС. За ЕПС из соја *K. oxytoca* ICCF419 максималан принос је остварен након 52 часа ферментације (Tomulescu и сар., 2021). Још једно могуће објашњење ниског приноса ЕПС је претпоставка да је ЕПС у форми капсуле, с обзиром да сојеви *Klebsiella sp.*, као патогени, имају генетске потенцијале за синтезу капсуларних ЕПС (Cai и сар., 2013). У случају капсуларног ЕПС метода изолације таложењем етанолом није довољно ефикасна за потпуно одвајање капсуле од бактеријског ћелијског зида и део заостаје са пелетом, уместо да буде сакупљен у супернатанту. Екстракција капсуларних ЕПС захтева екстремније услове, укључујући примену ензима, високе температуре, ултразвука и/или интензивније центрифугирање (Khadka и сар., 2023).

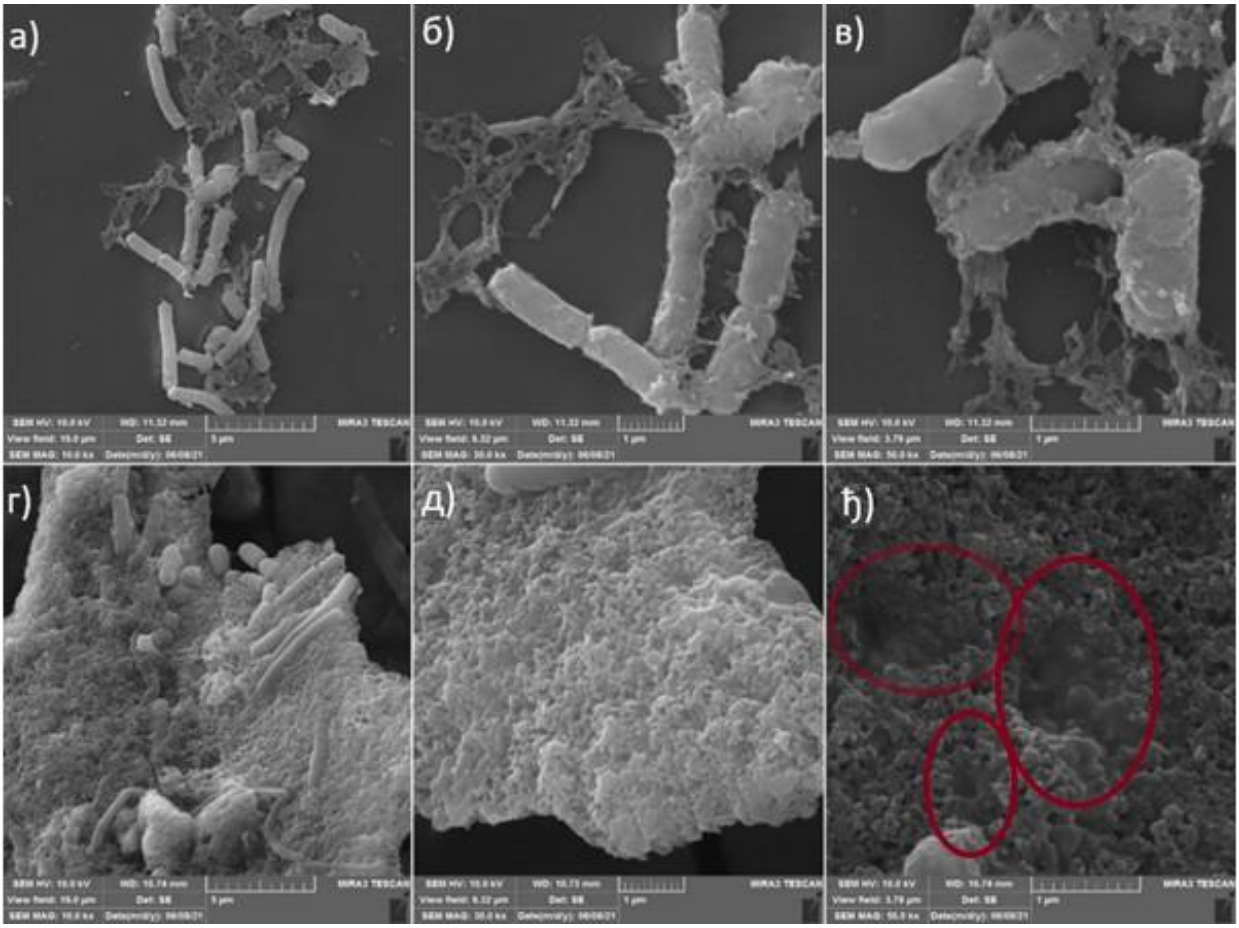
Сој *K. oxytoca* J7 је недвосмислено произвођач ЕПС. Добијени резултати оправдавају и указују на потребу наставка истраживања везаних за *K. oxytoca* J7 као извор ЕПС. У циљу повећања приноса ЕПС из овог соја потребно је утврдити, пре свега, да ли је ЕПС који овај сој производи капсуларни и уколико јесте, прилагодити методу екстракције. У случају да ЕПС није капсуларни, оптимизација производње ЕПС би била усмерена на оптимизацију састава ферментационог медијума (извори угљеника и азота, однос C/N), радне температуре, pH, степена аерације и времена инкубације.

4.2 Карактеризација ЕПС из *L. reuteri* B2 и *K. oxytoca* J7

4.2.1 Одређивање микроструктуре и морфологије скенирајућом електронском микроскопијом

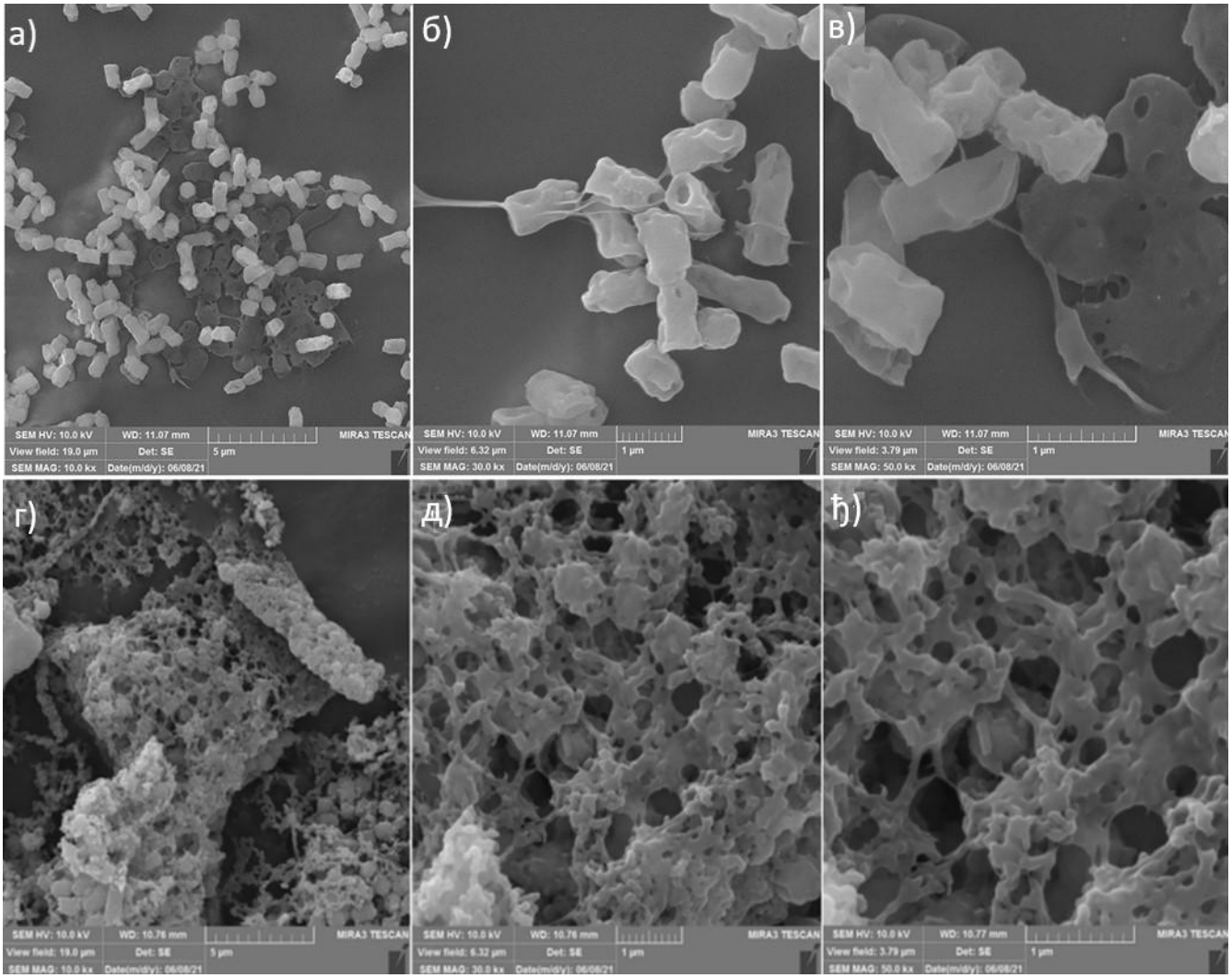
На сликама 15 (а-в) су приказане бактерије *L. reuteri* B2, при увећањима 10,0 кх, 30,0 кх и 50,0 кх. Слике ЕПС добијеног из *L. reuteri* B2 при различитим увећањима (слика 15 г-ђ) показале су збијену, порозну структуру. На сликама је уочена структура налик пени, ситнијих и неправилно распоређених пора. Површина ЕПС је континуирана, нема мрежаст изглед, без изражених је слојева, шупљина и пукотина. Овакав изглед површине

указује на једноставнији састав ЕПС и доминантно присуство неутралних моносахарида, на мању разноликост функционалних група (Zaghloul и сар., 2022). Површина ЕПС делује храпаво, док се на великом увећању (слика 15 ђ) местимично уочавају површине прекривене глатким слојем (црвеним заокружене), које би могле указати на уједначену структуру, претежно линеарну организацију полисахаридног ланца, са мањим степеном или без гранања. Глатке зоне ЕПС нису порозне, могу указивати на делимичну кристалиничност и могу имати улогу заштитне баријере код бактерија од различитих спољних утицаја, док у индустрији ова особина може имати потенцијал за стабилизацију биофилмова и гелова (посебно значајно у фармацеутској и прехрамбеној индустрији). Сличну порозност и местимично глатке области показали су ЕПС из бактеријских сојева *Lactiplantibacillus* (*Lactobacillus*) *plantarum* PRK 7 и *L. plantarum* PRK11 (Kowsalya и сар., 2023), који су састављени од неутралних хексоза.



Слика 15: SEM слике пробиотских ћелија *L. reuteri* B2 снимљених при увећањима 10 кх (а), 30 кх (б) и 50 кх (в) и ЕПС *L. reuteri* B2 снимљеног при увећањима 10 кх (г), 30 кх (д) и 50 кх (ђ)

На слици 16 (а-в) су приказани снимци бактерија *K. oxytoca* J7 добијени SEM при увећањима 10,0 – 50,0 кх. на слици 16 г је приказан излучен ЕПС заједно са бактеријским ћелијама (увећање 10,0 кх), док је на слици 16(д-ћ) приказан ЕПС изолован из *K. oxytoca* J7 (снимљено при увећањима 30,0 кх и 50,0 кх).



Слика 16: SEM слике бактеријских ћелија *K. oxytoca* J7 снимљених при увећањима 10 кх (а), 30 кх (б) и 50 кх (в) и ЕПС *K. oxytoca* J7 снимљеног при увећањима 10 кх (г), 30 кх (д) и 50 кх (ђ)

На приказаним сликама се може уочити да ЕПС није капсуларни, већ га бактерије слободно излучују, што указује да је низак принос овог ЕПС вероватно последица услова ферментације. За разлику од ЕПС из соја *L. reuteri* B2 овај ЕПС поседује тродимензионалну структуру налик мрежи, са неправилно распоређеним порама и каналима. Поре су различитих димензија и облика, међусобно повезане, доприносе већој специфичној површини ЕПС. Овакав изглед ЕПС обично указује на хетерогени састав, односно присуство различитих функционалних група (W. Wang и сар., 2023). Биолошки

значај овакве структуре за бактерије је улога матрице за задржавање молекула воде и различитих биомолекула из спољне средине, док индустријски значај може имати у процесима адсорпције, услед велике способности задржавања воде и јона, као и у медицини и фармацији за процес контролисаног отпуштања лека (drug delivery). Осим тога, овај ЕПС који имају овакву структуру имају могућност да повећају вискозност медијума у коме се налазе (Liu и сар., 2017). Поред тога, на сликама 16(д-ђ) се могу уочити неуниформна структура и фрагменти биополимера што указује да ЕПС *K. oxytoca* J7 није стабилан и не подржава формирање биофилма.

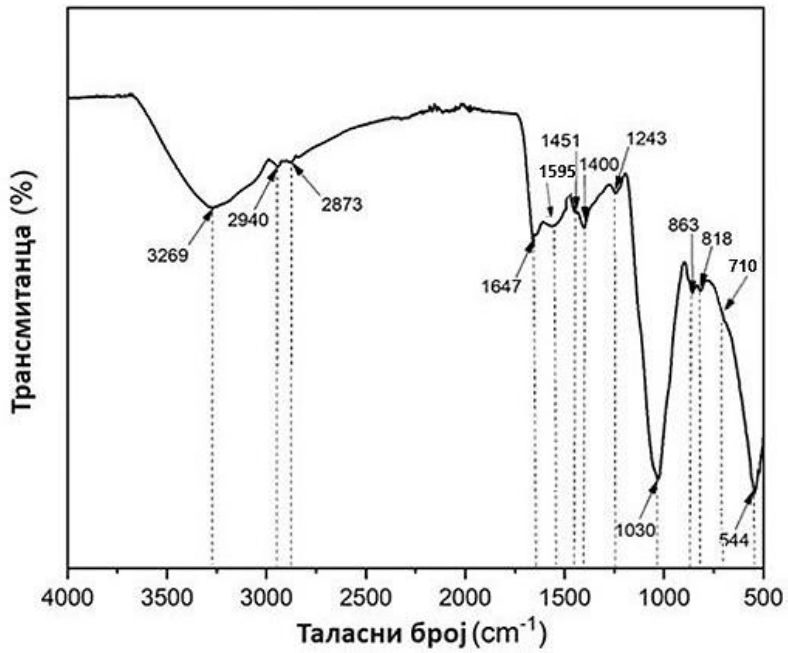
4.2.2 Одређивање структуре FTIR спектроскопијом

Анализом FTIR спектра (слика 17) ЕПС *L. reuteri* B2 запажене су апсорпционе траке типичне за полисахариде (Charoenwongpaiboon и сар., 2021; Wangpaiboon и сар., 2020). Широка трака на 3269 cm^{-1} потиче од вибрација истезања слободних хидроксилних група (O-H) (Obruca и сар., 2014). Вибрације симетричног и асиметричног истезања C-H групе (Melo и сар., 2002) дају сигнале на 2940 и 2873 cm^{-1}, што би указало на присуство алифатичних -CH_2- и -CH_3 група и могуће присуство 6-дезокси шећера, који у положају C6 имају -CH_3 групу уместо -OH. Затим, трака апсорпције на 1647 cm^{-1}, може бити последица истезања прстена галактозе и манозе, као и других хексоза (Wang и сар., 2015). Сигнал у овој области указује и на потенцијално присуство адсорбоване воде (Wangpaiboon и сар., 2020) или на истезање C=O амидне групе (амид I), док би сигнал на 1595 cm^{-1} указивао на амид II истезање C=O амидне групе. Траке апсорпције на 1451 cm^{-1} (Ermiş и сар., 2020) и 1400 cm^{-1} (Wu и сар., 2021) узроковане су вибрацијама група C-H. Нису уочене изражене траке на око 1720-1750 cm^{-1} које би указале на присутне уронске киселине у овом ЕПС, док траке на 1647 cm^{-1} и 1595 cm^{-1}, типичне за амидне везе, би могле да укажу на присуство N-ацетиламино хексоза или остатке протеина у ЕПС (Lembre и сар., 2012).

У области ''отиска прста'' спектра карактеристичног за полисахариде (1200–800 cm^{-1}), запажене су апсорпционе траке од 1030 cm^{-1} до 818 cm^{-1}. Траке на 1030 cm^{-1} и 863 cm^{-1} указују да полисахарид садржи пиранозу (Hong и сар., 2021). Сигнал на 863 cm^{-1} је чест у спектрима β-конфигурација пираноза, углавном глукозе, док сигнал на 818 cm^{-1} сугерише на присуство глукозе у α-конфигурацији (Ibrahim и сар., 2006) или манозе (Ermiş и сар., 2020). Такође, интензиван пик на 1030 cm-1, иако неспецифичан, приписује се често β-глукози (Ghimire и сар., 2017, Shuhong и сар., 2014), а ређе се јавља и у спектрима манозе, галактозе и рамнозе. Нема изражених апсорпционих трака између 1000-1250 cm^{-1} које би указале на присуство сулфатних и фосфатних група (Ali и сар., 2024). Слаб сигнал на 544 cm^{-1} указује на гликозидну везу у ланцима полисахарида.

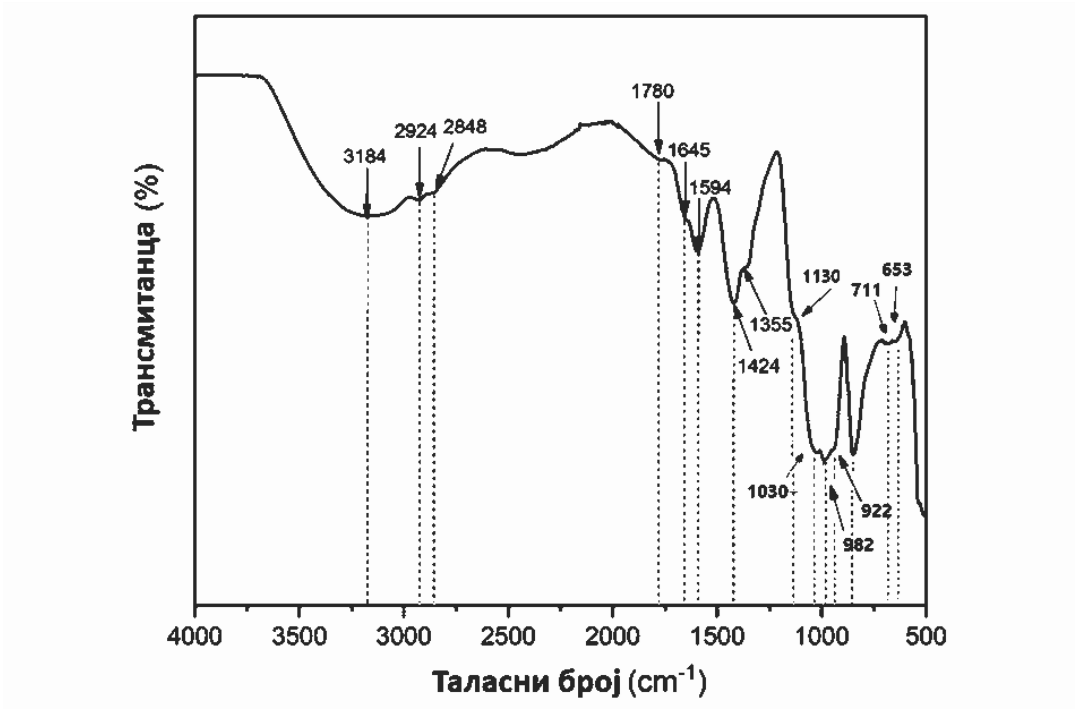
Дакле, FTIR спектар ЕПС *L. reuteri* B2 показао је да у полисахаридном ланцу доминирају пиранозе (глукоза), које су међусобно повезане и α и β гликозидним везама,

и да је могуће присуство N-ацетиламино хексоза или остатака протеина. Нису уочене јасне назнаке присуства уронских киселина, фосфатних и сулфатних група.



Слика 17: FTIR спектар ЕПС добијеног из *L. reuteri* B2 у опсегу 500–4000 cm^{-1}

Спектар лиофилизованог узорка ЕПС из *K. oxytoca* J7 је приказан на слици 18. Широка трака на око 3184 cm^{-1} указује на вибрације истезања хидроксилних група (O-H) (Biswas и сар., 2015). Вибрације асиметричног и симетричног истезања C–H дају траке између 2924 и 2848 cm^{-1} (Tomulescu и сар., 2020) могу указивати на присуство 6-дезокси шећера. Ове траке су биле слабије изражене у спектру ЕПС из *K. oxytoca* J7 него у спектру ЕПС из *L. reuteri* B2. За разлику од резултата добијених FTIR анализом ЕПС из *L. reuteri* B2, на око 1780 cm^{-1} приметна је трака која се приписује вибрацијама истезања C=O групе естарске везе, која може потицати од депротонованих COO^- карбоксилатних група (Xu и сар., 2012) и указује на потенцијално присуство уронских киселина. Сигнал је благо померен у односу на уобичајене траке које указују на уронске киселине и могао би се приписати лактонским формама ових киселина, и то γ-лактону (Tipson и сар., 1968). Апсорпциона трака на 1645 cm^{-1} вероватно је последица вибрација истезања прстена галактозе или манозе (Wang и сар., 2015), апсорбоване воде или истезања C=O везе амидне групе (амид I трака). Трака на 1594 cm^{-1} указује на вибрације истезања C=O амидне везе (амид II трака) и COO^- групе (Hong и сар., 2021). Траке 1645 cm^{-1} и 1594 cm^{-1} би могле да укажу присуство амидних група аминошећера.



Слика 18: FTIR спектар ЕПС добијеног из *K. oxytoca* J7 у опсегу 500–4000 cm^{-1}

Траке у области 1200-920 cm^{-1} могу бити показатељи α- и β-(1→4) гликозидних веза између хексоза (Nikonenko и сар., 2000) у главном полисахаридном ланцу ЕПС, док сигнали на 1424 и 1355 cm^{-1}, који вероватно потичу од савијања C-H веза (у -CH_2- и -CH_3 групама), сугеришу да се главни полисахаридни ланац грана. У области "отиска прста" приметне су траке на 850 cm^{-1}, 922 cm^{-1}, 982 cm^{-1} а затим и траке на 1030 cm^{-1} и 1130 cm^{-1}. Траке на 850 cm^{-1} и 982 cm^{-1} су показатељи *α*-гликозидних веза између мономера шећера у ЕПС (Meng и сар., 2017; Shi и сар., 2016). Интензивна трака на 1030 cm^{-1} може указати и на присуство галактозе, рамнозе и манозе, мада је најкарактеристичнија за спектар β-глукопиранозе. Трака на 1130 cm^{-1} указује на асиметрично истезање β-гликозидних C-O-C веза што може бити последица рачвања ланца (Wang и сар., 2010). Нема израженог пика који би указао на присуство сулфатних и фосфатних група (Ali и сар., 2024). Дакле, анализа FTIR спектра ЕПС из *K. oxytoca* J7 указује на могуће присуство више различитих моносахаридних јединица у односу на ЕПС из пробиотског соја, присуство карбоксилних и могуће присуство амидних група, присуство и α- и β-гликозидних веза међу моносахаридима и могуће рачвање главног ланца. Слично као и са претходним ЕПС, нема сигнала који указују на фосфорилацију или присуство сулфатних група.

Хемијске групе са таласним бројевима за ЕПС добијене из оба бактеријска соја су представљене у табели 5.

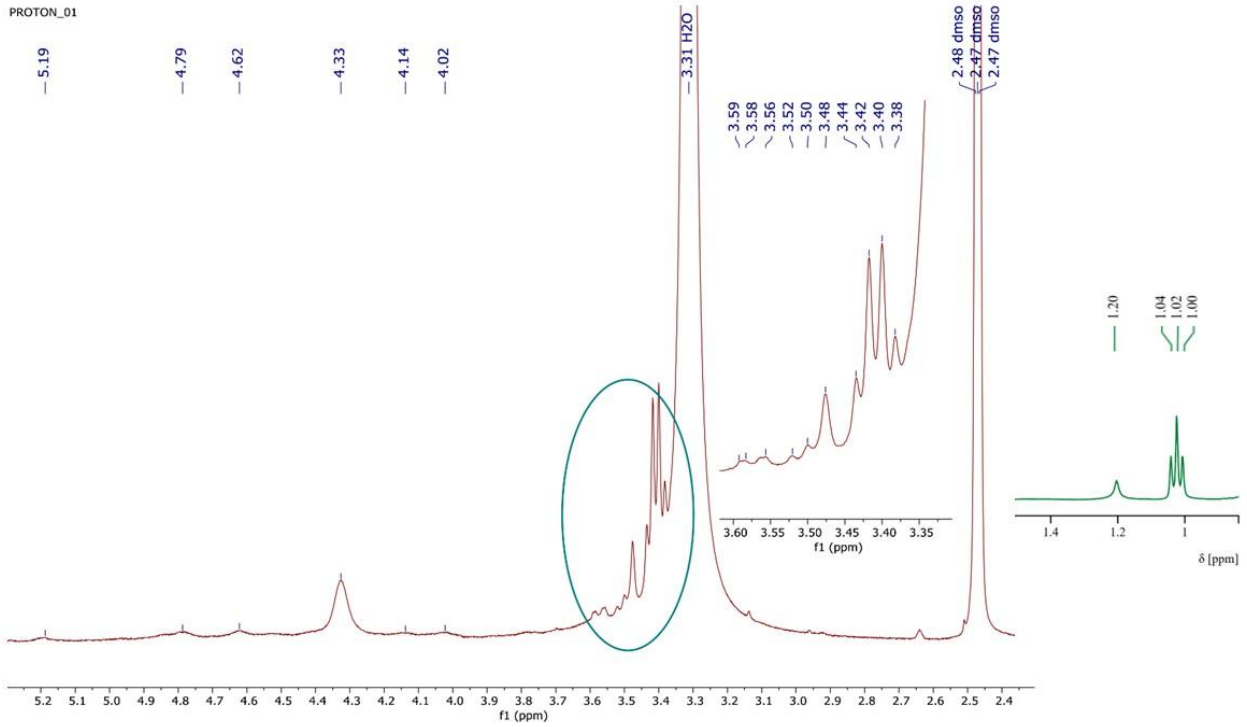
Табела 5. Преглед хемијских веза према FTIR-у за ЕПС добијене из бактеријских сојева *L. reuteri* B2 и *K. oxytoca* J7

Функционална група и врсте вибрација	**Таласна дужина (cm^{-1})**	
	***L. reuteri* B2**	***K. oxytoca* J7**
Хидроксилна група (O-H)	3269	3184
Симетричне и асиметричне вибрације истезања C-H групе	2940 2873	2924 2848
Вибрације истезања C=O група (могући лактони)		1780
Вибрације истезања прстена манозе и галактозе/везана вода/вибрације истезање C=O амидне групе	1647	1645
COO- дублет карактеристичан за полисахариде/деформација -NH амидне групе	1595	1594
Вибрације деформација C-H групе (CH_2) Вибрације деформација C-H групе (CH_3)	1451 1400	
Вибрације истезања гликозидних веза (рачвање)		1424
Вибрације симетричног истезања -COO групе		1355
Вибрације истезања C-N амидне везе	1243	
Вибрације истезања C-O-C веза (рачвање)		1130
Вибрације C-O-C веза пираноза	1030	1030
Истезање β-гликозидних веза	863	982 922
Истезање α-гликозидних веза	818	850

4.2.3 Одређивање структуре NMR методом

На слици 19 приказан је ^{1}H-NMR спектар ЕПС из *L. reuteri* B2. У ^{1}H-NMR спектру детектовани су пикови у области δ_H 3-5 ppm, што је типично за полисахариде. Сигнали аномерних протона (H-1) у ^{1}H-NMR спектру детектовани су на δ_H: 5,19 ppm, 4,79 ppm, 4,62 ppm, што указује на то да се понављајући блок у полисахаридном ланцу ЕПС из *L. reuteri B2* састоји од три различите моносахаридне јединице, или од две моносахаридне јединице, од којих се једна јавља у обе конформације (α и β). Сигнал на δ_H 5,19 ppm указује да ЕПС садржи α-конфигурацију (Meng и сар., 2017) и да је ова фракција ЕПС састављена претежно од пираноза. Присуство пираноза у ЕПС потврђено је и FTIR

анализом. Сигнали у области δ_H 4,79-4,61 ppm указују на присуство β-конфигурације у структури ЕПС, што потврђује сигнал на 818 cm^{-1} у FTIR спектру.



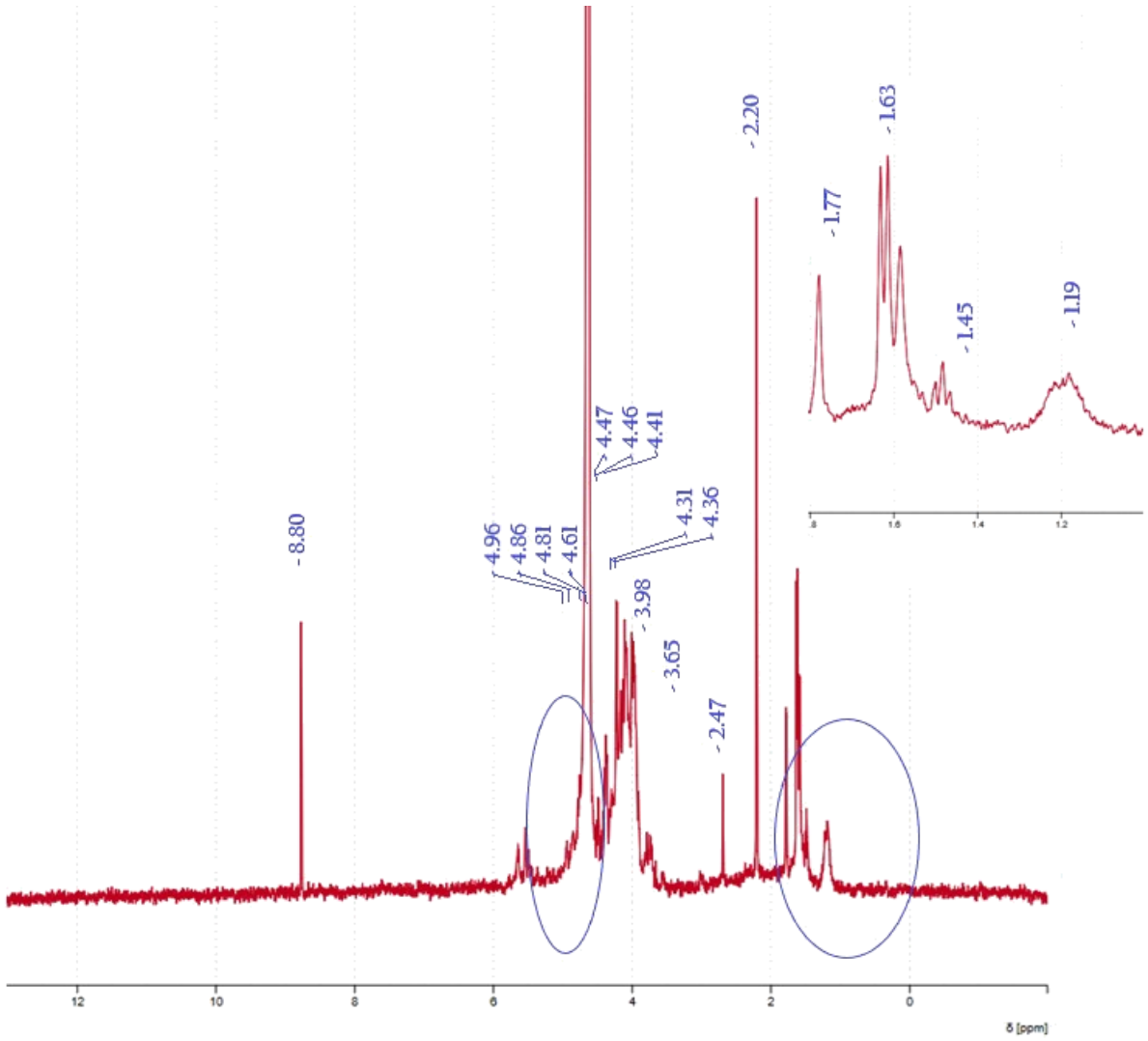
Слика 19: ^{1}H-NMR спектар ЕПС из *L. reuteri* B2

Трака у аномерном региону на δ_H 5,19 ppm би могла указати на присуство α-D-манопиранозе (Ventorino и сар., 2019), α-L-рамнозе (Zhang и сар., 2020) или α-D-глукопиранозе (Dogsa и сар., 2024). Сигнал H-1 протона α-D-манозе у ^{1}H-NMR спектру се разликује од сигнала H-1 протона α-D-глукозе по врло малом интензитету пика и појави уског дублета на δ_H 5,1-5,2 ppm, који није уочен. Такође, у FTIR спектру у области "отиска прста" није запажен сигнал на око 1070 cm^{-1} који је типичан за α-манозу, те би се могло искључити присуство α-D-манопиранозе у трисахаридном понављајућем блоку. Трака на δ_H 4,79 ppm би могла потицати од β-D-манопиранозе или α-L-рамнозе (Ventorino и сар., 2019; Zhang и сар., 2020), док трака на δ_H 4,62 сугерише присуство β-D-глукопиранозе (Fontana и сар., 2023).

Сигнали протона H-2 до H-6 дали су пикове ^{1}H-NMR спектру у области између δ_H 4,33 ppm и δ_H 3,38 ppm (Meng и сар., 2017; Xu и сар., 2019). Бројне траке у овој области δ_H (сигнали протона прстена) указују да је ЕПС из *L. reuteri* B2 хетероЕПС и могуће је преклапање сигнала протона сахаридних прстена глукозе, галактозе и манозе, (Sathishkumar и сар., 2021). Сигнали H-2 протона прстена глукозе се јављају у области 3,2-3,6 ppm, док сигнали H-2 протона прстена манозе, као C2 епимера глукозе дају траке око

3,6-3,9 ppm, који нису запажени због чега се може искључити присуство и β-манозе. Слично, сигнали H-4 протона прстена галактозе, као C4 епимера глукозе, дају траке око 3,6-3,9 ppm (Fontana и сар., 2023), различито од H-4 протона глукозе (3,2-3,6 ppm) што није запажено у спектру. Такође, сигнали аномерних протона типичних за α-D-галактозу (изнад 5,2 ppm) и β-D-галактозу (око 4,5 ppm) нису запажени због чега се може искључити присуство α- и β-галактозе у овом ЕПС. Сигнал детектован на δ_H 2,47 ppm је приписан хемијском помаку протона у коришћеном деутерисаном растварачу DMSO-d6, док је сигнал на δ_H 3,31 ppm додељен D_2O у DMSO-d6. Пик на око 2,1 ppm би могао припадати ацетилној метил групи, што би могло да укаже на присуство N-ацетиламино хексозе. Међутим, како сигнал није интензиван и нису присутне траке протона прстена на 3,6-4,0 ppm (Fontana и сар., 2023), може се искључити присуство N-ацетиламино хексозе у овом ЕПС. Пикови између 1,02 ppm и 1,20 ppm вероватно потичу од метил протона 6-дезокси шећера (Do и сар., 2020), рамнозе или фукозе. Фукоза се ређе налази у ЕПС БМК и вероватније је да је у овом ЕПС присутна рамноза, која је најчешће присутна у α-L-конформацији, што би потврдила трака на 5,19, односно 4,79 ppm. Претпоставка је да трисахаридна понављајућа јединица овог ЕПС има следећи састав: α-D-глукопираноза - β-D-глукопираноза - α-L-рамноза, или β-D-глукопираноза - β-D-глукопираноза - α-L-рамноза. Идентификовање моносахаридних јединица, редослед везивања моносахаридних јединица и тип гликозидних веза између њих није могуће са сигурношћу утврдити без додатних 2D NMR анализа, метилационе анализе и хроматографских метода.

У ^{1}H-NMR спектру ЕПС изолованог из K. *oxytoca* J7 (слика 20) запажена је резонанца у области δ_H 4,96-3,65 ppm, сигнал на 8,80 ppm, као и низ сигнала у области 1,19-2,47 ppm. Траке у региону аномерних протона су запажене на δ_H: 4,96 ppm, 4,86 ppm, 4,81 ppm, 4,61 ppm, 4,47 ppm, 4,46 ppm, 4,41 ppm, што указује на присуство више врста различитих моносахаридних јединица у структури ЕПС из K. *oxytoca* J7. Сличне резултате објавили су Tomulescu и Feng који су показали да се у саставу ЕПС изолованих из сојева *K. oxytoca* ICCF-419 (Tomulescu и сар., 2020) и *K. oxytoca* (Feng и сар., 2009) налази шест, односно седам, различитих моносахаридних јединица. Трака на 4,96 ppm указује на присуство α-конфигурације и могла би припадати α-глукопиранози, α-галактопиранози или N-ацетилглукозамину. Ипак, већински део спектра у аномерној области (прелази у области δ_H 4,81-4,41 ppm) указује да у овом ЕПС преовлађују β-конфигурације моносахаридних јединица (Jivkova и сар., 2022). За разлику од ЕПС из пробиотског соја, у саставу овог ЕПС се могу наћи и моносахаридне јединице манозе и галактозе, на шта указују сигнали око 3,6-3,9 ppm. Сигнали на око δ_H 4,8-4,9 ppm су карактеристични за присуство α-(1-6) гликозидне везе које указују на гранање полисахарида (Nguyen и сар., 2024). Како нема сигнала у аномерној области између 5,2-5,4 ppm може се искључити присуство фуранозних облика моносахарида.



Слика 20: ^{1}H-NMR спектар ЕПС из K. *oxytoca* J7

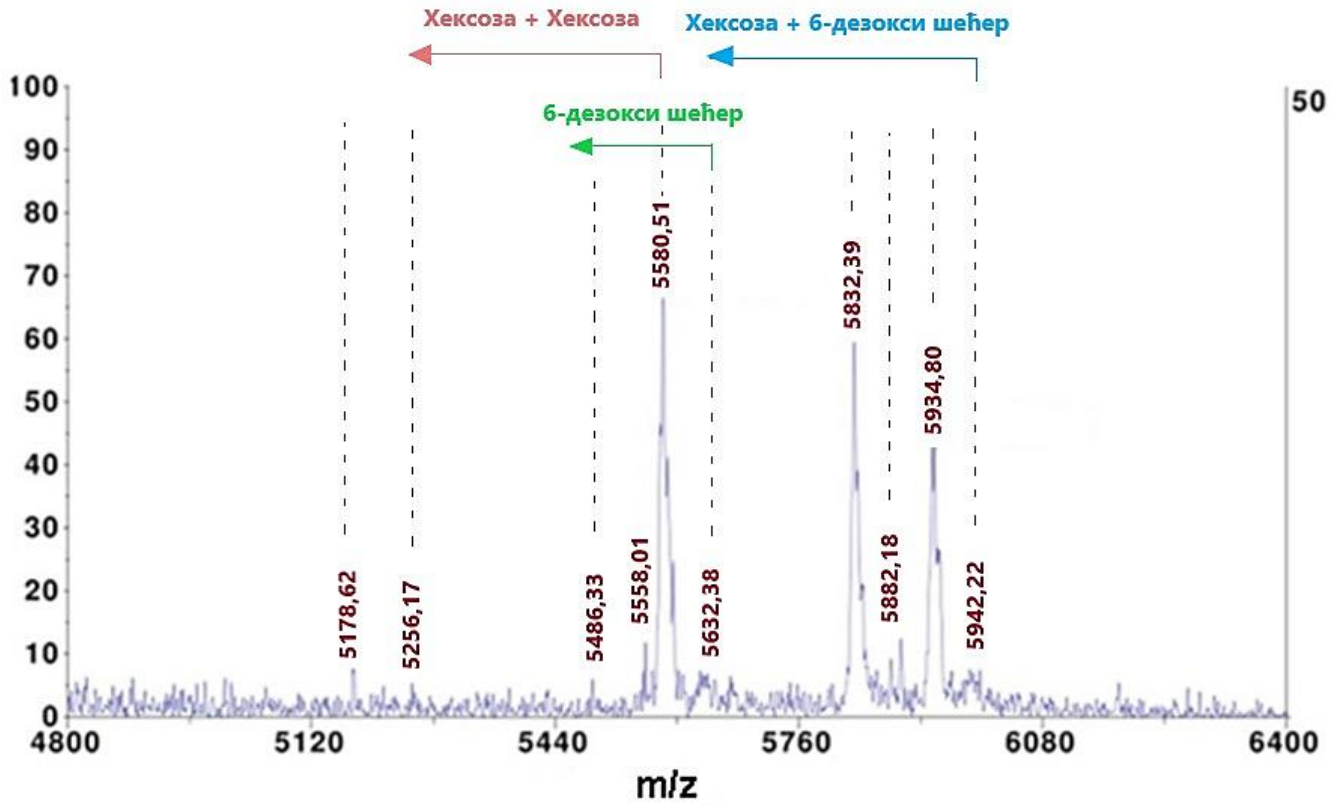
Траке у ^{1}H-NMR спектру од 3,65 до 3,98 ppm одговарају протонима H-2 до H-6 (Jiang и сар., 2021), везаним за C-2 до C-6 атоме у пиранозном прстену. Као и у случају ЕПС из *L. reuteri* B2, детектован је сигнал растварача DMSO-d6 на око 2,47 ppm. Детектовани су и сигнали 1,20 до 1,77 ppm, који вероватно потичу од протона алкил-(метил-) група 6-дезокси шећера (Dilna и сар., 2015), што би потврдило присуство фукозе или рамнозе у структури ЕПС. Пик на 2,19 ppm је карактеристичан за ацетатне остатке и сугерише присуство N-ацетиламино хексозе. Могуће је да сигнал на 8,80 ppm потиче од протона амидне група, што би потврдило присуство аминошећера у ЕПС.

Дакле, у структури ЕПС из *K. oxytoca* J7 присутне су обе конфигурације (α и β), више различитих типова моносахаридних јединица у пиранозним формама и главни ланац ЕПС се вероватно рачва, што указује на сложеност структуре ЕПС из *K. oxytoca* J7.

Није искључено присуство галактозе и манозе, а има назнака за присуство 6-дезокси шећера и аминошећера.

4.2.4 MALDI-TOF-MS анализа

У спектру ЕПС из *L. reuteri* B2 (слика 21) су детектована три интензивна сигнала на 5580,51 m/z, 5832,39 m/z и 5934,81 m/z која представљају масе три јонизована фрагмента полисахаридног ланца ЕПС.



Слика 21: MALDI-TOF-MS спектар ЕПС из *L. reuteri* B2

Најинтензивнији сигнал забележен је на 5580,51 m/z и то би могла бити маса најучесталијег или најстабилнијег фрагмента ЕПС. Спектар са само три интензивна сигнала је указује да је ЕПС великог степена чистоће, стабилан или једноставне структуре, вероватно линеаран ланац без рачвања или са малим степеном гранања и вероватно без модификованих моносахаридних јединица (ацетилација, фосфорилација, сулфонација, итд.). Сигнали мањих интензитета запажени су на m/z: 5178,62, 5256,17, 5486,33, 5558,01, 5632,38, 5882,18 и 5942,22. Како нема униформних масених разлика између суседних сигнала искључује се могућност да је ЕПС састављен само од једне врсте

моносахаридних јединица. Између несуседних сигнала мањих интензитета (5632,38 m/z и 5486,33 m/z) је запажен размак који одговара маси 6-дезокси шећера. Размак који одговара маси дисахарида хексоза + 6-дезокси шећер запажен је између несуседних сигнала (5486,33 m/z и 5178,62 m/z). Сигнали на: 5256,17 m/z, 5558,01 m/z и 5632,38 m/z вероватно настају отцепљивањем дисахарида састављеног од две хексозе од фрагмената којима одговарају сигнали на 5580,51 m/z, 5882,18 m/z и 5942,22 m/z, редом. Уочен је и низ повезаних сигнала (5942,22 m/z → 5632,38 m/z → 5486,33 m/z → 5178,62 m/z који указује да се фрагментисање полисахаридног ланца ЕПС може одвијати следећим редом: хексоза+хексоза, 6-дезокси шећер, хексоза+6-дезокси шећер.

Имајући у виду да је ^{1}H-NMR анализом утврђено да се понављајући блок ЕПС *L. reuteri* B2 састоји из три различите моносахаридне јединице могло би се закључити да се у понављајућем блоку ЕПС налазе две хексозе и један 6-дезокси шећер. 6-дезокси шећери се углавном у структури ЕПС налазе у бочним ланцима, односно, за суседне моносахаридне јединице у ЕПС се не везују преко C4. Триплет сигнал на око 1,20 ppm у ^{1}H-NMR спектру указује да је -CH_3 група (C6) 6-дезокси шећера слободна, не учествује у грађењу гликозидне везе, већ се везивање остварује преко аномерног C1 атома, најчешће за хидроксилне групе у положајима C2, C3 или C4 хексозе (Speciale и сар., 2022). Ако се претпостави да су две хексозе међусобно повезане (1→4) гликозидном везом, која се најчешће јавља као веза између две хексозе у главном ланцу ЕПС, за везивање са 6-дезокси шећером остају слободне хидроксилне групе на C2 и C3 хексозе. Друга могућа веза између две хексозе у главном ланцу је (1→3) гликозидна веза и у том случају остају слободне хидроксилне групе на C2 и C4 хексозе за грађење гликозидне везе са 6-дезокси шећером. Дакле, могуће везе између хексозе и 6-дезокси шећера су (1→2), (1→3) и (1→4) гликозидне везе, односно 6-дезокси шећер је за једну од хексоза бочно везан.

Добијени резултати указују да је просечна молекулска маса *M*w ЕПС који производи *L. reuteri* B2 ≈ 5755 Da. За рачунање *M*w коришћена је формула (5):

$$Mw = (\sum N_i M_i^2)/(\sum N_i M_i) \qquad (5)$$

где су:

M_i - маса појединачних фракција ЕПС,

N_i - број молекула моносахарида са масом M_i,

при чему је претпостављено да је интензитет сигнала у спектру пропорционалан броју молекула моносахарида ($N_i \approx I_i$) у олигосахариду.

Молекулска маса молекула хексозе је 180 Da, док је маса 6-дезокси шећера 164 Da. Након губитка два молекула воде (маса 2x18 Da) услед грађења две гликозидне везе добија се маса једног понављајућег блока од 488 Da. Узимајући у обзир масе детектованих фрагмената у спектру, и израчунату просечну молекулску масу ЕПС *L. reuteri* B2, претпоставља се да се анализирани узорак ЕПС састоји од 11-12 оваквих понављајућих блокова, уз остатке у виду моносахаридне или дисахаридне јединице, односно од укупно 35-37 моносахаридних јединица. Слично, анализа ЕПС из пробиотског соја *Lactobacillus plantarum* MTCC 9510 показује најинтензивнији сигнал у спектру на 5297,7 m/z и одређена је просечна молекулска маса ЕПС ≈ 5189 Da (Ismail и сар., 2014). Претходним анализама потврђено је да се понављајући блок састоји од три хексозе (α-D-манозе, α-D-глукозе и β-D-глукозе), што је довело до закључка да се ЕПС састоји од 10 оваквих понављајућих блокова.

Интересантно је да су у спектру између 3 најинтензивнија сигнала детектовани размаци, односно губици маса (102 Da и 254 Da, односно 354 Da) који не одговарају масама типичних моносахарида или дисахарида. С обзиром да је претпостављено да нема модификација у полисахаридном ланцу ЕПС *L. reuteri* B2 које би фрагментацијом показале неспецифичне масене губитке у MALDI-TOF-MS спектру, претпоставља се да долази до раскидања веза у самом прстену моносахаридне јединице, што би се манифестовало неспецифичним разликама у масама фрагмената (Domon и сар., 1988). Друго објашњење доводи до претпоставке да анализирани ЕПС из *L. reuteri* B2 представља смешу два ЕПС различитих састава које би овај сој могао да синтетише. Случајеви синтезе различитих ЕПС из сојева *Lactobacillus sp.* објављени су у неколико радова. Према Sanchez и сарадницима (Sánchez и сар., 2006) сој *L. pentosus* LPS26 који је узгајан на подлогама састављеним од различитих моносахарида синтетисао је симултано два ЕПС: ЕПС састављен од глукозе и рамнозе при узгајању на глукозној хранљивој подлози и ЕПС састављен од глукозе и манозе, при узгајању на фруктозној подлози. Слично, сој *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* NCFB 2772 је при узгајању на глукозној подлози синтетисао ЕПС састављен од галактозе, глукозе и рамнозе, док је при узгајању на фруктозној подлози синтетисан ЕПС састављен од глукозе и галактозе (Grobben и сар., 1997). За синтезу ЕПС из *L. reuteri* B2 коришћена је подлога са сахарозом, дисахаридом састављеним од глукозе и фруктозе, те је, теоријски, симултана синтеза два ЕПС различитих састава, могућа. Анализом масених вредности детектованих полисахаридних фрагмената у спектру, масених вредности мањих фрагмената (моносахарида, дисахарида) који се одвајају од већих ланаца и могућих комбинација понављајућих блокова састављених од хексоза и 6-дезокси шећера, долази се до претпоставке да ЕПС највероватније представља смешу ЕПС 1 чији се понављајући блок полисахаридног ланца састоји из две хексозе и једног 6-дезокси шећера, укупне масе 488 Da и ЕПС 2 чији се понављајући блок састоји од две хексозе, укупне масе 342 Da, слично као у истраживању Grobben и сарадника (Grobben и сар., 1997). Сигнали у спектру би, у том случају, представљали масе смеша ових ЕПС у различитом односу, што би могло

бити приказано кроз различите односе два различита понављајућа блока. Ако се узму у обзир губици масе који настају грађењем гликозидних веза и да два различита полисахаридна ланца међусобно нису повезани гликозидном везом, сигнал на 5934,80 m/z би одговарао маси 31 јединице хексозе и 6 јединица 6-дезокси шећера (укупно 37 моносахаридних јединица), што би се уклопило у масу смеше 6 понављајућих блокова ЕПС 1 и 9 понављајућих блокова ЕПС 2, са остатком од једне хексозе, као протонован молекул $[M + H]^+$, уз одступање од +1 Da:

$$6 \times 488\ Da - 5 \times 18\ Da + 9 \times 342\ Da - 8 \times 18\ Da + 162\ Da + H^+ \approx 5934\ Da + H^+ \approx 5935\ Da$$

На исти начин је утврђено да би пик 5832,39 m/z одговарао маси 35 јединица хексоза и 1 јединице 6-дезокси шећера (укупно 36 моносахаридних јединица), што се уклапа у масу смеше 17 понављајућих блокова ЕПС 2 са остатком једног 6-дезокси шећера и једне хексозе, као протонован молекул $[M + H]^+$, уз одступање од +3 Da:

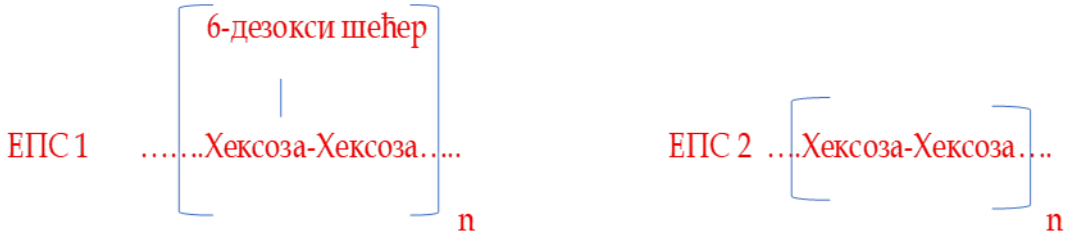
$$17 \times 342\ Da - 16 \times 18\ Da + 146\ Da + 162\ Da + H^+ \approx 5834\ Da + H^+ \approx 5835\ m/z$$

Најинтензивнији сигнал у спектру, 5580,52 m/z, би одговарао маси 27 јединица хексоза и 8 јединица 6-дезокси шећера (35 моносахаридних јединица), што би одговарало смеши 7 понављајућих блокова ЕПС 1 и 6 понављајућих блокова ЕПС 2, са остатком једне хексозе и једног 6-дезокси шећера, као протонован молекул $[M + H]^+$, уз одступање од -1 Da:

$$(7 \times 488\ Da - 6 \times 18\ Da + 6 \times 342\ Da - 5 \times 18\ Da + H^+ \approx 5578\ Da + H^+ \approx 5579\ Da)$$

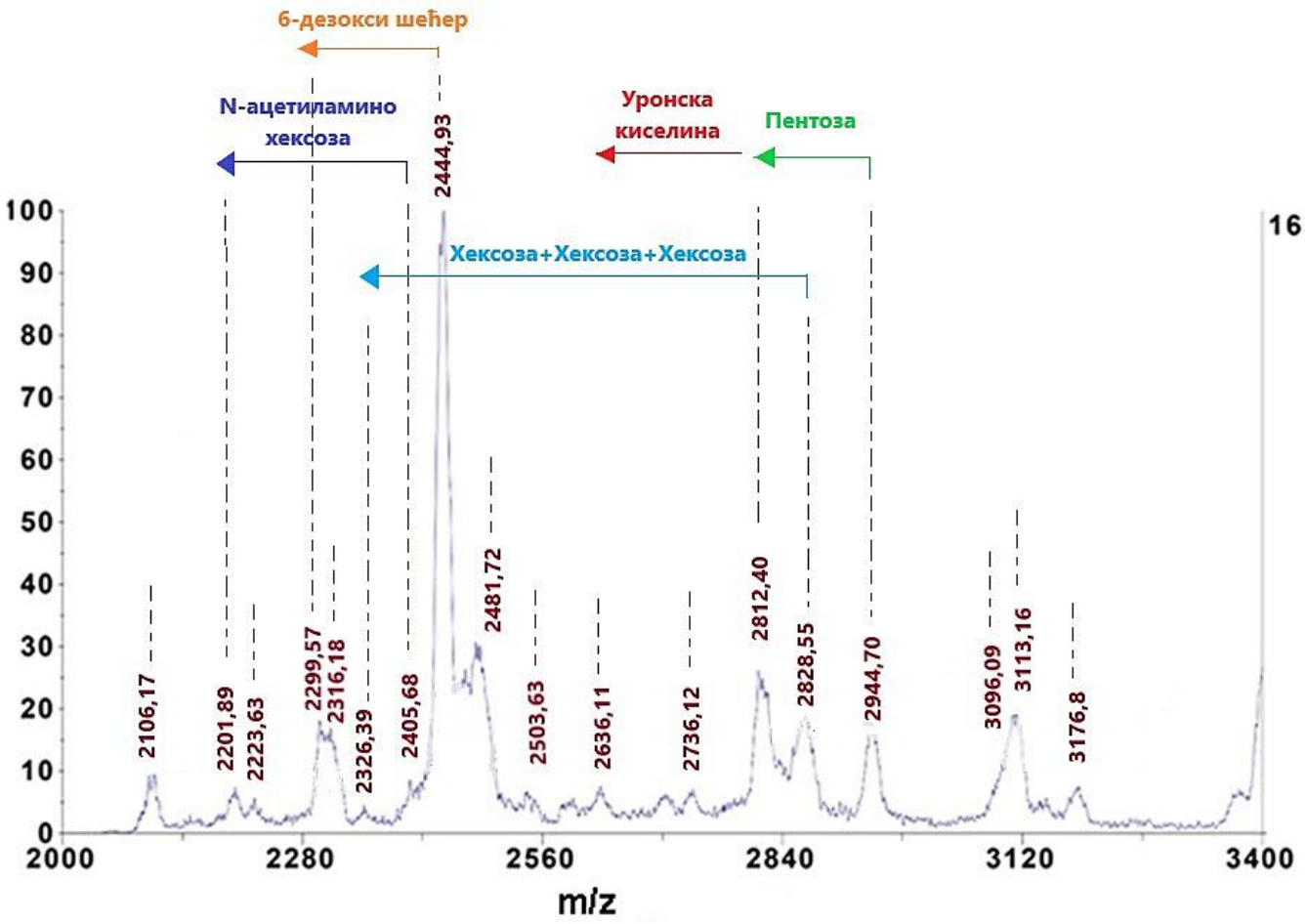
Одступања ±1-3 Da су прихватљива у MALDI-TOF анализи и на нивоу су експерименталне грешке. Начин фрагментације који је дао сигнале слабијег интензитета у спектру би имао смисла и у случају смеше два различита ЕПС, с обзиром да се уочавају исти остаци понављајућих блокова (6-дезокси шећер, 6-дезокси шећер + хексоза, хексоза). Као што може да се уочи, сваки наредни од три интензивна сигнала представља полисахаридни ланац са једном моносахаридном јединицом више од претходног, што не би могло да се закључи само на основу вредности детектованих сигнала и размака међу њима, без хипотезе о смеши два различита ЕПС.

Из свега наведеног, претпостављени састави два ЕПС *L. reuteri* B2 су приказани на слици 22.



Слика 22: Предложени састав ЕПС1 и ЕПС2 из *L. reuteri* B2

На слици 23 приказан је спектар ЕПС из *K. oxytoca* J7. Детектовани су сигнали који представљају масе јонизованих фрагмената полисахарида (протонованих молекула $[M+H]^+$) насталих услед дејства ласерског зрака одређене енергије.



Слика 23: MALDI-TOF-MS спектар ЕПС из *K. oxytoca* J7

Најмања детектована маса у спектру ЕПС *K. oxytoca* J7 је 2106,18 m/z, а највећа 3176,8 m/z. Између ових сигнала нема униформних понављајућих размака који би указали на масу понављајућег блока ЕПС и претпоставка је да се у овом опсегу може детектовати највише један понављајући блок, односно да је маса понављајућег блока минимум разлика између најмање и највеће детектоване масе. Пик са највећим интензитетом је на 2444,93 m/z и представља масу најучесталијег фрагмента насталог фрагментацијом и јонизацијом. За разлику од спектра ЕПС из *L. reuteri* B2, MALDI-TOF-MS спектар ЕПС из патогеног бактеријског соја *K. oxytoca* J7 има више сигнала (фрагмената), што потврђује претпоставку да је овај ЕПС сложеније структуре која показује мању стабилност под дејством енергије ласера. Између суседних сигнала нема

узастопних униформних размака који одговарају само једној моносахаридној јединици, што потврђује да је анализирани ЕПС по саставу хетероЕПС. Међу појединим несуседним сигналима запажени су масени губици који одговарају масама различитих моносахаридних јединица одвојених од олигосахаридног ланца: 146 Da за 6-дезокси шећер (између сигнала 2299,57 m/z и 2444,93 m/z), 132 Da за пентозу (између сигнала 2812,39 m/z и 2944,70 m/z), 203 Da за N-ацетиламино хексозу (између сигнала 2405,68 m/z и 2201,89 m/z) и 176 Da за уронску киселину (између сигнала 2812,39 m/z и 2636,11 m/z). Ови подаци указују да су управо ове моносахаридне јединице део понављајућег блока анализираног ЕПС. Интересантно је да нису детектоване масе које одговарају појединачним хексозама, које су честе и очекиване у саставу хетероЕПС. Међутим, између појединих несуседних сигнала запажени су масени губици који одговарају масама различитих дисахарида, трисахарида и тетрасахарида који садрже хексозе и који заједно могу дати информације о потенцијалној структури ЕПС. Рецимо, запажен је размак између два несуседна сигнала (2828,55 m/z и 2326,39 m/z) који одговара маси трисахарида састављеног од три хексозе, из чега се претпоставља да понављајући блок ЕПС има три међусобно везане хексозе. Резултати указују да је овај фрагмент потенцијално део два спојена понављајућа блока између којих су везе остварене преко две хексозе и у том случају би понављајући блок имао најмање две међусобно везане хексозе. Маса фрагмента састављеног из више моносахарида рачуна се сабирањем молекулских маса свих моносахаридних јединица у фрагменту и одузимањем суме молекулских маса молекула воде који се ослобађају при грађењу гликозидних веза између моносахарида:

M (фрагмент дисахарида) = M (моносахарид 1) + M (моносахарид 2) – M (гликозидне везе ≈18 Da)

M (фрагмент трисахарида) = M (моносахарид 1) + M (моносахарид 2) + M (моносахарид 3) – 2 x M (гликозидне везе ≈18 Da)

Размак између два несуседна сигнала (3096,09 m/z и 2405,68 m/z) одговара маси тетрасахарида састављеног из три хексозе и једне N-ацетиламино хексозе, док размак између сигнала 3113,16 m/z и 2481,71 m/z указује да је за три међусобно везане хексозе везан 6-дезокси шећер. Дакле, N-ацетиламино хексоза и 6-дезокси шећер везане су за по једну хексозу из трисахаридног ланца. Имајући у виду да је средња хексоза у трисахариду већ везана за две суседне хексозе, а да се прва и трећа хексоза трисахаридног ланца вероватно везују за претходни и наредни блок, због стерних сметњи није вероватно да било која од три хексозе има две бочне гране. Вероватније је да је једна од ове две моносахаридне јединице (N-ацетиламино хексоза или 6-дезокси шећер) део основног ланца (везана за C1 хексозе), која би се везивала за хексозу из наредног блока, док би друга моносахаридна јединица започињала бочни ланац (везана преко C2, C3 или C4 хексозе). У различитим ЕПС 6-дезокси шећер је најчешће бочно везан у полисахаридном ланцу (Harnagel и сар., 2023), док се N-ацетиламино хексоза јавља и као

део основног и као део бочног ланца (Van Calsteren и сар., 2002; Landersjö и сар., 2002). Претпоставка је да је N-ацетиламино хексоза део основног полисахаридног ланца понављајућег блока, везан за једну од крајњих хексоза (не средњу) и да остварује везу са хексозом из наредног блока, а да је 6-дезокси шећер везан бочно за исту хексозу као и N-ацетиламино хексоза. Друга могућа варијанта је да је N-ацетиламино хексоза такође бочна грана (везана у неком другом положају хексозе) али да остварује везивање за хексозу из наредног блока. У спектру је запажен размак између сигнала 2223,63 m/z и 2503,63 m/z који одговара маси отцепљеног фрагмента 6-дезокси шећер + пентоза. Сви ови подаци указују да су у понављајућем блоку ЕПС за једну од три међусобно везане хексозе везани N-ацетиламино хексоза и за другу хексозу један 6-дезокси шећер, за који је даље везана једна пентоза. Позиција уронске киселине која је детектована као засебна моносахаридна јединица је вероватно у терминалном положају, везана за једну од хексоза у главном ланцу или за пентозу у бочном ланцу. Нема запаженог размака између пикова који указује на фрагмент који садржи и уронску киселину уз друге моносахариде. Из свега наведеног претпостављено је да ЕПС из *K. oxytoca* J7 сложене структуре, сачињен од седам различитих моносахаридних јединица, са рачвањем главног ланца, што је у складу са резултатима ^{1}H-NMR анализе. Дакле, крајња претпоставка је да је основни ланац понављајућег блока ЕПС *K. oxytoca* J7: хексоза + хексоза + хексоза + N-ацетиламино хексоза, а да фрагмент 6-дезокси шећер + пентоза одговара бочном ланцу. У првој претпостављеној структури пентоза и уронска киселина су терминалне моносахаридне јединице које се даље не везују за друге моносахаридне јединице, а N-ацетиламино хексоза је део основног ланца и везује се даље за наредни блок. У другој претпостављеној структури уронска киселина и N-ацетиламино хексоза су терминалне моносахаридне јединице а једна од хексоза учествује у грађењу гликозидне везе са наредним блоком. Предлози састава и структуре понављајућих блокова ЕПС приказани су на слици 24.

Слика 24: Претпостављени састави ЕПС из *K. oxytoca* J7

Оба редоследа везивања моносахаридних јединица у бактеријском ЕПС имају смисла. Ако се узме у обзир да хексозе и N-ацетиламино хексозе стабилизују основни ланац ЕПС (Brott и сар., 2019), смислена је претпоставка да је N-ацетиламино хексоза део основног ланца. N-ацетиламино хексозе (најчешће N-ацетиламино глукоза и N-ацетиламино галактоза) штите олигосахаридни ланац од разградње, због могућности грађења водоничних веза са суседним ланцима. Биолошка улога N-ацетиламино хексозе у ЕПС је да олакшава адхезију микроорганизма који га синтетише и олакша интеракцију са околином (Lin и сар., 2015). Сличну улогу имају уронске киселине и 6-дезокси шећер које олакшавају адхезију бактерија на површину и формирање биофилма (Beech и сар., 1991; Formosa-Dague и сар., 2018). Због негативног наелектрисања, уронске киселине у терминалној позицији бочног ланца омогућавају везивање јона (катјона) и интеракцију са окружењем. У овој позицији уронске киселине смањују хидрофобност ЕПС којој доприноси 6-дезокси шећер, што резултира повећањем растворљивости ЕПС. 6-дезокси шећер има улогу у отпорности на ензиме гликозидазе и литичке ензиме, улогу у маскирању и заштити од имунског система домаћина (Palusiak и сар., 2013; Whitfield и сар., 2015), мењајући тродимензионални облик ЕПС (услед недостатка OH групе на C6 позицији), наелектрисање и имитирајући неке сахариде (гликане) из људског организма. Сличну функцију могу имати и пентозе (Newman и сар., 2025). Пентозе дају флексибилност олигосахаридном ланцу, с обзиром на мањи стерни ефекат молекула (Whitfield и сар., 2015). У другој претпостављеној структури, где је уронска киселина везана за пентозу, пентоза би имала улогу моста између хидрофобног 6-дезокси шећера и уронске киселине.

Сличне моносахаридне саставе имали су ЕПС из других сојева *K. oxytoca*. По наводима Wang и сарадника (Wang и сар. 1999), ЕПС из соја *K. oxytoca* CF154 састоји се из три хексозе (глукозе, галактозе, манозе), уронске киселине и пентозе (арабинозе). За ЕПС из соја *K. oxytoca* у претходним истраживањима (Feng и сар., 2009) утврђен је састав од три хексозе (глукоза, галактоза, маноза), два 6-дезокси шећера (рамноза, фукоза) и две пентозе (арабиноза, ксилоза). Tomulescu и сарадници (Tomulescu и сар., 2020) објавили су да ЕПС из соја *K. oxytoca ICCF419* има састав: три хексозе (глукоза, фруктоза, маноза), 6-дезокси шећер (рамноза), уронске киселине. *K. oxytoca* у истраживању Bannwart и сарадника (Bannwart и сар., 2022) производи ЕПС састава: три хексозе (глукоза, галактоза, маноза) и 6-дезокси шећер (рамноза). ЕПС из *K. oxytoca* KY498625 (Hayet и сар., 2021) имао је *M*w 4,0x10^4 Da и у свом саставу претежно глукозу, манозу, арабинозу и глукуронску киселину.

Према добијеним резултатима просечна молекулска маса *M*w ЕПС *K. oxytoca* J7 је ≈ 2621 Da. При рачунању моларне масе разгранатих олигосахарида у обзир се узимају масе свих моносахаридних јединица које граде понављајући блок, губици масе који

настају грађењем гликозидних веза (18,01 Da) између моносахаридних јединица, као и број терминалних јединица који само једним крајем учествују у грађењу гликозидне везе.

M (хексозе) = 180,16 Da

M (6-дезокси шећера) = 164,16 Da

M (пентозе) = 150,13 Da

M (уронске киселине) = 194,14 Da

M (N-ацетиламино хексоза) = 221,21 Da

m – број моносахаридних јединица у блоку

k – број терминалних јединица у блоку

M (ЕПС) = $\sum M$ – (m – k – 1) x молска маса воде (гликозидна веза) ≈ 1180 Da

Као што је претпостављено, маса једног понављајућег блока има већу вредност од разлике сигнала на почетку и на крају спектра и може се детектовати једино сигнал који одговара маси два цела понављајућа блока. Када се узме у обзир губитак масе услед грађења гликозидних веза између понављајућих блокова, маса два међусобно везана понављајућа блока (2 ПБ) би била ≈ 2342 Da, маса три међусобно везана понављајућа блока (3 ПБ) би била ≈ 3504 Da. Када се од масе три међусобно везана понављајућа блока одузме маса једног понављајућег блока, добија се вредност ≈ 2325 Da, која, уз масу додатог H^+, одговара детектованом сигналу у спектру на m/z 2326,39. Разлика у маси ≈ 2342 и ≈ 2325 одговара маси једне гликозидне везе која се раскида при одвајању једног блока од већег ланца, при чему на редукујућем крају моносахарида који је градио гликозидну везу заостаје ОН група (17 Da) .

У спектру је уочен потенцијално повезан низ сигнала који би одговарао разградњи прве претпостављене структуре понављајућег блока ЕПС:

≈3504 (3 ПБ) → 2944,70 → 2812,40 → 2503,63 → 2326,39 (2 ПБ)

Када се од 3 ПБ отцепе терминална уронска киселина и фрагмент састављен од хексозе и N-ацетиламино хексозе, заостаје ланац чија се маса детектује сигналом 2944,70 m/z; даљим одвајањем једне пентозе заостаје ланац чија се маса детектује на 2812,40 m/z; даљим одвајањем фрагмента састављеног од хексозе и 6-дезокси шећера заостаје ланац чија маса се детектује сигналом 2503,64 m/z; даљим одвајањем преостале хексозе из понављајућег блока која је учествовала у грађењу гликозидне везе између два блока детектује се сигнал који одговара маси 2 ПБ.

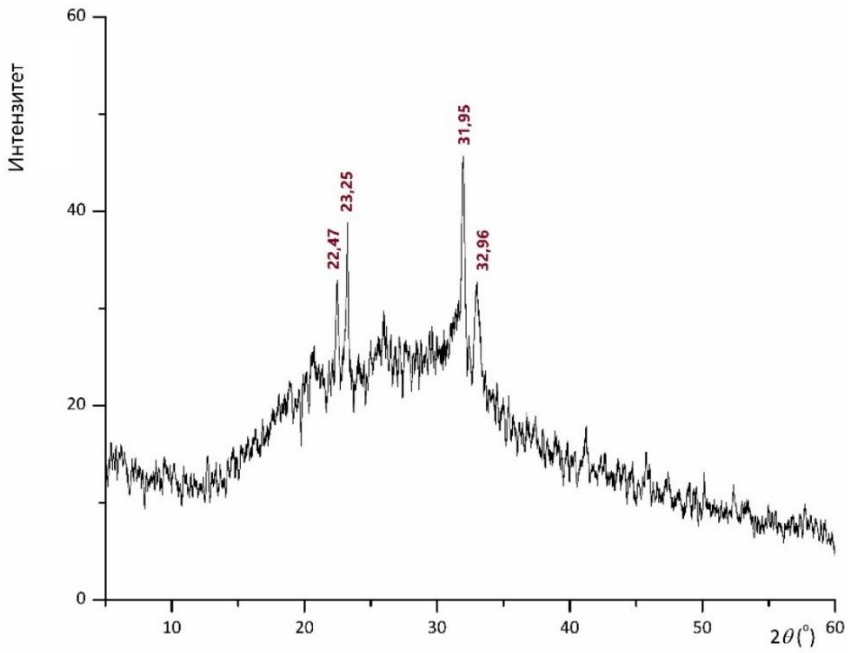
Други потенцијални низ сигнала, који би одговарао разградњи понављајућег блока ЕПС са другом претпостављеном структуром:

≈3504 → 3176,80 → 2828,55 → 2503,63 → 2326,39

Када се од 3 ПБ отцепи бочни фрагмент састављен од пентозе и уронске киселине заостаје ланац чија се маса детектује на 3176 m/z; даљим отцепљивањем N-ацетиламино хексозе и 6-дезокси шећера заостаје ланац чија се маса детектује на 2828 m/z; даљим отцепљивањем три преостале хексозе из понављајућег блока детектује се сигнал који одговара маси 2 ПБ. Фрагмент од три хексозе детектован је у спектру, због чега је вероватнија друга предложена структура понављајућег блока ЕПС.

4.2.5 Одређивање кристалиничности XRD анализом

У дифрактограму ЕПС из *L. reuteri* B2 (слика 25) у опсегу од 5-60° 2θ запажа се доминантан широк аморфни брег и неколико изражених дифракционих пикова, што указује да ЕПС садржи и аморфне и кристалне области у својој структури. Аморфни брег уочава се у опсегу од 20-25° 2θ и карактеристичан је за аморфне структуре (Mosharaf и сар., 2018). Слично, аморфни брег у области 15-25° 2θ запажен је у XRD анализи ЕПС из *B. cereus* KMS3-1 (Krishnamurthy и сар., 2020). Оштри пикови који указују на присуство кристалне фазе уочени су на 2*θ* 22,47°, 23,25°, 31,95° и 32,96°, са *d*-размацима 4,0 Å, 3,8 Å, 2,8 Å и 2,7 Å. Оштри пикови су релативно слабог интензитета, што указује на присуство области мале кристалиничности у ЕПС *L. reuteri B2*. С обзиром да је понављајући блок овог ЕПС састављен од само три различите моносахаридне јединице и само од неутралних шећера, пикови у дифрактограму вероватно потичу од појединих, малих сегмената полисахаридног ланца који су локално спонтано уређени и стабилизовани услед грађења водоничних веза између моносахаридних -OH група (као што је приказано на слици 5). Слично, у раду Biswas и сарадника (Biswas и сар. 2015) дифрактограм показује аморфни брег у области 20-40° 2*θ* и оштре пикове на око 22°, 23° и 31° 2*θ* за ЕПС добијен из *H. xianhensis* SUR308, који се састоји од неутралних шећера, конкретно хексоза (глукозе, галактозе и манозе) и пентоза (рибозе и ксилозе). Пикове на око 31 и 32° имао је и дифрактограм ЕПС из *B. licheniformis* (Singh и сар., 2011) у чијем су моносахаридном саставу заступљени такође само неутрални шећери (галактоза, глукоза, маноза и арабиноза). Пикове на око 23 и 32° имао је ЕПС из *V. dokdonensis* (Andrew и сар., 2022), који се састоји од глукозе, рибозе, фруктозе и ксилозе (неутрални шећери).

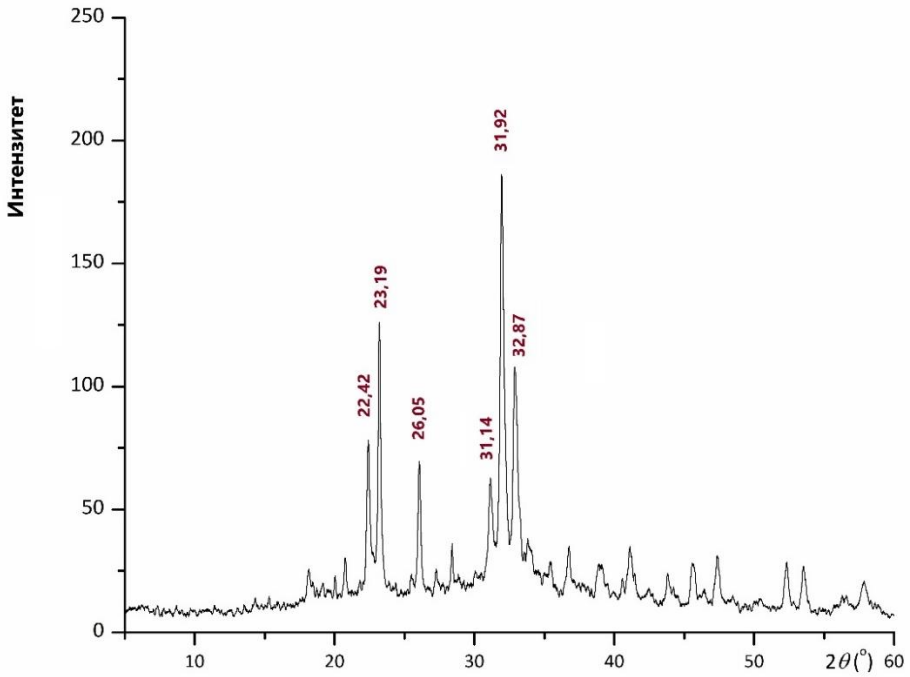


Слика 25: Дифрактограм ЕПС добијеног из *L. reuteri B2*

Допринос кристалиничности могу дати и слободни моносахариди који су заостали током процеса синтезе (полимеризације) ланца ЕПС или раскидањем од полисахаридног ланца ЕПС током процеса изолације и пречишћавања, а који су заостали заробљени у порозној матрици ЕПС и након процеса дијализе. Ови слободни моносахариди могу међусобно градити агрегате повезујући се водоничним везама, могу кристалисати током процеса таложења етанолом или процеса лиофилизације. У том смислу, пикови у спектрима који указују на кристалне области у ЕПС *L. reuteri B2* могу потицати не само од уређења и начина паковања полисахаридног ланца, већ и од кристалних слободних моносахарида присутних у оба ЕПС. Позиције пикова у дифрактограму ЕПС одговарају α-D-глукози у кристалном облику (база података *Crystalography Open Database* – COD 1518432), што сугерише да је у аморфном ЕПС потенцијално присутна слободна кристална α-D-глукоза. Додатно, у ^{1}H-NMR спектру је уочен пик на око 5,19 ppm који би могао бити приписан α-D-глукози.

Дифрактограм ЕПС из соја *K. oxytoca* J7 приказан је на слици 26. За разлику од ЕПС из *L. reuteri* B2, у опсегу од 5–60° 2θ се не јавља изражен аморфни брег, док је запажено више оштрих пикова у области 20-30° 2θ, што указује да структура није доминантно аморфна, већ је делимично кристална. ЕПС у свом саставу, поред неутралних шећера има уронске киселине (могуће у форми лактона) и аминошећере. N-ацетиламино хексозе могу допринети кристалиничности узорка (као, рецимо, N-ацетилглукозамин у хитину (Liu и сар., 2023)). Претпоставка је да аминошећери, заједно са уронским

киселинама, доприносе грађењу бројних међумолекулских водоничних веза чиме утичу на стабилизацију и већи степен уређености полисахаридног ланца, што доприноси појави кристалних пикова у спектру. Додатно, -COO^- групе уронских киселина могу да везују катјоне K^+, Na^+, Mg^{2+} из подлоге (састав подлоге дат у табели 3) и граде соли које могу заостати интегрисане у ЕПС и након дијализе на MWCO 12-14 Da. Способност везивања катјона омогућава грађење јонских мостова између различитих делова полисахаридног ланца ЕПС што, такође, даје допринос кристалиничности ЕПС. Пиковима који су уочени на 2θ 22,42°, 23,19°, 26,05°, 31,14°, 31,92° и 32,87° одговарају *d*-размаци 4,0 Å, 3,8 Å, 3,4 Å, 2,9 Å, 2,8 Å и 2,7 Å.



Слика 26: Дифрактограм ЕПС изолованог из *K. oxytoca* J7

Пик на око 32° у спектру имао је, слично, и ЕПС из *C. tropikalis* MYCt (Sountharavallee и сар., 2023), у чијем саставу преовлађују неутрални шећери, уронске киселине и аминошећери (N-ацетил глукозамин, маноза, глукуронска киселина, глукоза, рамноза, галактоза и фруктоза), док је пикове на око 26 и 32° у спектру имао ЕПС из *B. velezensis* OM03 који је сачињен од неутралних шећера (манозе и глукозе). Спектар ЕПС из *K. oxytoca* J7 показује пикове на приближним позицијама 2θ као и спектар ЕПС из *L. reuteri* B2, док су интензитети различити. Сличност у саставу ЕПС из *L. reuteri* B2 и ЕПС из *K. oxytoca* J7 се огледа у присуству неутралних шећера (претежно хексоза), који су међусобно повезани гликозидним везама. Основни полисахаридни ланац је донекле сличан у ова два ЕПС и ови сегменти могу примарно утицати на формирање одређених

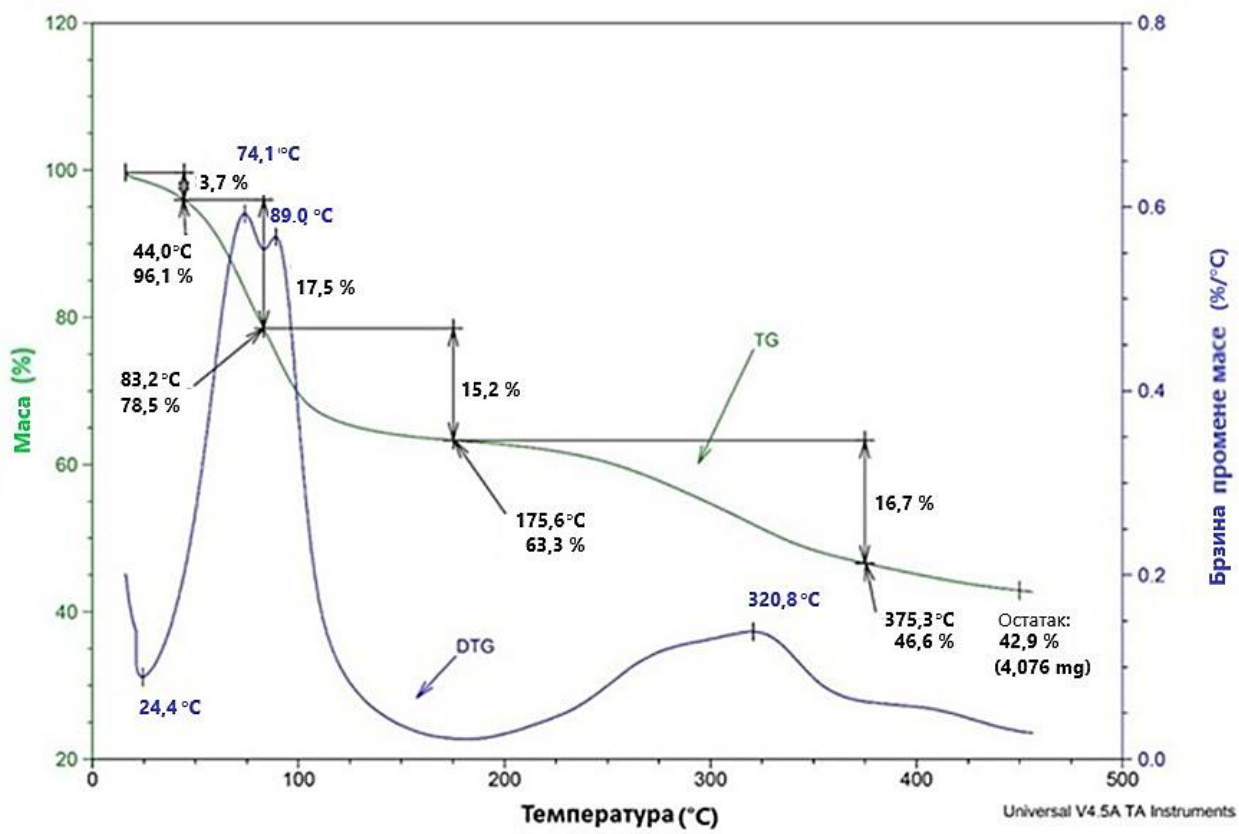
уређених области које доприносе кристалиничности. Уређеност полисахаридног ланца је вероватно израженија код ЕПС из *K. oxytoca* J7 због тога што, поред неутралних шећера, садржи и уронске киселине и аминошећере. Уронске киселине могу учествовати у грађењу јонских мостова и у грађењу соли са катјонима метала које заједно доприносе кристалиничности ЕПС. На SEM сликама ЕПС *K. oxytoca* J7 нису уочени кристали соли, што не значи да их нема, већ кристали могу бити ситни или заробљени у матрици ЕПС, због чега неће бити детектовани микроскопом. У ЕПС из овог соја могуће је, такође, присуство кристалисаних слободних моносахарида који би допринели појави оштрих пикова у дифрактограму.

Дакле, у случају оба ЕПС, из соја *L. reuteri* B2 и *K. oxytoca* J7, оштри пикови у дифрактограмима потичу вероватно од начина паковања полисахаридног ланца и заосталих слободних кристалних моносахарида и/или кристалних соли. Аморфни карактер је више изражен код ЕПС из *L. reuteri* B2 који је састављен од неутралних шећера, док је већа кристалиничност уочена код ЕПС из *K. oxytoca* J7, који поред неутралних шећера садржи у свом саставу и аминошећере и уронске киселине који могу допринети повећању кристалиничности ЕПС.

4.2.6 Одређивање термостабилности TGA методом

Резултати TGA анализе ЕПС из *L. reuteri* B2 испитиваног у интервалу 0 – 450 °C су приказани на TG/DTG дијаграму (слика 27). Значајнији губици масе ЕПС детектовани су до ≈ 375 °C, али је мањег губитка масе било све до прекида загревања на 450 °C. Ово је показатељ вишестепене термичке деградације, што указује на хетерогеност структуре ЕПС. У првој фази разградње, при промени температуре између собне температуре и 44,0 °C, дошло је до мањег губитка масе од 3,7 %, највероватније услед губитка слободне, физички адсорбоване воде у ЕПС. Друга фаза разградње ЕПС је забележена између 44,0 °C и 83,2 °C, при чему је губитак масе био израженији, 17,5 %. Губитак масе у овој фази вероватно је повезана са издвајањем везане воде која гради водоничне везе са -OH групама моносахарида у ланцу ЕПС (Chowdhury и сар., 2011). Неутрални шећери од којих је састављен овај претежно аморфан ЕПС имају бројне OH групе које могу утицати на задржавање воде. Могуће присуство кристалних слободних моносахарида у ЕПС и малих кристалних области утичу на јаче везивање воде и њено ослобађање на вишим температурама. Даље, са порастом температуре између 83,2 °C до 175,6 °C, губитак масе је износио 15,2 % и у овој области се ослобађа остатак чвршће везане воде и вероватно започиње термичка деградација полисахаридног ланца. У опсегу температура од 175,6 °C до 375,3 °C губитак масе био је 16,7 %, што је вероватно последица деградације и раскидања C-C и C-O хемијских веза у структури прстена присутних шећера (Miao и сар., 2015). Разградња прстена може довести до стварања испарљивих једињења, CO, CO_2 и H_2O и последично до смањења масе у каснијим фазама термичке разградње. Ако се узме

у обзир претпоставка да се узорак ЕПС *L. reuteri* B2 састоји од два ЕПС различитих састава (ЕПС 1 и ЕПС 2), то би могло објаснити више степена разградње. ЕПС различитих састава и са различитим гликозидним везама започеће разградњу вероватно на различитим температурама. Док се ЕПС 1 (претпостављено) састоји само од хексоза међусобно везаних у дугим, правим ланцима, ЕПС 2 се (претпостављено) састоји од хексоза и 6-дезокси шећера (вероватно бочно везаног), који има једну -OH групу мање од хексоза, другачију термичку стабилност од хексоза и могуће је да се деградира на различитим температурама.



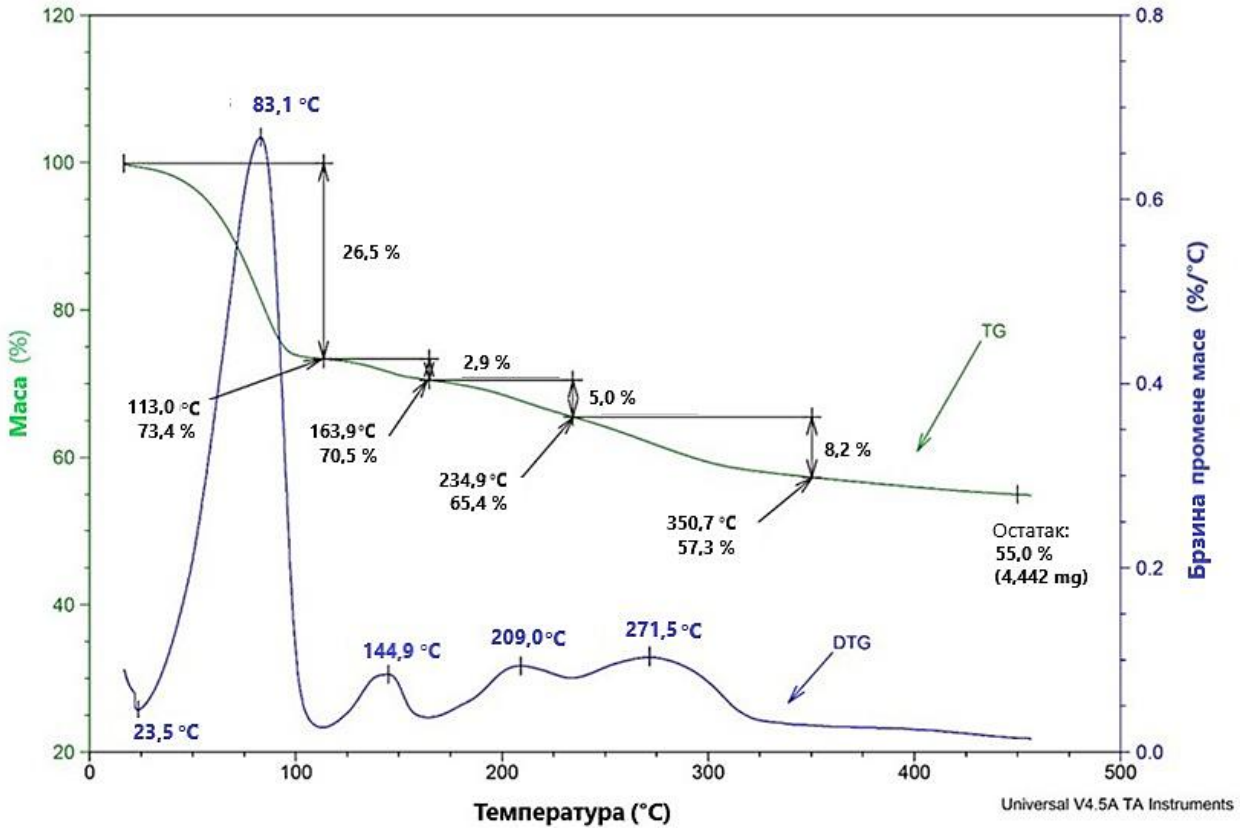
Слика 27: TGA и DTG криве ЕПС из *L. reuteri* B2

DTG крива је показала и деградацију ЕПС на 320,8 °C. Сличан резултат (319,3 °C) добијен је при анализи ЕПС из *Lactobacillus plantarum* HY, хетероЕПС претежно сачињеног од неутралних шећера и уронске киселине (Liu и сар., 2019), док је нижу температуру деградације (292,6 °C) имао декстран из соја *Lactobacillus reuteri* CK24.003, хомоЕПС састављен од неутралних шећера (Miao и сар., 2015). Ова температурна разлика могла би се објаснити молекуларном конфигурацијом ЕПС из *L. reuteri* B2 - састављен је вероватно од два ЕПС различитих састава, садржи само неутралне шећере, претежно је аморфан и флексибилан, док потенцијално присуство малих кристалних домена који стабилизују и укрућују делове ланца могу померити разградњу ка нешто вишим температурама. Исти

ефекат померања разградње ка нешто вишим температурама може имати и 6-дезокси шећер, бочно везан, у саставу једног од два ЕПС.

Маса чврстог остатка на око 450 °C била је 42,9 % од почетне масе узорка. Велики угљенични остатак (пепео) на око 450 °C вероватно потиче од стабилних ароматичних једињења формираних током процеса ароматизације и кондензације при загревању (Nomura и сар., 2021) и присуством делимично кристалних области и/или кристалних компоненти (слободни моносахариди). Ароматизација и кондензација се дешавају преко интермедијера фурфурала и 5-хидроксиметилфурфурала (5-HMF), који настају из редукујућих сахарида услед дехидратације (Nomura и сар., 2021). На температурама вишим од 450 °C, уколико би се наставило загревање до температура од 600 – 800 °C, дошло би до даље, вероватно спорије разградње остатка (Zhang и сар., 2021).

Губитак масе ЕПС из *K. oxytoca* J7 у термогравиметријској анализи приказан је на слици 28. Највећи губитак масе ЕПС, од 26,5 %, уочен је на почетку загревања, до температуре 113,0 °C. Губитак масе у овој фази приписује се губитку адсорбоване и везане воде и указује на значајну способност овог ЕПС да везује воду.



Слика 28: TGA и DTG криве ЕПС из *K. oxytoca* J7

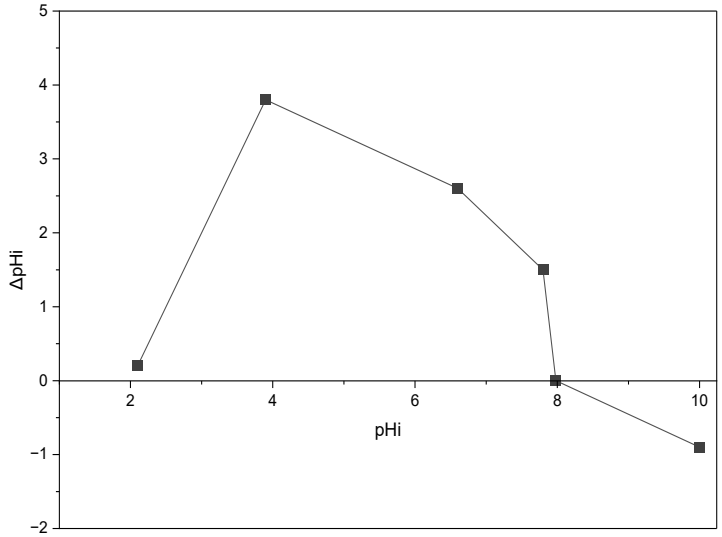
Заједно са неутралним шећерима, аминошећери и уронске киселине које се налазе у саставу ЕПС доприносе везивању воде грађењем водоничних веза преко -OH, -COOH и -NH_2 група. Осим тога, слике SEM анализе показале су високу порозност ЕПС *K. oxytoca* J7, што повећава специфичну површину за везивање молекула воде и олакшава дифузију молекула воде кроз поре ЕПС. Први детектован губитак масе биополимера, на 113,0 °C, је виши у поређењу са ЕПС ZW3 састављеног само од неутралних шећера, који је изолован из соја *Lactobacillus kefiranofaciens* ZW 3 (Ahmed и сар., 2013). У поређењу са ЕПС ZW3, ЕПС из *K. oxytoca* J7 садржи и уронске киселине и аминошећере, односно има више поларних и јонских група, и стога способност задржавања веће количине воде која се ослобађа на температурама до око 113,0°C. У фази загревања на температурама између 113,0 °C и 163,9 °C и између 163,9 °C и 234,9 °C уочени су мањи масени губици, од 2,9 % и 5,0 %, редом. Мањи губици масе на температурама нижим од температуре разградње полисахаридног ланца би могли да укажу на разградњу слабијих веза, рецимо деацетилацију N-ацетил групе аминошећера и почетак декарбоксилације уронских киселина (Benito-Román и сар., 2024; Corazzari и сар., 2015). Постепена и вишестепена разградња током загревања ЕПС може се дешавати због разгранате структуре ЕПС и слабијих веза у бочним ланцима, као и присуства више различитих моносахарида у саставу, који могу имати различите термичке стабилности. У температурном опсегу 234,9 °C до 350,7 °C губитак масе је износио 8,2 % и вероватно је последица термичке деградације ЕПС, при чему се формирају испарљива једињења CO, CO_2 и H_2O (Miao и сар., 2015). На DTG криви уочава се температура деградације на 271,5 °C, што је ниже у поређењу са ЕПС *L. reuteri* B2 (320,8 °C). Ово може бити објашњено структурним разликама - ЕПС из *K. oxytoca* J7 је вероватно мање термички стабилан због декарбоксилације и деаминације функционалних група које започињу на нижим температурама и због гранања основног ланца које се остварује слабијим везама које се брже раскидају, док ЕПС из *L. reuteri* B2 вероватно има линеарну структуру и јаче гликозидне везе међу моносахаридима, због чега деградација започиње на нешто вишим температурама.

На температури око 450,0 °C заостало је 55,0 % чврстог остатка, што указује да је више од половине садржаја (састојака) ЕПС овог соја стабилно на температурама до 450 °C. Исто као у случају ЕПС из *L. reuteri* B2, велики остатак на овој температури би могао да се припише ароматичним једињењима насталим током процеса загревања угљених хидрата, а која се потпуно разграђују на вишим температурама. Већи чврсти остатак него у случају ЕПС из *L. reuteri* B2 може се приписати потенцијално присутним солима у ЕПС *K. oxytoca* J7, које могу градити уронске киселине са катјонима из подлоге.

Приказани резултати показују да термичко понашање ЕПС варира у зависности од његове хомогености/хетерогености, моносахаридног састава, функционалних група, разгранатости ланца ЕПС и степена порозности (Ma и сар., 2018; Zamora и сар., 2002).

4.2.7 Одређивање тачке нултог наелектрисања ЕПС из *L. reuteri* B2 и *K. oxytoca* J7

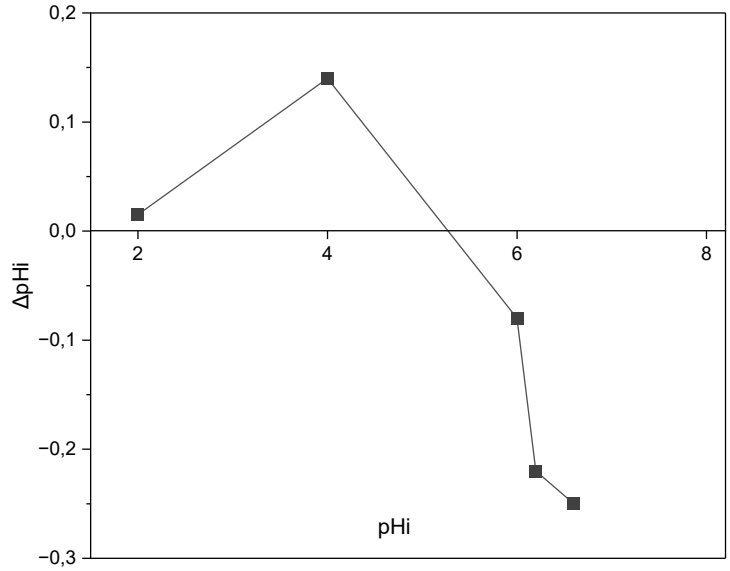
Вредности PZC испитиваних ЕПС одређене су из зависности ΔpHi од pH, као pH вредност при којој је ΔpHi = 0. PZC ЕПС из *L. reuteri* B2 (слика 29) износи 8,0. Вредност PZC блиска неутралној pH може да се објасни саставом ЕПС. Претпоставка је да се ЕПС из *L. reuteri* B2 (ЕПС1 и ЕПС2) састоји од неутралних шећера који немају јонизујуће киселе и базне групе које би значајно допринеле наелектрисању ЕПС, док се моносахаридне -OH^- групе, због високих вредности pKa, углавном депротонују при pH > 7. На pH > 8, изнад вредности PZC, површинско наелектрисање ЕПС из *L. reuteri* B2 је негативно, што је допринос делимично депротонованих -OH група. Стога је област pH вредности изнад 8 погодна за уклањање катјона.



Слика 29: Одређивање PZC ЕПС из *L. reuteri* B2

PZC вредност за ЕПС из соја *K. oxytoca* J7 одређена је на основу дијаграма приказаног на слици 30, и износи 5,2.

NH_2 групе N-ацетиламино хексоза у саставу ЕПС протонују се при pH вредностима нижим од pKa(NH_2), тј. на око 6-7 у полисахаридима (Ke и сар., 2021), и дају позитивно наелектрисање површини ЕПС. -COOH групе уронских киселина у саставу ЕПС депротонују се у ширем опсегу pH (pKa(COOH) ~ 3-4 (Nichols и сар., 2025) и дају негативно наелектрисање површини ЕПС. Оне вероватно имају доминантан допринос кумулативно негативном наелектрисању површине ЕПС и смањењу вредности PZC ЕПС из *K. oxytoca* J7 испод неутралног pH.



Слика 30: Одређивање PZC ЕПС из *K. oxytoca* J7

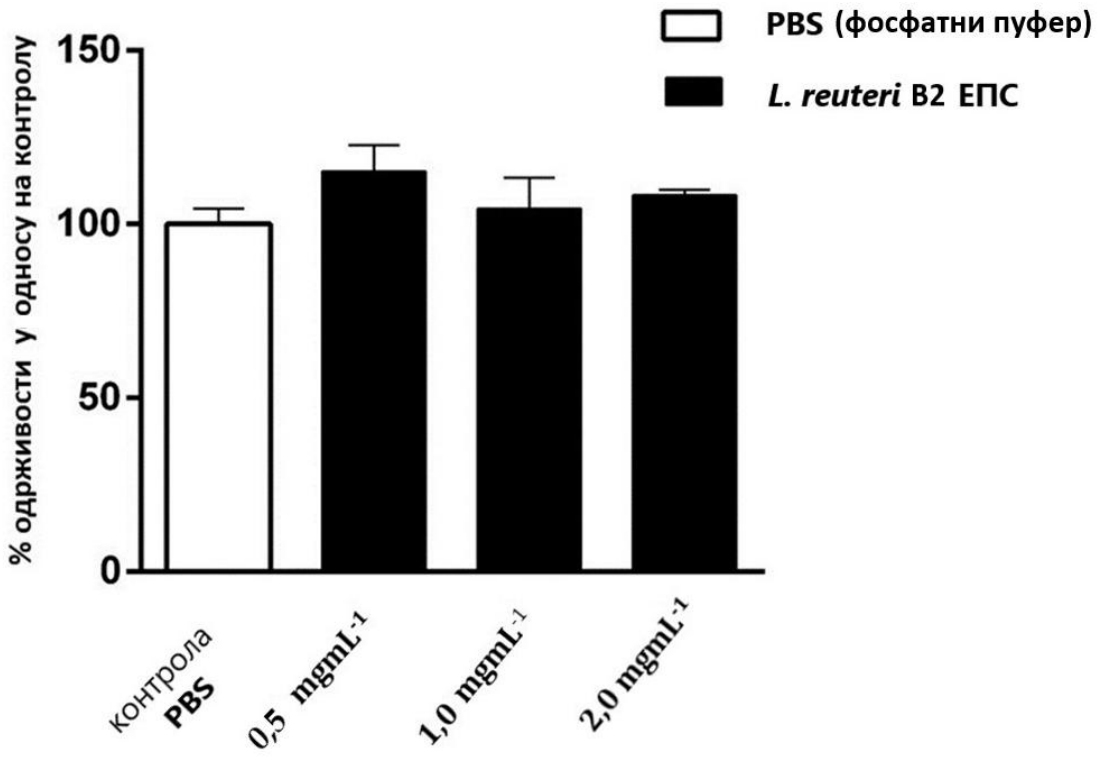
На вредностима pH вишим од вредности PZC површинско наелектрисање ЕПС је негативно, те је ова област pH вредности погодна за уклањање катјона.

4.3 Биолошка својства ЕПС из *L. reuteri* B2 и *K. oxytoca* J7

4.3.1 Цитотоксични ефекат ЕПС из *L. reuteri* B2 на ћелијску линију MRC-5

На слици 31 је приказана одрживост MRC-5 ћелијске линије (хумани фибробласти плућа) при третману различитим концентрацијама ЕПС из *L. reuteri* B2 (0,5, 1,0 и 2,0 $mgmL^{-1}$) током 24 h. Преживљавање ћелија инкубираних у физиолошком раствору пуферисаном фосфатним пуфером (PBS) током 24h је било референтно, 100 %. Према приказаним резултатима повећање концентрације ЕПС током 24 h третмана није довело до смањења преживљавања ћелија MRC-5 ћелијске линије. Напротив, запажено је благо повећање одрживости ћелија при све три концентрације ЕПС из *L. reuteri* B2 (~2-10%). Ови резултати указују да ЕПС у анализираним концентрацијама не показује цитотоксични ефекат према MRC-5 ћелијској линији и да може благо стимулисати метаболичку активност ћелија MRC-5, што је најизраженије при концентрацији ЕПС од 0,5 $mgmL^{-1}$. Претпоставка је да повећана метаболичка активност настаје зато што живе ћелије користе моносахаридне јединице ЕПС као извор шећера (угљеника) и зато што ЕПС може деловати заштитно према испитиваним ћелијама, стварајући заштитину баријеру и матрицу за задржавање воде и јона. Добијени резултати су у складу са подацима из литературе, према којима ЕПС изоловани из различитих сојева бактеријске врсте *Lactobacillus* показују сличан ефекат на различите нетуморске ћелијске линије. У

претходним истраживањима (El-Deeb и сар., 2018) ЕПС из *L. acidophils* DSMZ 20079 није показао цитотоксичност према MRC-5 ћелијској линији чак ни при концентрацијама већим од 2 $mgmL^{-1}$. Различите концентрације ЕПС из *L. paraplantarum* KM1 (0 – 0,5 $mgmL^{-1}$) у истраживању Sharma и сарадника (Sharma и сар., 2020) нису показале цитотоксични ефекат на ћелијску линију HEp-2C током 24 h. ЕПС из *L. casei* WXD030 у опсегу концентрација 0,05 – 0,8 $mgmL^{-1}$ није утицао на вијабилност туморске линије мишјих макрофага RAW264.7, а довео је до пораста њихове фагоцитне активности, што је указало да ЕПС није цитотоксичан и да може благо стимулисати имунски одговор.

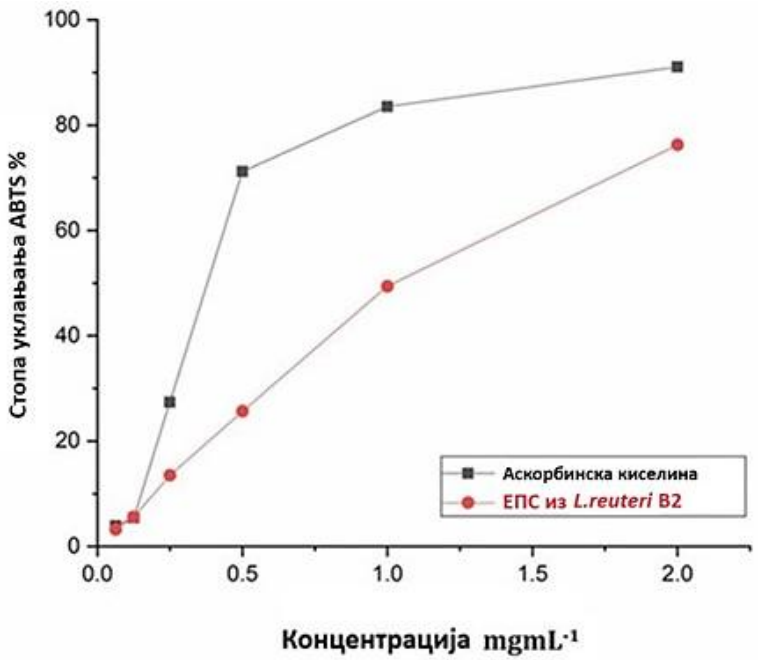


Слика 31: Одрживост ћелијске линије нормалних хуманих фибробласта плућа MRC-5 током 24 h инкубације у присуству ЕПС из *L. reuteri* B2 (0,5; 1,0 и 2,0 $mgmL^{-1}$)

4.3.2 Антиоксидативна својства ЕПС из *L. reuteri* B2

Анализа антиоксидативне активности ЕПС из *L. reuteri* B2 приказана је на слици 32, где је аскорбинска киселина, познати антиоксиданс, коришћена као референтни стандард. Резултати су показали да је антиоксидативна активност ЕПС, као и аскорбинске киселине, била зависна од концентрације. Способност ЕПС из *L. reuteri* B2 да неутралише слободне радикале ABTS+ пропорционално је расла са повећањем концентрације ЕПС. Најинтензивнија неутрализација слободних радикала, 76 %, била је при концентрацији од 2,0 $mgmL^{-1}$ ЕПС и била је нижа у поређењу са неутрализацијом са аскорбинском киселином (91 %) при истој концентрацији. Аскорбинска киселина је

показала двоструко већу стопу уклањања слободних радикала у поређењу са ЕПС из *L. reuteri* B2 при концентрацији 0,25 mgmL-1, а троструко већу при концентрацији 0,5mgmL^{-1}. Са повећањем концентрације ЕПС на око 1,0 mgmL^{-1} уклањено је 40-45% слободних радикала, а при највећој концентрацији (2,0 mgmL^{-1}) 75% слободних радикала је неутралисано. Аскорбинска киселина има бржи раст ове стопе са нижим концентрацијама од 1,0 mgmL^{-1}, након чега долази до стабилизације антиоксидативне активности, вероватно због ограничене количине доступних радикала. Са даљим повећањем концентрације брже расте стопа уклањања код ЕПС и не показује тенденцију засићења, али остаје нижа од аскорбинске киселине у целокупном испитаном опсегу концентрација.

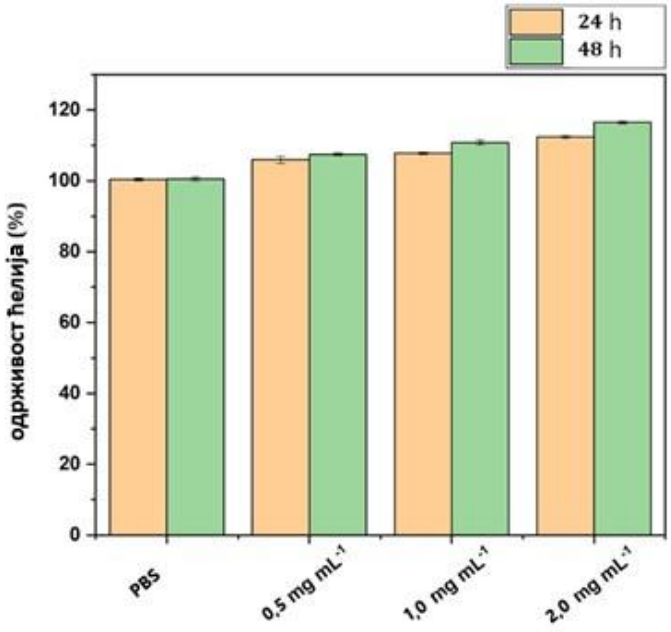


Слика 32: Антиоксидативна активност ЕПС добијеног из *L. reuteri* B2 у поређењу са аскорбинском киселином

Способност ЕПС *L. reuteri* B2 да неутралише ABTS^{+} радикалеје слабија у поређењу са аскорбинском киселином и ЕПС *L. fermentum* (93,6%, при концентрацији 1,0 mgmL^{-1})(Han и сар., 2025), али упореива са ефикасношћу *L. plantarum* WLPL04 (76%, при 2,0 mgmL^{-1}) (Liu и сар., 2017). Сходно томе, ови резултати су показали да ЕПС има солидну способност неутрализације слободних радикала ABTS^{+} и да би могао да се истражи као природна алтернатива за комерцијалне синтетске антиоксидансе, с обзиром да у тестираном концентрационом опсегу није испољавао цитотоксични ефекат на MRC-5 ћелијској линији.

4.3.3 Цитотоксични ефекат ЕПС из *K. oxytoca* J7 на ћелијску линију MRC-5

Утицај ЕПС из *K. oxytoca* J7 на одрживост ћелија је процењена MTT тестом на ћелијској линији нормалних хуманих фибробласта плућа MRC-5 (слика 33).



Слика 33: Одрживост ћелијске линије нормалних хуманих фибробласта плућа MRC-5 у присуству ЕПС из *K. oxytoca* J7 током 24 h и 48 h

ЕПС из *K. oxytoca* J7 је тестиран у три концентрације (0,5; 1,0 и 2,0 $mgmL^{-1}$). Преживљавање ћелија инкубираних у физиолошком раствору пуферисаном фосфатним пуфером (PBS) током одговарајућег периода (24 h и 48 h) је било референтно, 100 %. У поређењу са контролом, вијабилност ћелија третираних било којом од три наведене концентрације ЕПС током 24 h и 48 h је била већа за ~5-15%. Ови резултати указују да ЕПС из *K. oxytoca* J7 не показује цитотоксичност према ћелијама људских фибробласта MRC-5 у наведеном опсегу концентрација током 24 h и 48 h и да може благо стимулисати метаболичку активност MRC-5 ћелија у поменутим условима. ЕПС *K. oxytoca* J7 се може сматрати биокомпатибилним, што је у складу са истраживањем Kianopour (Kianpour и сар., 2017), где је ЕПС из *K. oxytoca* BAS-10 везан са Fe^{3+} јонима, Fe-ЕПС, такође био нетоксичан и биокомпатибилан, при концентрацијама у опсегу 0,001 – 4,0 $mgmL^{-1}$. ЕПС из патогеног бактеријског соја је нежив биоматеријал који је у првим фазама пречишћавања одвојен од ћелија бактерија и сам по себи не поседује патогени потенцијал. Међутим, потенцијална нетоксичност и биокомпатибилност ЕПС у овом

истраживању утврђена је само на једној ћелијској линији и било би неопходно спровести даља *in vivo* и *in vitro* испитивања која би потврдила могућност сигурне примене ових биоматеријала.

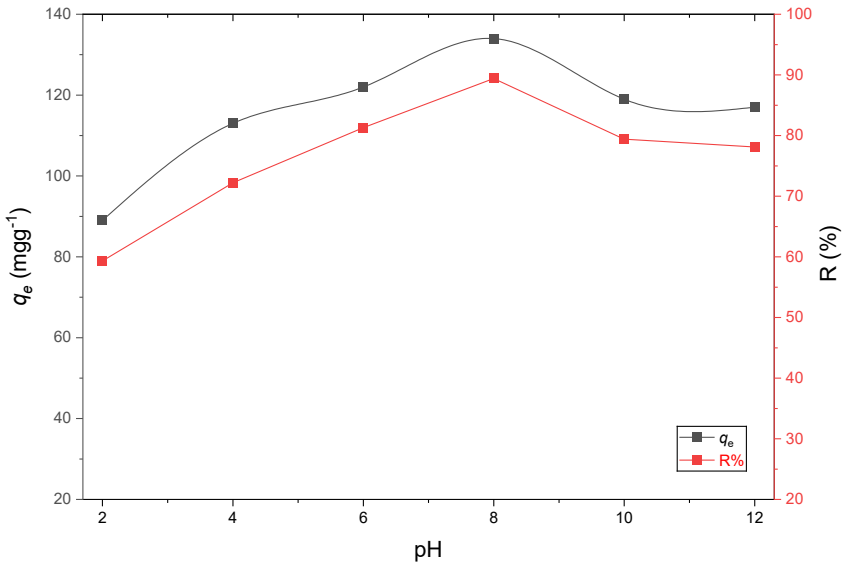
4.4 Биосорпциона студија

ЕПС из *L. reuteri* B2 и *K. oxytoca* J7 одликује висока порозност, присуство функционалних група типичних за полисахариде, добра термичка стабилност и нетоксичност према ћелијској линији MRC-5, због чега представљају потенцијални материјал за адсорпцију тешких метала из водених раствора.

4.4.1 Адсорпција Ni^{2+} из водених раствора на ЕПС из *L. reuteri* B2

4.4.1.1 Ефекат pH

Утицај pH вредности на адсорпцију Ni^{2+} јона на ЕПС из *L. reuteri* B2 приказан је на слици 34.

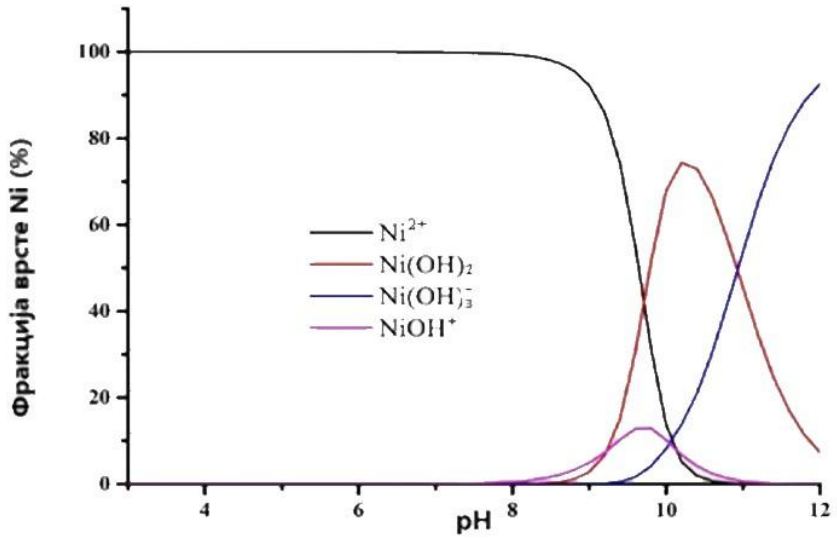


Слика 34: Зависност адсорпционог капацитета и ефикасности уклањања Ni^{2+} јона помоћу ЕПС из *L. reuteri* B2 од pH вредности (температура 25 °C, C_i(Ni)=10 mgL^{-1}, концентрација ЕПС 65 mgL^{-1}, време контакта 60 минута)

Значајно смањење концентрације јона Ni^{2+} у воденом раствору је запажено са повећањем pH, а максимум адсорпције је достигнут при pH 8,0, где је вредност максималног капацитета адсорпције износила 135,5 mgg^{-1}. Слично се мењала и вредност ефикасности уклањања, од 59 % при pH≈2,0 до максимума од 89,4 % на pH≈8,0, након

чега је запажен смањен проценат уклањања јона Ni^{2+}. Након достизања максимума адсорпције на pH 8,0, са даљим повећањем pH вредност адсорпционог капацитета је опадала. При pH вредностима вишим од 8,0, због веће концентрације OH^- јона, Ni^{2+} јони граде хидриксилне јонске врсте $Ni(OH)^+$ и $Ni(OH)^-_3$, као и једињење $Ni(OH)_2$ (Öztürk и сар., 2004) у виду талога (слика 36). Вероватно до смањења адсорпционог капацитета долази зато што је наелектрисање површине ЕПС кумулативно негативно, а у раствору настају доминантно негативно наелектрисани $Ni(OH)^-_3$ јони, што онемогућава електрокстатичке интеракције.

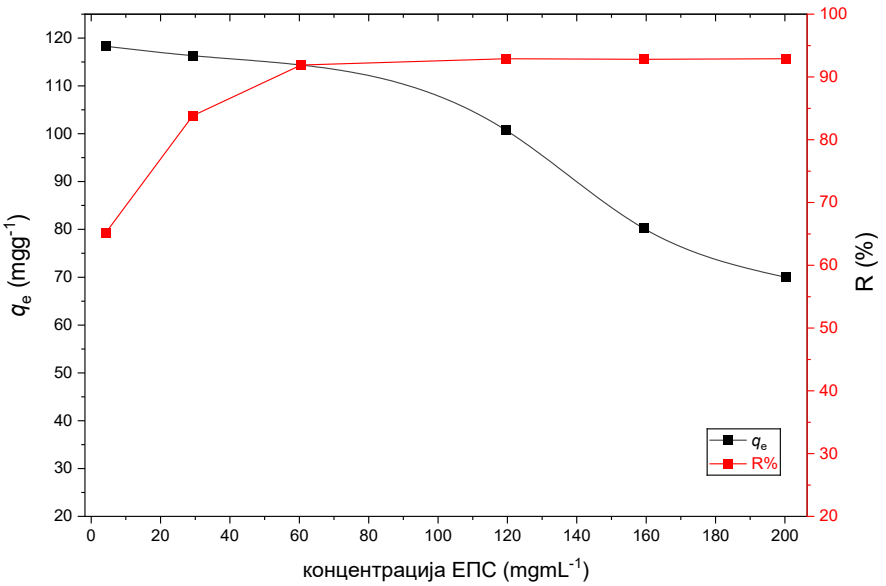
Настанак хидроксилних врста јона никла је важан параметар при избору радне pH за даље експерименте биосорпције. Други битан параметар при избору радне pH јесте вредност PZC, која за ЕПС из *L. reuteri* B2 износи 8,0. На pH > PZC вредности је ЕПС *L. reuteri* B2 негативно наелектрисана и погодује интеракцији са позитивним јонима никла (Ni^{2+}). Како је вредност PZC ЕПС *L. reuteri* B2 веома блиска pH вредностима раствора на којима долази до грађења јонских врста никла $Ni(OH)^+$, $Ni(OH)^-_3$ и једињења $Ni(OH)_2$ који могу утицати на резултат адсорпције, компромисно су сви експерименти адсорпције Ni^{2+} јона на ЕПС из *L. reuteri* B2 извођени на pH 8,0.



Слика 35: Расподела врста јона Ni у зависности од pH одређена коришћењем софтвера MINTEQ 3.0 (температура 25 °C, C_i(Ni)= 10 mgL^{-1} (Fang и сар., 2015))

4.4.1.2 Ефекат концентрације ЕПС

Резултати приказани на слици 36 показују да са повећањем концентрације ЕПС *L. reuteri* B2 од 10 до 200 mgL^{-1}, адсорпциони капацитет ЕПС опада, односно долази до смањења адсорпционог капацитета, од 117,2 mgg^{-1}до 71,0 mgg^{-1} за Ni^{2+} јоне.

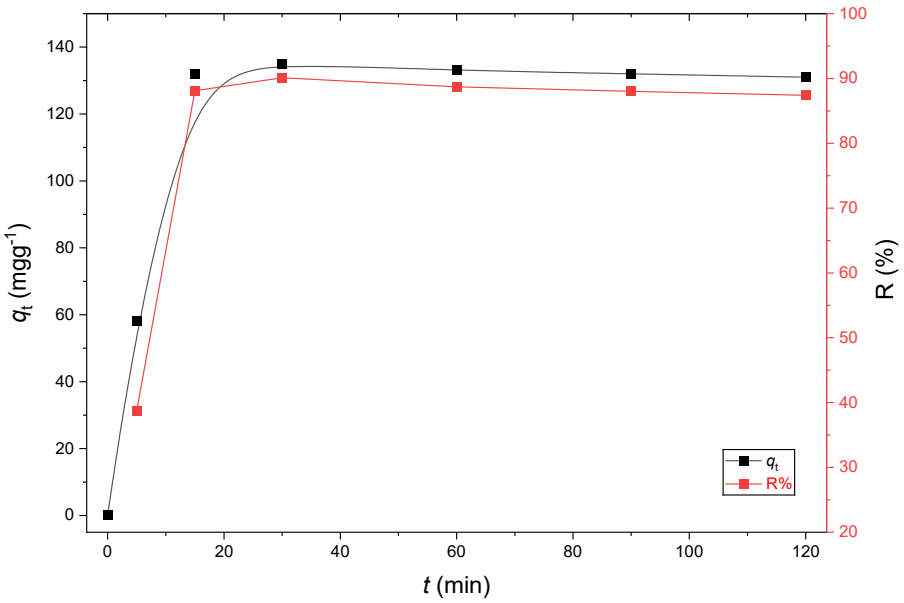


Слика 36: Зависност адсорпционог капацитета и ефикасности уклањања Ni^{2+} јона помоћу ЕПС из *L. reuteri* B2 од концентрација ЕПС (pH = 8,0, температура 25 °C, C_i(Ni)=10 mgL^{-1}, време контакта 60 минута)

Дакле, адсорпциони капацитет ЕПС из *L. reuteri* B2 за јоне Ni^{2+} већи је при мањим концентрацијама ЕПС него при већим концентрацијама. Слично, ефикасност уклањања метала са ЕПС *L. reuteri* B2 се најпре повећавала са повећањем концентрације ЕПС (активних места) и износила је 92,9 % при дози ЕПС од 65 mgL^{-1}. Даљим повећањем концентрације ЕПС, ефикасност уклањања јона метала се није мењала, због могућег засићења доступних места за везивање јона Ni^{2+}. Могуће је да при већим концентрацијама ЕПС долази до агрегације ланаца ЕПС (ланци два ЕПС) путем нековалентних интеракција због чега се ефективна површина ЕПС смањује и део функционалних група ЕПС постаје скривен и неприступачан за јоне Ni^{2+}. Такође, са повећањем масе ЕПС одређена количина јона никла се распоређује на све већу масу ЕПС, те је по јединици масе ЕПС све мања количина адсорбованих јона никла, односно, капацитет адсорпције је све мањи.

4.4.1.3 Ефекат времена контакта

Резултати утицаја времена контакта на процес адсорпције су приказани на слици 37.



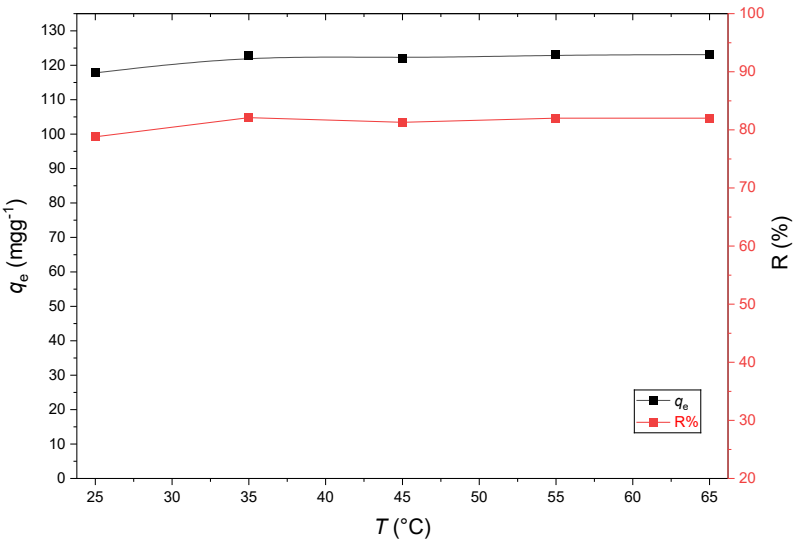
Слика 37: Зависност адсорпционог капацитета и ефикасности уклањања Ni^{2+} јона помоћу ЕПС из *L. reuteri* B2 од времена контакта (pH = 8,0, температура 25 °C, C_i(Ni)=10 mgL^{-1}, концентрација ЕПС 65 mgL^{-1})

На слици 37 се види да је максималан капацитет адсорпције ЕПС постигнут веома брзо. 40 % максималног капацитета уклањања Ni^{2+} јона постигнуто је након 5 минута експеримента. Капацитет адсорпције се брзо повећавао са повећањем контактног времена (за следећих 10 минута), а након 30 минута је достигнута равнотежа. У овом тренутку, капацитет адсорпције (q_{max}) ЕПС из *L. reuteri* B2 је износио 132,74 mgg^{-1}. Важно је напоменути и да је више од 90 % уклањања Ni^{2+} јона постигнуто у првих 15 минута експеримента. Из овога се може закључити да је овај биополимер имао изузетно високу брзину адсорпције, при чему се у раној фази (0-15 минута) адсорпциони капацитет брзо повећавао са повећањем времена контакта. На почетку адсорпције сва активна места на површини ЕПС су доступна за јоне Ni^{2+} због чега је адсорпциони капацитет у сталном порасту. Након што се попуни већина активних места достиже се равнотежа јона у раствору и јона везаних на површини ЕПС. Слични резултати су добијени у раду Dobrowolski и сарадника (Dobrowolski и сар., 2017), где је адсорпциона равнотежа за Ni^{2+} јоне на ЕПС добијеним из *Rhodococcus rhodochorus* и *Rhodococcus opacus* достигнута у првих 15 минута. Исто тако, у претходном истраживању Wei и сарадника (Wei и сар., 2016) показано је се да се у раном периоду контакта адсорпција метала брзо одиграва, због већег броја места везивања на површини адсорбента. За ЕПС састављен само од

неутралних шећера се не би очекивала висока ефикасност везивања јона метала, зато што овакви ЕПС имају мали број функционалних група (само -OH групе моносахарида) за везивање јона. SEM анализом је утврђено да је ЕПС из *L. reuteri* B2 порозан и да су поре ситније, што може да резултује повећањем специфичне површине ЕПС и да погодује дифузији јона са малим јонским радијусом кроз поре ЕПС. Са друге стране, ако се узме у обзир хидратациони радијус јона који је у случају јона Ni^{2+} вишеструко већи од његовог јонског радијуса, то може бити и ограничавајући фактор. Добра ефикасност уклањања Ni^{2+} јона у овом случају је вероватно резултат и структуре ЕПС и оптималног односа концентрација ЕПС и јона метала у раствору, због чега је довољно доступних активних места на површини ЕПС за везивање већине јона Ni^{2+} из воденог раствора. Време потребно за успостављање равнотеже је значајан параметар у индустрији јер што је адсорпција бржа процес ће бити економичнији.

4.4.1.4 Ефекат температуре

Утицај температуре на уклањање Ni^{2+} јона помоћу ЕПС из *L. reuteri* B2 истражен је у опсегу између 25 °C и 65 °C, и графички приказан на слици 38.



Слика 38: Зависност адсорпционог капацитета и ефикасности уклањања Ni^{2+} јона помоћу ЕПС из *L. reuteri* B2 од температуре (pH = 8,0, C_i(Ni)=10 mgL^{-1}, концентрација ЕПС 65 mgL^{-1}, време контакта 60 минута)

Са слике 38 се може закључити да у анализираном опсегу температура има веома мали утицај на ефикасност адсорпције. Минимално повећање капацитета адсорпције и ефикасности уклањања Ni^{2+} јона запажено је на 35 °C, док је са даљим повећањем температуре капацитет био непромењен, исто као и ефикасност уклањања. У литератури је показано да се на температурама вишим од 35 °C повећава површинска

активност биополимера, што може утицати на ефикасност процеса адсорпције (Huang и сар., 2022). Више температуре доводе до повећања флексибилности полисахаридног ланца, смањења вискозности ЕПС и смањења површинског напона раствора, што може условити већу покретљивост и бољу дифузију јона Ni^{2+} кроз поре ЕПС (Concórdio-Reis и сар., 2020). ЕПС састављен искључиво од неутралних шећера је релативно стабилан у испитиваном опсегу температура и повећање температуре не утиче значајно на доступност активних места на површини ЕПС за јоне Ni^{2+}.

4.4.1.5 Кинетичка студија за адсорпцију Ni^{2+} јона на ЕПС из *L. reuteri* B2

Кинетика адсорпције може пружити значајне информације о ефикасности адсорпције, о могућем механизму адсорпције, о времену успостављања адсорпционе равнотеже и о брзинама свих корака процеса адсорпције: (1) спољног преноса масе адсорбата до спољне површине адсорбента, (2) спољног преноса масе кроз гранични слој који окружује површину биосорбента, (3) унутарчестичне дифузије и (4) интеракције са функционалним групама (активним местима) на површини биосорбента (Park и сар., 2010). Разумевање механизма адсорпције значајно је због оптимизације процеса и разматрања услова за оптимално искоришћење биосорбента у индустријским размерама. За истраживање процеса адсорпције Ni^{2+} јона из воденог раствора са ЕПС из соја *L. reuteri* B2 коришћени су модел псеудо-првог реда и модел псеудо-другог реда, као и модел унутарчестичне дифузије.

Модел псеудо-првог реда (Lagergren, 1898) указује да у основи механизма адсорпције лежи дифузија до површине адсорбента и заузимање слободних активних места на површини адсорбента, што је типично за физисорпцију. Описује се линеарном једначином (6) (Wang и сар., 2022):

$$log\ (q_e - q_t) = logq_e - \frac{K1 \cdot t}{2{,}303} \qquad (6)$$

Модел псеудо-другог реда (Ho и сар., 1999) предлаже хемисорпцију као механизам адсорпције, зато што је у основи механизма интеракција адсорбата са функционалним групама адсорбента (Ghiorghita и сар., 2022). У линеарном облику модел се описује једначином (7) (Wang и сар., 2022):

$$\frac{t}{qt} = \frac{1}{K2 \cdot qe2} + \frac{t}{qe} \qquad (7)$$

где су:

q_t – количина адсорбата везана по јединици масе адсорбента у времену t (mgg^{-1});

q_e - количина адсорбата везана по јединици масе адсорбента у равнотежи (mgg^{-1});

K_1 – константа брзине модела псеудо првог реда ($g \cdot (mg \cdot min)^{-1}$),

K_2 – константа брзине модела псеудо другог реда ($g \cdot (mg \cdot min)^{-1}$).

Weber-Morris-ов модел унутарчестичне дифузије се користи за боље разумевање процеса адсорпције и приближније одређивање механизма адсорпције. Применом овог модела испитује се колики утицај унутарчестична дифузија и дифузија кроз гранични слој имају на укупну брзину процеса адсорпције, с обзиром да ова два процеса, као најспорија, најчешће ограничавају укупну брзину процеса адсорпције. Модел се описује једначином (8) (Wang и сар., 2022):

$$q = k_{id}\sqrt{t} + C_0 \qquad (8)$$

где су:

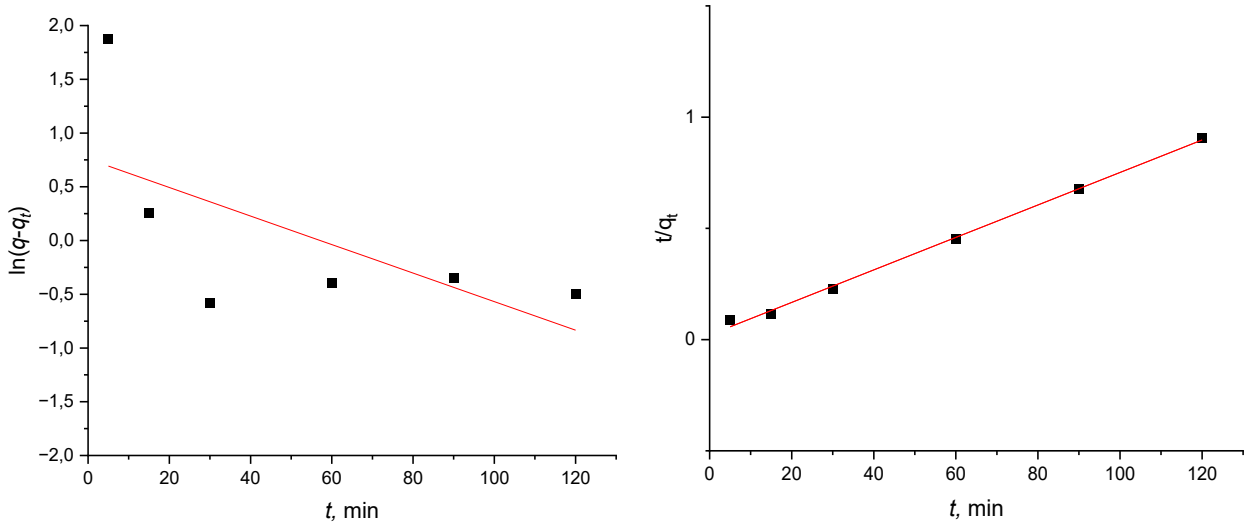
q_t - количина адсорбата адсорбованог по јединици масе адсорбента у тренутку t (mgg^{-1}),

k_{id} – константа брзине унутарчестичне дифузије (min^{-1}),

C_0 – константа чија вредност указује на дебљину граничног слоја.

Ако је зависност q_t-$t^{0,5}$ линеарна и пролази кроз координатни почетак унутарчестична дифузија је једини корак који одређује брзину процеса адсорпције. У случају да је график вишестепен и не пролази кроз координатни почетак ($C_0 \neq 0$) на укупну брзину адсорпције утиче и спољна дифузија, односно дебљина граничног слоја.

На слици 39 (а и б) приказани су дијаграми фитованих експерименталних података кинетичким моделима псеудо-првог и псеудо-другог реда.



а) б)

Слика 39: Кинетички модели: а) псеудо-првог реда и б) псеудо-другог реда за адсорпцију Ni^{2+} јона помоћу ЕПС из *L. reuteri* B2

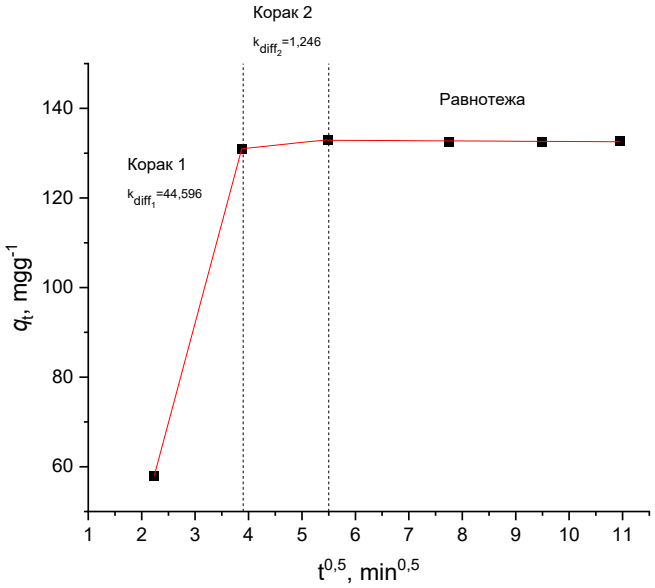
Из добијених дијаграма псеудо-првог и псеудо-другог реда очитани су кинетички параметри, капацитети адсорпције q_e (cal) и константе брзине адсорпције K_1 и K_2. Вредности кинетичких параметара приказани су у табели 6.

Табела 6. Кинетички параметри за адсорпцију Ni^{2+} јона помоћу ЕПС из *L. reuteri* B2 (C_i(Ni)=10 mgL^{-1}, температура 25 °C)

Кинетика	**Параметри**	**Вредности**
Псеудо-први ред	q_e (cal)(mgg^{-1})	2,14
	K_1 ($Lmin^{-1}$)	0,0133
	R^2	0,6361
Псеудо-други ред	q_e (cal) (mgg^{-1})	136,98
	K_2 ($Lmin^{-1}$)	0,0026
	R^2	0,9987

Из добијених вредности параметара R^2 може се закључити да модел псеудо-првог реда не може добро да фитује експерименталне податке добијене за адсорпцију јона Ni^{2+} на ЕПС из *L. reuteri* B2 (R^2=0,6361), док модел псеудо-другог реда показује да се кинетика адсорпције боље уклапа у овај модел (R^2=0,9987). Добијени резултати сугеришу да је брзина адсорпције ограничена интеракцијом јона Ni^{2+} са функционалним групама на површини ЕПС, што се повезује са процесом хемисорпције. Вредности израчунатог капацитета q_e (cal) и експерименталног q_{max} су приближне, што показује да модел добро предвиђа попуњеност активних места на површини ЕПС.

На слици 40 приказан је дијаграм зависности q_t-$t^{0,5}$ за адсорпцију Ni^{2+} јона на ЕПС из *L.reuteri* B2. Из дијаграма се може видети да унутарчестична дифузија није једини корак адсорпције који ограничава укупну брзину процеса, већ на брзину адсорпције утиче и дифузија у граничном слоју. Дијаграм показује три линеарне области, што указује да се процес адсорпције одвија у три фазе/корака. Дебљина граничног слоја (C_0) одређена је одсечком фитоване криве на у-оси, док је константа брзине дифузије (k_{dff}) одређена нагибом праве добијене линеарним фитовањем, у свакој области. Први корак адсорпције (5-15 минута) је најбржи - константа брзине дифузије тј. нагиб праве, односно има највећу вредност у поређењу са наредна два корака адсорпције. Овај корак адсорпције се односи на спољну дифузију, односно на транспорт Ni^{2+} јона из раствора до граничног слоја. Одсечак на у-оси има малу вредност, односно дебљина граничног слоја нема значајан утицај у овом кораку и процес се одвија брзо.



Слика 40: Модел унутарчестичне дифузије (Weber-Morris-ов модел) примењен на адсорпцију јона Ni^{2+} помоћу ЕПС из *L. reuteri* B2

Други корак адсорпције (15-30 минута) је спорији, права у овој линеарној области има мањи нагиб (константа брзине дифузије има нижу вредност) и овај корак се односи на дифузију Ni^{2+} јона унутар пора. Након овог времена (након 30 минута) долази до дифузије Ni^{2+} јона кроз ситније поре и најзад, до успостављања адсорпционе равнотеже. Може се рећи да је динамичка равнотежа успостављена већ после 30 минута. Дакле, иако дифузија кроз поре у овом случају није једини корак који ограничава укупну брзину процеса адсорпције, најспорији је корак и стога, доминантно утиче на брзину процеса адсорпције јона Ni^{2+} на ЕПС из *L. reuteri* B2.

4.4.1.6 Одређивање адсорпционих изотерми за адсорпцију Ni^{2+} јона са ЕПС из *L. reuteri* B2

Адсорпционе изотерме су криве зависности адсорбованог адсорбата на адсорбенту и концентрације адсорбата у раствору, у равнотежним условима, при константној температури. Изотерме се користе за описивање капацитета биосорбента, за поређење адсорпционих капацитета различитих биосорбента и за поређење адсорпције различитих супстанци истим биосорбентом (Gadd и сар., 2009). Изотерме могу указати на својства површине биосорбента и афинитет биосорбента према адсорбату. Најчешће коришћени математички модели за описивање равнотеже адсорпционог процеса су двопараметарски модели, Фројндлихов и Ленгмиров модел, који се користе само при константним pH вредностима.

Ленгмиров математички модел је заснован на претпоставци да сва места на површини адсорбента поседују једнак афинитет према адсорбату, односно да је површина адсорбента енергетски униформна. Свако активно место специфично везује само један јон/молекул и нема интеракције између адсорбованих јона/молекула на површини, због чега је адсорпција монослојна. Модел се описује једначином (9) (Wang и сар., 2022):

$$q_e = \frac{qmax \cdot KL \cdot Ce}{1+KL \cdot Ce} \quad (9)$$

где су:

q_{max} – максимални адсорпциони капацитет (mgg^{-1});

q_e – равнотежни капацитет адсорпције (mgg^{-1});

C_e - равнотежна концентрација (mgL^{-1});

K_L- Ленгмирова адсорпциона константа (Lmg^{-1}).

Из дијаграма зависности равнотежног адсорпционог капацитета и равнотежне концентрације (q_e – C_e) очитавају се вредности параметара Ленгмировог модела, q_{max} и K_L.

Фројндлихов математички модел описује адсорпцију на неуниформном биосорбенту, односно везивање јона/молекула за активна места на површини адсорбента чији су афинитети према адсорбату различити. Између адсорбованих јона/молекула могу се остварити интеракције, због чега адсорпција може бити и вишеслојна. Описује се једначином (10) (Wang и сар., 2022):

$$q_e = K_f \cdot Ce^{1/n} \quad (10)$$

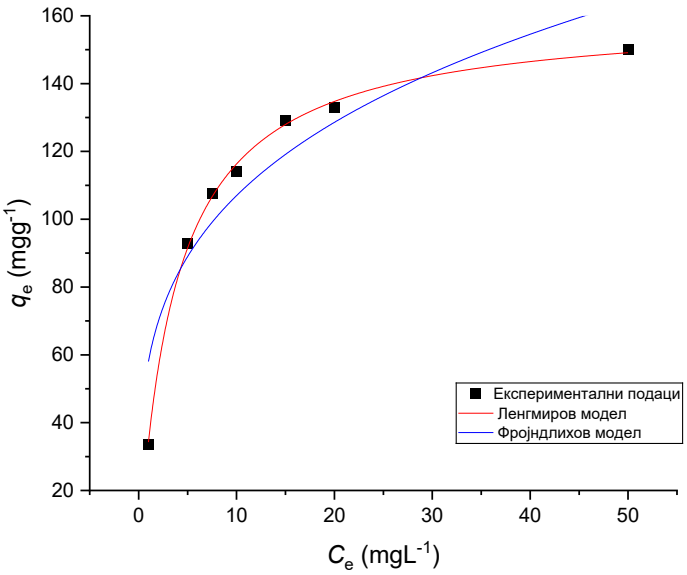
где су:

K_f – Фројндлихова константа адсорпционог капацитета (mgg^{-1});

n – Фројндлихова константа интензитета адсорпције.

Вредности параметара Фројндлиховог модела очитавају се са дијаграма зависности q_e-C_e.

На слици 41 приказани су експериментални резултати и Ленгмиров и Фројндлихов модел изотерме за адсорпцију јона Ni^{2+} помоћу ЕПС из *L. reuteri* B2 при датим условима.



Слика 41: Експериментални резултати и Ленгмиров и Фројндлихов модел изотерме за адсорпцију јона Ni^{2+} помоћу ЕПС из *L. reuteri* B2 (температура 25 °C, pH 8,00, C_i(Ni) = 10 mgL^{-1}, концентрација ЕПС 65 mgL^{-1}, време контакта 60 минута)

Вредности параметара очитаних графички из изотермних модела приказане су у табели 7.

Табела 7. Параметри Ленгмировог и Фројндлиховог модела изотерме за адсорпцију Ni^{2+} јона помоћу ЕПС из *L. reuteri* B2

Изотермни модели	**Параметри**	**Вредности**
Ленгмиров модел адсорпционе изотерме	q_{max} (mgg^{-1})	161,0
	K_L	0,270
	R^2	0,998
Фројндлихов модел адсорпционе изотерме	K_f	58,0
	n	3,76
	R^2	0,879

Вредности корелационих коефицијената (R^2) добијене фитовањем су показале да Ленгмиров модел (R^2=0,998) боље одговара експерименталним подацима него Фројндлихов модел (R^2=0,879). Боље слагање резултата са Ленгмировим моделом указује

да је адсорпција на ЕПС из *L. reuteri* B2 монослојна и да се Ni^{2+} јони адсорбују на униформној површини (Petrović и сар., 2017), где су сва активна места исте енергије. ЕПС из *L. reuteri* B2 састављен је само од неутралних шећера, нема јаких јонизационих група већ се адсорпција Ni^{2+} јона одвија специфичном интеракцијом са -OH групама моносахарида, водоничним везама или другим слабим интеракцијама. OH групе ЕПС се разликују по позицији у молекулу и оријентацији у простору, али су хемијски веома сличне и имају приближно исте способности координације јона Ni^{2+}. Из тог разлога свака -OH група може специфично везивати само један јон Ni^{2+} и формирати монослој на површини ЕПС, што потврђује боље уклапање експерименталних података у Ленгмиров модел. У биосорпционој анализи Lakzian и сарадника (Lakzian и сар., 2008) Ленгмиров модел је такође добро фитовао експерименталне податке адсорпције јона Ni^{2+} на ЕПС из *Ensifer meliloti* MS-125 и указао на монослојну адсорпцију.

4.4.1.7 Термодинамичка студија за адсорпцију Ni^{2+} јона са ЕПС из *L. reuteri* B2

При константној температури и притиску, вредност промене Гибсове енергије ΔG^{Θ} је основни критеријум спонтаности процеса адсорпције. Ако је вредност $\Delta G^{\Theta}<0$, онда се адсорпција спонтано дешава. Конверзијом (једначина (11)) Ленгмирових константи K_L одређених из Ленгмирових адсорпционих изотерми на три различите температуре, добијене су бездимензионе равнотежне константе K_D (Liu и сар., 2009) из којих су израчунате вредности термодинамичких параметара ΔG^{Θ}, ΔH^{Θ} и ΔS^{Θ} према изразима (12), (13) и (14):

$$K_D = K_L \cdot C^{\Theta} \tag{11}$$

$$\Delta G^{\Theta} = -RT\ln K_D \tag{12}$$

$$\Delta G^{\Theta} = \Delta H^{\Theta} - T\,\Delta S \tag{13}$$

$$\ln K_D = -\Delta H^{\Theta}/RT + \Delta S^{\Theta}/R \tag{14}$$

где су:

K_D – бездимензиона константа термодинамичке равнотеже,

K_L - Ленгмирова адсорпциона константа (Lmg^{-1}),

C^{Θ} – стандардна концентрација за адсорпцију из воденог раствора ($C^{\Theta} = 1000\ mgL^{-1}$),

ΔG^{Θ} - стандардна промена слободне Гибсове енергије (KJmol^{-1}),

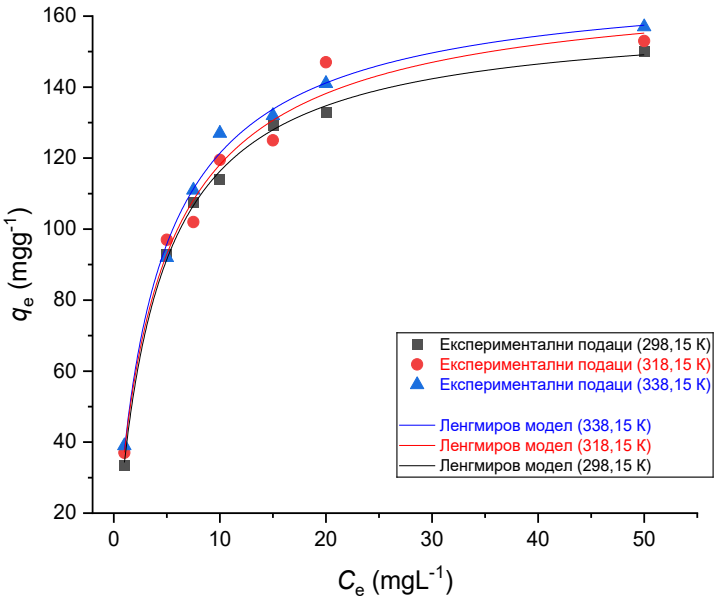
ΔH^{Θ} - стандардна промена енталпије (KJmol^{-1}),

ΔS^{Θ} - стандардна промена ентропије (Jmol^{-1}),

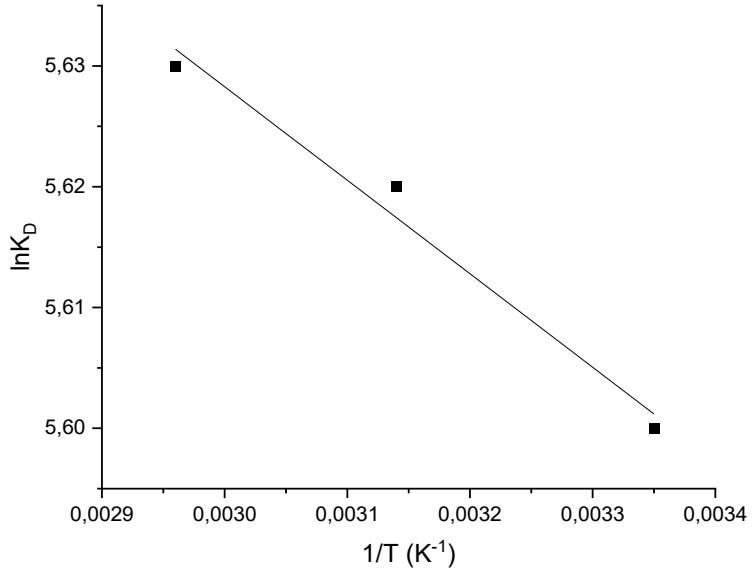
R – универзална гасна константа (8,314 J K^{-1} mol^{-1}),

T – апсолутна температура (K).

На слици 42 приказани су експериментални резултати и Ленгмирови модели изотерме за адсорпцију Ni^{2+} јона помоћу ЕПС из *L. reuteri* B2 на три температуре: 25, 45 и 65°C (298,15 K, 318,15 K и 338,15 K). Вредности ΔG^{Θ} за три температуре су израчунате из једначине (12), док су ΔH^{Θ} и ΔS^{Θ} одређене из дијаграма зависности $\ln K_D$ - $1/T$ (van't Hoff-овог дијаграма, слика 43), на основу нагиба ($-\Delta H^{\Theta}/R$) и одсечка ($\Delta S^{\Theta}/R$) добијене праве.



Слика 42: Експериментални резултати и Ленгмиров модел изотерме за адсорпцију јона Ni^{2+} јона помоћу ЕПС из *L. reuteri* B2 (температуре 25 °C, 45 °C и 65 °C, pH 8,00, C_i(Ni) = 10 mgL^{-1}, концентрација ЕПС 65 mgL^{-1}, време контакта 60 минута)



Слика 43: Дијаграм зависности ln*K* - 1/*T* за адсорпцију Ni^{2+} јона помоћу ЕПС из *L. reuteri* B2 (температуре 25 °C, 45 °C и 65 °C, pH 8,00, C_i(Ni) = 10 mgL^{-1}, концентрација ЕПС 65 mgL^{-1}, време контакта 60 минута)

Вредности израчунатих термодинамичких параметара приказани су у табели 8.

Табела 8. Термодинамички параметри за адсорпцију Ni^{2+} јона помоћу ЕПС из *L. reuteri* B2

***T* (K)**	**ΔG^{Θ} ($KJmol^{-1}$)**	**ΔH^{Θ} ($KJmol^{-1}$)**	**ΔS^{Θ} ($J(molK)^{-1}$)**
298,15	-13,88	0,64	48,72
318,15	-14,87		
338,15	-15,85		

Негативне вредности ΔG^{Θ} указују на спонтаност и изводљивост адсорпције Ni^{2+} јона на ЕПС из *L. reuteri* B2, односно да је процес у коме се остварују интеракције Ni^{2+} јона са -OH групама ЕПС термодинамички повољан. Иако добро уклапање у модел псеудо-другог реда сугерише да је механизам адсорпције хемисорпција, негативна вредност ΔG^{Θ} и мала позитивна вредност ΔH^{Θ} указују да је адсорпција спонтан, благо ендотерман процес, и да се одвија механизмом физисорпције, у виду слабих електростатичких интеракција између Ni^{2+} јона и површине ЕПС (Zafar и сар., 2015). Слободна енергија хидратације јона Ni^{2+} има релативно високу апсолутну вредност (Liu и сар., 2016), што указује на јачину везе Ni^{2+} јона са молекулима воде у хидратационом омотачу, док је енергија која се ослобађа при интеракцији јона са функционалним групама ЕПС нижа. Због тога је енергетски повољнија реорганизација молекула воде у хидратационом

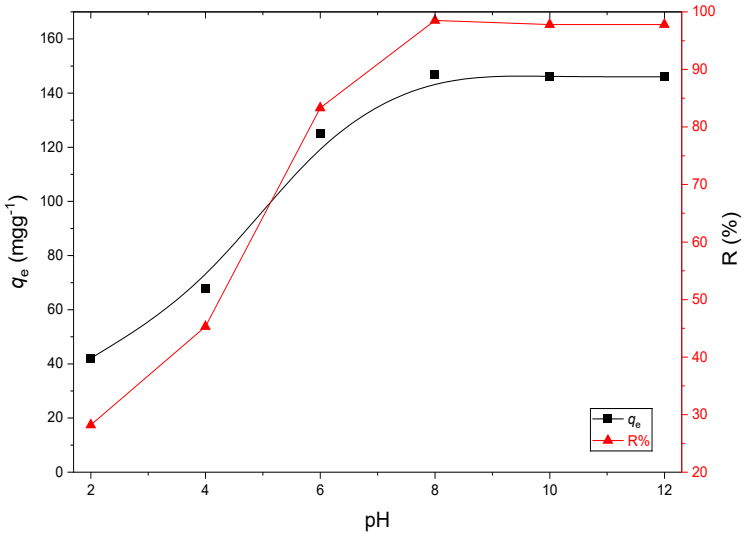
омотачу и грађење комплекса спољне сфере Ni^{2+} јона са -OH групама неутралних моносахарида ЕПС. До реорганизације молекула воде у хидратационом омотачу јона вероватно долази и због хидрофобног ефекта појединих области ЕПС ланца услед присуства 6-дезокси шећера у полисахаридном ланцу, док реверзибилна природа интеракција са јонима Ni^{2+} може допринети томе да систем буде динамичан (стално успостављање равнотеже између адсорпције и десорпције јона Ni^{2+}), што ће повећавати број могућих конформација ЕПС ланца. Сви ови ефекти који повећавају слободу кретања молекула воде и омогућавају различите просторне оријентације функционалних група ЕПС би могли објаснити повећање неуређености у систему, односно позитиван ентропијски допринос ($\Delta S^{\Theta}>0$). Иако је процес адсорпције ендотерман и захтева енергију, неуређеност система даје значајнији допринос спонтаном извођењу процеса. Слично, у истраживању Nkoh и сарадника (Nkoh и сар., 2019), добијени термодинамички параметри адсорпције јона Ni^{2+} са ЕПС из *P. fluorescens* такође указују на спонтаност процеса адсорпције, да је процес ендотерман ($\Delta H^{\Theta}>0$) и да је повећана насумичност везивања јона за активна места на површини ЕПС ($\Delta S^{\Theta}>0$).

4.4.2 Адсорпција Ni^{2+} јона на ЕПС из *K. oxytoca* J7

Експерименти шаржне адсорпције су спроведени да би се испитао капацитет адсорпције ЕПС из *K. oxytoca* J7 за уклањање Ni^{2+} јона, на различитим pH вредностима, са различитим концентрацијама ЕПС, при различитим временима контакта и на различитим температурама.

4.4.2.1 Ефекат pH

Адсорпција ЕПС из *K. oxytoca* J7 на различитим pH вредностима приказана је на слици 44. Експеримент је изведен у опсегу pH 2-12. Запажено је повећање адсорпционог капацитета са повећањем pH, све до достизања максималног капацитета адсорпције, 147,0 mgg^{-1} на pH 8,15. Са даљим повећањем pH вредности адсорпциони капацитет се није значајно мењао. Слично као и у случају адсорпције на ЕПС из *L. reuteri* B2, ефикасност уклањања је била ниска на нижим pH вредностима, приметно се повећавала са повећањем pH вредности до pH=8, где је ефикасност уклањања, изражена у процентима, била максимална. Повећање адсорпционог капацитета је запажено и на вредностима pH < pH_{PZC} (5,2), где је услед протонације функционалних група кумулативно наелектрисање површине ЕПС позитивно, што указује да механизам адсорпције није заснован само на електростатичким интеракцијама. При pH > pH_{PZC} долази до депротонизације хидроксилних и карбоксилних група у моносахаридном саставу ЕПС услед чега површина ЕПС добија негативно наелектрисање које погодује електростатичком привлачењу Ni^{2+} јона из раствора и доводи до повећања адсорпционог капацитета.

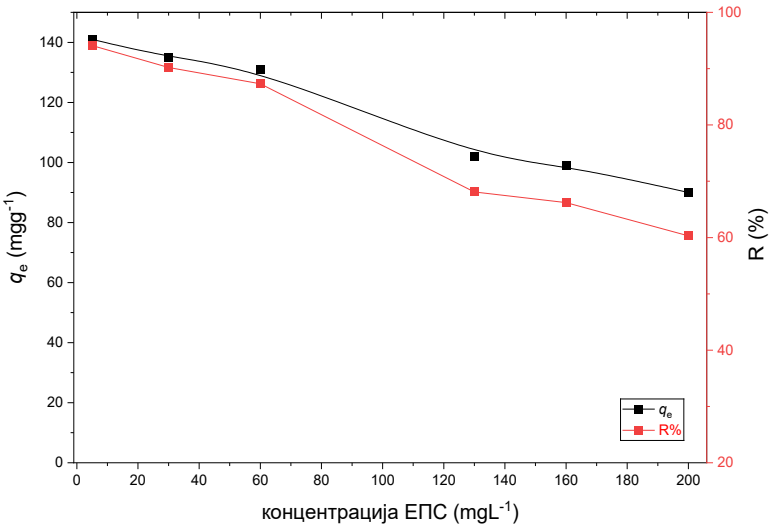


Слика 44: Зависност адсорпционог капацитета и ефикасности уклањања Ni^{2+} јона помоћу ЕПС из *K. oxytoca* J7 од pH вредности (температура 25 °C, C_i (Ni)=10 mgL^{-1}, концентрација ЕПС 65 mgL^{-1}, време контакта 60 минута)

Максимални капацитет адсорпције достиже се при вредности pH на којој долази до хидролизе јона Ni^{2+}, започиње формирање негативно наелектрисаних хидроксилних комплекса никла и таложног једињења никла (слика 36) који у експерименталним условима могу дати привидно већи капацитет адсорпције (Guarín-Romero и сар., 2019). С обзиром да са повећањем pH вредности изнад 8,0 није запажен пораст q_e што указује да ови ефекти нису доминантни, остали експерименти у овом истраживању рађени су на pH 5,5.

4.4.2.2 Ефекат концентрације ЕПС

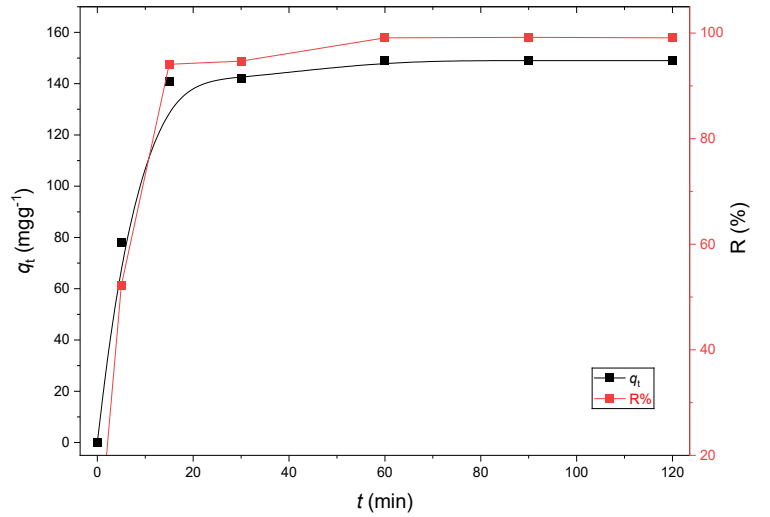
Да би се испитао утицај концентрације ЕПС на адсорпцију Ni^{2+} јона помоћу ЕПС из *K. oxytoca* J7, експерименти су спроведени у опсегу ЕПС концентрација од 10-200 mgL^{-1}. Експериментални резултати су приказани на слици 45. Са повећањем концентрације ЕПС капацитет адсорпције се смањио од 140,90 mgg^{-1} на 89,82 mgg^{-1}, а ефикасност уклањања мењала се од око 94 % до око 60 %. Уопштено, ефикасност адсорпције у шаржном режиму може бити одређена односом концентрација ЕПС и концентрације јона метала. Уколико је концентрација ЕПС у односу на концентрацију јона Ni^{2+} у раствору у вишку биће довољно слободних и доступних активних места за везивање свих јона из раствора. Са превеликим вишком ЕПС поједина активна места остала би непопуњена, што може смањити ефективни капацитет адсорпције. Већа концентрација ЕПС може довести до агрегације полисахаридних ланаца и до смањења броја доступних активних места ЕПС, а самим тим и капацитет адсорпције.



Слика 45: Зависност адсорпционог капацитета и ефикасности уклањања Ni^{2+} јона помоћу ЕПС из *K. oxytoca* J7 од концентрације ЕПС (pH = 8,0, температура 25 °C, C_i(Ni)=10 mgL^{-1})

4.4.2.3 Ефекат времена контакта

На слици 46 је приказана зависност адсорпционог капацитета од времена контакта, *t*. Након 5 минута експеримента ефикасности уклањања је била преко 50% од максималне ефикасности уклањања, која је постигнута након 60 минута. Исто запажање имали су Dobrowolski и сарадници у својој биосорпционој студији (Dobrowolski и сар., 2017).



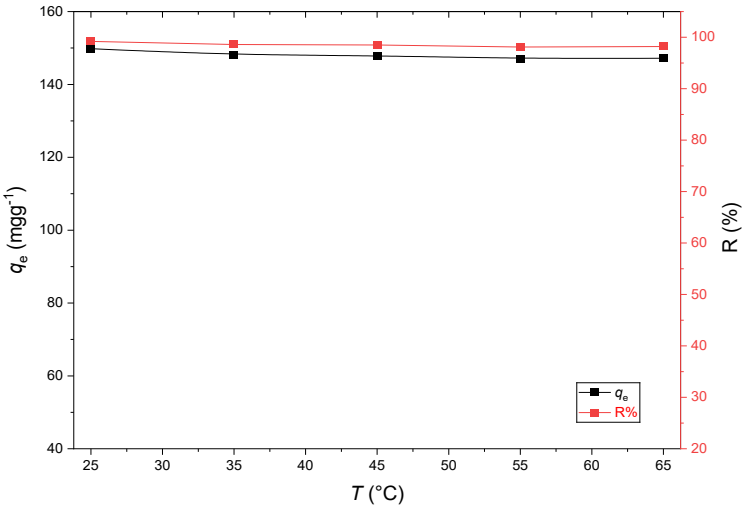
Слика 46: Зависност адсорпционог капацитета и ефикасности уклањања Ni^{2+} јона помоћу ЕПС из *K. oxytoca* J7 од времена контакта (pH = 8,0, температура 25 °C, C_i(Ni) = 10 mgL^{-1}, концентрација ЕПС 65 mgL^{-1})

Капацитет адсорпције (q_t) Ni^{2+} јона из раствора на ЕПС из *K. oxytoca* J7 се веома брзо мењао са повећањем контактног времена од 5 до 15 минута, од 79,0 mgg^{-1} до 142,2 mgg^{-1}. Између 15 и 60 минута се капацитет адсорпције минимално повећавао до максималне вредности од 148,8 mgg^{-1}. Може се рећи да је равнотежа успостављена након 60 минута.

Изражена порозност, мрежаста структура, разгранатост ланаца и присуство великог броја функционалних група заједно доприносе великом броју доступних активних места на површини ЕПС из *K. oxytoca* J7, што резултује великом брзином адсорпције у првих 15 минута. На брзину адсорпције утичу и електростатичке интеракција између активних места (јонизујућих група ЕПС) и Ni^{2+} јона, које се успостављају веома брзо.

4.4.2.4 Ефекат температуре

Температура је важан параметар који може утицати на промене структуре и функционалних група ЕПС током адсорпције, самим тим и на адсорпциони капацитет. Утицај температуре на адсорпциони капацитет јона Ni^{2+} на ЕПС из *K. oxytoca* J7 је приказан на слици 47.



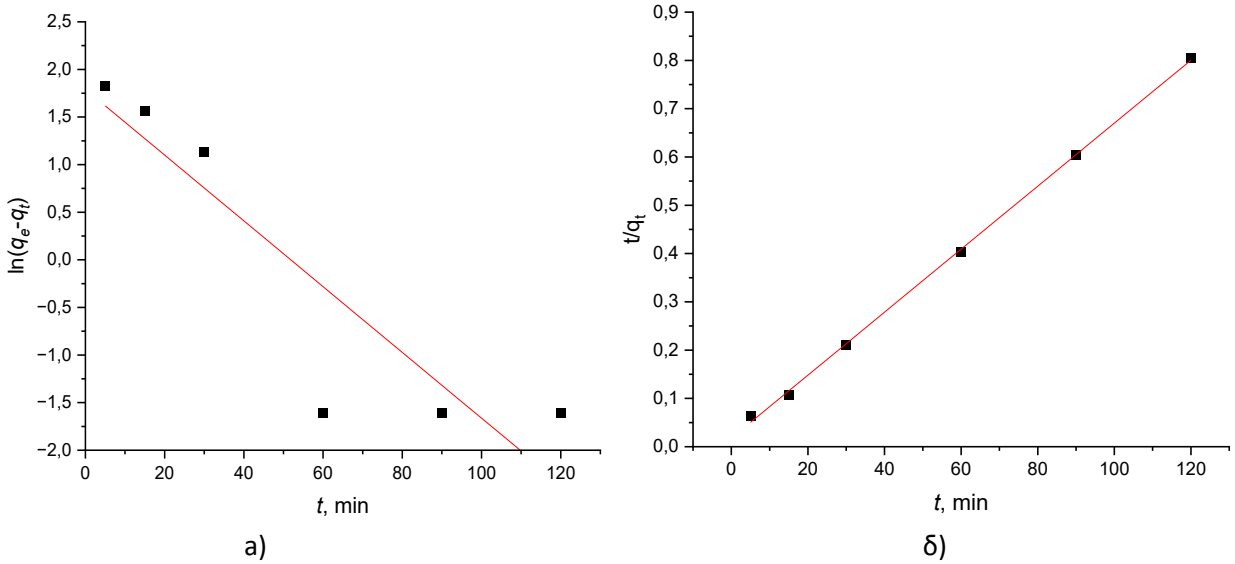
Слика 47: Зависност адсорпционог капацитета и ефикасности уклањања Ni^{2+} јона помоћу ЕПС из *K. oxytoca* J7 од различитих температура (pH = 8,0, C_i(Ni) = 10 mgL^{-1}, концентрација ЕПС 65 mgL^{-1}, време контакта 60 минута)

Утицај температуре на адсорпцију испитан је у опсегу температура између 25 °C и 65 °C, при чему се капацитет адсорпције минимално смањивао, од 149,1 mgg^{-1} до 146,9 mgg^{-1}, а ефикасност уклањања се минимално смањивала, од око 99% до око 98 %. У овом истраживању повишење температуре није значајно утицало на вредност адсорпционог

капацитета и ефикасности уклањања, што указује да више температуре незнатно инхибирају адсорпцију Ni^{2+} јона на ЕПС и немају значајан утицај на ефикасност адсорпције. Ово се може објаснити хемијским интеракцијама које се успостављају између функционалних група ЕПС и јона Ni^{2+} које су стабилне на повишеним температурама.

4.4.2.5 Кинетичка студија за адсорпцију Ni^{2+} јона на ЕПС из *K. oxytoca* J7

На слици 48 (а и б) приказани су дијаграми моделовања експерименталних података адсорпције јона Ni^{2+} на ЕПС из *K. oxytoca* J7 моделима псеудо-првог и псеудо-другог реда.



а) б)

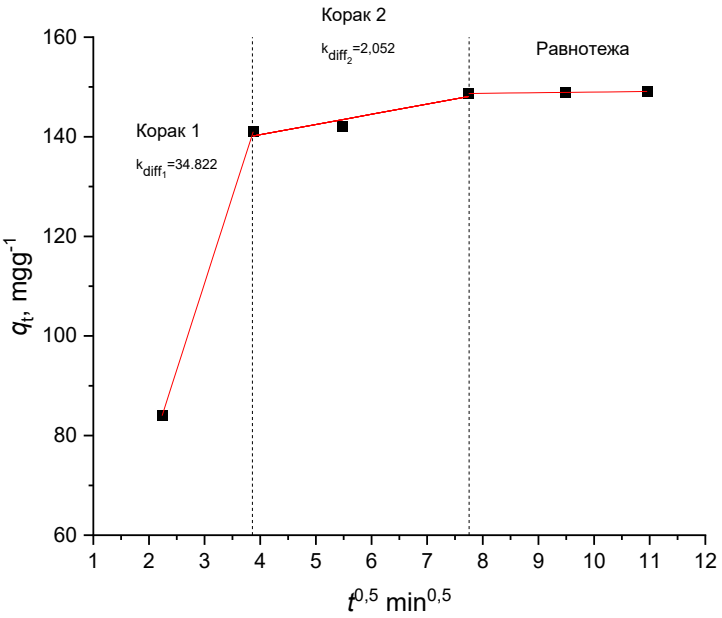
Слика 48: Кинетички модела а) пресудо-првог реда и б) псеудо-другог реда за адсорпцију Ni^{2+} јона помоћу ЕПС из *K. oxytoca* J7

У табели 9 приказани су резултати кинетичке студије за процес адсорпције Ni^{2+} јона на ЕПС из *K. oxytoca* J7. Израчунате вредности q_e и R добијене моделом псеудо-првог реда указују да овај модел не може добро да опише кинетику адсорпционог процеса. Израчуната равнотежна вредност адсорпције q_e (cal) применом модела псеудо-другог реда је у складу са експерименталним вредностима q_e. С обзиром да ЕПС поред неутралних шећера у свом саставу има и уронске киселине и амино шећере више је функционалних група које могу успоставити и јаче, координативно-ковалентне и електростатичке интеракције са јонима Ni^{2+}, које се брзо успостављају и термички су стабилне.

Табела 9. Кинетички параметри за адсорпцију Ni^{2+} јона на ЕПС из *K. oxytoca* J7, при концентрацији јона Ni^{2+} од 10 mgL^{-1}и на температури 25 °C.

Кинетика	Параметри	Вредности
Псеудо-први ред	q_e (cal)(mgg^{-1})	6,0
	K_1 ($Lmin^{-1}$)	0,0695
	R^2	0,855
Псеудо-други ред	q_e (cal)(mgg^{-1})	99,2
	K_2 ($Lmin^{-1}$)	0,0192
	R^2	0,999

На слици 49 приказан је дијаграм зависности q_t-$t^{0,5}$ за адсорпцију Ni^{2+} јона помоћу ЕПС из *K. oxytoca* J7.



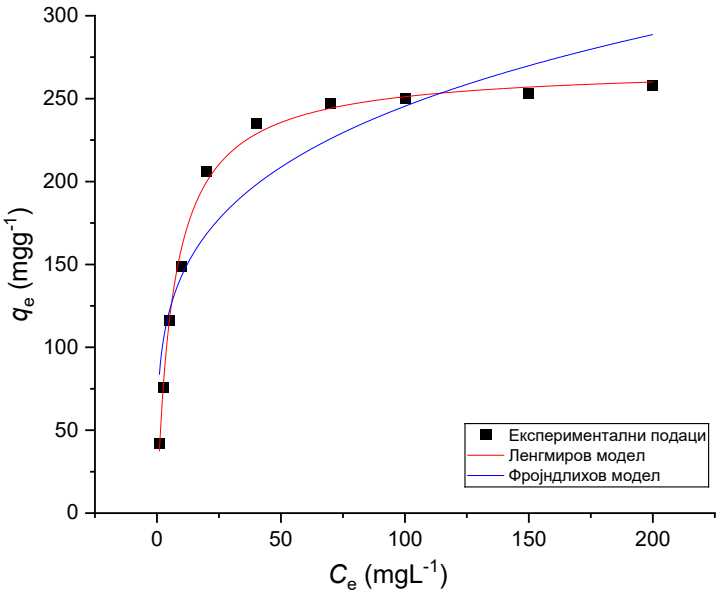
Слика 49: Модел унутарчестичне дифузије (Weber-Morris-ов модел) примењен на адсорпцију јона Ni^{2+} помоћу ЕПС из *K. oxytoca* J7

Из дијаграма зависности q_t-$t^{0,5}$ се може видети да унутарчестична дифузија није једини корак који утиче на укупну брзину адсорпције и да се адсорпција Ni^{2+} јона одвија у три корака. Први корак адсорпције (до 15 минута) је најбржи, константа брзине дифузије има највећу вредност у поређењу са наредна два корака адсорпције. Други корак адсорпције (15-60 минута) је спорији, коефицијент дифузије је већи него у претходном кораку, што говори да се дифузија Ni^{2+} јона унутар пора одвија спорије него кроз гранични слој. Након 60 минута успоставља се адсорпциона равнотежа. Дакле, и у овом случају, као и у случају ЕПС из *L. reuteri* B2, дифузија Ni^{2+} јона кроз поре ограничава укупну брзину адсорпције, али није једини корак адсорпције.

Модели унутарчестичне дифузије за процесе адсорпције јона Ni^{2+} на оба ЕПС су показали да дифузија кроз поре није једини корак адсорпције (присутна је и дифузија кроз спољашњи слој) али је најспорији корак и контролише укупну брзину процеса. Код ЕПС из *L. reuteri* B2 дифузија кроз спољашњи слој се одвија брже него код ЕПС из *K. oxytoca* J7 (k_{diff1} *L. reuteri* B2 > k_{diff1} *K. oxytoca* J7), док је други корак адсорпције бржи у случају ЕПС из *K. oxytoca* J7 него код ЕПС из *L. reuteri* B2 (k_{diff2} *K. oxytoca* J7 > k_{diff2} *L. reuteri* B2). Ово се може објаснити структурама ЕПС и типом веза које се остварују са јонима Ni^{2+}. Код ЕПС из *L. reuteri* B2 површина је хомогена, активна места су равномерно распоређена и лако доступна јонима, док су поре ситније, уже, мање приступачне јонима због чега се адсорпција одвија претежно на површини ЕПС. Интеракције јона са функционалним групама неутралног ЕПС су слабе, реверзибилне, углавном физисорпционог типа и остварују се брзо, тренутно, због чега се динамичка равнотежа успоставља већ након 30 минута. Код ЕПС из *K. oxytoca* J7 дифузија кроз спољашњи слој је спорија него код ЕПС из *L. reuteri* B2 због структурно неуједначене површине и тежег приступа свим активним местима, док је дифузија кроз поре бржа у односу на ЕПС из *L. reuteri* B2 због мањег отпора кретању јона у широким порама и мрежастој матрици. Интеракције између јона и функционалних група се успостављају хемисорпционо, спорије и дубље у унутрашњости порозне мреже због чега цео процес траје дуже, равнотежа се у датим условима успоставља спорије (након 60 минута), али се због приступа већем броју активних места постижу већи капацитет адсорпције и боља ефикасност уклањања јона.

4.4.2.6 Одређивање изотерми за адсорпцију Ni^{2+} јона на ЕПС из *K. oxytoca* J7

На слици 50 приказани су експериментални резултати и Ленгмиров и Фројндлихов модел изотерме за адсорпцију јона Ni^{2+} јона на ЕПС из *K. oxytoca* J7.



Слика 50: Експериментални резултати и Ленгмиров и Фројндлихов модел изотерме за адсорпцију јона Ni^{2+} јона помоћу ЕПС из *K. oxytoca* J7 (температура 25 °C, pH 8,00, C_i(Ni) = 10 mgL^{-1}, концентрација ЕПС 65 mgL^{-1}, време контакта 60 минута)

У табели 10 приказане су вредности параметара очитаних графички из модела изотерми.

Табела 10. Термодинамички параметри за адсорпцију Ni^{2+} јона на ЕПС из *K. oxytoca* J7

Изотермни модел	**Параметри**	**Вредности**
Ленгмиров модел адсорпционе изотерме	q_{max} (mgg^{-1})	270,0
	K_L	0,1601
	R^2	0,9956
Фројндлихов модел адсорпционе изотерме	K_f	83,50
	n	4,27
	R^2	0,8816

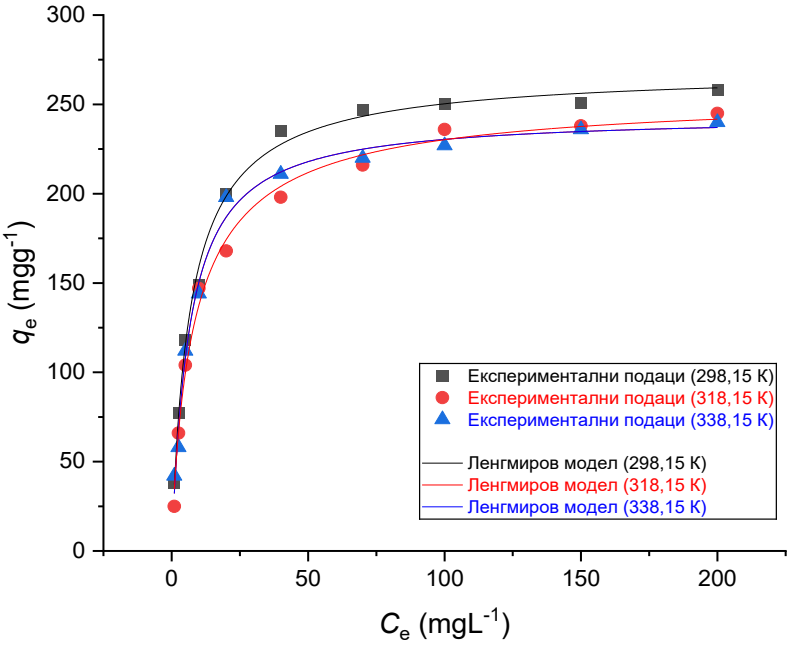
Коефицијенти корелације показују да се Ленгмиров модел боље уклапа са експерименталним подацима од Фројндлиховог модела. Иако ЕПС има сложену, изражено порозну, мрежасту тродимензионалну структуру, адсорпција је у великој мери одређена ограниченим бројем доступних функционалних група ЕПС (неутралних

моносахарида, уронских киселина и аминошећера) које могу везивати само по један јон Ni^{2+}, што резултује монослојном адсорпцијом јона на ЕПС.

Према Munir Ahamed и сарадницима (Munir Ahamed и сар., 2024), Ленгмиров модел је такође боље описивао процес адсорпције јона Ni^{2+} са ЕПС из *Jeotgalicoccus huakuii* (R^2=0,99), у поређењу са Фројндлиховим моделом (R^2=0,89). Слично је и у објави Zhang и сарадника (Zhang и сар., 2017), док је у раду Dobrowolski и сарадника (Dobrowolski и сар., 2017) боље фитовање добијено Фројндлиховим него Ленгмировим моделом.

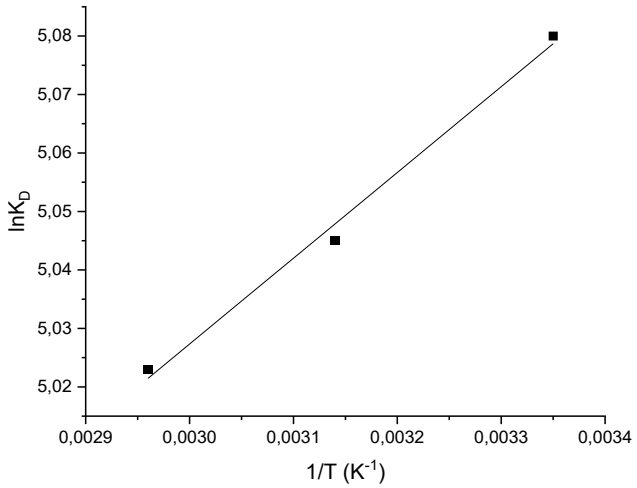
4.4.2.7 Термодинамичка студија за адсорпцију Ni^{2+} јона на ЕПС из *K. oxytoca* J7

На слици 51 приказани су експериментални резултати и Ленгмирове изотерме за адсорпцију Ni^{2+} јона на ЕПС из *K. oxytoca* J7 на три температуре: 298,15 K, 318,15 K и 338,15 K (25, 45 и 65 °C).



Слика 51: Експериментални резултати и Ленгмиров модел изотерме за адсорпцију јона Ni^{2+} помоћу ЕПС из *K. oxytoca* J7 (температуре 25 °C, 45 °C и 65 °C, pH 8,00, C_i(Ni) = 10 mgL^{-1}, концентрација ЕПС 65 mgL^{-1}, време контакта 60 минута)

Бездимензиона константа равнотеже K_D и ΔG^{Θ} су израчунати из Ленгмирових константи K_L на три температуре, према једначинама (11) - (14), док су ΔH^{Θ} и ΔS^{Θ} одређени из дијаграма зависности $\ln K_D$ - $1/T$ (слика 52). Вредности израчунатих термодинамичких параметара приказани су у табели 11.



Слика 52: Дијаграм зависности ln*K* - 1/*T* за адсорпцију Ni^{2+} јона помоћу ЕПС из *K. oxytoca* J7 (температуре 25 °C, 45 °C и 65 °C, pH 8,00, C_i(Ni) = 10 mgL^{-1}, концентрација ЕПС 65 mgL^{-1}, време контакта 60 минута)

Табела 11. Термодинамички параметри за адсорпцију Ni^{2+} јона на ЕПС из *K. oxytoca* J7 на различитим температурама

Температура (K)	**ΔG^{Θ} ($KJmol^{-1}$)**	**ΔH^{Θ} ($KJmol^{-1}$)**	**ΔS^{Θ} ($J(molK)^{-1}$)**
298,15	-12,58	-1,22	38,14
318,15	-13,44		
338,15	-14,12		

Негативна вредност ΔG^{Θ} указује на спонтаност и изводљивост процеса адсорпције Ni^{2+} јона на ЕПС. Процес адсорпције је благо егзотерман ($\Delta H^{\Theta} < 0$), енергија се ослобађа при грађењу хемијских веза између јона Ni^{2+} и депротонованих функционалних група ЕПС. Процес физисорпције је такође присутан у електростатичкој интеракцији између јона Ni^{2+} и површине ЕПС (мала вредност ΔG^{Θ}). Енталпијски допринос је слабије изражен и адсорпција се спонтано дешава услед ентропијског доприноса ($\Delta S^{\Theta} > 0$). Повећање неуређености система је последица повећане слободе кретања молекула воде при ослобађању из хидратационог омотача јона (грађење комплекса унутрашње сфере), као и повећане слободе кретања неорганских јона електростатички везаних за карбоксилатне групе ЕПС који се измењују са јонима Ni^{2+} у раствору. Грађење комплекса

унутрашње сфере је у складу са моделом псеудо-другог реда и Ленгмировим моделом, који указују да су активна места специфична, ограничена и енергетски униформна. У истраживању Cui и сарадника (Cui и сар., 2020) термодинамичка студија је такође показала да је процес адсорпције Ni^{2+} јона на ЕПС из *Agrobacterium tumefaciens* F2 егзотерман, а да је једна од главних група одговорна за процес адсорпције је C=O, која ја присутна и у структури ЕПС из *K. oxytoca* J7.

4.4.3 Анализа могућих механизама адсорпције

Механизми адсорпције јона Ni^{2+} на ЕПС зависе од моносахаридног састава ЕПС, односно присутних функционалних група, вредности PZC ЕПС и радних параметара (вредности pH). Функционалне групе на површини ЕПС које би могле бити значајне за интеракцију са Ni^{2+} јонима су O-H, C=O, C=C, C-O, C-H, C-O-C, C-N (Charazińska и сар., 2022).

Шема могућих механизама адсорпције јона Ni^{2+} на ЕПС добијеном из бактеријског соја *L. reuteri* B2 приказана је на слици 53. Негативно наелектрисање површине ЕПС потиче од депротонизација -OH група неутралних моносахарида ЕПС, које су при радном pH=8,0 депротоноване у малом обиму (због високе вредности pKa). Депротоноване OH групе имају слободан електронски пар на кисеонику који делује као лиганд према коме јон никла има афинитет због делимично попуњене d-орбитале (Vakili и сар., 2021), услед чега се могу наградити комплекси спољашње сфере са јонима Ni^{2+}. Ипак, због готово електронеутралне површине ЕПС (pH ≈ PZC), комплексација је вероватно слабо изражена а доминантне су физичке интеракције у виду водоничних веза (успостављају се између кисеоника из функционалних група ЕПС и молекула водоника из воде која је координирана за јон Ni^{2+} и van der Waals-ових интеракција. Слично се могу понашати C-O-C групе (гликозидне везе), чији би атом кисеоника са слободним електронским паром могао имати мању улогу у адсорпцији Ni^{2+} јона (Cui и сар., 2020). С обзиром да су могуће интеракције слабије (физисорпција),а а капацитет адсорпције велики и ефикасност уклањања висок, поред поменутих интеракција вероватно допринос пружају просторна организација ЕПС ланаца и просторна структура (стерни ефекат) које доприносе томе да хидратисани јони Ni^{2+} буду физички ''заробљени'' у међуланчаним микроканалима и задржани у уским порама ЕПС из којих се не могу спонатно ''ослободити''. Такође, на исход утиче и радни pH=8,00, при ком може доћи и до микропреципитације (хемисорпција). Термодинамички параметри указали су да се процес адсорпције одвија спонтано, слабо ендотермно и потврђују механизам физисорпције. Кинетички параметри указују да се модел псеудо-другог реда боље слаже са експерименталним подацима. Иако се овај модел обично повезује са хемисорпцијом у овом случају описује физисорпциони процес и боље прати смањење брзине адсорпције услед попуњавања ограничених активних места. Ово може бити

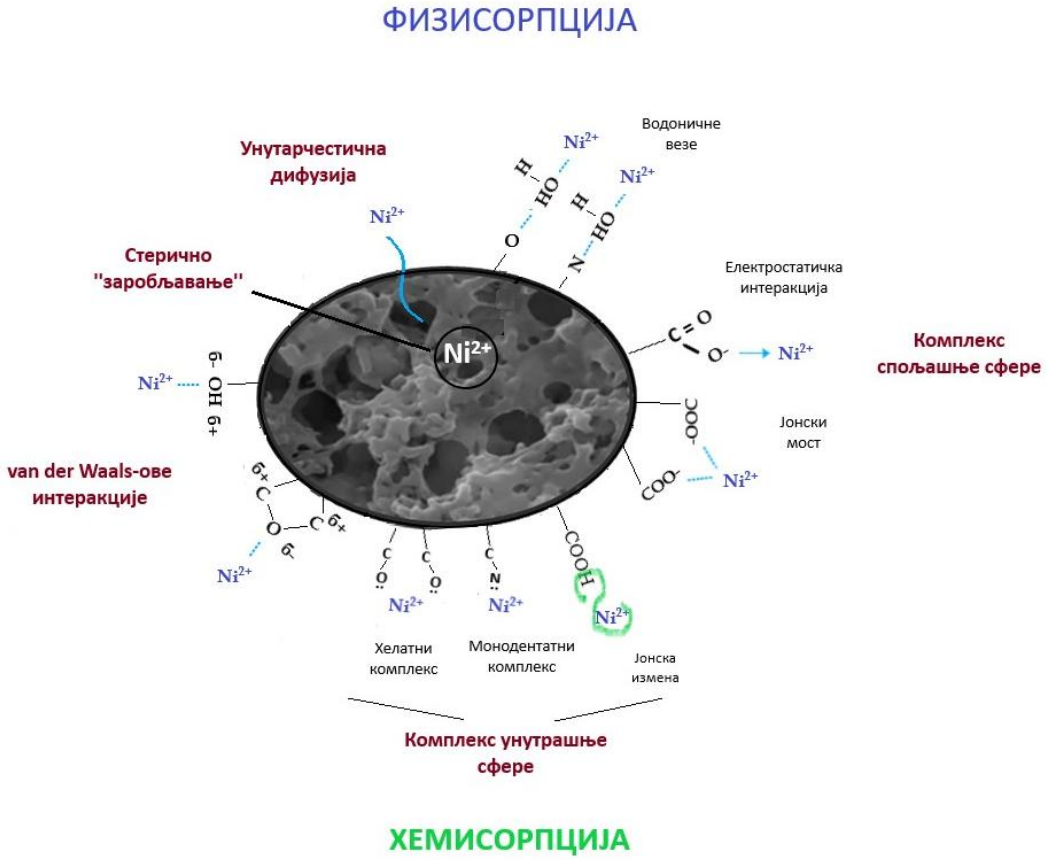
објашњено и привременом (реверзибилном) десорпцијом адсорбованих јона са активних места ЕПС при физичким интеракцијама које су доминантан механизам адсорпције у овом случају. Анализа модела унутарчестичне дифузије потврдила је да дифузија кроз поре значајно ограничава укупну брзину процеса. Може се закључити да у овом процесу адсорпције механизам представља комбинацију физисорпције (водоничне везе, van der Waals-ове интеракције, унутарчестична дифузија, задржавања јона у порама, стерно "заробљавање" јона у међуланчаним микроканалима и мањим делом грађење комплекса спољне сфере), али и хемисорпције (микропреципитација), а да утицај на ефикасност адсорпције свакако имају процесни параметари (концентрација ЕПС у довољном вишку, радни pH приближан PZC ЕПС и на граници грађења једињења никла у виду талога).

Слика 53: Шематски приказ механизма адсорпције Ni^{2+} јона на ЕПС из *L. reuteri* B2

Према резултатима из ове дисертације, могући механизми адсорпције Ni^{2+} на ЕПС изолованом из бактеријског соја *K. oxytoca* J7 приказани су на слици 54.

ЕПС из *K. oxytoca* J7, поред неутралних шећера, у свом саставу има и уронске киселине и аминошећере, самим тим и више функционалних групе које могу интераговати са јонима Ni^{2+}. Негативно наелектрисање ЕПС вероватно потиче од депротонованих уронских киселина. При радном pH=5,5 већина уронских киселина је депротонована, док је ова вредност ниска за депротонизацију OH група чији је pKa знатно виши од неутралног pH. За разлику од ЕПС из *L. reuteri* B2, могуће су директне

координације са јонима и грађење комплекса унутрашње сфере. На овај начин могу се изградити монодентатни комплекси и хелатни комплекси са јонима Ni^{2+}.



Слика 54: Шематски приказ механизма адсорпције Ni^{2+} јона на ЕПС из *K. oxytoca* J7

XRD анализом је утврђена висока кристалиничност ЕПС из *K. oxytoca* J7која вероватно потиче од формираних соли (уроната) са јонима K^+, Na^+ и Mg^{2+} који се могу измењивати са јонима Ni^{2+}, те је јонска измена још један могући хемисорпциони механизам у виду грађења комплекса унутрашње сфере. За разлику од ЕПС из *L. reuteri* B2 адсорпција је извођена при нижој pH вредности, што искључује могућност микропреципитације. Електростатичким привлачењем депротонованих група ЕПС са јонима Ni^{2+} се такође могу остварити интеракције (комплекс спољне сфере), при чему се могу изградити и јонски мостови са две суседне депротоновене уронске киселине. При радном pH $-NH_2$ група је протонована до $-NH_3^+$ и у том облику, без слободног електронског пара и са позитивним наелектрисањем, не може директно везивати јоне Ni^{2+} већ може остварити водоничну везу са молекулима воде из хидратационог омотача јона. SEM анализа је показала изражено порозну, мрежасту структуру ЕПС која омогућава бољу дифузију јона кроз поре до "скривених" активних места. Поред јаких веза вероватно су присутне и слабије интеракције типа водоничних веза и van der Waals-

ових интеракција хидратисаних јона са -OH и -NH_2/-NH- групама, као и физичко задржавање јона у мрежастој структури. Добијени термодинамички параметри потврђују да се ради о спонтаном, егзотермном процесу заснованом на физисорпцији. На основу кинетичких параметра процес адсорпције се одвија по механизму хемисорпције. Модел унутарчестичне дифузије потврдио је да се адсорпција јона никла одвија и унутар пора адсорбента и да је то најспорији корак адсорпције. У случају адсорпције са овим биосорбентом може се говорити о комбинацији механизма хемисорпције и физисорпције. Хемисорпција се огледа у грађењу комплекса унутрашње сфере (монодентатна комплексација, бидентатна комплексација - хелација, јонска измена), док се физисорпција огледа у грађењу комплекса спољашње сфере (електростатичке интеракције, јонски мостови), грађењу водоничних веза, успостављању van der Waals-ових интеракција, унутарчестичној дифузији и стерном "заробљавању" јона.

4.4.4 Поређење ЕПС из *L. reuteri* B2 и *K. oxytoca* J7 као биосорбената за уклањање Ni^{2+} јона из водених раствора

У данашње време, налажење решења за загађење животне средине тешким металима постаје једна од најатрактивнијих области за истраживаче широм света. Због тога је много истраживања усмерено на природне материјале који се користе за уклањање Ni^{2+} јона из водених раствора (Charazińska и сар., 2022; Noman и сар., 2022; Raval и сар., 2017; Sinyeue и сар., 2022). ЕПС су већ у употреби као биосорбенти, због своје специфичне структуре, јефтине производње, чињенице да за њихово добијање није потребна лиза ћелија и због еколошки прихватљивог начина производње (Pagliaccia и сар., 2022). Компаративни приказ ефикасности уклањања Ni^{2+} јона и адсорпционих капацитета ЕПС изолованих из *L. reuteri* B2 и *K. oxytoca* J7 и ЕПС изолованих из других бактеријских сојева дат је у табели 12.

Како наводе Ashruta и сарадници (Ashruta и сар., 2014) адсорпциони капацитет ЕПС продукованог од групе Грам негативних бактерија (сојеви нису наведени у студији) за јоне Ni^{2+} износио је свега 3,3 mgg^{-1}, док је ефикасност уклањања била 66,63 %. Ниску ефикасност уклањања Ni^{2+} јона (9%) и мањи адсорпциони капацитет (26,7 mgg^{-1}) имао је и ЕПС из *Pseudomonas aureginosa* MTCC 1688 (Chug и сар., 2021) при истој почетној концентрацији јона метала као у овом истраживању. Анализе су показале да су у интеракцијама са јонима Ni^{2+} учествовале C=O и амидне групе ЕПС. Мању ефикасност уклањања јона Ni^{2+} (29,5%) и мањи адсорпциони капацитет (1,45 mgg^{-1}) имао је и ЕПС из *Pseudomonas fluorescens* (Nkoh и сар., 2019), као и ЕПС из *Paenibacillus jamilae* (Morillo Pérez и сар., 2008) (17,66 mgg^{-1}). Капацитети адсорпције Ni^{2+} јона на ЕПС из *Ensifermeliloti* F2 MS-125, 54,0 mgg^{-1}, (Lakzian и сар., 2008) и ЕПС из *Agrobacterium tumefaciens F2*, 51,3 mgg^{-1}, (Cui и сар., 2020) били су нижи у поређењу са ЕПС из ове дисертације.

Табела 12. Преглед ефикасности уклањања Ni^{2+} из водених раствора (%) и адсорпционог капацитета ЕПС из различитих врста бактерија

Извор ЕПС-а	**pH**	**Максимални адсорпциони капацитет q_{max} (mgg^{-1})**	**Ефикасност уклањања R(%)**	**Референца**
Agrobacterium tumefaciens F2	6,0	51,3	78,0	(Cui и сар., 2020)
Paenibacillus jamilae	5,5	17,7	/	(Morillo Pérez и сар., 2008)
Ensifermeliloti MS-125	6,0	54,0	85,0	(Lakzian и сар., 2008)
Rhodococcus opacus	6,5	129,3	/	(Dobrowolski и сар., 2017)
Rhodococcus rhodochorus	8,0	154,1	/	(Dobrowolski и сар., 2017)
Jeotgalicoccus huakuii	5,0	81,0	91,0	(Munir Ahamed и сар., 2024)
Alteromonas sp. JL2810	5,0	330,0	/	(Zhang и сар., 2017)
Pseudomonas aureginosa MTCC 1688	7,0	26,7	9,00	(Chug и сар., 2021)
Pseudomonas fluorescens		1,45	29,5	(Nkoh и сар., 2019)
Мешовита култура Грам негативних бактерија		3,3	66,6	(Ashruta и сар., 2014)
Lactobacillus reuteri B2	8,0	161,0	93,0	Ово истраживање
Klebsiella oxytoca J7	5,5	270,0	99,3	Ово истраживање

Истраживањем Munir Ahamed и сарадника (Munir Ahamed и сар., 2024) је утврђено да је адсорпциони капацитет ЕПС из *Jeotgalicoccus huakuii* за Ni^{2+} јоне 81 mgg^{-1}, док је ефикасност уклањања 91%. Претходно је показано (Dobrowolski и сар., 2017) да два ЕПС екстрахована из сојева *Rhodococcus opacus* и *Rhodococcus rhodochorus*, имају високе

адсорпционе капацитете за јоне Ni^{2+} од 129,3 mgg^{-1} и 154,1 mgg^{-1}, редом, што је више од ЕПС из *L. reuteri* B2 а ниже од ЕПС из *K. oxytoca* J7. ЕПС из *Alteromonas sp.* JL2810 (Zhang и сар., 2017) је имао виши адсорпциони капацитет према јонима Ni^{2+} (330,0 mgg^{-1}) у поређењу са оба ЕПС из ове дисертације. ЕПС из *Alteromonas sp.* JL2810 састављен је већински од уронских киселина и неутралних шећера и главне групе које су учествовале у интеракцији са јонима Ni^{2+} биле су OH, C=O и C-O-C.

ЕПС из *L. reuteri* B2 показао је висок капацитет адсорпције и високу ефикасност уклањања, у примењеним експерименталним условима. С обзиром да је ЕПС из *L. reuteri* B2 састављен искључиво од неутралних шећера, претпоставка је да у основи механизма леже слабе интеракције типа водоничких веза и van der Waals-ових сила (физисорпција), а да су добра ефикасност уклањања, велики капацитет адсорпције и брза адсорпција резултат просторне организације ланаца ЕПС која омогућава да велики број активних места буде доступан. ЕПС из *K. oxytoca* J7 у примењеним експерименталним условима имао је већи капацитет адсорпције и бољу ефикасност уклањања у односу на ЕПС из *L. reuteri* B2. Уронске киселине и аминошећери у саставу ЕПС из *K. oxytoca* J7 вероватно доприносе грађењу јаких хемијских веза. Поред тога, у саставу ЕПС *K. oxytoca* J7 је више типова моносахаридних јединица, функционалне групе су бројније и разноврсније, ланац ЕПС је разгранат, ЕПС има изражено велике поре, што је све заједно допринело бољим резултатима адсорпције. ЕПС из оба бактеријска соја, *L. reuteri* B2 и *K. oxytoca* J7 показала су, у примењеним експерименталним условима, добру адсорпциону моћ у погледу адсорбовања јона никла из водених раствора, што је потврђено поређењем са до сада објављеним резултатима о адсорпцији никла на ЕПС добијене из различитих извора.

4.4.5 Перспектива примене ЕПС из *L. reuteri* B2 и *K. oxytoca* J7

Упоређујући резултате адсорпције раније објављених истраживања (табела 12) са резултатима ове дисертације, може се закључити да ЕПС изоловани из сојева *L. reuteri* B2 и *K. oxytoca* J7 имају добар адсорпциони капацитет (161,0 и 270,0 mgg^{-1}, редом) за Ni^{2+} јоне у експерименталним условима, што им даје потенцијал за примену у процесима уклањања тешких метала и за даља испитивања могућности индустријске примене на реалним узорцима. Сходно томе, ови ЕПС се могу сматрати потенцијалним биосорбентима који су економични, еколошки прихватљиви и нешкодљиви за жива бића. ЕПС из соја *L. reuteri* B2 испољио је солидну антиоксидативну активност, на ћелијској линији MRC-5 није показао цитотоксичност (при опсегу концентрација 0,5 – 2,0 $mgmL^{-1}$), што даје идеје за наставак истраживања и испитивања могућности примене овог ЕПС за развој функционалне хране, дијететских суплемената и у биомедицинским истраживањима. ЕПС из соја *K. oxytoca* J7, иако је показао нетоксичност на MRC-5 ћелијској линији (при опсегу концентрација 0,5 – 2,0 $mgmL^{-1}$), због патогености извора би своју намену првенствено могао наћи у процесима уклањања тешких метала из

контаминираних вода, у виду филтера или композита са другим материјалима. За примену у областима медицине, ветерине и фармације ЕПС из патогеног соја не може парирати ЕПС из бактеријских сојева који имају GRAS статус и уколико би се разматрала оправдана примена у овим областима било би потребно одрадити додатна испитивања која би потврдила да је ЕПС безбедан по здравље људи и животиња.

Бактеријски ЕПС из соја *K. oxytoca* Ј7, као биокомпатибилан и еколошки прихватљив материјал који има добар афинитет према јонима Ni^{2+} би се могао размотрити као потенцијална јефтинија алтернатива за имобилизацију јона никла у Ni-NTA (Ni-нитрилотриацетат) афинитетној хроматографији. У овој хроматографији, која се примењује за пречишћавање рекомбинантних протеина, искоришћена је способност никла да формира везе са хистидинским остацима протеина (Crowe и сар., 1996; Spriestersbach и сар., 2015). Рекомбинантни протеини са генетски уметнутим хистидинским наставком (his tag-ом) се специфично везују за јоне Ni^{2+} који су имобилисани на NTA везану за носач (Ramos и сар., 2004). NTA координише са јонима никла преко једне амино и три карбоксилне групе, због чега би ЕПС из *K. oxytoca* Ј7, који садржи ове групе, могао да буде размотрен за ову намену. Ni-NTA афинитетна хроматографија је широко примењивана и ефикасна метода али, због високе цене носача и Ni-NTA комплекса, оправдана је потреба за јефтинијом алтернативом. Ова идеја отвара још један правац за наредна истраживања и испитивање могуће примене ЕПС из бактеријског соја *K. oxytoca* Ј7.

5 ЗАКЉУЧАК

Циљ овог истраживања било је изоловање по први пут ЕПС из два нова бактеријска соја, једног пробиотског (*L. reuteri* B2) и једног патогеног (*K. oxytoca* J7) и извршити карактеризацију изолованих бактеријских ЕПС, у настојању да се допринесе развоју одрживих биоматеријала из обновљивих ресурса. Карактеризација ЕПС обухватила је одређивање морфологије, утврђивање хемијске структуре и хемијског састава, одређивање молекулске масе, процену степена кристалиничности и термичке стабилности. Поред хемијске и структурне карактеризације ЕПС, процењен је утицај оба ЕПС на вијабилност ћелија (цитотоксичност) на једној хуманој ћелијској линији, док је за ЕПС из пробиотског соја додатно процењена антиоксидативна активност. Могућа примена ЕПС извршена је испитивањем адсорпционог потенцијала према јонима никла, метала који поред токсичне природе има и биотехнолошки значај у процесима пречишћавања протеина, а у досадашњим биосорпционим студијама са ЕПС као биосорбентом је ређе био предмет истраживања.

- Добијени резултати изолације ЕПС показали су да два нова бактеријска соја *L. reuteri* B2 и *K. oxytoca* J7 представљају изворе ЕПС и да се могу сврстати међу потенцијалне обновљиве ресурсе у развоју нових биоматеријала. Пробиотски сој је у одабраним условима ферментације дао солидан принос ЕПС, док је патогени сој имао изражено низак принос у поређењу са резултатима истих бактеријских врста из литературе.

- Два изолована ЕПС су свеобухватно окарактерисана применом SEM, FTIR, NMR, MALDI-TOF-MS, XRD и TGA метода и међу њима су показане извесне разлике у тродимензионалној структури, степену порозности, моносахаридном саставу, степену разгранатости ланца. Наведене разлике су се одразиле и на разлике у присутним функционалним групама, вредности тачке нултог наелектрисања, степену кристалиничности и термичком понашању ЕПС.

- SEM анализа је показала да ЕПС из соја *L. reuteri* B2 има структуру налик пени, густу, збијену, са ситним порама неправилног распореда и местимично глатким областима, док ЕПС из патогеног соја има растреситу, више мрежасту структуру, са израженим и неправилним порама.

- FTIR анализом утврђено је да два ЕПС имају сличне сигнале у спектру на позицијама које потврђују полисахаридну природу ЕПС, док су разлике запажене у области спектра које указују на присуство карбоксилних група код ЕПС из патогеног соја (уронских киселина) и у спектралном региону

"отиска прста" које су указале на присуство различитих моносахаридних јединица у полисахаридним ланцима два ЕПС.

- NMR анализа показала је да ЕПС из пробиотског соја има три различите моносахаридне јединице у понављајућем блоку полисахаридног ланца, да су присутне и α- и β- гликозидне везе међу моносахаридима у ланцу, да је искључено присуство манозе и галактозе, да је вероватно присутна глукоза у α- и/или β- конформацији и 6-дезокси шећер, вероватно рамноза. Код ЕПС из патогеног соја NMR анализом утврђено је да су гликозидне везе претежно у β-конформацији, да се понављајући блок ЕПС ланца састоји из седам различитих моносахаридних јединица и да је ЕПС ланац вероватно разгранат. У овом ЕПС није искључено присуство галактозе и манозе у некој од конформација, а претпостављено је присуство 6-дезокси шећера и аминошећера.

- Анализа MALDI спектра ЕПС из пробиотског соја указала је да би ЕПС из пробиотског соја могао бити смеша два различита ЕПС састављених од неутралних шећера, при чему је понављајући блок ЕПС 1 састављен од две хексозе и једног 6-дезокси шећера (вероватно у бочном ланцу), а понављајући блок ЕПС 2 састављен од две међусобно везане хексозе (вероватно различите). Просечна молекулска маса *M*w ЕПС из *L. reuteri* B2 је одређена из спектра и износи ≈ 5755 Da. Анализа MALDI спектра ЕПС из патогеног соја указао је да он у свом саставу има хексозе, пентозе, 6-дезокси шећере, аминошећере и уронске киселине и да је понављајући блок ланца ЕПС састављен од три међусобно везане хексозе за које су бочно везани: за једну хексозу 6-дезоксишећер за кога је даље везана једна пентоза, за другу хексозу је везан N-ацетиламино шећер, док је уронска киселина везана или за пентозу у бочном ланцу, као терминална, или је везана као терминална за трећу хексозу у основном ланцу ЕПС. Просечна молекулска маса ЕПС из *K. oxytoca* J7 одређена је из спектра и износи ≈ 2621 Da.

- Дифрактограм ЕПС из пробиотског соја показао је типичан аморфни брег са појединим пиковима који указују на присуство кристалне фазе. Насупрот том, дифрактограм ЕПС из патогеног соја показао је веома слабо изражен аморфни брег и више кристалних пикова јачег интензитета, што је указало на израженију кристалиничност овог ЕПС.

- Термогравиметријска анализа ЕПС из пробиотског соја показала је вишестепену термичку разградњу ЕПС и губитак воде у два корака, термичку стабилност до температуре разградње од 320,8 °C и да након

450 °C заостаје значајан део масе (42,9 %). ЕПС из патогеног соја је мање термички стабилан и разграђује се на нешто нижим температурама (271,5 °C). Овај ЕПС је показао велики иницијални губитак слободне воде, и да при загревању на 450 °C заостаје велики угљенични остатак (54,9 %). Термичка стабилност оба ЕПС значајна је са аспекта потенцијалне примене у индустријским процесима и синтези биоинжењерских материјала чија обрада захтева високе температуре.

- Различити састави и особине ЕПС директно су утицале на капацитет и кинетику адсорпције јона Ni^{2+}. Оба ЕПС су имала велики капацитет и високу ефикасност уклањања јона Ni^{2+}. У случају аморфнијег, неутралног ЕПС из пробиотског соја утврђена је вредност PZC≈8, максимални капацитет адсорпције 161,0 mgg^{-1} и ефикасност уклањања јона Ni^{2+} од 92 % при pH = 8,0. Одређене изотерме, кинетичка и термодинамичка студија указале су да је процес адсорпције спонтан, ендотерман, енталпијски вођен и да се неуређеност у систему током адсорпције повећава. Механизам адсорпције на ЕПС из *L. reuteri* B2 је претежно физисорпциони, могуће у комбинацији са хемисорпцијом, а дифузија кроз поре има значајан утицај на укупну брзину процеса адсорпције. У датим условима адсорпције динамичка равнотежа успоставља се након 30 минута. Код разгранатог, анјонског и кристаличнијег ЕПС из патогеног соја одређена је вредност PZC ≈ 5, максимални капацитет адсорпције 270,0 mgg^{-1} и ефикасност уклањања > 98 % при pH = 5,5. Одређене изотерме, кинетичка и термодинамичка студија показале су да се адсорпција одвија спонтано, да је процес егзотерман и енталпијски вођен, при чему се неуређеност система повећава током процеса. Механизам адсорпције на ЕПС *K. oxytoca* J7 је комбинација хемисорпције и физисорпције, при чему је ефекат микропреципитације искључен; дифузија кроз поре се дешава брже него у случају ЕПС из пробиотског соја али је укупна брзина адсорпције мања и динамичка равнотежа се успоставља након 60 минута.

- MTT тест показао је да су оба ЕПС, у концентрацијама 0,5 – 2,0 mgL^{-1}, нетоксична на ћелијској линији хуманих фибробласта MRC-5, што указује да би ЕПС оба соја могли бити погодни за даља истраживања у оквиру биотехнологије и развоја биоматеријала. За ЕПС из пробиотског соја је показано ABTS тестом да може имати и добра антиоксидативна својства (висок капацитет уклањања слободних радикала од 76 % при концентрацији 2 mgL^{-1}).

Добијени резултати адсорпције указују да два нова биоматеријала на бази ЕПС имају потенцијал као биосорбенти за уклањање тешких метала из воде. Зато се, ради потенцијалне индустријске примене, за наставак истраживања предлаже оптимизација процеса адсорпције, испитивање са вишекомпонентним узорцима и у реалним условима и испитивање процеса десорпције. Због доброг афинитета према јонима Ni^{2+} за наставак истраживања предлаже се испитивање могућности примене комплекса ЕПС- Ni^{2+} (из соја *K. oxytoca* J7) као јефтиније алтернативе NTA-Ni^{2+} комплексу, ради примене у афинитетној хроматографији за пречишћавање рекомбинантних протеина. Анализе биолошких својстава ЕПС из пробиотског соја *L. reuteri* B2 указују да би он могао имати добра биоактивна својства ЕПС и подржавају идеју о наставку истраживања са овим ЕПС ради стицања бољег увида у његову биоактивност. Даља истраживања би могла обухватити испитивање антиоксидативног потенцијала ЕПС пробиотског соја са различитим врстама слободних радикала и испитивање и оптимизацију својства адхезије пробиотских бактерија, са циљем процене потенцијалне биомедицинске примене, примене у области биотехнологије, прехрамбене и фармацеутске индустрије. С обзиром да је способност производње ЕПС и могућ састав ЕПС генетски предодређен и да фактори средине утичу на експресију ових гена, а да ови сојеви још увек у том смислу нису истражени, још један могући правац у коме би истраживање могло да се настави био би испитивање могућих разлика у саставу, структури и функционалним својствима ЕПС у зависности од састава хранљиве подлоге и ферментационог медијума. Ова истраживања би захтевала мултидисциплинарни приступ и могли би бити полазна тачка за добијање нових, индустријски релевантних, бактеријских сојева генетичким инжењерингом.

Научни допринос овог истраживања се огледа у по први пут извршеној изолацији и карактеризацији ЕПС из бактеријских сојева *L. reuteri* B2 и *K. oxytoca* J7. Такође, извршена процена адсорпционих потенцијала ових ЕПС према тешким металима значајно доприноси проширењу релативно мале научне базе података која се односи на адсорпцију јона никла са биоматеријалима на бази ЕПС. Резултати истраживања пружају основу за будућа мултидисциплинарна истраживања у развоју нових одрживих биоматеријала и њихову примену у биотехнологији и заштити животне средине.

6 ЛИТЕРАТУРА

Abdalla, Abdelmoneim K., Mutamed M. Ayyash, Amin N. Olaimat, Tareq M. Osaili, Anas A. Al-Nabulsi, Nagendra P. Shah, and Richard Holley. 2021. "Exopolysaccharides as Antimicrobial Agents: Mechanism and Spectrum of Activity." *Frontiers in Microbiology* 12. doi: 10.3389/fmicb.2021.664395.

Abid, Yousra, Angela Casillo, Houda Gharsallah, Ichrak Joulak, Rosa Lanzetta, Maria Michela Corsaro, Hamadi Attia, and Samia Azabou. 2018. "Production and Structural Characterization of Exopolysaccharides from Newly Isolated Probiotic Lactic Acid Bacteria." *International Journal of Biological Macromolecules* 108:719–28. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.10.155.

Adewuyi, Adewale. 2020. "Chemically Modified Biosorbents and Their Role in the Removal of Emerging Pharmaceutical waste in the Water System." *Water (Switzerland)* 12(6):1551. doi: 10.3390/w12061551.

Ahmed, Zaheer, Yanping Wang, Nomana Anjum, Asif Ahmad, and Salman Tariq Khan. 2013. "Characterization of Exopolysaccharide Produced by Lactobacillus Kefiranofaciens ZW3 Isolated from Tibet Kefir - Part II." *Food Hydrocolloids* 30(1):343–50. doi: 10.1016/j.foodhyd.2012.06.009.

Ali, Shimaa Kamel, Fathy M. Mohamed, Ahmed H. El-Ghorab, Eman A. Hamed, Moustafa A. Aboel-Ainin, Mohamed A. Abdelgawad, Khaled El-Adl, and Hussein S. Mohamed. 2024. "Biological Activity and Chemical Characteristics Studies of New Oligomannose Produced by Erwinia Gerundensis." *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications* 8:100569. doi:10.1016/J.CARPTA.2024.100569.

Anchal, Singh, Saini Pinki, Srivastava Urvashi, and Kushwaha Radha. 2021. "Biosorption of Cadmium and Lead through Lactobacillus Reuteri and Lactobacillus Plantarum and Its Exopolysaccharides: A Comparative Study." *International Journal of Current Research and Review* 13(15):30–35. doi:10.31782/ijcrr.2021.131507.

Andrew, Monic, and Gurunathan Jayaraman. 2022. "Molecular Characterization and Biocompatibility of Exopolysaccharide Produced by Moderately Halophilic Bacterium Virgibacillus Dokdonensis from the Saltern of Kumta Coast." *Polymers* 14(19). doi: 10.3390/polym14193986.

Arayes, Mervat A., Mona E. M. Mabrouk, Soraya A. Sabry, and Bahaa Abdella. 2023. "Exopolysaccharide Production from Alkalibacillus Sp. W3: Statistical Optimization and Biological Activity." *Biologia* 78(1):229–40. doi: 10.1007/s11756-022-01233-1.

Arserim Ucar, Dilhum Keriman, Dilara Konuk Takma and Figen Korel. 2021. ''Exopolysaccharides in Food Processing Industrials.'' Ashok Kumar Nadda, Kuttuvan Valappil Sajna, and Swati Sharma (Eds.) *Microbial Exopolysaccharides as Novel and Significant Biomaterials*, pp.200-234. Springer. doi: 10.1007/978-3-030-75289-7.

Årsköld, Emma, Malin Svensson, Halfdan Grage, Stefan Roos, Peter Rådström, and Ed W. J. van Niel. 2007. "Environmental Influences on Exopolysaccharide Formation in Lactobacillus Reuteri ATCC 55730." *International Journal of Food Microbiology* 116(1):159–67. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2006.12.010.

Ashruta, Gawali, Vijay D. Nanoty, and V. D. Bhalekar. 2014. "Biosorption of Heavy Metals from Aqueous Solution Using Bacterial EPS." *International Journal of Life Sciences* 2(4):373–77.

Ates, Ozlem. 2015. "Systems Biology of Microbial Exopolysaccharides Production." *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 3:200. doi: 10.3389/fbice.2015.00200.

Bach, Horacio, and David L. Gutnick. 2005. "1Engineering Bacterial Biopolymers for the Biosorption of Heavy Metals." In: Kevin J Yarema (Eds.), *Handbook of Carbohydrate Engineering* 54(4): 507–534, Chapter18. CRC Press. doi:10.1201/9781420027631.ch18.

Bagnol, Romain, Dirk Grijpma, David Eglin, and Fintan Moriarty. 2022. "The Production and Application of Bacterial Exopolysaccharides as Biomaterials for Bone Regeneration." *Carbohydrate Polymers* 291:119550. doi: 10.1016/J.CARBPOL.2022.119550.

Bajpai, Vivek K., Rajib Majumder, Irfan A. Rather, and Kangmin Kim. 2016. "Extraction, Isolation and Purification of Exopolysaccharide from Lactic Acid Bacteria Using Ethanol Precipitation Method." *Bangladesh Journal of Pharmacology* 11(3):573–76. doi:10.3329/bjp.v11i3.27170.

Bannwart, Thays Avelino, Ciomar Aparecida Bersani-Amado, Franciele Queiroz Ames, Vera Lúcia Dias Siqueira, Arildo José Braz de Oliveira, and Regina Aparecida Correia Gonçalves. 2022. "Exopolysaccharides from Klebsiella Oxytoca: Anti-Inflammatory Activity." *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* 58:1–11. doi: 10.1590/s2175-97902022e190511.

Bhattacharyya, Lokesh and Rohrer s. John. 2012. ''Appendix 2: Dissociation constants (pKa) of common sugars and alcohols.'' In: Bhattacharyya L. and Rohrer S. J. (Eds.) *Application of Ion Chromatography for Pharmaceutical and Biological Product.* (pp.455-456). John Wiley & Sons, Ltd. doi: 10.1002/9781118147009.app2.

Beech, Iwona Boguslava, Christine C. Gaylarde, James J. Smith, and Gill G. Geesey. 1991. "Extracellular Polysaccharides from Desulfovibrio Desulfuricans and Pseudomonas Fluorescens in the Presence of Mild and Stainless Steel." *Applied Microbiology and Biotechnology* 35(1):65–71. doi:10.1007/BF00180638.

Begum, Wasefa, Summi Rai, Soujanya Banerjee, Sudip Bhattacharjee, Monohar Hossain Mondal, Ajaya Bhattarai, and Bidyut Saha. 2022. "A Comprehensive Review on the Sources, Essentiality and Toxicological Profile of Nickel." *RSC Advances* 12(15):9139–53.

Benalaya, Ikbel, Gilberto Alves, João Lopes, and Luís R. Silva. 2024. "A Review of Natural Polysaccharides: Sources, Characteristics, Properties, Food, and Pharmaceutical Applications." *International Journal of Molecular Sciences* 25(2):1322. doi. 10.3390/ijms25021322

Benito-Román Oscar, Maria Teresa Sanz, and Sagrario Beltrán. 2024. "Studies of Degradation of Pectin Derived Compounds from Onion Skins in Subcritical Water." *The Journal of Supercritical Fluids* 206:106155. doi:10.1016/J.SUPFLU.2023.106155.

Bibi, Amna, Yongai Xiong, Muhammad Shahid Riaz Rajoka, Hafiza Mahreen Mehwish, Emanuele Radicetti, Muhammad Umair, Mahtab Shoukat, Muhammad Kashif Iqbal Khan, and Rana Muhammad Aadil. 2021. "Recent Advances in the Production of Exopolysaccharide (EPS) from Lactobacillus Spp. and Its Application in the Food Industry: A Review." *Sustainability (Switzerland)* 13(22). doi: 10.3390/su132212429.

Biswas, Jhuma, Jhuma Ganguly, and Anand Kilari Paul. 2015. "Partial Characterization of an Extracellular Polysaccharide Produced by the Moderately Halophilic Bacterium Halomonas Xianhensis SUR308." *Biofouling* 31(9):735–44. doi: 10.1080/08927014.2015.1106479.

Briffa, Jessica, Emmanuel Sinagra, and Renald Blundell. 2020. "Heavy Metal Pollution in the Environment and Their Toxicological Effects on Humans." *Heliyon* 6(9):e04691. doi: 10.1016/j.heliyon.2020.e04691.

Brott, Ashley S., and Anthony J. Clarke. 2019. "Peptidoglycan O-Acetylation as a Virulence Factor: Its Effect on Lysozyme in the Innate Immune System." *Antibiotics* 8(3):94. doi:10.3390/antibiotics8030094.

Cai, Litao, Jitian Li, Songtao Quan, Wei Feng, Junna Yao, Minglu Yang, and Wuyin Li. 2019. "Dextran-Based Hydrogel with Enhanced Mechanical Performance via Covalent and Non-Covalent Cross-Linking Units Carrying Adipose-Derived Stem Cells toward Vascularized Bone Tissue Engineering." *Journal of Biomedical Materials Research - Part A* 107(6):1120–1131. doi: 10.1002/jbm.a.36580.

Cai, Yunpeng, Yinghui Chen, Xiaoyun Hong, Zhenguo Liu, and Weien Yuan. 2013. "Porous Microsphere and Its Applications." *International Journal of Nanomedicine* 8:1111–1120. doi:10.2147/IJN.S41271.

Casillo, Angela, Rosa Lanzetta, Michelangelo Parrilli, and Maria Michela Corsaro. 2018. "Exopolysaccharides from Marine and Marine Extremophilic Bacteria: Structures, Properties, Ecological Roles and Applications." *Marine Drugs* 16(2):69. doi: 10.3390/md16020069.

Castro-Bravo, Nuria, Jerry M. Wells, Abelardo Margolles, and Patricia Ruas-Madiedo. 2018. "Interactions of Surface Exopolysaccharides from Bifidobacteriumand Lactobacillus within the Intestinal Environment." *Frontiers in Microbiology* 9(OCT):1–15. doi:10.3389/fmicb.2018.02426.

Charazińska, Sylwia, Ewa Burszta-Adamiak, and Paweł Lochyński. 2022. ''Recent Trends in Ni(II) Sorption from Aqueous Solutions Using Natural Materials.'' *Reviews in Enviromental Science and Bio/Technology* 21: 105-138. doi: 10.1007/s11157-021-09599-5.

Charoenwongpaiboon, Thanapon, Karan Wangpaiboon, Rath Pichyangkura, Sergey A. Nepogodiev, Piyanuch Wonganan, Panupong Mahalapbutr, and Robert A. Field. 2021. "Characterization of a Nanoparticulate Exopolysaccharide from Leuconostoc Holzapfelii KM01 and Its Potential Application in Drug Encapsulation." *International Journal of Biological Macromolecules* 187:690–698. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2021.07.174.

Chojnacka, Katarzyna. 2010. "Biosorption and Bioaccumulation - the Prospects for Practical Applications." *Environment International* 36(3):299–307. doi: 10.1016/j.envint.2009.12.001.

Chowdhury, Sougata Roy, Ratan Kumar Basak, Ramkrishna Sen, and Basudam Adhikari. 2011. "Characterization and Emulsifying Property of a Carbohydrate Polymer Produced by Bacillus Pumilus UW-02 Isolated from Waste Water Irrigated Agricultural Soil." *International Journal of Biological Macromolecules* 48(4):705–712. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2011.02.019.

Chug, Ravneet, Shruti Mathur, S. L. Kothari, Harish, and Vinod Singh Gour. 2021. "Maximizing EPS Production from Pseudomonas Aeruginosa and Its Application in Cr and Ni Sequestration." *Biochemistry and Biophysics Reports* 26: 100972. doi: 10.1016/j.bbrep.2021.100972.

Concórdio-Reis, Patrícia, Maria A. M. Reis, and Filomena Freitas. 2020. "Biosorption of Heavy Metals by the Bacterial Exopolysaccharide Fucopol." *Applied Sciences (Switzerland)* 10(19):6708. doi: 10.3390/APP10196708.

Corazzari, Ingrid, Roberto Nisticò, Francesco Turci, Maria Giulia Faga, Flavia Franzoso, Silvia Tabasso, and Giuliana Magnacca. 2015. "Advanced Physico-Chemical Characterization of Chitosan by Means of TGA Coupled on-Line with FTIR and GCMS: Thermal Degradation and Water Adsorption Capacity." *Polymer Degradation and Stability* 112:1–9. doi:10.1016/j.polymdegradstab.2014.12.006.

Crowe, Joanne, Brigitte Steude Masone, and Joachim Ribbe. 1996. "One-Step Purification of Recombinant Proteins with the 6xHis Tag and Ni-NTA Resin." In: Harwood J. Adrian (Ed.) *Basic DNA and RNA protocols*. *Methods in Molecular Biology,* 58:491–510, Humana Press *N.J.* doi:10.1385/0-89603-402-x:491.

Cui, Di, Chong Tan, Hongna Deng, Xunxue Gu, Shanshan Pi, Ting Chen, Lu Zhou, and Ang Li. 2020. "Biosorption Mechanism of Aqueous Pb2+, Cd2+, and Ni2+Ions on Extracellular Polymeric Substances (EPS)." *Archaea* 2020:8891543. doi: 10.1155/2020/8891543.

Delattre, Cédric, Céline Laroche, and Philippe Michaud. 2007. ''Production of Microbial and Fungal Polysaccharides.'' In: C. Larroche, A. Pandey, C.G. Dussap (Eds.) *Advances in Fermentattion Technology*, Chapter 18, pp. 484-522. Asiatech Publisher, Inc., New Delhi, India.

Derdak, Reda, Souraya Sakoui, Oana Lelia Pop, Dan Cristian Vodnar, Boutaina Addoum, Abdelhakim Elmakssoudi, Faouzi Errachidi, Ramona Suharoschi, Abdelaziz Soukri, and Bouchra El Khalfi. 2022. "Screening, Optimization and Characterization of Exopolysaccharides Produced by Novel Strains Isolated from Moroccan Raw Donkey Milk." *Food Chemistry X*, 14:100305. doi: 10.1016/j.fochx.2022.100305.

Dhanya, Bythadka Erappa, Athmika, and Punchappady Devasya Rekha. 2021. "Characterization of an Exopolysaccharide Produced by Enterobacter Sp. YU16-RN5 and Its Potential to Alleviate Cadmium Induced Cytotoxicity in Vitro." *3 Biotech* 11(12):491. doi: 10.1007/s13205-021-03034-w.

Dilna, Sasidharan Vasanthakumari, Harikumar Surya, Ravindran Girija Aswathy, Kontham Kulangara Varsha, Dasappan Nair Sakthikumar, Ashok Pandey, and Kesavan Madhavan Nampoothiri. 2015. "Characterization of an Exopolysaccharide with Potential Health-Benefit Properties from a Probiotic Lactobacillus Plantarum RJF4." *LWT – Food Science and Technology* 64(2):1179–1186. doi: 10.1016/j.lwt.2015.07.040.

Dimopoulou Maria and Dols-Lafargue Marguerite. 2021. "Exopolysaccharides Producing Lactic Acid Bacteria in Wine and Other Fermented Beverages: For Better or for Worse?" *Foods* 10(9):2204. doi: 10.3390/foods10092204.

Do, Thi Bich Thuy, Thi Ai Luyen Tran, Thi Van Thi Tran, Trung Hieu Le, Vijay Jayasena, Thi Hong Chuong Nguyen, Chinh Chien Nguyen, Soo Young Kim, and Quyet Van Le. 2020. "Novel Exopolysaccharide Produced from Fermented Bamboo Shoot-Isolated Lactobacillus Fermentum." *Polymers* 12(7):1531. doi: 10.3390/polym12071531.

Dobrowolski, Ryszard, Aleksandra Szcześ, Magdalena Czemierska, and Anna Jarosz-Wikołazka. 2017. "Studies of Cadmium(II), Lead(II), Nickel(II), Cobalt(II) and Chromium(VI) Sorption on Extracellular Polymeric Substances Produced by Rhodococcus Opacus and Rhodococcus Rhodochrous." *Bioresource Technology* 225:113–120. doi: 10.1016/J.BIORTECH.2016.11.040.

Dogsa, Iztok, Barbara Bellich, Mojca Blaznik, Cristina Lagatolla, Neil Ravenscroft, Roberto Rizzo, David Stopar, and Paola Cescutti. 2024. "Bacillus Subtilis EpsA-O: A Novel Exopolysaccharide Structure Acting as an Efficient Adhesive in Biofilms." *Npj Biofilms and Microbiomes* 10(1):98. doi:10.1038/s41522-024-00555-z.

Domon, Bruno, and Catherine E. Costello. 1988. "A Systematic Nomenclature for Carbohydrate Fragmentations in FAB-MS/MS Spectra of Glycoconjugates." *Glycoconjugate Journal* 5(4):397–409. doi:10.1007/BF01049915.

Donot, Florentin, Angelique Fontana, Jean Claude Baccou, and Sabine Schorr-Galindo. 2012. "Microbial Exopolysaccharides: Main Examples of Synthesis, Excretion, Genetics and Extraction." *Carbohydrate Polymers* 87(2):951–962. doi: 10.1016/J.CARBPOL.2011.08.083.

Doyle, Michael P., Larry R. Steenson and Jianghong Meng. 2013. "Bacteria in Food and Beverage production." In: E. Rosenberg, E. F. DeLong, S. Lory, E. Stackebrandt, F. Thompson (Eds.) *The Prokaryotes: Applied Bacteriology and Biotechnology*, Chapter 8, Springer-Verlag Berlin Heidelberg ISBN:9783642313 doi: 10.1007/978-3-642-31331-8.

Duruibe, Joseph, C, Ogwuegbu M. O. C. & Egwurugwu, Jude. 2007. ''Heavy Metal Pollution and Human Biotoxic Effects.'' *International Journal of the Physical Science* 2(5):112 - 118. doi: 10.5897/IJPS.9000289.

El-Deeb, Nehal M., Abdelrahman M. Yassin, Lamiaa A. Al-Madboly, and Amr El-Hawiet. 2018. "A Novel Purified Lactobacillus Acidophilus 20079 Exopolysaccharide, LA-EPS-20079, Molecularly Regulates Both Apoptotic and NF-KB Inflammatory Pathways in Human Colon Cancer." *Microbial Cell Factories* 17(1):29. doi:10.1186/s12934-018-0877-z.

El-naggar, Amal H., Hanan H. Omar, Mohamed Osman, and Gehan Ismail. 2008. "Heavy Metal Binding Capacity of Exopolysaccharides Produced By Anabaena Variabilis and Nostoc Muscorum." *Egyptian Journal of Experimental Biology* 4(0):47–52.

Ermiş, Ertan, Ecem Poyraz, Enes Dertli, and Mustafa Tahsin Yılmaz. 2020. "Optimization of Exopolysaccharide Production of Lactobacillus Brevis E25 Using RSM and Characterization." *Sakarya University Journal of Science* 24:151–60. doi: 10.16984/saufenbilder.545929.

European Union. 2020. "Directive EU 2020/2184 of the European Parliament and of the Council." *Official Journal of the European Union Water Quality* L 453 (63).
https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=OJ:L:2020:435:TOC

Fang, Liping, Wentao Li, Huimin Chen, Feng Xiao, Lizhi Huang, Peter E. Holm, Hans Christian B. Hansen, and Dongsheng Wang. 2015. "Synergistic Effect of Humic and Fulvic Acids on Ni Removal by the Calcined Mg/Al Layered Double Hydroxide." *RSC Advances* 5(24):18866–74. doi: 10.1039/c4ra15406a.

Fedorová, Maria, Radomira Nemcová, Dagmar Mudroňová, Eva Styková, Martina Brudňáková, and Katarina Reiffová. 2018. "Exopolysaccharides May Increase Gastrointestinal Stress Tolerance of Lactobacillus Reuteri ." *Folia Veterinaria* 62(4):24–32. doi: 10.2478/fv-2018-0034.

Feng, Lei, Xiufen Li, Guocheng Du, and Jian Chen. 2009. "Characterization and Fouling Properties of Exopolysaccharide Produced by Klebsiella Oxytoca." *Bioresource Technology* 100(13):3387–3394. doi: 10.1016/j.biortech.2009.02.016.

Filote, Cătălina, Mihaela Roşca, Raluca Maria Hlihor, Petronela Cozma, Isabela Maria Simion, Maria Apostol, and Maria Gavrilescu. 2021. "Sustainable Application of Biosorption and Bioaccumulation of Persistent Pollutants in Wastewater Treatment: Current Practice." *Processes* 9(10):1696. doi: 10.3390/pr9101696.

Flemming, Hans Curt, and Jost Wingender. 2010. "The Biofilm Matrix." *Nature Reviews Microbiology* 8(9):623–633.

Fomina, Marina, and Geoffrey Michael Gadd. 2014. "Biosorption: Current Perspectives on Concept, Definition and Application." *Bioresource Technology* 160:3–14. doi: 10.1016/j.biortech.2013.12.102.

Fontana, Carolina, and Göran Widmalm. 2023. "Primary Structure of Glycans by NMR Spectroscopy." *Chemical Reviews* 123(3):1040–1102. doi:10.1021/acs.chemrev.2c00580.

Formosa-Dague, Cécile, Mickaël Castelain, Hélène Martin-Yken, Karen Dunker, Etienne Dague, and Marit Sletmoen. 2018. "The Role of Glycans in Bacterial Adhesion to Mucosal Surfaces: How Can Single-Molecule Techniques Advance Our Understanding?" *Microorganisms* 6(2):39. doi:10.3390/microorganisms6020039.

Freitas, Filomena, Vitor D. Alves, and Maria A. M. Reis. 2011. "Advances in Bacterial Exopolysaccharides: From Production to Biotechnological Applications." *Trends in Biotechnology* 29(8):388–398. doi:10.1016/j.tibtech.2011.03.008.

Gadd, Geoffrey Michael. 2009. "Biosorption: Critical Review of Scientific Rationale, Environmental Importance and Significance for Pollution Treatment." *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 84(1):13–28. doi: 10.1002/jctb.1999.

Gangalla, Ravi, Baswaraju Macha, Sarika Kasarla, Rakesh Eerla, and Raja Komuraiah Thampu. n.d. "Anti-inflammatory activity of the exopolysaccharides (EPS) produced from polluted soil." *International Journal of Pharmacy and Biological* Sciences 8(1):623-631. doi: 10.21276/ijpbs.2018.8.1.78.

Genchi, Giuseppe, Alessia Carocci, Graziantonio Lauria, Maria Stefania Sinicropi, and Alessia Catalano. 2020. "Nickel: Human Health and Environmental Toxicology." *International Journal of Environmental Research and Public Health* 17(3):679. doi:10.3390/ijerph17030679.

George, Ashish, Mavinkere Rangappa Sanjay, Rapeeporn Srisuk, Jyotishkumar Parameswaranpillai, and Suchart Siengchin. 2020. "A Comprehensive Review on Chemical Properties and Applications of Biopolymers and Their Composites." *International Journal of Biological Macromolecules* 154:329–338. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.03.120.

Ghanaim, Amira Mohamed, Heba I. Mohamed, and Abeer E. El-Ansary. 2025. "Production and Characterization of Exopolysaccharides from Pseudomonas Aeruginosa AG01 with Some Medical Potential Applications." *Microbial Cell Factories* 24(1):107. doi:10.1186/s12934-025-02730-z.

Ghimire, Hemendra, Mahathi Venkataramani, Zhen Bian, Yuan Liu, and A. G. Unil Perera. 2017. "ATR-FTIR Spectral Discrimination between Normal and Tumorous Mouse Models of Lymphoma and Melanoma from Serum Samples." *Scientific Reports* 7(1):16993. doi:10.1038/s41598-017-17027-4.

Ghiorghita, Claudiu Augustin, Maria Valentina Dinu, Maria Marinela Lazar, and Ecaterina Stela Dragan. 2022. "Polysaccharide-Based Composite Hydrogels as Sustainable Materials for Removal of Pollutants from Wastewater." *Molecules* 27(23):8574. doi: 10.3390/molecules27238574.

Giordani Barbara, Naldi Marina, Croatti Vanessa, Parolin Carola, Erdoğan Ülfet, Bartolini Manuela, Vitali Beatrice. 2023. "Exopolysaccharides from vaginal lactobacilli modulate microbial biofilms." *Microbial Cell Factories* 22(1):45. doi: 10.1186/s12934-023-02053-x.

Gonzalez-Gil, Graciela, Ludivine Thomas, Abdul Hamid Emwas, Piet N. L. Lens, and Pascal E. Saikaly. 2015. "NMR and MALDI-TOF MS Based Characterization of Exopolysaccharides in Anaerobic Microbial Aggregates from Full-Scale Reactors." *Scientific Reports* 5:14316. doi: 10.1038/srep14316.

Grobben, Gert J., Willemikek H. M. Van Casteren, Henk A. Schols, A. Oosterveld, Gabriela Sala, Martin R. Smith, Jan Sikkema, and Jan A. M. De Bont. 1997. "Analysis of the Exopolysaccharides Produced by Lactobacillus Delbrueckii Subsp. Bulgaricus NCFB 2772 Grown in Continous Culture on Glucose and Fructose." *Applied Microbiology and Biotechnology* 48(4):516–521. doi:10.1007/s002530051089.

Guarín-Romero, Jhonatan R., Paola Rodríguez-Estupiñán, Liliana Giraldo, and Juan Carlos Moreno-Piraján. 2019. "Simple and Competitive Adsorption Study of Nickel (II) and Chromium (III) on the Surface of the Brown Algae Durvillaea Antarctica Biomass." *ACS Omega* 4(19):18147–18158. doi:10.1021/acsomega.9b02061.

Gupta, Pratima, and Batul Diwan. 2017. "Bacterial Exopolysaccharide Mediated Heavy Metal Removal: A Review on Biosynthesis, Mechanism and Remediation Strategies." *Biotechnology Reports* 13:58–71. doi: 10.1016/j.btre.2016.12.006.

Gupta, Vinod Kumar, Arunima Nayak, and Shilpi Agarwal. 2015. "Bioadsorbents for Remediation of Heavy Metals: Current Status and Their Future Prospects." *Environmental Engineering Research* 20(1):1–18. doi.10.4491/eer.2015.018

Häffele, Florian, Lucas Jakob, and Hermann Nirschl. 2022. "Isolation of Bacterial Exopolysaccharides from Streptococcus Thermophilus via Dynamic Cross Flow Filtration in

Pilot Scale." *Separation and Purification Technology* 300:121698. doi: 10.1016/J.SEPPUR.2022.121698.

Han, Kiseok, Kumar Vishven Naveen, Xin Zhang, Anbazhagan Sathiyaseelan, and Hye Yong Kim. 2025. "Cellular Antioxidant Potential and Cytotoxic Activities of Extracellular Polysaccharides Isolated from Lactobacillus Graminis Strain KNUAS018." *Polysaccharides* 6(2):33. doi:10.3390/polysaccharides6020033.

Hancock, Robert D., and Arthur E. Martell. 1996. "Hard and Soft Acid-Base Behavior in Aqueous Solution: Steric Effects Make Some Metal Ions Hard a Quantitative Scale of Hardness-Softness for Acids and Bases." *Journal of Chemical Education* 73(7):654.doi: 10.1021/ed073p654.

Harnagel, Alexa P., Mia Sheshova, Meng Zheng, Maggie Zheng, Karolina Skorupinska-Tudek, Ewa Swiezewska, and Tania J. Lupoli. 2023. "Preference of Bacterial Rhamnosyltransferases for 6-Deoxysugars Reveals a Strategy To Deplete O-Antigens." *Journal of the American Chemical Society* 145(29):15639–15646. doi:10.1021/jacs.3c03005.

Hassan, Md. Rakib, Farhana Yasmin, Fatema Khayrun Noor, Md. Shahriar Rahman, Md. Sahab Uddin, and Snahasish Bhowmik 2023. "Synthesis and Applications of Nickel Nanoparticles (NiNPs)- Comprehensive Review." *Journal of Ultra Chemistry* 19(1):9–37. doi:10.22147/juc/190102.

Hayet, Showkat, Khaled Mahmud Sujan, Afrina Mustari, and Mohammad Alan Miah. 2021. "Hemato-Biochemical Profile of Turkey Birds Selected from Sherpur District of Bangladesh." *International Journal of Advanced Research in Biological Sciences* 8(6):1–5. doi: 10.22192/ijarbs.

Ho, Yuhshan S., and Gordon Mckay. 1999. ''Pseudo-Second Order Model for Sorption Processes''. *Process Biochemistry* 34(5): 451-465. doi: 10.1016/S0032-9592(98)00112-5.

Hong, Tao, Jun Yi Yin, Shao Ping Nie, and Ming Yong Xie. 2021. "Applications of Infrared Spectroscopy in Polysaccharide Structural Analysis: Progress, Challenge and Perspective." *Food Chemistry X*, 12:100168. doi: 10.1016/j.fochx.2021.100168.

Hu, Jingfei, Xueqing Tian, Tong Wei, Hangjie Wu, Jing Lu, Mingsheng Lyu, and Shujun Wang. 2021. "Anti-Helicobacter Pylori Activity of a Lactobacillus Sp. Pw-7 Exopolysaccharide." *Foods* 10(10):2453. doi: 10.3390/foods10102453.

Huang, Lei, Yinie Jin, Danheng Zhou, Linxin Liu, Shikun Huang, Yaqi Zhao, and Yucheng Chen. 2022. "A Review of the Role of Extracellular Polymeric Substances (EPS) in Wastewater Treatment Systems." *International Journal of Environmental Research and Public Health* 19(19):12191. doi: 10.3390/ijerph191912191.

Hyrslova, Ivana, Vladimir Drab, Jaromir Cihlar, Gabriela Krausova, Iva Mrvikova, Antonin Kana, Jiri Stetina, and Sarka Musilova. 2023. "Functional and Probiotic Characterization of Newly

Isolated Strains from Infant Feces and Breast Milk." *Fermentation* 9(11):960. doi:10.3390/fermentation9110960.

Ibrahim, Medhat, Moussa Alaam, Hanan El-Haes, Abraham F. Jalbout, and Aned De Leon. 2006. "Analysis of the Structure and Vibrational Spectra of Glucose and Fructose." *Ecletica Quimica* 31(3):15–21. doi:10.1590/S0100-46702006000300002.

Iñiguez-Moreno, Maricarmen, Juan Arturo Ragazzo-sánchez, and Montserrat Calderón-santoyo. 2021. "An Extensive Review of Natural Polymers Used as Coatings for Postharvest Shelf-life Extension: Trends and Challenges." *Polymers* 13(19):3271. doi: 10.3390/polym13193271.

Ismail, Bindhumol, and Kesavan Madhavan Nampoothiri. 2014. "Molecular Characterization of an Exopolysaccharide from a Probiotic Lactobacillus Plantarum MTCC 9510 and Its Efficacy to Improve the Texture of Starchy Food." *Journal of Food Science and Technology* 51(12):4012–4018. doi:10.1007/s13197-013-0928-8.

Jadav, Mahima, Deep Pooja, David J. Adams, and Hitesh Kulhari. 2023. "Advances in Xanthan Gum-Based Systems for the Delivery of Therapeutic Agents." *Pharmaceutics* 15(2):402. doi: 10.3390/pharmaceutics15020402.

Jaseera K.V. and Thasneem Abdulla.2021. ''Microbial EPS as Immunomodulatory Agents.'' Ashok Kumar Nadda, Kuttuvan Valappil Sajna, and Swati Sharma (Eds.) *Microbial Exopolysaccharides as Novel and Significant Biomaterials*, pp.235-264. Springer. doi: 10.1007/978-3-030-75289-7.

Jeckelmann Jean-Marc and Erni Bernhard. 2020. "Transporters of glucose and other carbohydrates in bacteria." *Pflügers Archive – European Journal of Physiology* 472(9):1129-1153. doi: 10.1007/s00424-020-02379-0.

Jiang, Guangyang, Longzhan Gan, Xiaoguang Li, Juan He, Shihao Zhang, Jia Chen, Ruoshi Zhang, Zhe Xu, and Yongqiang Tian. 2021. "Characterization of Structural and Physicochemical Properties of an Exopolysaccharide Produced by Enterococcus Sp. F2 From Fermented Soya Beans." *Frontiers in Microbiology* 12:744007. doi: 10.3389/fmicb.2021.744007.

Jin, Hui, Yunju Jeong, Sang Ho Yoo, Tony V. Johnston, Seockmo Ku, and Geun Eog Ji. 2019. "Isolation and Characterization of High Exopolysaccharide-Producing Weissella Confusa VP30 from Young Children's Feces." *Microbial Cell Factories* 18(1):110. doi:10.1186/s12934-019-1158-1.

Jivkova, Desislava, Ganesan Sathiyanarayanan, Mourad Harir, Norbert Hertkorn, Philippe Schmitt-Kopplin, Ghislain Sanhaji, Sylvain Fochesato, Catherine Berthomieu, Alain Heyraud, Wafa Achouak, Catherine Santaella, and Thierry Heulin. 2022. "Production and Characterization of a Novel Exopolysaccharide from Ramlibacter Tataouinensis." *Molecules* 27(21):7172. doi: 10.3390/molecules27217172.

Ju, Jung-hyun, Sang-gyu Jeon, Sun-yeon Heo, Ji-soo Kim, Min-ho Jo, Min-soo Kim, Chul-ho Kim, and Baek-rock Oh. 2023. "Synbiotics Production Using Lactobacillus Reuteri EC01 , a Strain That Produces Alternan-Type Exopolysaccharide." *LWT -Food Science and Technology* 182:114814. doi: 10.1016/j.lwt.2023.114814.

Jurášková, Dominika, Susana C. Ribeiro, and Celia C. G. Silva. 2022. "Exopolysaccharides Produced by Lactic Acid Bacteria: From Biosynthesis to Health-Promoting Properties." *Foods* 11(2):156. doi: 10.3390/foods11020156.

Kalimuthu, Arjun Kumar, Sureshbabu Ram, Kumar Pandian, Pavadai Parasuraman, Shanmugampillai Jeyaraguru Kabilan, Murugesan Sankaranarayanan, Ala Chandu, and Selvaraj Kunjiappan. 2023. "Drug Delivery Applications of Exopolysaccharides from Endophytic Bacteria Pseudomonas Otitidis from Tribulus Terrestris L." *Journal of Polymers and the Environment* 31(8):1-18. doi: 10.21203/rs.3.rs-2534155/v1.

Kalita, Debajit, and Santaram R. Joshi. 2017. "Study on Bioremediation of Lead by Exopolysaccharide Producing Metallophilic Bacterium Isolated from Extreme Habitat." *Biotechnology Reports* 16:48–57. doi: 10.1016/j.btre.2017.11.003.

Kambourova, Margarita, E. Toksoy Oner, and Annarita Poli. 2015. "Exopolysaccharides from Prokaryotic Microorganisms-Promising Sources for White Biotechnology Processes." In: Ashok Pandey, Rainer Höfer, Mohammad Taherzadeh, K. Madhavan Nampoothiri, Christian Larroche (Eds.) *Industrial Biorefineries and White Biotechnology*, Chapter 15, pp. 523–554. Elsevier. doi: 10.1016/B978-0-444-63453-5.00017-3

Kanamarlapudi, Sri Lakshmi Ramya Krishna, and Sudhamani Muddada. 2017. "Characterization of Exopolysaccharide Produced by Streptococcus Thermophilus CC30." *BioMed Research International* 2017:4201809. doi: 10.1155/2017/4201809.

Kasra Kermanshahi, Rouha, Gholamreza Jahed Khaniki, and Leila Goudarzi. 2023. ''Biosorption of Cd +2 and Pb +2 by Exopolysaccharide Extracted from Lactobacillus Fermentum 6b; Adsorption Isotherm and Kinetic Studies.'' *Iranian Journal of Public Health* Vol. 52(3): 622-632. doi: 10.18502/ijph.v52i3.12145.

Ke, Cai Ling, Fu Sheng Deng, Chih Yu Chuang, and Ching Hsuan Lin. 2021. "Antimicrobial Actions and Applications of Chitosan." *Polymers* 13(6):904. doi:10.3390/polym13060904.

Khadka, Saroj, Brooke E. Ring, Drew A. Pariseau, and Laura A. Mike. 2023. "Characterization of Klebsiella Pneumoniae Extracellular Polysaccharides." *Current Protocols* 3(11):e937. doi:10.1002/cpz1.937.

Kianpour, Sedigheh, Alireza Ebrahiminezhad, Milad Mohkam, Ali Mohammad Tamaddon, Ali Dehshahri, Reza Heidari, and Younes Ghasemi. 2017. "Physicochemical and Biological Characteristics of the Nanostructured Polysaccharide-Iron Hydrogel Produced by

Microorganism Klebsiella Oxytoca." *Journal of Basic Microbiology* 57(2):132–40. doi: 10.1002/jobm.201600417.

Koo Hyun, Falsetta Megan L. and Klein Mitch I. 2013. "The exopolysaccharide matrix: a virulence determinant of cariogenic biofilm." *Journal of Dental Research* 92(12):1065-1073. doi: 10.1177/0022034513504218.

Korcz, Evelin, and László Varga. 2021. "Exopolysaccharides from Lactic Acid Bacteria: Techno-Functional Application in the Food Industry." *Trends in Food Science and Technology* 110:375–384. doi: 10.1016/j.tifs.2021.02.014.

Kothari, Damini, Deeplina Das, Seema Patel, and Arun Goyal. 2014. "Dextran and Food Application." In: Ramawat, K., Mérillon, JM. (Eds.) *Polysaccharides*. Springer Inc. Publishing. pp 1–16. doi: 10.1007/978-3-319-03751-6_66-1.

Kowsalya, Mariyappan, Thangavel Velmurugan, R. Mythili, Woong Kim, Kattakgounder Govindaraj Sudha, Saheb Ali, Balakrishnan Kalpana, Srinivasan Ramalingam, and Mohan Prasanna Rajeshkumar. 2023. "Extraction and Characterization of Exopolysaccharides from Lactiplantibacillus Plantarum Strain PRK7 and PRK 11, and Evaluation of Their Antioxidant, Emulsion, and Antibiofilm Activities." *International Journal of Biological Macromolecules* 242(Pt 2):124842. doi: 10.1016/J.IJBIOMAC.2023.124842.

Krishnamurthy, Mathivanan, Chandirika Jayaraman Uthaya, Mathimani Thangavel, Vinothkanna Annadurai, Rajaram Rajendran, and Annadurai Gurusamy. 2020. "Optimization, Compositional Analysis, and Characterization of Exopolysaccharides Produced by Multi-Metal Resistant Bacillus Cereus KMS3-1." *Carbohydrate Polymers* 227:115369. doi: 10.1016/j.carbpol.2019.115369.

Kuleyin, Ayşe, and Hülya Erikli Uysal. 2020. "Recovery of Copper Ions from Industrial Wastewater by Electrodeposition." *International Journal of Electrochemical Science* 15(2):1474–1485. doi: 10.20964/2020.02.39.

Lakzian, Amir, A. R. Berenji, E. Karimi and S. Razavi. 2008. *''Adsorption Capability of Lead, Nickel and Zinc by Exopolysaccharide and Dried Cell of Ensifer meliloti.'' Asian Journal oF Chemistry* 20(8): 6075-6080.

Landersjö, Clas, Zhennai Yang, Eine Huttunen, and Göran Widmalm. 2002. "Structural Studies of the Exopolysaccharide Produced by Lactobacillus Rhamnosus Strain GG (ATCC 53103)." *Biomacromolecules* 3(4):880–84. doi:10.1021/bm020040q.

Lembre, Pierre, Cecile Lorentz, and Patrick Di. 2012. "Exopolysaccharides of the Biofilm Matrix: A Complex Biophysical World." In: Kurunaratne, Desiree Nedra (Ed.) *The Complex World of Polysaccharides*, Chapter 13. IntechOpen, London. doi:10.5772/51213.

Leroy, Frédéric, and Luc De Vuyst. 2016. "Advances in Production and Simplified Methods for Recovery and Quantification of Exopolysaccharides for Applications in Food and Health." *Journal of Dairy Science* 99(4):3229–38. doi: 10.3168/jds.2015-9936.

Li, Chao, Yue Yu, Aisheng Fang, Duo Feng, Min Du, Anqi Tang, Sheng Chen, and An Li. 2022. "Insight into Biosorption of Heavy Metals by Extracellular Polymer Substances and the Improvement of the Efficacy: A Review." *Letters in Applied Microbiology* 75(5):1064–73. doi: doi: 10.1111/lam.13563.

Li, Hongyan, Lianxin Liu, Jianguo Cui, Jiali Cui, Fang Wang, and Feng Zhang. 2020. "High-Efficiency Adsorption and Regeneration of Methylene Blue and Aniline onto Activated Carbon from Waste Edible Fungus Residue and Its Possible Mechanism." *RSC Advances* 10(24):14262–14273. doi: 10.1039/d0ra01245a.

Li, Na, Wenjun Mao, Mengxia Yan, Xue Liu, Zheng Xia, Shuyao Wang, Bo Xiao, Chenglong Chen, Lifang Zhang, and Sujian Cao. 2015. "Structural Characterization and Anticoagulant Activity of a Sulfated Polysaccharide from the Green Alga Codium Divaricatum." *Carbohydrate Polymers* 121:175–182. doi: 10.1016/j.carbpol.2014.12.036.

Li, Ningjie, Jie Liu, Rui Yang, and Lei Wu. 2020. "Distribution, Characteristics of Extracellular Polymeric Substances of Phanerochaete Chrysosporium under Lead Ion Stress and the Influence on Pb Removal." *Scientific Reports* 10(1):17633. doi: 10.1038/s41598-020-74983-0.

Li, Qiuhua, Weifeng Song, Mengge Sun, Jiayao Li, and Zefeng Yu. 2019. "Composition Change and Adsorption Performance of EPS from Bacillus Vallismortis Sp. Induced by Na2S." *Ecotoxicology and Environmental Safety* 185:109679. doi: 10.1016/j.ecoenv.2019.109679.

Liu, Hu Y., Chunhui H. Fang, Yan Fang, Yuan Q. Zhou, Haiwen W. Ge, Fayan Y. Zhu, Pu Chao Sun, and Juntian T. Miao. 2016. "Characterizing Ni (II) Hydration in Aqueous Solution Using DFT and EXAFS." *Journal of Molecular Modeling* 22(1):1–9. doi:10.1007/s00894-015-2871-2.

Liu, Tao, Kang Zhou, Sheng Yin, Shuliang Liu, Yuanting Zhu, Yong Yang, and Chengtao Wang. 2019. "Purification and Characterization of an Exopolysaccharide Produced by Lactobacillus Plantarum HY Isolated from Home-Made Sichuan Pickle." *International Journal of Biological Macromolecules* 134:516–26. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.05.010.

Liu, Yang, M. C. Lam, and Herbert H. P. Fang. 2001. "Adsorption of Heavy by EPS of Activated Sludge." *Water Science and Technology* 43(6):59–66. doi: 10.2166/wst.2001.0340.

Liu, Yihao, Zhen Qin, Chunling Wang, Zhengqiang Jiang. 2023. "N-acetyl-d-glucosamine-based oligosaccharides from chitin: Enzymatic production, characterization and biological activities." *Carbohydrate Polymers* 315(5):121019. doi:10.1016/j.carbpol.2023.121019.

Liu, Yu. 2009. "Is the Free Energy Change of Adsorption Correctly Calculated ?" *Journal of Chemical & Engineering Data* 54(7):1981–1985.doi: 10.1021/je800661q

Liu, Zhengqi, Zhihong Zhang, Liang Qiu, Fen Zhang, Xiongpeng Xu, Hua Wei, and Xueying Tao. 2017. "Characterization and Bioactivities of the Exopolysaccharide from a Probiotic Strain of Lactobacillus Plantarum WLPL04." *Journal of Dairy Science* 100(9):6895–6905. doi: 10.3168/jds.2016-11944.

Lv, Longyi, Ziyin Wei, Weiguang Li, Jiarui Chen, Yu Tian, Wenfang Gao, Pengfei Wang, Li Sun, Zhijun Ren, Guangming Zhang, Xiaoyang Liu, and Huu Hao Ngo. 2024. "Regulation of Extracellular Polymers Based on Quorum Sensing in Wastewater Biological Treatment from Mechanisms to Applications: A Critical Review." *Water Research* 250:121057. doi:10.1016/J.WATRES.2023.121057.

Lynch, Kieran M., Emanuele Zannini, Aidan Coffey, and Elke K. Arendt. 2018. "Lactic Acid Bacteria Exoploysaccharides in Foods and Beverages: Isolation, Properties, Characterization, and Health Benefits." *Annual Review of Food Science and Technology* 9:155–176. doi: 10.1146/annurev-food-030117.

Ma, Zhongqing, Junhao Wang, Youyou Yang, Yu Zhang, Chao Zhao, Youming Yu, and Shurong Wang. 2018. "Comparison of the Thermal Degradation Behaviors and Kinetics of Palm Oil Waste under Nitrogen and Air Atmosphere in TGA-FTIR with a Complementary Use of Model-Free and Model-Fitting Approaches." *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 134:12–24. doi:10.1016/J.JAAP.2018.04.002.

Maddela, Naga Raju, Laura Svalvenzi and Matteo Radice. 2021. ''Novel Insights of Microbial Exopolysaccharides as Bio-adsorbents for the Removal of Heavy Metals from Soil and Wastewater.'' Ashok Kumar Nadda, Kuttuvan Valappil Sajna, and Swati Sharma (Eds.) *Microbial Exopolysaccharides as Novel and Significant Biomaterials*, pp.265-283. Springer. doi: 10.1007/978-3-030-75289-7.

Massoud, Ramona, Kianoush Khosravi-Darani, Anoosheh Sharifan, Gholam Hassan Asadi, and Allaleh Zoghi. 2020. "Lead and Cadmium Biosorption from Milk by Lactobacillus Acidophilus ATCC 4356." *Food Science and Nutrition* 8(4):5284–5291. doi: 10.1002/fsn3.1825.

Mehta, Krina, Arpit Shukla, and Meenu Saraf. 2021. "Articulating the Exuberant Intricacies of Bacterial Exopolysaccharides to Purge Environmental Pollutants." *Heliyon* 7(11):e08446. doi: 10.1016/j.heliyon.2021.e08446.

Melo, Marcos R. S., Judith P. A. Feitosa, Ana L. P. Freitas, and Regina C. M. De Paula. 2002. ''Isolation and Characterization of Soluble Sulfated Polysaccharide from the Red Seaweed Gracilaria Cornea.'' *Carbohydrate Polymers* 49(4): 491-498, doi: 10.1016/S0144-8617(02)0006-1.

Meng, Meng, Dai Cheng, Lirong Han, Yuanyuan Chen, and Chunling Wang. 2017. "Isolation, Purification, Structural Analysis and Immunostimulatory Activity of Water-Soluble Polysaccharides from Grifola Frondosa Fruiting Body." *Carbohydrate Polymers* 157:1134–43. doi: 10.1016/j.carbpol.2016.10.082.

Miao, Ming, Yajun Ma, Chao Huang, Bo Jiang, Steve W. Cui, and Tao Zhang. 2015. "Physicochemical Properties of a Water Soluble Extracellular Homopolysaccharide from Lactobacillus Reuteri SK24.003." *Carbohydrate Polymers* 131:377–383. doi: 10.1016/j.carbpol.2015.05.066.

Michalak, Izabela, Katarzyna Chojnacka, and Anna Witek-krowiak. 2013. "State of the Art for the Biosorption Process — a Review." *Applied Biochemistry and Biotechnology* 170: 1389–1416. doi: 10.1007/s12010-013-0269-0.

Milošević, Milena D., Aleksandar D. Marinković, Predrag Petrović, Anita Klaus, Milica G. Nikolić, Nevena Prlainović, and Ilija N. Cvijetić. 2020. "Synthesis, Characterization and SAR Studies of Bis(Imino)Pyridines as Antioxidants, Acetylcholinesterase Inhibitors and Antimicrobial Agents." *Bioorganic Chemistry* 102:104073. doi: 10.1016/j.bioorg.2020.104073.

Mishra, Avinash, and Bhavanath Jha. 2013. "Microbial Exopolysaccharides." In: E. Rosenberg, E. F. DeLong, S. Lory, E. Stackebrandt, F. Thompson (Eds.) *The Prokaryotes: Applied Bacteriology and Biotechnology*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 5: 179–92. doi: 10.1007/978-3-642-31331-8 25.

Mohamed, Dorria H., Haitham Mohammed, Reem H. El-Gebaly, Mohamed Adam, and Fadel M. Ali. 2024. "Pulsed Electric Field at Resonance Frequency Combat Klebsiella Pneumonia Biofilms." *Applied Microbiology and Biotechnology* 108(1):505. doi:10.1007/s00253-024-13330-z.

Morillo, Pérez, José Antonio, Rafael García-Ribera, Teresa Quesada, Margarita Aguilera, Alberto Ramos-Cormenzana, and Mercedes Monteoliva-Sánchez. 2008. "Biosorption of Heavy Metals by the Exopolysaccharide Produced by Paenibacillus Jamilae." *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 24(11):2699–2704. doi: 10.1007/s11274-008-9800-9.

Mosharaf, M. Khaled, Mohammad Z. H. Tanvir, Manjurul M. Haque, Mamunul A. Haque, M. A. A. Khan, Abdul Hossain Molla, Mohammad Z. Alam, Mahbubal S. Islam, and M. Raihan Talukder. 2018. "Metal-Adapted Bacteria Isolated from Wastewaters Produce Biofilms by Expressing Proteinaceous Curli Fimbriae and Cellulose Nanofibers." *Frontiers in Microbiology* 9:1334. doi: 10.3389/fmicb.2018.01334.

Munir Ahamed, Johnthini, Hans Uwe Dahms, and Yeou Lih Huang. 2024. "Heavy Metal Tolerance, and Metal Biosorption by Exopolysaccharides Produced by Bacterial Strains Isolated from Marine Hydrothermal Vents." *Chemosphere* 351:141170. doi: 10.1016/J.CHEMOSPHERE.2024.141170.

Mustafa, Syed, B. Dilara, K. Nargis, A. Naeem, and P. Shahida. 2002. ''Surface Properties of the Mixed Oxides of Iron and Silica.'' *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 205 (3): 273-282. doi:10.1016/S0927-7757(02)00025-0.

Mwandira, Wilson, Kazunori Nakashima, Satoru Kawasaki, Allison Arabelo, Kawawa Banda, Imasiku Nyambe, Meki Chirwa, Mayumi Ito, Tsutomu Sato, Toshifumi Igarashi, Hokuto

Nakata, Shouta Nakayama, and Mayumi Ishizuka. 2020. "Biosorption of Pb (II) and Zn (II) from Aqueous Solution by Oceanobacillus Profundus Isolated from an Abandoned Mine." *Scientific Reports* 10(1):21189. doi: 10.1038/s41598-020-78187-4.

Nachtigall, Carsten, Harald Rohm, and Doris Jaros. 2021. "Degradation of Exopolysaccharides from Lactic Acid Bacteria by Thermal, Chemical, Enzymatic and Ultrasound Stresses." *Foods* 10(2):396. doi: 10.3390/foods10020396.

Naja, Ghinwa, Volesky, Bohumil (2011). ''The Mechanism of Metal Cation and Anion Biosorption.'' In: Kotrba, P., Mackova, M., Macek, T. (Eds.) *Microbial Biosorption of Metals*. Springer, Dordrecht. Doi:10.1007/978-94-007-0443-5_3.

Netrusov, Alexander I., Elena V. Liyaskina, Irina V. Kurgaeva, Alexandra U. Liyaskina, Guang Yang, and Viktor V. Revin. 2023. "Exopolysaccharides Producing Bacteria: A Review." *Microorganisms* 11(6): 1541. doi: 10.3390/microorganisms11061541.

Newman, Patricia Pantoja, Brenda Landvoigt Schmitt, Rafael Moura Maurmann, and Brandt D. Pence. 2025. "Polysaccharides with Arabinose: Key Players in Reducing Chronic Inflammation and Enhancing Immune Health in Aging." *Molecules* 30(5):1178. doi.10.3390/molecules30051178.

Nguyen, Phu-Tho, and Huu-Thanh Nguyen. 2024. "Antioxidant Property and Structural Characteristics of Exopolysaccharides Derived from Lactiplantibacillus Plantarum VAL6." *Discover Bacteria* 1(1):6. doi:10.1007/s44351-024-00004-4.

Nicolaus, Barbara, Margarita Kambourova, and Ebru Toksoy Oner. 2010. "Exopolysaccharides from Extremophiles: From Fundamentals to Biotechnology." *Environmental Technology* 31(10):1145–1158.

Nielen, Michel W. F. 1999. ''Maldi Time-Of-Flight Mass Spectrometry Of Synthetic Polymers.'' *Mass Spectrometry Reviews* 18(5): 309-344. doi: 10.1002/(sici)1098-2787.

Nikonenko, Nataliya A., Dmitri K. Buslov, Nataliya I. Sushko, and Rostislav G. Zhbankov. 2005. "Spectroscopic Manifestation of Stretching Vibrations of Glycosidic Linkage in Polysaccharides." *Journal of Molecular Structure* 752(1-3):20-24. doi: 10.1016/j.molstruc.2005.05.015.

Nkoh, Jackson, Jing Yan, Zhi neng Hong, Ren kou Xu, Muhammad Aqeel Kamran, Jiang Jun, and Jiu yu Li. 2019. "An Electrokinetic Perspective into the Mechanism of Divalent and Trivalent Cation Sorption by Extracellular Polymeric Substances of Pseudomonas Fluorescens." *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 183. doi: 10.1016/j.colsurfb.2019.110450.

Noman, Efaq, Adel Al-Gheethi, Radin Maya Saphira Radin Mohamed, Mohamed Al-Sahari, Md Sohrab Hossain, Dai Viet N. Vo, and M. Naushad. 2022. "Sustainable Approaches for Nickel

Removal from Wastewater Using Bacterial Biomass and Nanocomposite Adsorbents: A Review." *Chemosphere* 291:132862. doi:10.1016/J.CHEMOSPHERE.2021.132862.

Nomura, Takashi, Eiji Minami, and Haruo Kawamoto. 2021. "Hydroxymethylfurfural as an Intermediate of Cellulose Carbonization." *ChemistryOpen* 10(6):610–617. doi:10.1002/open.202000314.

Nouha, Klai, Ram Saurabh Kumar, Sellamuthu Balasubramanian, and Rajeshwar Dayal Tyagi. 2018. "Critical Review of EPS Production, Synthesis and Composition for Sludge Flocculation." *Journal of Environmental Sciences (China)* 66:225–245. doi: 10.1016/j.jes.2017.05.020.

Nwodo, Uchechukwu U., Ezekiel Green, and Anthony I. Okoh. 2012. "Bacterial Exopolysaccharides: Functionality and Prospects." *International Journal of Molecular Sciences* 13(11):14002–14015. doi: 10.3390/ijms131114002.

Obruca, Stanislav, Pavla Benesova, Sinisa Petrik, Dan Kucera, and Ivana Marova. 2014. "Biotechnological Conversion of Spent Coffee Grounds into Polyhydroxyalkanoates." Symposium 10: Biowaste biorefinery for a moresustainable bioeconomy O10-3, *New Biotechnology* 31S: 39–40. doi: 10.1016/j.nbt.2014.05.1701.

Oladimeji, Temitayo Elizabeth, Oyedemi Melody, Emetere Moses Eterigho, Agboola Oluranti, Adeoye John Busayo, and Odunlami Olayemi Abosede. 2024. "Review on the impact of heavy metals from industrial wastewater effluent and removal technologies." *Heliyon* 10(23): e40370. doi:10.1016/j.heliyon.2024.e40370.

Osita Eze, Christopher, Dinebari Phillip Berebon, Thaddeus Harrison Gugu, Francis Ifeanyi Anazodo, and James Ekemezie Okorie. 2023. "Lactobacillus Exopolysaccharide: An Untapped Biopolymer ." In: Marta Laranjo (Ed.) *Lactobacillus - A Multifunctional Genus*, Chapter 7. IntechOpen, London. doi:10.5772/intechopen.104954.

Özpınar Fatma Beyza, İspirli Hümeyra, Kayacan Selma, Korkmaz Kader, Dere Sevda, Sagdic Osman, Alkay Zuhal, Tunçil Yunus Emre, Ayyash Mutamed and Dertli Enes. 2024. "Physicochemical and structural characterisation of a branched dextran type exopolysaccharide (EPS) from Weissella confusa S6 isolated from fermented sausage (Sucuk)." *International Journal of Biological Macromolecules* 264(1):130507. doi:10.1016/j.ijbiomac.2024.130507.

Öztürk, Ayten, Tuba Artan, and Ahmet Ayar. 2004. "Biosorption of Nickel (II) and Copper (II) Ions from Aqueous Solution by Streptomyces Coelicolor A3(2)." *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 34(2):105–111. doi: 10.1016/j.colsurfb.2003.11.008.

Pagliaccia, Benedetta, Emiliano Carretti, Mirko Severi, Debora Berti, Claudio Lubello, and Tommaso Lotti. 2022. "Heavy Metal Biosorption by Extracellular Polymeric Substances (EPS)

Recovered from Anammox Granular Sludge." *Journal of Hazardous Materials* 424(C):126661. doi: 10.1016/j.jhazmat.2021.126661.

Palusiak, Agata. 2013. "Immunochemical Properties of Proteus Penneri Lipopolysaccharides—One of the Major Proteus Sp. Virulence Factors." *Carbohydrate Research* 380:16–22. doi:10.1016/J.CARRES.2013.06.025.

Park, Donghee, Yeoung Sang Yun, and Jong Moon Park. 2010. "The Past, Present, and Future Trends of Biosorption." *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 15(1):86–102. doi: 10.1007/s12257-009-0199-4.

Pérez-Morales, Guadalupe, Héctor Mario Poggi-Varaldo, Teresa Ponce-Noyola, Abigail Pérez-Valdespino, Everardo Curiel-Quesada, Juvencio Galíndez-Mayer, Nora Ruiz-Ordaz, and Perla Xochitl Sotelo-Navarro. 2024. "A Review of the Production of Hyaluronic Acid in the Context of Its Integration into GBAER-Type Biorefineries." *Fermentation* 10(6):305. doi: 10.3390/fermentation10060305.

Petrović, Marija, Tatjana Šoštarić, Mirjana Stojanović, Jelena Petrović, Marija Mihajlović, Aleksandar Ćosović, and Slavka Stanković. 2017. "Mechanism of Adsorption of Cu2+ and Zn2+ on the Corn Silk (Zea Mays L.)." *Ecological Engineering* 99:83–90. doi: 10.1016/j.ecoleng.2016.11.057.

Pi, Shanshan, Ang Li, Jiguo Qiu, Liang Feng, Lu Zhou, He Ping Zhao, and Fang Ma. 2021. "Enhanced Recovery of Hexavalent Chromium by Remodeling Extracellular Polymeric Substances through Engineering Agrobacterium Tumefaciens F2." *Journal of Cleaner Production* 279:123829. doi: 10.1016/j.jclepro.2020.123829.

Pohl, Alina. 2020. "Removal of Heavy Metal Ions from Water and Wastewaters by Sulfur-Containing Precipitation Agents." *Water, Air, and Soil Pollution* 231(10):503. doi: 10.1007/s11270-020-04863-w.

Popescu, Gabriela, and Lucia Dumitru. 2009. "Biosorption of Some Heavy Metals from Media with High Salt Concentrations by Halophilic Archaea." *Biotechnology and Biotechnological Equipment* 23(1):791–95. doi: 10.1080/13102818.2009.10818542.

Popović, Mina, Marijana Stojanović, Zlate Veličković, Ana Kovačević, Radmila Miljković, Nemanja Mirković, and Aleksandar Marinković. 2021. "Characterization of Potential Probiotic Strain, L. Reuteri B2, and Its Microencapsulation Using Alginate-Based Biopolymers." *International Journal of Biological Macromolecules* 183:423–434. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2021.04.177.

Prete, Roberta, Mohammad Khairul Alam, Giorgia Perpetuini, Carlo Perla, Paola Pittia, and Aldo Corsetti. 2021. "Lactic Acid Bacteria Exopolysaccharides Producers: A Sustainable Tool for Functional Foods." *Foods* 10(7):1653. doi: 10.3390/foods10071653.

Prior, Ronald L., Xianli Wu, and Karen Schaich. 2005. "Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53(10):4290–4302. doi: 10.1021/jf0502698.

Pushkar, Bhupendra, Pooja Sevak, Sejal Parab, and Nikita Nilkanth. 2021. "Chromium Pollution and Its Bioremediation Mechanisms in Bacteria: A Review." *Journal of Environmental Management* 287:112279. doi: 10.1016/j.jenvman.2021.112279.

Ramos, Celso Raul Romero, Patricia Antonia Estima Abreu, Ana L. T. O. Nascimento, and Paulo Lee Ho. 2004. "A High-Copy T7 Escherichia Coli Expression Vector for the Production of Recombinant Proteins with a Minimal N-Terminal His-Tagged Fusion Peptide." *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 37(8):1103–1109. doi:10.1590/S0100-879X2004000800001.

Rana, Sonali, and Lata Sheo Bachan Upadhyay. 2020. "Microbial Exopolysaccharides: Synthesis Pathways, Types and Their Commercial Applications." *International Journal of Biological Macromolecules* 157:577–583. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.04.084.

Rasulov, Bakhtiyor A., Abulimiti Yili, and Haji A. Aisa. 2013. "Biosorption of Metal Ions by Exopolysaccharide Produced by Azotobacter Chroococcum&lt XU1." *Journal of Environmental Protection* 4(9):989–993. doi: 10.4236/jep.2013.49114.

Raval, Nirav P., Prapti U. Shah, and Nisha K. Shah. 2017. "Malachite Green 'a Cationic Dye' and Its Removal from Aqueous Solution by Adsorption." *Applied Water Science* 7(7):3407–3445. doi:10.1007/s13201-016-0512-2.

Ren, Yanxin, Fangyi Pei, Xinbo Cao, Wen Zhang, Renpeng Du, Jingping Ge, and Wenxiang Ping. 2023. "Purification of Exopolysaccharides from Lactobacillus Rhamnosus and Changes in Their Characteristics by Regulating Quorum Sensing Genes via Polyphenols." *International Journal of Biological Macromolecules* 240:124414. doi:10.1016/J.IJBIOMAC.2023.124414.

Richel, Aurore, Caroline Vanderghem, Mathilde Simon, Bernard Wathelet, and Michel Paquot. 2012. "Evaluation of Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry for Second-Generation Lignin Analysis." *Analytical Chemistry Insights* 7(1):79–89. doi: 10.4137/ACI.S10799.

Sajna Kuttuvan Valappil, Swati Sharma and Ashok Kumar Nadda. 2021. ''Microbial Exopolysaccharides: An Introduction.'' Ashok Kumar Nadda, Kuttuvan Valappil Sajna, and Swati Sharma (Eds.) *Microbial Exopolysaccharides as Novel and Significant Biomaterials*, pp.1-18. Springer. doi: 10.1007/978-3-030-75289-7.

Sánchez Jorge-Ignacio, Martı´nez Beatriz, Guille´n Rafael, Jime´nez-Dı´az Rufino, and Rodrı´guez Ana. 2006. "Culture Conditions Determine the Balance between Two Different Exopolysaccharides Produced by *Lactobacillus pentosus* LPS26." *Applied and Environmental Microbiology*, 72(12): 7495–7502. doi: 10.1128/AEM.01078.

Sathishkumar, Ramamoorthy, Ramachandran Kannan, Sekar Jinendiran, Natesan Sivakumar, Gopal Selvakumar, and Rajaram Shyamkumar. 2021. "Production and Characterization of Exopolysaccharide from the Sponge-Associated Bacillus Subtilis MKU SERB2 and Its in-Vitro Biological Properties." *International Journal of Biological Macromolecules* 166:1471–1479. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.11.026.

Schmid, Jochen, Volker Sieber, and Bernd Rehm. 2015. "Bacterial Exopolysaccharides: Biosynthesis Pathways and Engineering Strategies." *Frontiers in Microbiology* 6:496. doi: 10.3389/fmcib.2015.00496.

Selim, Manal S., Sahar S. Mohamed, Mohsen S. Asker, Abeer Y. Ibrahim, Samah A. El-Newary, and Mohamed E. El Awady. 2023. "Characterization and In-Vitro Alzheimer's Properties of Exopolysaccharide from Bacillus Maritimus MSM1." *Scientific Reports* 13(1):11399. doi: 10.1038/s41598-023-38172-z.

Sharma, Kanika, Nivedita Sharma, Shweta Handa, and Shruti Pathania. 2020. "Purification and Characterization of Novel Exopolysaccharides Produced from Lactobacillus Paraplantarum KM1 Isolated from Human Milk and Its Cytotoxicity." *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology* 18(1):56. doi: 10.1186/s43141-020-00063-5.

Shi, Yingying, Qingping Xiong, Xiaoli Wang, Xia Li, Chunhao Yu, Jie Wu, Jing Yi, Xiaojuan Zhao, Ying Xu, and Hao Cui. 2016. "Characterization of a Novel Purified Polysaccharide from the Flesh of Cipangopaludina Chinensis." *Carbohydrate Polymers* 136:875–883. doi: 10.1016/j.carbpol.2015.09.062.

Shuhong, Ye, Zhang Meiping, Yang Hong, Wang Han, Xiao Shan, Liu Yan, and Wang Jihui. 2014. "Biosorption of Cu2+, Pb2+ and Cr6+ by a Novel Exopolysaccharide from Arthrobacter Ps-5." *Carbohydrate Polymers* 101(1):50–56. doi: 10.1016/j.carbpol.2013.09.021.

Shukla, Arpit, Krina Mehta, Jignesh Parmar, Jaimin Pandya, and Meenu Saraf. 2019. "Depicting the Exemplary Knowledge of Microbial Exopolysaccharides in a Nutshell." *European Polymer Journal* 119:298–310. doi: 10.1016/j.eurpolymj.2019.07.044.

Sims, Ian M., Steven A. Frese, Jens Walter, Diane Loach, Michelle Wilson, Kay Appleyard, Jocelyn Eason, Megan Livingston, Margaret Baird, Gregory Cook, and Gerald W. Tannock. 2011. "Structure and Functions of Exopolysaccharide Produced by Gut Commensal Lactobacillus Reuteri 100-23." *ISME Journal* 5(7):1115–1124. doi: 10.1038/ismej.2010.201.

Singh, Ravindra Pal, Mahendra K. Shukla, Avinash Mishra, Puja Kumari, C. R. K. Reddy, and Bhavanath Jha. 2011. "Isolation and Characterization of Exopolysaccharides from Seaweed Associated Bacteria Bacillus Licheniformis." *Carbohydrate Polymers* 84(3):1019–1026. doi: 10.1016/j.carbpol.2010.12.061.

Sinyeue, Cynthia, Théophile Garioud, Monika Lemestre, Michaël Meyer, Frédérique Brégier, Vincent Chaleix, Vincent Sol, and Nicolas Lebouvier. 2022. "Biosorption of Nickel Ions Ni2+

by Natural and Modified Pinus Caribaea Morelet Sawdust." *Heliyon* 8(2):e08842. doi:10.1016/j.heliyon.2022.e08842.

Siya Kamat. 2021. ''Molecular Basis and Genetic Regulation of EPS.'' Ashok Kumar Nadda, Kuttuvan Valappil Sajna, and Swati Sharma (Eds.) *Microbial Exopolysaccharides as Novel and Significant Biomaterials*, pp.44-83. Springer. doi: 10.1007/978-3-030-75289-7.

Song, Yige, Shuxin Li, Hao Gong, Ryan Chak Sang Yip, and Hao Chen. 2023. "Biopharmaceutical Applications of Microbial Polysaccharides as Materials: A Review." *International Journal of Biological Macromolecules* 239:124259. doi:10.1016/j.ijbiomac.2023.124259.

Sountharavallee, V. Sree, M. Suresh Kumar, K. Kathiresan, M Suresh Kumar. 2023. "Biosynthesis and Delineate Industrially Prime Exopolysaccharide (MYCtPs) from Marine Yeast Candida Tropicalis (MYCt)." *Journal of Coastal Life Medicine,* 11(2):275-285.

Speciale, Immacolata, Anna Notaro, Pilar Garcia-Vello, Flaviana Di Lorenzo, Samantha Armiento, Antonio Molinaro, Roberta Marchetti, Alba Silipo, and Cristina De Castro. 2022. "Liquid-State NMR Spectroscopy for Complex Carbohydrate Structural Analysis: A Hitchhiker's Guide." *Carbohydrate Polymers* 277:118885. doi:10.1016/j.carbpol.2021.118885.

Spriestersbach, Anne, Jan Kubicek, Frank Schäfer, Helena Block, and Barbara Maertens. 2015. "Purification of His-Tagged Proteins." *Methods in Enzymology* 559:1–15. doi:10.1016/BS.MIE.2014.11.003.

Steiner, Elisabeth, Rebecca E. Shilling, Anja M. Richter, Nadine Schmid, Mustafa Fazli, Volkhard Kaever, Urs Jenal, Tim Tolker-Nielsen, and Leo Eberl. 2022. "The BDSF Quorum Sensing Receptor RpfR Regulates Bep Exopolysaccharide Synthesis in Burkholderia Cenocepacia via Interaction with the Transcriptional Regulator BerB." *Npj Biofilms and Microbiomes* 8(1):93. doi:10.1038/s41522-022-00356-2.

Sun, Jian, Yarun Gou, Jun Liu, Hong Chen, Juan Kan, Chunlu Qian, Nianfeng Zhang, Fuxiang Niu, and Changhai Jin. 2020. "Anti-Inflammatory Activity of a Water-Soluble Polysaccharide from the Roots of Purple Sweet Potato." *RSC Advances* 10(65):39673–39686. doi: 10.1039/d0ra07551e.

Suryawanshi, Nisha, Sweta Naik and Satya J. 2022. ''Exopolysaccharides and their application in food processing industries.'' *Food Science and Applied Biotechnology* 5(1):22-24.doi: 10.30721/fsab2022.v5.i1.165.

Sutherland, Ian W. 2009. "Physical Properties of Exopolysaccharides." In: *Biotechnology of Microbial Exopolysaccharides* 102–16. Cambridge Studies in Biotechnology. Cambridge University Press. doi: 10.1017/cbo9780511525384.009.

Tabernero, Antonio, and Stefano Cardea. 2020. "Microbial Exopolysaccharides as Drug Carriers." *Polymers* 12(9):2142. doi: 10.3390/polym12092142.

Talbi, Chouhra, Salma Elmarrakchy, Mourad Youssfi, Sarah Bouzroud, Meryem Belfquih, Aicha Sifou, Nezha Bouhaddou, Bouabid Badaoui, Abdelaali Balahbib, Abdelhakim Bouyahya, and Ilhame Bourais. 2023. "Bacterial Exopolysaccharides: From Production to Functional Features." *Progress in Microbes and Molecular Biology* 6(1). doi: 10.36877/pmmb.a0000384.

Teymoorian, Seyedeh Kiana, Hoda Nouri, and Hamid Moghimi. 2024. "In-Vivo and in-Vitro Wound Healing and Tissue Repair Effect of Trametes Versicolor Polysaccharide Extract." *Scientific Reports* 14(1):3796. doi: 10.1038/s41598-024-54565-0.

Tomulescu, Caterina, Misu Moscovici, Roxana Madalina Stoica, Gabriel Bujor Albu, Claudia Sevcenco, and Adrian Vamanu. 2021. "Optimization and Kinetics Studies on Exopolysaccharide Production Using Klebsiella Oxytoca ICCF 419 Strain, and Glucose as Substrate." *Romanian Biotechnological Letters* 26(1):2214–2222. doi: 10.25083/rbl/26.1/2214.2222.

Tomulescu, Caterina, Misu Moscovici, Roxana Madalina Stoica, Angela Casarica, Mariana Vladu, Sultana Nita, Roxana Donciu, Ionica Bejanaru, Georgeta Neagu, Robertina Ionescu, Anamaria Hanganu, Cristina Stanciu, Cristina Bazdoaca, and Adrian Vamanu. 2020. "Isolation and Partial Characterization of a Polysaccharide Produced by Klebsiella Oxytoca ICCF 419, a Newly-Isolated Strain in Romania." *Romanian Biotechnological Letters* 25(5):1861–1876. doi: 10.25083/rbl/25.5/1861.1876.

Torres, Enrique. 2020. "Biosorption: A Review of the Latest Advances." *Processes* 8(12):1584. doi: 10.3390/pr8121584.

Trabelsi, Imen, Naourez Ktari, Sirine Ben Slima, Mehdi Triki, Sana Bardaa, Hela Mnif, and Riadh Ben Salah. 2017. "Evaluation of Dermal Wound Healing Activity and in Vitro Antibacterial and Antioxidant Activities of a New Exopolysaccharide Produced by Lactobacillus Sp.Ca6." *International Journal of Biological Macromolecules* 103:194–201. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.05.017.

Urtuvia, Viviana, Nataly Maturana, Fernando Acevedo, Carlos Peña, and Alvaro Díaz-Barrera. 2017. "Bacterial Alginate Production: An Overview of Its Biosynthesis and Potential Industrial Production." *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 33(11):198. doi: 10.1007/s11274-017-2363-x.

Vakili, Mohammadtaghi, Mohd Rafatullah, Jing Yuan, Haider M. Zwain, Amin Mojiri, Zahra Gholami, Fatemeh Gholami, Wei Wang, Abdulmoseen S. Giwa, Youqing Yu, Giovanni Cagnetta, and Gang Yu. 2021. "Nickel Ion Removal from Aqueous Solutions through the Adsorption Process: A Review." *Reviews in Chemical Engineering* 37(6):755–778. doi: 10.1515/revce-2019-0047.

Van Calsteren, Marie-Rose, Corinne Pau-Roblot, Andre !. Be, ; Gin, and Denis Roy. 2002. "Structure Determination of the Exopolysaccharide Produced by Lactobacillus Rhamnosus Strains RW-9595M and R.'' *Biochemical Journal* 363(Pt 1):7-17.doi: 10.1042/bj3630007.

Veena S. More, Allwin Ebinesar, A. Prakruthi, P. Praveen, Aneesa Fasim, Archana Rao, Farhan Zameer, K. S. Anantharaju, and Sunil More.2021. In: Vaishnav, Anukool, and Devendra Kumar Choudhary (Eds.) *Microbial Polymers: Applications and Ecological Perspectives*. Springer Singapore. Chapter 3:69-86. doi: 10.1007/978-981-16-0045-6.

Ventorino, Valeria, Barbara Nicolaus, Paola Di Donato, Giorgia Pagliano, Annarita Poli, Alessandro Robertiello, Valeria Iavarone, and Olimpia Pepe. 2019. "Bioprospecting of Exopolysaccharide-Producing Bacteria from Different Natural Ecosystems for Biopolymer Synthesis from Vinasse." *Chemical and Biological Technologies in Agriculture* 6(1):18. doi:10.1186/s40538-019-0154-3.

Wang, Fu-Jin, Pan, C., Wu, C. 1999. "Composition and Rheological Bacterium Properties of Extracellular Mucilage from Marine Bacterium Klebsiella Oxytoca CF154." *Fisheries Science* 65(5):742–749.

Wang, Ji, Xiao Zhao, Yawei Yang, Aimei Zhao, and Zhennai Yang. 2015. "Characterization and Bioactivities of an Exopolysaccharide Produced by Lactobacillus Plantarum YW32." *International Journal of Biological Macromolecules* 74:119–26. doi:10.1016/j.ijbiomac.2014.12.006.

Wang, Jia, Davvid R. Salem, and Rajesh K. Sani. 2019. "Extremophilic Exopolysaccharides: A Review and New Perspectives on Engineering Strategies and Applications." *Carbohydrate Polymers* 205:8–26. doi: 10.1016/j.carbpol.2018.10.011.

Wang, Jianlong, and Can Chen. 2009. "Biosorbents for Heavy Metals Removal and Their Future." *Biotechnology Advances* 27(2):195–226. doi:10.1016/j.biotechadv.2008.11.002.

Wang, Junyong, Jing Zhang, Henan Guo, Qiang Cheng, Zaheer Abbas, Yucui Tong, Tiantian Yang, Yichen Zhou, Haosen Zhang, Xubiao Wei, Dayong Si, and Rijun Zhang. 2023a. "Optimization of Exopolysaccharide Produced by Lactobacillus Plantarum R301 and Its Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities." *Foods* 12(13):2481. doi: 10.3390/foods12132481.

Wang, Wei, Yuhao Ju, Nan Liu, Shengbo Shi, and Lujiang Hao. 2023. "Structural Characteristics of Microbial Exopolysaccharides in Association with Their Biological Activities: A Review." *Chemical and Biological Technologies in Agriculture* 10(1):137. doi.10.1186/s40538-023-00515-3.

Wang, Yanping, Chao Li, Peng Liu, Zaheer Ahmed, Ping Xiao, and Xiaojia Bai. 2010. "Physical Characterization of Exopolysaccharide Produced by Lactobacillus Plantarum KF5 Isolated from Tibet Kefir." *Carbohydrate Polymers* 82(3):895–903. doi: 10.1016/j.carbpol.2010.06.013.

Wangpaiboon, Karan, Nisachon Waiyaseesang, Pawinee Panpetch, Thanapon Charoenwongpaiboon, Sergey A. Nepogodiev, Sanong Ekgasit, Robert A. Field, and

Pichayangkura, Rath. 2020. "Characterisation of Insoluble α-1,3-/α-1,6 Mixed Linkage Glucan Produced in Addition to Soluble α-1,6-Linked Dextran by Glucansucrase (DEX-N) from Leuconostoc Citreum ABK-1." *International Journal of Biological Macromolecules* 152:473–482. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.02.247.

Waoo, Ashwini A., Sukhendra Singh, Ashutosh Pandey, Gaurav Kant, Kamlesh Choure, Kassian T. T. Amesho, and Sameer Srivastava. 2023. "Microbial Exopolysaccharides in the Biomedical and Pharmaceutical Industries." *Heliyon* 9(8):e18613. doi: 10.1016/j.heliyon.2023.e18613.

Wei, Wei, Qilin Wang, Ang Li, Jixian Yang, Fang Ma, Shanshan Pi, and Dan Wu. 2016. "Biosorption of Pb (II) from Aqueous Solution by Extracellular Polymeric Substances Extracted from Klebsiella Sp. J1: Adsorption Behavior and Mechanism Assessment." *Scientific Reports* 6:31575. doi: 10.1038/srep31575.

Welman, Alan D., and Ian S. Maddox, 2003. "Exopolysaccharides from Lactic Acid Bacteria: Perspectives and Challenges." *Trends in Biotechnology* 21(6):269–274. doi: 10.1016/S0167-7799(03)00107-0.

Werning, María Laura, Annel M. Hernández-Alcántara, María Julia Ruiz, Lorena Paola Soto, María Teresa Dueñas, Paloma López, and Laureano Sebastián Frizzo. 2022. "Biological Functions of Exopolysaccharides from Lactic Acid Bacteria and Their Potential Benefits for Humans and Farmed Animals." *Foods* 11(9):1284. doi: 10.3390/foods11091284.

Whitfield, Gregory B., Lindsey S. Marmont, and P. Lynne Howell. 2015. "Enzymatic Modifications of Exopolysaccharides Enhance Bacterial Persistence." *Frontiers in Microbiology* 6. doi:10.3389/fmicb.2015.00471.

WHO.2005. ''Nickel in Drinking-Water.'' *Background Document for Development of WHO Guidelines for Drinking-Water Quality*. World Health Organization (https://cdn.who.int/media/docs/default-source/wash-documents/wash-chemicals/nickel-background-document.pdf?sfvrsn=90644b9f_9)

Witkowska M, Smolewski P. 2013. ''Helicobacter pylori infection, chronic inflammation, and genomic transformations in gastric MALT lymphoma.'' Mediators of Inflammation 2013:523170. doi: 10.1155/2013/523170.

Wu, Jiayi, Yuheng Zhang, Ling Ye, and Chenglin Wang. 2021. "The Anti-Cancer Effects and Mechanisms of Lactic Acid Bacteria Exopolysaccharides in Vitro: A Review." *Carbohydrate Polymers* 253:117308. doi: 10.1016/j.carbpol.2020.117308.

Wu, Junrui, Danli Yan, Yumeng Liu, Xue Luo, Yang Li, Chengxu Cao, Mo Li, Qi Han, Cong Wang, Rina Wu, and Lanwei Zhang. 2021. "Purification, Structural Characteristics, and Biological Activities of Exopolysaccharide Isolated From Leuconostoc Mesenteroides SN-8." *Frontiers in Microbiology* 12:644226. doi: 10.3389/fmicb.2021.644226.

Xu, Ren Bo, Xin Yang, Jing Wang, Hai Tian Zhao, Wei Hong Lu, Jie Cui, Cui Lin Cheng, Pan Zou, Wei Huang, Pu Wang, Wen Jing Li, and Xing Long Hu. 2012. "Chemical Composition and Antioxidant Activities of Three Polysaccharide Fractions from Pine Cones." *International Journal of Molecular Sciences* 13(11):14262–14277. doi: 10.3390/ijms131114262.

Xu, Yuanmei, Yanlong Cui, Xin Wang, Fangfang Yue, Yuanyuan Shan, Bianfang Liu, Yuan Zhou, Yanglei Yi, and Xin Lü. 2019. "Purification, Characterization and Bioactivity of Exopolysaccharides Produced by Lactobacillus Plantarum KX041." *International Journal of Biological Macromolecules* 128:480–492. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.01.117.

Yang, Jixian, Wei, Shanshan Pi, Fang Ma, Ang Li, Dan Wu, and Jie Xing. 2015. "Competitive Adsorption of Heavy Metals by Extracellular Polymeric Substances Extracted from Klebsiella Sp. J1." *Bioresource Technology* 196:533–539. doi:10.1016/j.biortech.2015.08.011.

Ye, Guangbin, Chen Yuanhong, Wang Changli, Yang Ruirui, and Bin Xiaoyun. 2018. "Purification and characterization of exopolysaccharide produced by Weissella cibaria YB-1 from pickle Chinese cabbage." *International Journal of Biological Macromolecules*, 120(A):1315-1321, ISSN 0141-8130. doi:10.1016/j.ijbiomac.2018.09.019.

Yingkong, Pariyaporn, and Somporn Tanskul. 2019. "Adsorption of Iron(III) and Copper(II) by Bacterial Cellulose from Rhodococcus Sp. MI 2." *Journal of Polymers and the Environment* 27(9):1948–1958. doi: 10.1007/s10924-019-01480-5.

Zafar, Muhammad Nadeem, Iqra Aslam, Raziya Nadeem, Shahida Munir, Usman Ali Rana, and Salah Ud Din Khan. 2015. "Characterization of Chemically Modified Biosorbents from Rice Bran for Biosorption of Ni(II)." *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers* 46:82–88. doi: 10.1016/j.jtice.2014.08.034.

Zaghloul, Eman H., and Mohamed I. A. Ibrahim. 2022. "Production and Characterization of Exopolysaccharide From Newly Isolated Marine Probiotic Lactiplantibacillus Plantarum EI6 With in Vitro Wound Healing Activity." *Frontiers in Microbiology* 13:903363. doi:10.3389/fmicb.2022.903363.

Zamora, Francisca, M. C. González, Maria Teresa Dueñas, Ana Irastorza, Susana Velasco, and Idoia Ibarburu. 2002. "Thermodegradation and Thermal Transitions of an Exopolysaccharide Produced by Pediococcus damnosus 2.6." *Journal of Macromolecular Science - Physics* 41 B(3):473–486. doi:10.1081/MB-120004348.

Zanetti, Rocco, Sarah Zecchin, Milena Colombo, Gigliola Borgonovo, Stefania Mazzini, Leonardo Scaglioni, Giorgio Facchetti, Raffaella Gandolfi, Isabella Rimoldi, and Lucia Cavalca. 2022. "Ni2+ and Cu2+ Biosorption by EPS-Producing Serratia Plymuthica Strains and Potential Bio-Catalysis of the Organo–Metal Complexes." *Water (Switzerland)* 14(21):3410. doi: 10.3390/w14213410.

Zdujić, Aleksandar, Katarina Trivunac, Biljana Pejić, Marija Vukčević, Mirjana Kostić, and Milan Milivojević. 2021. "A Comparative Study of Ni (II) Removal from Aqueous Solutions on Ca-Alginate Beads and Alginate-Impregnated Hemp Fibers." *Fibers and Polymers* 22(1):9–18. doi: 10.1007/s12221-021-9814-6.

Zhang, Chenting, Li Chao, Zhanming Zhang, Lijun Zhang, Qingyin Li, Huailin Fan, Shu Zhang, Qing Liu, Yingyun Qiao, Yuanyu Tian, Yi Wang, and Xun Hu. 2021. "Pyrolysis of Cellulose: Evolution of Functionalities and Structure of Bio-Char versus Temperature." *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 135:110416. doi:10.1016/J.RSER.2020.110416.

Zhang, Shuaibing, and Pierre Stallforth. 2024. "Biofilms and Exopolysaccharides in Pseudomonas Aeruginosa: Pathogenesis, Immune Evasion, and Lung–Brain Signaling during Pneumonia." *Signal Transduction and Targeted Therapy* 9(1):204. doi:10.1038/s41392-024-01902-4.

Zhang, Tao, Ming Shuai, Pengcheng Ma, Jian Huang, Chengxin Sun, Xiaodong Yao, Zehui Chen, Xun Min, and Shengkai Yan. 2020. "Purification, Chemical Analysis and Antioxidative Activity of Polysaccharides from PH-Modified Citrus Pectin after Dialyzation." *LWT* 128:109513. doi:10.1016/J.LWT.2020.109513.

Zhang, Zilian, Ruanhong Cai, Wenhui Zhang, Yingnan Fu, and Nianzhi Jiao. 2017. "A Novel Exopolysaccharide with Metal Adsorption Capacity Produced by a Marine Bacterium Alteromonas Sp. JL2810." *Marine Drugs* 15(6):175. doi: 10.3390/md15060175.

Zhao, Shanshan, Feishu Cao, Hong Zhang, Lei Zhang, Fuming Zhang, and Xinle Liang. 2014. "Structural Characterization and Biosorption of Exopolysaccharides from Anoxybacillus Sp. R4-33 Isolated from Radioactive Radon Hot Spring." *Applied Biochemistry and Biotechnology* 172(5):2732–2746. doi: 10.1007/s12010-013-0680-6.

Биографија аутора

Верица М. Љубић је рођена 1983. године у Београду. Основну школу завршила је у Београду, а затим и средњу Медицинску школу у Београду, на смеру Фармацеутски техничар. Дипломирала је на Технолошко–металуршком факултету Универзитета у Београду 2011. године, на одсеку за Биохемијско инжењерство и биотехнологију. На Пољопривредном факултету Универзитета у Београду одбранила је мастер рад 2014. године, на одсеку Прехрамбене технологије. 2019. године уписала је докторске студије на Технолошко-металуршком факултету у Београду, на смеру Хемијско инжењерство.

Од 2019. године запослена је у Институту за хемију, технологију и металургију (ИХТМ). У периоду 2019-2021. године активно је учествовала у лабораторијским анализама предмета опште употребе у акредитованој лабораторији Центра за екологију и техноекономику (ЦЕТЕ) ИХТМ, изради документације и акредитацијама лабораторије. Од 2021. године у оквиру ЦЕТЕ ИХТМ, ради као истраживач у области биосорпције загађујућих материја из воде применом различитих биолошких материјала. У истој области, радила је истраживања за своју докторску дисертацију, са фокусом на добијању и карактеризацији нових биоматеријала на бази бактеријских егзополисахарида и испитивање могућности њихове примене за биосорпције тешких метала из воде. 2020. године изабрана је у звање истраживач приправник, а 2023. године изабрана је у звање истраживач сарадник. Верица М. Љубић је коаутор три публикована рада у научним часописима међународног значаја и једног рада у часописима националног значаја. Коаутор је два саопштења на конференцијама међународног значаја штампаних у целини, три саопштења са међународних скупова штампаних у изводу и једног саопштења са скупа националног значаја штампаног у целини. Из области истраживања којој припада тема докторске дисертације до сада је објавила два рада у водећим међународним часописима категорије М21.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора: Верица Љубић

Број индекса: 4026/2019

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом:

"Егзополисахарди из бактеријских сојева *Lactobacillus reuteri* B2 и *Klebsiella oxytoca* J7: изоловање, карактеризација и примена за уклањање тешких метала из воде"

• резултат сопственог истраживачког рада;

• да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;

• да су резултати коректно наведени и

• да нисам кршила ауторска права и користила интелектуалну својину других лица.

Потпис аутора

У Београду, _____

_____

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора: Верица Љубић

Број индекса: 4026/2019

Студијски програм: Хемијско инжењерство

Наслов рада: **"Егзополисахариди из бактеријских сојева *Lactobacillus reuteri* B2 и *Klebsiella oxytoca* J7: изоловање, карактеризација и примена за уклањање тешких метала из воде"**

Ментори: Проф. др Катарина Тривунац, ванредни професор

Др Слободан Цветковић, виши научни сарадник

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предала ради похрањивања у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду.**

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис аутора

У Београду, _____

_____

Изјава о коришћењу

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

"Егзополисахариди из бактеријских сојева *Lactobacillus reuteri* B2 и *Klebsiella oxytoca* J7: изоловање, карактеризација и примена за уклањање тешких метала из воде"

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предала сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучила.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

Потпис аутора

У Београду, _____

_____

ОЦЕНА ИЗВЕШТАЈА О ПРОВЕРИ ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

На основу Правилника о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду, коришћењем програма iThenticate извршена је провера оригиналности докторске дисертације кандидаткиње Верице М. Љубић, под називом „Егзополисахариди из бактеријских сојева *Lactobacillus reuteri* B2 и *Klebsiella oxytoca* J7: изоловање, карактеризација и примена за уклањање тешких метала из воде“. Извештај који садржи резултате провере оригиналности ментори су добили дана 09.04.2026. године. Утврђени проценат подударности је 5 %. Овај степен подударности последица је употребе термина типичних за област којој припада дисертација, назива примењених метода истраживања, физичких величина, установа у којима су запослени чланови Комисије и слично. У тексту докторске дисертације постоје и подударања са радовима у којима су објављени резултати докторандовог истраживања, који су проистекли из рада на изради докторске дисертације.

На основу свега изнетог, а у складу са чланом 8. став 2. Правилника о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду, изјављујемо да извештај указује на оригиналност докторске дисертације, те се прописани поступак припреме за њену одбрану може наставити (позитивна оцена).

Београд, 24.04.2026.

Ментори

Др Катарина Тривунац, ванредни професор

Универзитета у Београду, Технолошко-металуршки факултет

_____

Др Слободан Цветковић, виши стручни сарадник

Универзитета у Београду, Институт за хемију, технологију и металургију,

Институт од националног значаја за Републику Србију

_____