

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Janez OREHEK

**STRUKTURNI OPIS BIORAZGRADNJE GOSTIL
NA CELULOZNI OSNOVI**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Ljubljana, 2013

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Janez OREHEK

**STRUKTURNI OPIS BIORAZGRADNJE GOSTIL NA CELULOZNI
OSNOVI**

DOKTORSKA DISERTACIJA

**STRUCTURAL CHARACTERIZATION OF CELLULOSE
THICKENERS BIODEGRADATION**

DOCTORAL DISSERTATION

Ljubljana, 2013

Na podlagi Statuta Univerze v Ljubljani ter po sklepu Senata Biotehniške fakultete in sklepa Komisije za doktorski študij Univerze v Ljubljani z dne 07. 12. 2011 je bilo potrjeno, da kandidat izpolnjuje pogoje za opravljanje doktorata znanosti na Interdisciplinarnem doktorskem študijskem programu Bioznanosti, znanstveno področje biotehnologija. Za mentorja je bil imenovan prof. dr. David Stopar.

Doktorska disertacija je zaključek interdisciplinarnega doktorskega študijskega programa Bioznanosti, znanstveno področje biotehnologija na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. V njem opisane raziskave in poskusi so bili izvedeni na Katedri za mikrobiologijo, Oddelek za živilstvo, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani ter v Tehnološko Raziskovalnemu Centru JUB d.o.o., SAXS sipalne krivulje smo posneli na Katerdri za fizikalno kemijo, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani. CHSP elementne analize in meritve kontaktnih kotov so bile izvedene na Inštitutu za celulozo in papir v Ljubljani.

Mentor: prof. dr. David Stopar

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Branka Javornik
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Član: prof. dr. David Stopar
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Član: izr. prof. dr. Miha Humar
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za lesarstvo

Član: prof. dr. Andrej Jamnik
Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo,
Katedra za fizikalno kemijo

Datum zagovora: 13.06.2013

Doktorska disertacija je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisani se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddal v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Doktorand
Janez Orehek

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dd
DK UDK 579.66+602.3:661.728.8:544.022(043)=163.6
KG biorazgradnja celuloznih gostil/struktura celuloznih gostil/karboksimetil celuloza/tozilat karboksimetil celuloze/hidroksitetil celuloza/metil celuloza/*Cellulomonas uda/Bacillus subtilis*/viskoznost/reducirajoči sladkorji/HPLC/SAXS/reološke lastnosti
AV OREHEK, Janez, univ. dipl. biok.
SA STOPAR David (mentor)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Interdisciplinarni doktorski študij Bioznanosti, področje biotehnologija
LI 2013
IN STRUKTURNI OPIS BIORAZGRADNJE GOSTIL NA CELULOZNI OSNOVI
TD Doktorska disertacija
OP XII, 100 str., 2 pregl., 41 sl., 100 vir.
IJ Sl
JI Sl/en
AI V tem doktorskem delu smo proučevali vpliv strukture celuloznih gostil na biorazgradljivost. Pokazali smo, da na biorazgradljivost vpliva stopnja substitucije in razporeditev substituent vzdolž celuloznega skeleta. Rezultati inkubacijskih eksperimentov z različnimi bakterijskimi vrstami so razkrili, da je hitrost biorazgradnje pogojena s tipom substituent vezanih na celulozni skelet. Hidrofobne substituente upočasnijo hitrost biorazgradnje celuloznih gostil. Depolimerizacija celuloznih gostil je znižala viskoznost in spremenila tokovno obnašanje raztopin iz močno psevdoplastičnih raztopin v skoraj newtonske raztopine. Sipalne krivulje ozkokotnega sipanja rentgenskih žarkov (SAXS) so razkrile znatno odvisnost konformacije molekul celuloznega gostila od substituent vezanih na celulozno ogrodje. Tako so npr. molekule karboksimetil celuloze (CMC) v konformaciji podobni naključnemu klobčiču, medtem ko pri istih pogojih molekule metil celuloze (MC) in hidroksitetil celuloze (HEC) zavzemajo konformacijo toge iztegnjene palice. Na primeru CMC smo pokazali, da ima topilo znaten vpliv na strukturiranost raztopin. Prisotnost elektrolitov povzroči senčenje inter- in intramolekularnih odbojnih interakcij, kar se odraža tudi v spremenjeni reologiji. Še bolj kot prisotnost elektrolitov, je na strukturiranost raztopin CMC imela vpliv pH vrednost. Z zniževanjem pH vrednosti od pH 7 do 1,6 smo s SAXS opazili, da narašča velikost delcev CMC v raztopini. Biorazgradnja CMC lahko spremeni porazdelitev elektronske gostote. Strukturne spremembe med biorazgradnjo korelirajo z reološkimi meritvami, kot tudi z HPSEC analizami ter določtvami koncentracij reducirajočih sladkorjev. S tozilacijo CMC smo pripravili novo gostilo TsCMC, ki ima znižano biorazgradljivost in nove reološke in tehnološke lastnosti.

KEY WORDS DOCUMENTATION

ND Dd
DC UDC 579.66+602.3:661.728.8:544.022(043)=163.6
CX biodegradation of cellulose thickeners/structure of cellulose
thickeners/carboxymethyl cellulose/tosylat carboxymethyl cellulose/hydroxyethyl
cellulose/methyl cellulose/*Cellulomonas uda/Bacillus subtilis*/viscosity /reducing
sugars /HPLC/SAXS/rheological properties
AU OREHEK, Janez, univ. dipl. biok.
AA STOPAR David (supervisor)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdisciplinary Doctoral
Programme in Biosciences, field Biotechnology
PY 2013
TY STRUCTURAL CHARACTERIZATION OF CELLULOSE THICKENERS
BIODEGRADATION
DT Doctoral dissertation
NO XII, 100 p., 2 tab., 41 fig., 100 ref.
LA SI
AI SI/en
AB In this work, we have studied the effect of structure of cellulose thickeners on
biodegradation. The results indicate that the degree of substitution, as well as the
distribution of substituents along the cellulose backbone are important factors that
affect the biodegradation. The results of incubation experiments with different
bacterial species revealed, that the rate of biodegradation is dependent on the
nature of substituents bounded to the cellulose backbone. The hydrophobic
substituents lowered the rate of biodegradation. Depolymerisation decreased
viscosity of the solution; in addition it changed flow behavior from pseudoplastic
to Newtonian flow. The (small angle X-ray scattering) SAXS scattering curves
revealed strong dependence of conformation of cellulose thickener molecule on
the nature of substituents. For instance, in aqueous solutions carboxymethyl
cellulose (CMC) is random coil, whereas molecules of methyl cellulose (MC) and
hydroxyethyl cellulose (HEC) take the conformation of rigid extended rods. The
presence of electrolytes decreased inter- and intramolecular repulsive interactions
of CMC, which changed conformation and rheology. Even greater effect on the
structure had pH. By lowering the pH value from 7 to 1. 6, the particles sizes of
CMC in solution increased. The biodegradation of low substituted CMC can
change the distribution of the electron density. Structural changes correlate with
rheological measurements, HPSEC, and reducing sugar concentration. A new
tosylated CMC, with lowered biodegradability and new rheological and
technological properties has been prepared.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA.....	III
KEY WORDS DOCUMENTATION.....	IV
KAZALO VSEBINE.....	V
KAZALO SLIK.....	VIII
KAZALO PREGLEDNIC.....	XI
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI.....	XII
1 UVOD.....	1
1.1 OPREDELITEV PROBLEMA.....	1
1.2 DELOVNE HIPOTEZE.....	2
1.3 CILJI DOKTORSKE NALOGE.....	3
2 PREGLED OBJAV.....	4
2.1 CELULOZA IN NJENI DERIVATI	4
2.1.1 Karboksimetil celuloza	5
2.1.2 Hidroksietil celuloza	7
2.1.3 Metil celuloza.....	8
2.2 BIORAZGRADNJA CELULOZE IN NJENIH DERIVATOV	9
2.2.1 Rod <i>Cellulomonas</i>	11
2.2.2 Rod <i>Bacillus</i>	12
2.2.2.1 <i>Bacillus subtilis</i>	12
2.3 VISKOZNOST	13
2.4 VELIKOSTNO IZKLUČITVENA KROMATOGRAFIJA – SEC	15
2.5 AMFIPATIČNI DERIVATI KARBOKSIMETIL CELULOZE.....	16
2.6 DOLOČANJE STRUKTURE POLISAHARIDOV Z OZKOKOTNIM RENTGENSKIM SIPANJEM – SAXS	17
3 MATERIALI IN METODE.....	18
3.1 MATERIALI.....	18
3.1.1 Kemikalije.....	18
3.1.2 Bakterijski sevi.....	19
3.1.3 Sestava gojišč	20
3.1.4 DNS reagent.....	21
3.2 INKUBACIJSKI EKSPERIMENTI	21
3.2.1 Inkubacijski eksperimenti z <i>Bacillus subtilis</i> NCIB 3610.....	22
3.2.2 Inkubacijski eksperimenti s <i>Cellulomonas uda</i> za preverjanje vpliva DS na biorazgradnjo.....	23
3.2.3 Inkubacijski eksperiment za preverjanje vpliva substituente na biorazgradljivost	24
3.2.4 Inkubacijski eksperiment za preverjanje biorazgradljivosti TsCMC.....	24
3.3 DNS METODA ZA DOLOČANJE KONCENTRACIJE REDUCIRAJOČIH SLADKORJEV	25
3.4 MERITVE VISKOZNOSTI	26
3.5 KVALITATIVNO OCENJEVANJE PRISOTNOSTI NESUBSTITUIRANIH REGIJ	26
3.6 VELIKOSTNO IZKLUČITVENA KROMATOGRAFIJA – SEC	27
3.7 MERJENJE OPTIČNE GOSTOTE BAKTERIJSKIH KULTUR	27

3.8 PRIPRAVA VZORCEV ZA PREVERJANJE VPLIVA pH VREDNOSTI NA STRUKTURU CMC.....	27
3.9 OZKOKOTNO SIPANJE RENTGENSKIH ŽARKOV – SAXS	28
3.10 MODELIRANJE SAXS PODATKOV	28
3.11 FTIR SPEKTROSKOPIJA	29
3.12 PRIPRAVA TOZILATA KARBOKSIMETIL CELULOZE.....	29
3.13 PREVERJANJE EMULGACIJSKE UČINKOVITOSTI.....	31
3.14 MERITVE DINAMIČNIH KONTAKTNIH KOTOV.....	32
3.15 CHSP ELEMENTNA ANALIZA	32
3.16 UV-VIS SPEKTROSKOPIJA	32
4 REZULTATI.....	33
4.1 STRUKTURNA KARAKTERIZACIJA CMC S SAXS	33
4.1.1 Vpliv biorazgradnje na strukturo CMC.....	33
4.1.2 Vpliv pH vrednosti na strukturo CMC.....	38
4.2 OPIS BIORAZGRADNJE CMC Z <i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> NCIB 3610 ..	40
4.2.1 Bakterijska rast.....	40
4.2.2 Koncentracija reducirajočih sladkorjev	42
4.2.3 Viskoznost.....	43
4.2.4 Velikostno izključitvena kromatografija	44
4.2.5 Reološke spremembe CMC po biorazgradnji	45
4.3 VPLIV DS VREDNOSTI IN Mw NA BIORAZGRADNJO CMC S <i>Cellulomonas uda</i> DSM 20108	48
4.3.1 Bakterijska rast pri različnih DS in Mw vrednostih za CMC	48
4.3.2 Biorazgradnja pri različnih DS in Mw vrednostih za CMC.....	50
4.3.3 Velikostno izključitvena kromatografija HPLC – SEC pri različnih DS in Mw vrednostih za CMC	52
4.3.4 Kvalitativno določanje deleža nesubstituiranih regij	54
4.4 VPLIV TIPA SUBSTITUENTE NA BIORAZGRADNJO CELULOZNIH GOSTIL S <i>Cellulomonas uda</i> DSM 20108	55
4.4.1 Dinamika biorazgradnje različno substituiranih celuloznih gostil	55
4.4.2 Velikostno izključitvena kromatografija SEC	57
4.4.3 SAXS	58
4.4.4 Sprememba reologije	59
4.5 SINTEZA, KARAKTERIZACIJA IN BIORAZGRADNJA TsCMC	62
4.5.1 FTIR spektroskopija CMC in TsCMC	62
4.5.2 UV – VIS spektroskopija CMC in TsCMC	64
4.5.3 CHSP elementna sestava CMC in TsCMC	65
4.5.4 Reološka primerjava CMC in TsCMC	66
4.5.5 Meritve dinamičnega kontaktnega kota	70
4.5.6 Emulgacijska učinkovitost	70
4.5.7 SAXS meritve CMC in TsCMC v BHM mediju in v vodi	71
4.5.8 Biorazgradnja TsCMC glede na izhodni CMC.....	74
5 RAZPRAVA IN SKLEPI	79
5.1 RAZPRAVA	79
5.1.1 Vpliv tipa in deleža substituente na strukturo in biorazgradnjo celuloznih gostil	79
5.1.2 Sinteza in karakterizacija novega derivata CMC.....	83

5.2 SKLEPI.....	87
6 POVZETEK (SUMMARY)	89
6.1 POVZETEK.....	89
6.2 SUMMARY	91
7 VIRI.....	93
ZAHVALA	

KAZALO SLIK

Slika 1: Struktura celuloze	4
Slika 2: Struktura karboksimetil celuloze z DS = 1	5
Slika 3: Struktura hidroksietil celuloze z DS = 1 in MS = 1,5	7
Slika 4: Struktura metil celuloze z DS 1,5	8
Slika 5: Shema encimske hidrolize celuloze	10
Slika 6: Shema reakcije ki daje barvni produkt pri določanju reducirajočih sladkorjev z DNS ..	25
Slika 7: Shema sinteze tozilanhidrida	30
Slika 8: Shema reakcije estrenja –OH skupin CMC s tozilanhidridom	30
Slika 9: Shema strukture tozilata karboksimetil celuloze (TsCMC).....	31
Slika 10: Eksperimentalne SAXS sipalne krivulje 1% CMC med biorazgradnjo z <i>B. subtilis</i> ...	34
Slika 11: SAXS sipalne krivulje 2 % CMC	35
Slika 12: Reprezentativne strukture nativnega (A) in biorazgrajenega (B) 2 % CMC v BHM ...	38
Slika 13: SAXS sipalne krivulje 2 % (m/v) CMC z Mw = 90 kDa in DS = 0,7 pri različnih pH	39
Slika 14: Bakterijska rast, viskoznost in koncentracija reducirajočih sladkorjev tekom inkubacije <i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> NCIB 3610 v BHM rastnem mediju z 1 % CMC	41
Slika 15: Bakterijska rast, viskoznost in koncentracija reducirajočih sladkorjev tekom inkubacije <i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> NCIB 3610 v BHM rastnem mediju z 2 % CMC	42
Slika 16: Elucijski diagrami velikostno izključitvene kromatografije nativnega CMC z Mw = 90 kDa in DS = 0.7 in razgrajenega CMC	45
Slika 17: Viskoznosti nativnega 2 % CMC z Mw = 90 kDa in DS = 0,7 v BHM mediju, nativnega 2 % CMC v vodi, in razgrajenega 2 % CMC v BHM mediju	46
Slika 18: Viskoznosti nativnega CMC z Mw = 90 kDa in DS = 0,7 v BHM mediju, nativnega CMC v vodi, in razgrajenega CMC v BHM mediju pri različnih koncentracijah CMC.	47
Slika 19: Rast kulture <i>Cellulomonas uda</i> v BHM gojiščih 1 % CMC z Mw = 250 kDa in DS vrednostmi 0,7; 0,9 in 1,2.....	49

Slika 20: Rast kulture <i>Cellulomonas uda</i> v BHM gojičih 1 % CMC z DS vrednostjo 0,7 in Mw = 250 kDa in 90 kDa.....	50
Slika 21: Vpliv stopnje substituiranosti CMC na biorazgradnjo.....	51
Slika 22: Vpliv molske mase CMC na biorazgradnjo.....	52
Slika 23: SEC elugrami razgrajenih in nerazgrajenih BHM gojič z 1 % CMC z Mw = 250 kDa in DS = 0,7; 0,9 in 1,2.....	53
Slika 24: SEC elugrami razgrajenih in nerazgrajenih BHM gojič z 1 % CMC z DS = 0,7 in Mw = 250 kDa in 90 kDa.....	54
Slika 25: Delež nesubstituiranih regij v CMC z različnimi DS vrednostmi.....	55
Slika 26: Biorazgradnja različnih tipov gostil z kulturo <i>Cellulomonas uda</i> DSM 20108	56
Slika 27: SEC elugrami MC, CMC in HEC.....	58
Slika 28: SAXS sipalne krivulje I(q) 1 % MC, HEC in CMC v BHM rastnem mediju.....	59
Slika 29: Reogrami nerazgrajenih 1 % gostil v BHM rastnem mediju	60
Slika 30: Reogrami razgrajenih 1 % gostil v BHM rastnem mediju.....	61
Slika 31: FTIR spektri CMC, TSA in TsCMC	63
Slika 32: UV - VIS spektra 1 % vodnih raztopin CMC z Mw = 90 kDa in TsCMC	64
Slika 33: Odvisnost viskoznosti CMC in TsCMC od koncentracije.....	67
Slika 34: Tokovno obnašanje TsCMC in CMC pri različnih koncentracijah.	69
Slika 35: Diagram dinamičnih kontaktnih kotov CMC in TsCMC	70
Slika 36: Stabilnost emulzije s CMC in TsCMC	71
Slika 37: Relativne SAXS sipalne krivulje 1 % CMC z Mw = 90 kDa in DS = 0,7 in TsCMC ..	73
Slika 38: Rast kulture <i>Cellulomonas uda</i> v BHM gojičih z 1 % CMC in 1 % TsCMC	75
Slika 39: Normalizirana viskoznost BHM gojič z 1 % CMC in 1 % TsCMC tekom inkubacije s kulturo <i>Cellulomonas uda</i>	76
Slika 40: Koncentracija reducirajočih sladkorjev v BHM rastnem mediju z 1 % CMC in TsCMC tekom inkubacije s kulturo <i>Cellulomonas uda</i>	77

Slika 41: Biorazgradnja CMC in TsCMC z različnimi bakterijskimi sevi 78

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Parametri rešitev SAXS simulacije z modelom biserne ogrlice za 2 % (m/v) CMC.....	37
Preglednica 2: Rezultati CHSP elementne masne analize in teoretično izračunana elementna sestava CMC in TsCMC.....	65

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

Å	Ångström (1 Å = 10 ⁻¹⁰ m)
ATCC	<u>American Type Culure Collection</u>
BHM	gojišče po Busnellu in Haasu
CMC	karboksimetil celuloza
Da	Dalton
DNS	3,5-dinitrosalicilna kislina
DP	stopnja polimerizacije (ang. <u>degree of polymerisation</u>)
DS	stopnja substituiranosti (ang. <u>degree of substitution</u>)
DSM	<u>Deutsche Sammlung von Mikroorganismen</u>
EC	encimski razred
HEC	hidroksietil celuloza
HPLC	tekočinska kromatografija visoke učinkovitosti (ang. <u>high performance liquid chromatography</u>)
HMHEC	hidrofobno modificirana HEC
MC	metil celuloza
MS	molarna stopnja substitucije
M _w	molska masa
NCIB	<u>National Collection of Industrial Bacteria</u>
OD ₆₅₀	optična gostota pri 650 nm
PKE	pepton kvasni ekstrakt
rpm	obrati na minuto (ang. <u>rounds per minute</u>)
RI	refrakcijski indeks
SAXS	ozkokotno rentgensko sisanje (ang. <u>small angle X-ray scattering</u>)
SEC/HPSEC	velikostno izključitvena kromatografija (ang. <u>size exclusion chromatography</u>)
Tc	tetraciklin
TSA	<i>p</i> -toluensulfonska kislina
TsCMC	tozilat karboksimetil celuloze

1 UVOD

1.1 OPREDELITEV PROBLEMA

Namen raziskav, izvedenih v sklopu doktorske disertacije, je ugotoviti, kakšne strukturne in reološke spremembe povzroča biološka razgradnja celuloznih gostil, ter kako bi lahko zmanjšali neželjene spremembe reoloških lastnosti. Med najbolj uporabnimi celuloznimi gostili v industriji je karboksimetil celuloza (CMC). CMC se uporablja kot dodatek v prehranski, tekstilni, papirni, barvni, farmacevtski, kozmetični, detergentski, naftni, usnjarski, livarski, keramični industriji ter pri procesiranju mineralov. Poleg tega je zanimiv material za biomedicinske aplikacije. V industriji disperzijskih barv se CMC pogosto uporablja za uravnavanje reoloških lastnosti, kar je ključno pri nanosu barve na izbrano površino in omogoča aplikacijo barve širši populaciji uporabnikov. Najpomembnejša lastnost, ki jo gostilo omogoča, je, viskoznost barve, kadar nanjo ne vpliva nobena strižna sila (npr. pred in po nanosu na steno), med samo uporabo (med pleskanjem), ko na barvo delujemo z določeno strižno silo, pa se mora viskoznost zmanjšati, da je omogočen enostaven in enakomeren razmaz po steni. Notranje in fasadne barve vsebujejo poleg pigmenta, vezivnega sredstva in topila, številne dodatke (npr. polnila, surfaktante, reološka sredstva ter ostale aditive), ki lahko služijo kot vir hranil za rast mikroorganizmov in so zato podvržena biološki razgradnji, kar lahko povzroči veliko ekonomsko škodo.

Celulozna gostila so kemijsko modificirane molekule celuloze, ki onemogočajo tvorbo tesno povezanih snopov celuloznih verig preko vodikovih vezi. Dodane skupine, ki modificirajo celulozo in so vezane na OH skupine anhidroglukoznih enot, preprečujejo vzpostavitev vodikovih vezi med sosednjimi verigami celuloze, kar omogoča njihovo topnost. Med najpogosteje uporabljenimi celuloznimi gostili so karboksimetil celuloza (CMC), metil celuloza (MC) in hidroksietil celuloza (HEC). Celulozna gostila se med seboj kemijsko ločijo po substituentah, ki so vezane na hidroksilne skupine celuloznega skeleta, po deležu vezave le-teh na celulozni skelet (angl. degree of substitution ali DS) in stopnji polimerizacije (DP).

Ker so celulozna gostila v osnovi modificirane celulozne molekule, so takšna gostila v vodnih raztopinah močno podvržena mikrobnim razgradnjim in posledično izgubi želenih reoloških lastnosti. Izdelek, v katerem pride do biološke razgradnje celuloznega gostila, je poleg spremenjenega videza in neprijetnega vonja neuporaben, saj barva teče s čopiča ali pleskarskega valjčka in se ne obdrži na steni. Za preprečevanje nezaželenega pojava biorazgradnje uporabljamo biocidna sredstva, ki so sicer učinkovita, vendar pa praviloma ekološko oporečna. Zato smo v doktorski disertaciji določili dostopnost za biorazgradnjo in strukturne spremembe celuloznih gostil, ki se zgodijo med biorazgradnjo. Pogledali smo, koliko je celulozni skelet dovzet za biorazgradnjo pri različnih substituentah. Na podlagi rezultatov smo sintetizirali nov derivat celuloze, ki ima močno znižano biorazgradljivost in v procesu biorazgradnje ohranja reološke lastnosti, ki so ključne za industrijske aplikacije.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

- Biorazgradnja celuloznih gostil spremeni porazdelitev elektronske gostote raztopine, kar omogoča sledenje strukturnih sprememb med biorazgradnjo.
- Kemijska narava substituent oziroma sprememba deleža substituiranosti vpliva na biorazgradljivost, strukturiranost in reologijo celuloznih gostil.
- Tozilacija CMC spremeni biorazgradljivost in reološke lastnosti.

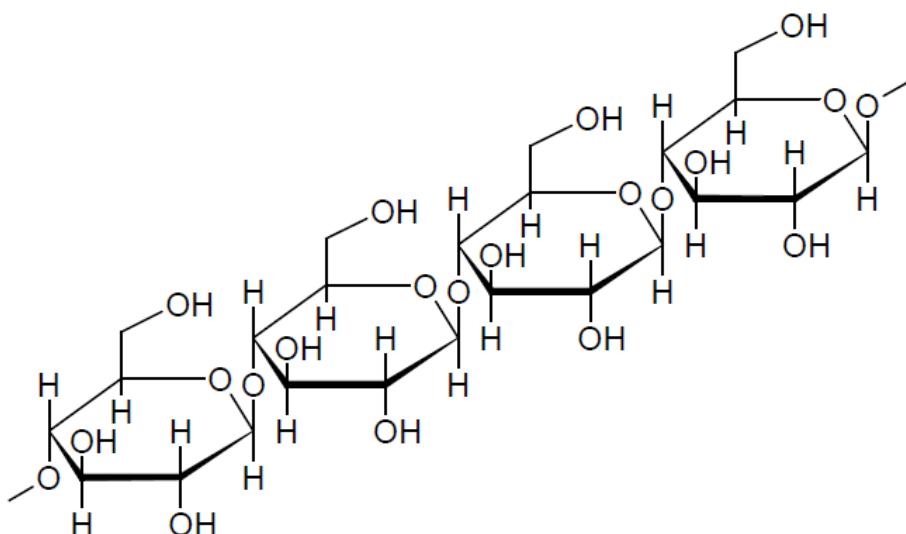
1.3 CILJI DOKTORSKE NALOGE

Gostila na celulozni osnovi lahko vsebujejo različne tipe in deleže substituent. Od tipa in deleža substituent so odvisne številne fizikalno-kemijske lastnosti celuloznih gostil, kot so: viskoznost, tvorba filmov, adhezivne lastnosti, topnost v različnih medijih, tokovno obnašanje, občutljivost na ione, strukturiranost v raztopini. Ker so gostila na celulozni osnovi podvržena biološki razgradnji, je eden izmed glavnih ciljev doktorske naloge preučiti vpliv substituent in njihovega deleža na strukturne in reološke lastnosti gostil ter na njihovo biorazgradljivost z namenom sinteze novega derivata, ki bo odpornejši na biorazgradnjo in bo skozi proces biorazgradnje bolje obdržal želene reološke lastnosti.

2 PREGLED OBJAV

2.1 CELULOZA IN NJENI DERIVATI

Celuloza je osnovna sestavina rastlinske celične stene, sintetizirajo pa jo tudi bakterije in celo nekatere živali (Lynd in sod., 2002). Ta dolgoverižni polisaharid je sestavljen iz glukoznih enot, ki so povezane z β -1,4 vezjo (Sirisena in Manamendra, 1995) (slika 1). Posebnost kemijske sestave je, da so molekule D-glukoze tipično hidrofilne molekule, ki polimerizirajo v netopne makromolekule (Kuga in Brown, 1991). Vsaka anhidroglukozna enota v molekuli celuloze ima tri hidroksilne skupine, ki so sposobne vezave s sosednjimi molekulami. Ustvarijo se številne vodikove vezi, kar onemogoči hidratacijo. S substituiranjem teh hidroksilnih skupin lahko pripravimo derivate, ki so topni v vodi (Clasen in Kulicke, 2001).



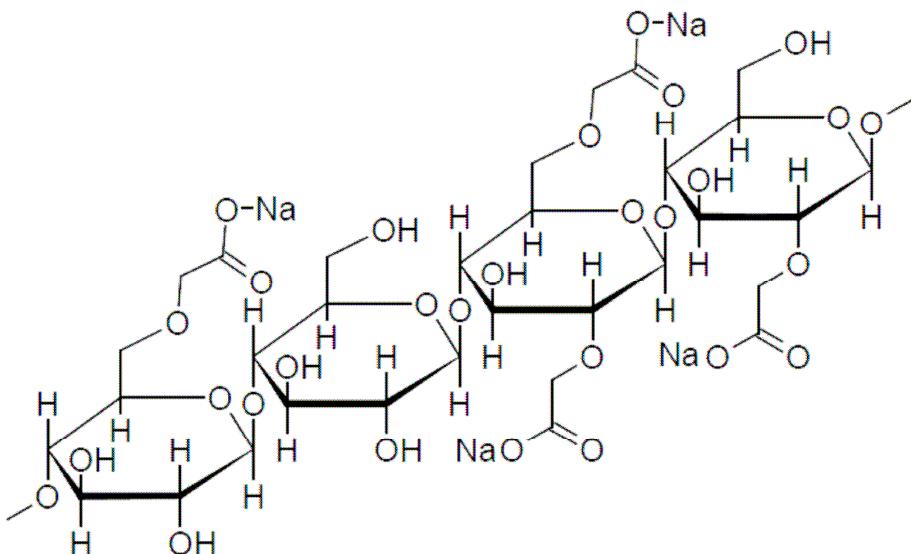
Slika 1: Struktura celuloze.

Figure 1: Cellulose structure.

Derivati celuloze so lahko estri (npr. celuloza acetat, celuloza ksantogenat, celuloza sulfat, celuloza fosfat, celuloza ftalat) ali etri (npr. karboksimetil celuloza, sulfoetyl celuloza, metil celuloza, hidroksietil celuloza, hidroksipropil celuloza) (Clasen in Kulicke, 2001). Ker bomo v nalogi proučevali biorazgradnjo metil, karboksimetil in hidroksietil celuloze, sledi v nadaljevanju splošen opis lastnosti teh derivatov.

2.1.1 Karboksimetil celuloza

Karboksimetil celuloza (CMC) (slika 2) je vodotopen eter celuloze (Reese in sod., 1950). Na trgu je večinoma dostopen kot natrijeva sol, ki je v čisti obliki bel prah brez vonja in okusa (Hollabaugh in sod., 1945). Industrijska proizvodnja CMC temelji na celulozi. Za pridobivanje CMC je ključno, da se v alkalnem okolju prekinejo vezi, ki povezujejo celulozne verige, kar dosežemo s pretvorbo -OH skupin v -ONa, ki ne tvorijo vodikovih vezi. V reakciji med hidratiziranimi verigami in natrijevim monokloroacetatom nastaja natrijeva karboksimetil celuloza (Adinugraha in sod., 2005). V nastalih vodotopnih polimerih so karboksilne skupine etsko vezane na anhidroglukozne enote celuloznega skeleta (Pal in sod., 2005).



Slika 2: Struktura karboksimetil celuloze z DS = 1.

Figure 2: Structure of carboxymethyl cellulose with DS = 1.

Stopnja substituiranosti (DS) označuje povprečno število dodanih skupin na anhidroglukozno enoto molekule CMC (Reese in sod., 1950). Tako je denimo DS celuloze enak 0, popolno substituiran polimer CMC pa ima DS = 3 (Clasen in Kulicke, 2001). Stopnja polimerizacije (DP) ali dolžina verig CMC ustreza številu anhidroglukoznih enot, ki sestavljajo molekulo. Stopnja polimerizacije ima največji

učinek na viskoznost raztopin CMC, z višanjem DP se viskoznost povečuje (Reese in sod., 1950).

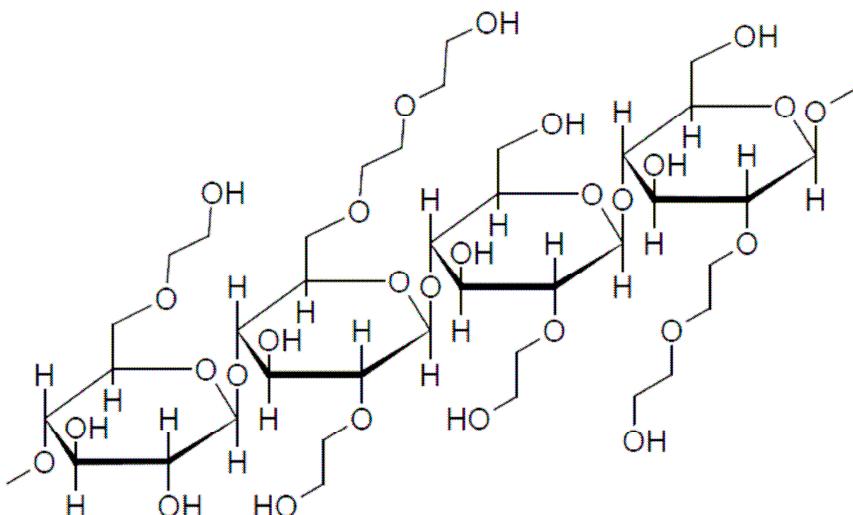
Za raztopine CMC je običajno značilno ne-newtonsko psevdoplastično tokovno obnašanje, izjema so nizkomolekularne in močno razredčene raztopine. Pri tem je najpomembnejša lastnost vpliv strižne hitrosti na viskoznost tekočine; s povečanjem strižne hitrosti viskoznost psevdoplastičnih raztopin pada (Gómez-Díaz in Navaza, 2002).

Na reološke lastnosti raztopin CMC vpliva molekularna struktura derivata, pri čemer sta najbolj pomembni molska masa in koncentracija CMC (Kulicke in sod., 1996). Pomembna je tudi distribucija karboksimetilnih skupin na CMC, saj vpliva na intermolekularne interakcije in na sposobnost agregacije. Za CMC je značilno zadrževanje vode in tiksotropno obnašanje (Clasen in Kulicke, 2001). CMC je industrijsko najbolj uporabljen derivat celuloze (Hollabaugh in sod., 1945). Kot zgoščevalec, vezivo, emulgator in stabilizator se CMC uporablja v predelanih živilskih produktih (npr. v sladoledu, sorbetih, pekarskih izdelkih, solatnih prelivih), v izdelkih za osebno nego (npr. v kremah, losjonih za telo, milih, šamponih, zobnih pastah) in v farmacevtskih pripravkih (Clasen in Kulicke, 2001; Hollabaugh in sod., 1945). Njegova uporaba v prehrani (prepoznamo ga tudi pod oznako E466) ni vprašljiva, saj ne povzroča alergijskih ali drugih zdravju škodljivih reakcij (Bär in sod., 1995). Derivati CMC z višjo stopnjo substituiranosti so izjemno pomembna sestavina detergentov za pranje perila (Eldib, 1971). Ti detergenti so okolju prijazni, saj je CMC biorazgradljiv in za razliko od nitratov in fosfatov ne povzroča evtrofikacije (Eldib, 1971; Reese in sod., 1950).

Adhezivne lastnosti CMC izkoriščajo v tekstilni industriji, pri pridelavi usnja in tudi v papirni industriji, kjer ga uporabljajo za povezovanje osnovnih sestavin in za povečanje čvrstosti papirja (Hollabaugh in sod., 1945). V barvah, ki temeljijo na vodni osnovi, deluje kot zgoščevalec in s tem zagotavlja ustrezeno stabilnost in viskoznost (Tothill in Seal, 1993), enostaven nanos barve pa nam omogočijo njegove psevdoplastične lastnosti.

2.1.2 Hidroksietil celuloza

Hidroksietil celuloza (HEC) (slika 3) je vodotopen, neionski derivat celuloze. Pridobivajo ga v alkalnem okolju z reakcijo med celulozo in etilen oksidom (Kirkland in sod., 1990). Poleg DS lahko pri HEC določimo tudi molarno stopnjo substituiranosti (MS). DS opisuje število substituiranih hidroksilnih skupin na anhidroglukozni enoti. Ker v primeru HEC substituenta še vedno vsebuje reaktivne hidroksilne skupine, lahko pride do večkratne substituiranosti (MS), zato se MS razlikuje od DS in lahko zavzema tudi vrednosti, ki so višje od 3 (Clasen in Kulicke, 2001).



Slika 3: Struktura hidroksietil celuloze z DS = 1 in MS = 1,5.

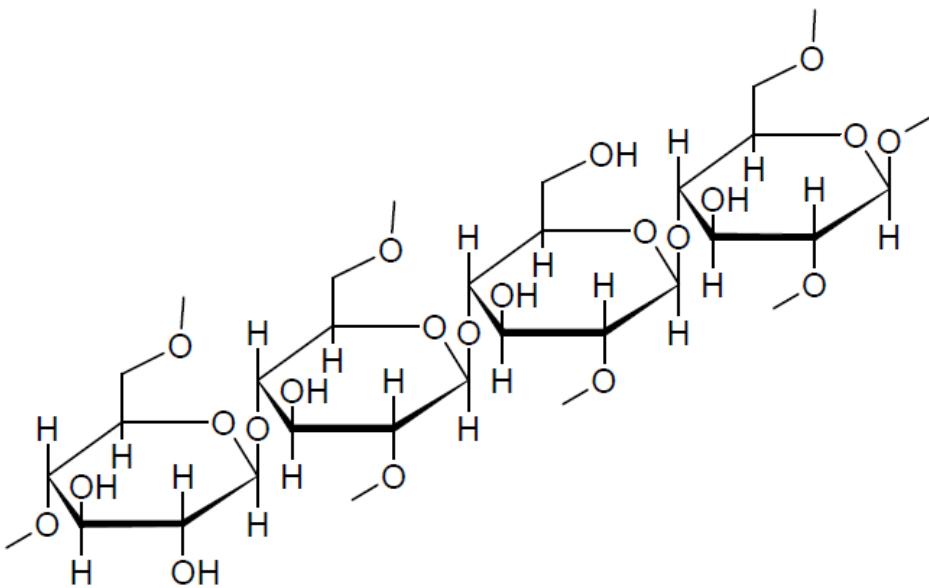
Figure 3: Structure of hydroxyethyl cellulose with DS = 1 and MS = 1.5.

Podobno kot CMC se tudi HEC uporablja v industriji barv (Tothill in Seal, 1993), v farmaciji in kozmetičnih pripravkih (Jones in sod., 1997), v papirni (Brinnick in Reilly, 1957) in tekstilni industriji (Lindenfors in Westberg, 1975), je pa tudi osnovna sestavina čistil in detergentov (Lohmann in sod., 1974).

2.1.3 Metil celuloza

Metil celulozo (MC) (slika 4) pripravljamo z eterifikacijo alkalne celuloze z metil kloridom (Bemiller, 1986). DS metil celuloz na trgu je med 1,7 in 2,3 substituent na anhidroglukozno enoto (Thielking in Schmidt, 2011). Metil celuloza z DS od 0,1 do 1,1 je topna v razredčenem (6 do 8 %) natrijevem hidroksidu, MC z DS od približno 1,4 do 2,0 je topna v vodi, skoraj popolnoma substituirana metilceluloza (DS 2,4 do 2,8) pa je netopna v vodi, vendar pa je topna v organskih topilih (Feller in Wilt, 1990).

Največ metil celuloze uporabimo v segmentu gradbenih materialov. MC se uporablja v belilih, ometih in lepilih za ploščice. V farmacevtski industriji se metil celuloza uporablja kot osnova za tablete in v prevlekah za tablete. V živilski in kozmetični industriji pa se uporablja zaradi zgoščevalnih in emulgacijskih lastnosti, s čimer dosegajo zaželeno konsistenco in teksturo produkta (Thielking in Schmidt, 2011).



Slika 4: Struktura metil celuloze z DS = 1,5.

Figure 4: Structure of methyl cellulose with DS = 1.5.

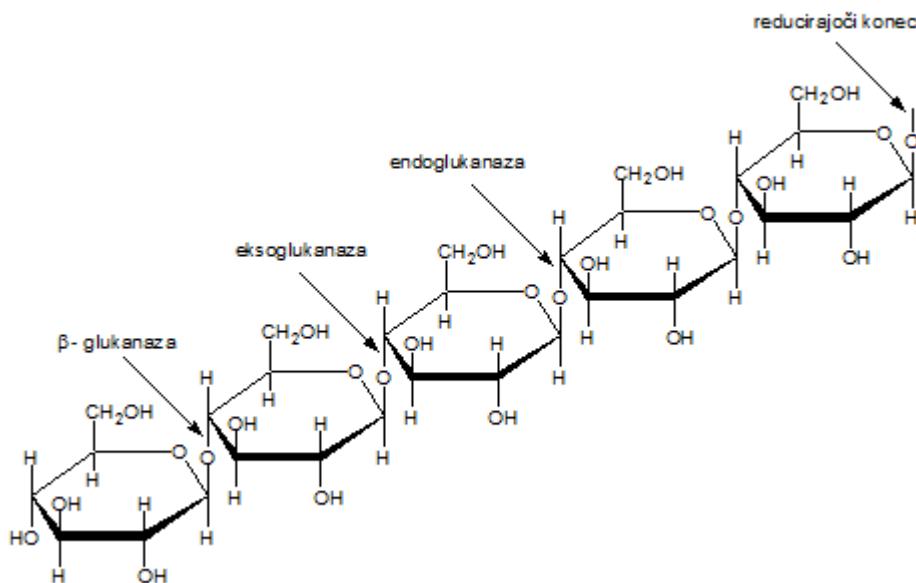
2.2 BIORAZGRADNJA CELULOZE IN NJENIH DERIVATOV

Celuloza je najbolj razširjen ogljikov hidrat v biosferi, zato njena razgradnja z mikroorganizmi predstavlja pomemben del pri kroženju ogljika (Béguin in Lemaire, 1996). Celulolitični mikroorganizmi primarno razgrajujejo ogljikove hidrate, običajno pa ne morejo izrabljati proteinov in lipidov kot vir energije za rast. V nalogi se bomo predvsem omejili na razgradnjo celuloze z bakterijami. Zemeljski predstavniki (npr. bakterije rodov *Cellulomonas* in *Cytophaga* ter večina gliv) lahko poleg celuloze izrabljajo tudi številne druge vire ogljika. Na drugi strani pa so anaerobne celulolitične vrste (npr. rodovi *Fibrobacter*, *Ruminococcus* in *Clostridium*) bolj omejene pri izbiri substratov, saj večinoma rastejo le na celulozi in njenih produktih hidrolize (Lynd in sod., 2002).

Katabolizem celuloze vključuje encimsko razgradnjo polimera in celično izrabo nastalih produktov. Poznamo dve primarni strategiji izrabe celuloznega materiala z bakterijami, ki temeljita na dostopnosti kisika. Anaerobne bakterije se vežejo na celulozo in razgradnjo opravijo s kompleksnimi celulaznimi sistemi, imenovanimi celulosomi, pri čemer nastajajo različni produkti fermentacije. Aerobne celulolitične bakterije lahko vzpostavijo le šibko povezavo s celulozo, vendar se običajno sploh ne vežejo na substrat. Proizvajajo nekompleksne celulaze in oksidirajo produkte hidrolize do CO_2 in vode. Seveda opisani strategiji nista povsem dihotomni, saj številni mikroorganizmi izkazujejo kombinirane lastnosti obeh načinov razgradnje (Lynd in sod., 2002). Med celulolitičnimi bakterijami so zelo dobro proučeni predstavniki rodu *Cellulomonas* (Stoppok in sod., 1982).

Razgradnja celuloznega materiala poteka z mešanico hidrolitičnih encimov, imenovanih celulaze (Dashtban in sod., 2010). V razgradnjo so vključeni vsaj trije tipi encimov: endo-glukanaze (EC 3.2.1.4), eksoglukanaze (EC 3.2.1.74) in β -glukozidaze (EC 3.2.1.21) (slika 5). Endoglukanaze hidrolizirajo naključne β -povezave v verigi celuloze, pri čemer nastanejo reducirajoči konci. Eksoglukanaze iz nereducirajočih koncev celuloze odcepijo celobiozo, ki je reducirajoči disaharid. Nastali produkti delujejo inhibitorno na eksoglukanaze, zato je za učinkovito razgradnjo celuloze potrebna še tretja skupina encimov. β -glukozidaze cepijo celobiozo in male oligosaharide do glukoze (da

Silva in sod., 2005; Dashtban in sod., 2010; Stoppok in sod., 1982; Saqib in Whitney, 2006).



Slika 5: Shema encimske hidrolize celuloze.

Figure 5: Scheme of cellulose hydrolysis.

V procesu biorazgradnje celuloznih gostil (v vodi topni derivati celuloze) sodelujejo enaki encimi, kot so potrebni za biorazgradnjo celuloze. Celulozna gostila so namreč derivati naravne celuloze, kemično modificirane tako, da so posamezne polimerne verige nezmožne tvorbe kompleksnih struktur preko vodikovih vezi, kar je ključ do topnosti celuloznih gostil v vodi. Celulozna gostila so praviloma le delno substituirana, stopnja substituiranosti pa je glavni parameter, ki določa stopnjo biorazgradljivosti (Reese in sod., 1950; Reese, 1957; Wirick, 1968). Če je vsaka anhidroglukozna enota v makromolekuli CMC vsaj enkrat substituirana, potem je molekula popolnoma neobčutljiva za encimsko hidrolizo (Reese in sod., 1950; Reese, 1957; Wirick, 1968). Začetni in ključni korak v biorazgradnji celuloznih gostil predstavlja hidroliza β -1,4-glikozidne vezi s celulazami (Batelaan in sod., 1992). Dokazano je, da karboksimetilacija onemogoča le endoglukanaze, ne pa tudi eksoglukanaze. Encimsko katalizirana cepitev celuloznega skeleta pa lahko poteče le na mestih, kjer so zaporedno vezane vsaj tri nesubstituirane anhidroglukozne enote. Po endoglukanazni hidrolizi ostanejo konci CMC molekul z nesubstituiranimi glukozami (Wirick, 1968; Kalsulke in sod., 1988). Nekatere

endoglukanaze pa lahko hidrolizirajo tudi glikozidne vezi ob monosubstituirani anhidroglukozni enoti, kadar je substituenta vezana na O – 6 mestu (Horner in sod., 1999).

Proučevanje biorazgradnje celuloznih gostil je bilo po večini opravljeno z očiščenimi celulazami pridobljenimi iz gliv kot so denimo *Myrothecium* in *Trichoderma* spp. (Bär in sod., 1995b; Vlasenko in sod., 1998; Cheroni in sod., 2010; Saqib in Whitney, 2006), ali iz bakterij kot so denimo. *Bacillus*, *Clostridium*, *Cellomonas*, *Rumminococcus*, *Alteromonas*, *Acetivibrio*, *Acidothermus*, *Thermonospora*, in *Bacteroides* spp. (Robson in Cambliss, 1989; Vlasenko in sod., 1998). V mnogih industrijskih procesih lahko prihaja do kontaminacije izdelkov ali surovin s celulolitičnimi mikrobi, kar lahko privede do ekonomske škode. Po kontaminaciji mikrobi rastejo in v produkt sproščajo celulaze, ki lahko popolnoma uničijo zgoščevalne lastnosti celuloznih gostil. To pomeni, da je biorazgradnja celuloznih gostil v realnosti pogojena tudi z mikrobnim rastjem, zaradi česar so za dobro razumevanje procesov biorazgradnje vsaj toliko kot študije z encimskimi sistemi, potrebne tudi študije biorazgradnje z mikroorganizmi. Kakorkoli, študij biorazgradnje celuloznih gostil z uporabo živih bakterijskih celic namesto na encimskih sistemih je razmeroma malo (Saqib in Whitney, 2006). Prihaja pa lahko do znatnih razlik med razgradnjo celuloze z encimskimi sistemi in bakterijskimi celicami. Npr. študije biorazgradnje CMC z bakterijsko kulturo *Agrobacterium* sp. A1 (Seiger in sod., 1995) so razkrile, da uporabljeni kultura lahko mineralizira zgolj nesubstituirano in presenetljivo tudi O-6 monosubstituirano glukozo, kar ni možno ugotoviti pri delu z očiščenimi celulazami. Za namene tega doktorskega dela smo vse eksperimente izvajali z živimi bakterijskimi kulturami, katerih opis sledi v nadaljevanju.

2.2.1 Rod *Cellulomonas*

V literaturi večinoma zasledimo, da so predstavniki rodu *Cellulomonas* aerobi, vendar lahko številni sevi rastejo tudi anaerobno, kot denimo *Cellulomonas uda* (Lynd in sod., 2002; Dermoun in sod., 1988). Rod *Cellulomonas* predstavlja korineformne bakterije, ki so večinoma gibljive, vendar nimajo sposobnosti tvorbe endospor (Thayer, 1984;

Thayer in sod., 1984). Ker imajo visok delež GC baznih parov (72 %), jih uvrščamo v deblo *Actinobacteria* in v istoimenski razred, v red *Actinomycetales* in v družino *Cellulomonadaceae* (Robson in Chambliss, 1989). Fiziološka lastnost, ki povezuje rod je hidroliza celuloze (Thayer, 1984), vendar vsi predstavniki ne izkazujejo enake celulolitične aktivnosti. Visoko aktivnost izkazujejo vrste *C. uda*, *C. gelida*, *C. cellasea* in *C. subalbus*, nižjo pa *C. biazotea*, *C. fimi* in *C. flavigena*. Razgradnja CMC poteka pri vseh bakterijskih kulturah najbolj učinkovito pri pH 7-7,5 in pri temperaturi 40 °C, medtem ko je optimalna temperatura rasti 30 °C. Rast stimulira tudi dodatek glukoze ali celobioze v gojišču, vendar s tem inhibiramo tako sintezo kot aktivnost celulaz (Thayer in sod., 1984).

2.2.2 Rod *Bacillus*

Bakterije rodu *Bacillus* so gram pozitivne bakterije, ki tvorijo endospore in izločajo širok nabor encimov, med drugim amilaze, proteaze, β -glukanaze in hemicelulaze (Priest, 1977). Predstavniki rodu *Bacillus* proizvajajo samo endoglukanaze in niso sposobni učinkovite razgradnje kristalinične celuloze. Celulolitični encimi rodu *Bacillus* so skoraj v celoti ekstracelularni (Robson in Chambliss, 1989). Veliko vrst bakterij *Bacillus* je sposobnih razgradnje CMC z endoglukanazami: *Bacillus subtilis* (Koide in sod., 1986, Robson in Chambliss, 1984, Knösel, 1971), *Bacillus polymyxa* (Fogarty in Griffin, 1973, Greaves, 1971), *Bacillus licheniformis* (Dhillon in sod., 1985), *Bacillus cereus* (Thayer, 1978), *Bacillus brevis* (Knösel, 1971), *Bacillus firmus* (Knösel, 1971), *Bacillus pumilus* (Knösel, 1971).

2.2.2.1 *Bacillus subtilis*

Bacillus subtilis lahko raste aerobno ali anaerobno in uporablja nitrat namesto kisika kot akceptor elektronov (Earl in sod., 2008; Kunst in sod., 1997; Nakano in sod., 1997). *Bacillus subtilis* lahko formira zelo odporne dormantne endospore, kot odziv na pomanjkanje hranič in ostale okoljske strese. Te spore se lahko enostavno prenašajo z vetrom. *Bacillus subtilis* lahko izoliramo iz mnogih zemeljskih in vodnih okolij (Earl in

sod., 2008). Endoglukanaze bakterije sevov *Bacillus subtilis* so termostabilne do 50 °C ± 5 °C, optimalni pH za celulazno aktivnost je v območju med 5,0 do 6,0 (Robson in Chambliss, 1989). Bakterija je pogosta predvsem v talnih ekosistemih, vendar jo najdemo tudi v vodi.

2.3 VISKOZNOST

Celulozna gostila se v tehnoloških aplikacijah večinoma uporabljajo za zgoščevanje tekočin in uravnavanje reoloških lastnosti proizvodov, kot so npr. prehranski izdelki in barve na vodni osnovi. Po definiciji je dinamična viskoznost η (Pas) sila, s katero se snov upira strižni napetosti (τ) pri dani strižni hitrosti ($\dot{\gamma}$), pri čemer so:

$$\eta = \frac{\tau}{\dot{\gamma}} \quad \dots(1)$$

η = dinamična viskoznost (Pas); τ = strižna napetost (Pa); $\dot{\gamma}$ = strižna hitrost (s^{-1})

$$\tau = \frac{F}{A} \quad \dots(2)$$

τ = strižna napetost; F = sila (N); A = površina (m^2)

$$\dot{\gamma} = \frac{v}{h} \quad \dots(3)$$

$\dot{\gamma}$ = strižna hitrost (s^{-1}); v = hitrost (ms^{-1}); h = debelina sloja tekočine (m)

Odvisnost viskoznosti od strižne hitrosti opisujemo s tokovnim obnašanjem raztopin, ki je lahko: od strižne hitrosti neodvisna viskoznost – newtonske tekočine; z naraščajočo strižno hitrostjo narašča – dilatantne tekočine; z naraščajočo strižno hitrostjo pada – psevdoplastične tekočine. Med slednje praviloma sodijo raztopine gostil na celulozni osnovi (Toğrul in Arslan, 2003; Karsheva in sod., 2007). Fizikalno kemijsko ozadje nastanka sil, ki se upirajo strižnim silam, je trenje med delci, ki pri izbrani strižni hitrosti drsijo drug ob drugemu, ter interakcije med delci. Viskoznost raztopine CMC narašča z naraščajočo koncentracijo polimera (pri konstantni molekulski masi) in z naraščajočo molekulsko maso polimera (pri konstantni masni koncentraciji) (Kulicke in sod., 1996).

Na viskoznost vplivajo tudi fizikalno-kemijski parametri neodvisni od polimera. Z naraščanjem temperature viskoznost raztopine CMC pada (Toğrul in Arslan, 2003). Kulicke in sod. (1996) ugotavljajo, da ima na viskoznost CMC vpliv tudi prisotnost NaCl, saj z naraščanjem koncentracije NaCl viskoznost raztopin CMC narašča, ta učinek pa je bolj izrazit pri nižjih koncentracijah CMC.

Intrinzično viskoznost določimo z grafično ekstrapolacijo reducirane viskoznosti na koncentracijo nič:

$$[\eta] = \lim_{\gamma \rightarrow 0} \frac{\eta - \eta_0}{\eta_0 \gamma} \quad \dots(4)$$

$[\eta]$ = intrinzična viskoznost (cm^3/g); η = viskoznost raztopine polimera (Pas); η_0 = viskoznost čistega topila (Pas); γ = masna koncentracija polimera v raztopini (g/L).

Z določanjem intrinzične viskoznosti pridobimo informacijo o velikosti in konformaciji molekule polimera, neodvisno od medmolekulskih interakcij. Glede na to, da viskoznost ekstrapoliramo na koncentracijo nič, lahko molekulo polimera obravnavamo kot izolirano. Molekula polimera lahko v dovolj razredčeni raztopini zavzame poljubno konformacijo in volumen. Ker je konformacija polimera v razredčeni raztopini odvisna izključno od sistema topilo –topljenec, je intrinzična viskoznost polimera funkcija molekulske mase, ki jo opisuje Mark-Houwinkova enačba:

$$[\eta] = KM^\alpha \quad \dots(5)$$

Pri čemur sta K in α Mark-Houwinkovi konstanti odvisni od sistema topilo – polimer. Mark-Houwinkove enačbe korelacij med molekulsko maso ter intrinzične viskoznosti so bile za CMC določene: $[\eta] = 1,43 \cdot 10^{-2} M_w^{0,90} \text{ cm}^3/\text{g}$ v $0,01 \text{ M NaCl}$ (Kulicke in sod., 1996); $[\eta] = 5,37 \cdot 10^{-2} M_w^{0,73} \text{ cm}^3/\text{g}$ v $0,5 \text{ N NaOH}$ (Eremeeva in Bykova, 1997); $[\eta] = 2,24 \cdot 10^{-2} M_w^{0,83} \text{ cm}^3/\text{g}$ v $0,4 \text{ M acetatnem pufru s pH 5}$ (Eremeeva in Bykova, 1997). Eremeeva in Bykova (1997) sta na podlagi svojih ugotovitev in ostalih določenih parov Mark-Houwinkovih konstant K in α ugotovili zvezo med konstantama za poljubno topilo in CMC, ki je po njunih ugotovitvah $\log K = -1,64 - 4,00 \alpha \text{ cm}^3/\text{g}$.

2.4 VELIKOSTNO IZKLUČITVENA KROMATOGRAFIJA – SEC

SEC je kromatografska tehnika, ki ločuje molekule polimerov glede na njihove hidrodinamske radije. Kadar s SEC ločujemo polimerne molekule enakih kemijskih struktur, je hidrodinamski radij sorazmeren z molekulsko maso polimerne molekule. Hidrodinamski radij polimera je pri enaki molekulski masi odvisen od topila, ki vpliva na njegovo konformacijo. Topilo ima še večji vpliv v primeru polielektrolitov kot je CMC, ki preko ionske jakosti in pH vrednosti vpliva poleg konformacije tudi na ekspanzijo polimerne molekule (Wach in sod., 2003). Inštrumentalno gre za metodo primerljivo klasičnim visokotlačnim tekočinskim kromatografijam (HPLC) brez gradientov mobilne faze. SEC se glede na klasične kromatografske tehnike ključno razlikuje po mehanizmu ločbe. Pri standardni HPLC se molekule različnih zvrsti ločujejo glede na afinitete do stacionarne faze, ki so odvisne tudi od uporabljenega topila oz. mobilne faze. Pri SEC pa uporabljamo porozne stacionarne faze, ki omogočajo, da molekule na poti skozi kolono potujejo v različno velike pore stacionarne faze. Najmanjše molekule gredo skozi pore vseh velikosti, večje le skozi večje pore, največje molekule pa potujejo mimo vseh por in tako opravijo najkrajšo pot (van Dijk in Smit, 1999; Montes-Bayón in sod., 2003). Za uspešno ločitev molekul po masi je ključno, da med molekulami analita ni interakcij, saj sicer dobimo precenjene mase, ki so posledica tvorbe kratko obstoječih agregatov, ki se obnašajo kot večji delec. Pomembna je tudi izbira materiala, ki tvori stacionarno fazo, saj mora biti le-ta popolnoma netopen v uporabljenih mobilnih fazah, analit pa se nanj ne sme adsorbirati kot v klasični kromatografski tehniki (Zhou in sod., 2000; Chin in sod., 1994).

2.5 AMFIPATIČNI DERIVATI KARBOKSIMETIL CELULOZE

Karboksimetil celuloza vsebuje dve različni funkcionalni skupini, preko katerih so mogoče modifikacije v kompleksnejše celulozne derivate. Derivatizacija CMC je mogoča preko nesubstituiranih hidroksilnih skupin celuloznega ogrodja, mogoča pa je tudi derivatizacija karboksilnih skupin. Modifikacije na karboksilnih skupinah so bile izpeljane preko tvorbe amida s pripajanjem alkil aminov (Cohen-Stuart in sod., 1998; Merle in sod., 1999). Z modifikacijami karboksilnih skupin z nenabitimi skupinami derivat izgublja naboj in s tem topnost v vodnih medijih. Pogosteje in bolj raznolike so modifikacije prostih hidroksilnih skupin celuloznega skeleta, pri katerih gre v večini primerov za uporabo reagentov, ki vsebujejo vinilno skupino (Cao in sod., 1997a, 1997b; Zhang in sod., 1999a, 1999b). Srakova in sod. (2003) pa so proste hidroksilne skupine CMC zaestrili preko mešanih anhidridov ocetne kisline in maščobnih kislin. Za derivate CMC z vezanimi hidrofobnimi skupinami je bilo ugotovljeno, da se obnašajo kot asociativna gostila (Charpentier in sod., 1997; Charpentier-Valenza in sod., 2005; Zhang, 2001). Asociativnost pomeni tvorbo medmolekularnih povezav med hidrofobnimi deli vezanimi na polarni skelet (Akiyoshi in sod., 1993; Bataile in sod., 1997). Povezave med hidrofobnimi deli povzročijo zamreženje strukture gostila v raztopini (Schulz in Bock, 1991), kar povzroči veliko višjo viskoznost takšnih raztopin (Landoll, 1982; Bataile in sod., 1997). Poleg same povišane viskoznosti asociativnih gostil je za njih značilno tudi eksponentno naraščanje viskoznosti z naraščajočo koncentracijo, za razliko od linearnega naraščanja viskoznosti neasociativnih gostil (Bataile in sod., 1997; Charpentier in sod., 1997). Hidrofobne substituente lahko vplivajo tudi na druge fizikalne lastnosti kot denimo ugotavljajo Srakova in sod. (2003), ki so proučevali emulgatorske lastnosti in čistilno uporabnost estrov maščobnih kislin s CMC.

2.6 DOLOČANJE STRUKTURE POLISAHARIDOV Z OZKOKOTNIM RENTGENSKIM SIPANJEM – SAXS

Ozkokotno sisanje rentgenskih žarkov (ang. Small Angle X-ray Scattering – SAXS) je metoda, s katero lahko preko sisanja rentgenskih žarkov proučujemo strukturne značilnosti koloidnih dimonzij. Za razliko od klasične kristalografije, pri kateri potrebujemo kristale in določamo strukturo na ravni atoma (1 – 20 Å), za določanje strukture s SAXS ne potrebujemo kristalov, pridobimo pa lahko strukturne informacije velikostnih redov od majhnih molekul do makromolekul (10 - 1000 Å) (Dore, 1995). Uporabnost metode SAXS se kaže tudi v tem, da z njo lahko določamo strukturo v razponu velikosti, ki so ključne za fizikalno-kemijsko obnašanje snovi v raztopinah. Velikostni razpon ki ga pokriva SAXS, tipično ni dosegljiv drugim metodam (Brant, 1999).

Meritve SAXS polisaharidnih raztopin so pokazale, da navzkrižno povezan hialuronan (EPS bakterije *Streptococcus equi*) vsebuje gostejša področja (Gamini in sod., 2002), podobno kot dekstran (Hirata in sod., 2003) in alginat (Draget in sod., 2003). SAXS meritve so bile uporabljene pri proučevanju gelacijskih mehanizmov kurdlana (Tada in sod., 1999), pri tem so pokazali, da pri gelaciji v rahlo alkalnem okolju in pri temperaturi 60 °C tvori homogeno mrežo, ki je pred gelacijo heterogena. Na gelacijo karagenana vplivajo dodani kationi (Yuguchi in sod., 2003). SAXS študije temperaturne odvisnosti gelskih karagenanov kažejo na povezovanje verig v dvojne viačnice in povezovanje leteh v večje strukturne enote. (Yuguchi in sod., 2002b). Yuguchi in sod. (1969) so s SAXS pokazali, da se gelan pri temperaturi 60 °C nahaja v obliki samostojnih verig. Pri ohlajanju gelana, pri čemer pride do gelacije, le-ta preide v stanje dvojne viačnice. Ob dodatku anorganskih soli gelan tvori gele. Yuguchi in sod. (2002a) so na gelanu pokazali, da se pri nižjih koncentracijah kalijevih soli pojavljajo enoslojni diskasti delci, zgrajeni iz dvojnih gelanovih verig, pri višjih koncentracijah pa se ti delci povezujejo v večslojne strukture. Dogša in sod. (2005) poročajo o vplivu pH vrednosti na strukturo EPS. Z nižanjem pH vrednosti od 11, kjer je EPS homogena raztopina, heterogenost narašča, pri tem se tvorijo gostejše regije.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Kemikalije

- 3,5-dinitrosalicilna kislina $C_7H_4N_2O_7xH_2O$ $M_w = 246,12$ g/mol (Sigma, Nemčija)
- dinatrijeva sol 4,5-dihidroksinaftalen-2,7-disulfonske kisline dihidrat $C_{10}H_6O_8S_2Na_2x2H_2O$ (Sigma – Aldrich, ZDA)
- agar (Fluka, Španija)
- amonijev nitrat NH_4NO_3 $M_w = 80,04$ g/mol (Sigma – Aldrich, Nemčija)
- D – (+) - glukoza, brezvodna $C_6H_{12}O_6$ $M_w = 76,05$ g/mol (Kemika, Hrvaška)
- destilirana voda
- hidroksietil celuloza (Natrosol 250 H4BR; Hercules – Aqualon)
- hidroksietil celuloza (Natrosol 250 MR; Ashland, Nemčija)
- K, Na-tartrat $C_4H_4KNaO_6x4H_2O$ $M_w = 282,23$ g/mol (Merck, Nemčija)
- kalcijev klorid $CaCl_2x2H_2O$ $M_w = 219,09$ g/mol (Sigma – Aldrich, ZDA)
- kalijev dihidrogen fosfat KH_2PO_4 $M_w = 136,09$ g/mol (Merck, Nemčija)
- kalijev hidrogen fosfat K_2HPO_4 $M_w = 174,18$ g/mol (Kemika, Hrvaška)
- karboksimetilceluloza $M_w = 250$ kDa, DS = 0,7 (Aldrich Chemistry, ZDA)
- karboksimetilceluloza $M_w = 250$ kDa, DS = 0,9 (Aldrich Chemistry, ZDA)
- karboksimetilceluloza $M_w = 250$ kDa, DS = 1,2 (Sigma – Aldrich, ZDA)
- karboksimetilceluloza $M_w = 90$ kDa, DS = 0,7 (Aldrich Chemistry, ZDA)
- karboksimetilceluloza DS = 1,2 (Blanose 12M31P, Ashland, Nemčija)

- kvasni ekstrakt (Biolife, Italija)
- magnezijev sulfat heptahidrat $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ $M_w = 246,48$ g/mol (Merck, Nemčija)
- metilceluloza CULMINAL 7000 PF (Ashland, Nemčija)
- natrijev hidroksid $NaOH$ $M_w = 40,00$ g/mol (Merck, Nemčija)
- natrijev klorid $NaCl$ $M_w = 58,44$ g/mol (Sigma – Aldrich, Danska)
- peptokompleks (Biolife, Italija)

3.1.2 Bakterijski sevi

- *Alcaligenes* sp. NCIB 11015
- *Azospirillum brasilense* ATCC 29145
- *Bacillus firmus*
- *Bacillus mycoides*
- *Bacillus subtilis* IS 75
- *Bacillus subtilis* JH 642
- *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* strain NCIB 3610
- *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* strain NCIB 3610 (*epsA-O*)::*tet*
- *Cellulomonas uda* DSM 20108
- *Chromobacterium violaceum*
- *Salmonella typhimurium*
- *Streptomyces coelicolor*

3.1.3 Sestava gojišč

- Prilagojeno BHM gojišče (Bushnell in Haas, 1941) z 1 % CMC ali TsCMC
 - 0,2 g MgSO₄·7H₂O
 - 1 g K₂HPO₄
 - 1 g KH₂PO₄
 - 1 g NH₄NO₃
 - 0,2 mL CaCl₂·2H₂O (100 g/l)
 - 10 g CMC ali CM
 - 1000 mL destilirane vode

Osnovna sestavina BHM gojišča je tudi FeCl₃·xH₂O, vendar železovih ionov nismo dodali, saj povzročijo koagulacijo CMC. Pri pripravi gojišča smo upoštevali tudi relativno vlogo CMC, tako da smo zatehtali ustreznou večjo količino. Relativno vlogo smo določili gravimetrično kot izgubo mase pri sušenju CMC na temperaturi 105 °C do konstantne mase (4h).

- BHM gojišče z 2 % CMC je imelo glede na BHM z 1 % CMC podvojene koncentracije vseh nutrientov
- BHM gojišča s HEC in MC so vsebovala tudi 1 g/L NaCl kot vir Na⁺, ker smo želeli ohraniti primerljivo razmerje nutrientov kot v primeru CMC, ki je v obliki Na soli.

- Trdno PKE gojišče
 - 6 g peptokompleksa
 - 3 g kvasnega ekstrakta
 - 15 g agarja
 - 1000 mL destilirane vode

Nekateri bakterijski sevi so na samem PKE gojišču rasli zelo počasi, zato smo le-te gojili na PKE ploščah z dodatkom 3 g/L glukoze.

3.1.4 DNS reagent

- 5 g 3,5-dinitrosalicilne kisline med segrevanjem raztopimo v 100 mL 2M NaOH,
- v 25 mL destilirane vode med segrevanjem raztopimo 150 g K, Na-tartrata,
- obe raztopini združimo v bučki in dopolnimo z destilirano vodo do oznake 500 mL.

3.2 INKUBACIJSKI EKSPERIMENTI

Preliminarni rezultati so pokazali, da so različne bakterijske kulture sposobne razgrajevati CMC z zelo različno hitrostjo. Na podlagi teh rezultatov smo se odločili, da bomo v naših eksperimentih uporabljali eno kulturo, ki lahko CMC razgraje zelo počasi, tako da bomo lahko spremljali dinamiko biorazgradnje. V ta namen smo izbrali bakterijo *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* NCIB 3610, natančneje (*epsA-O*):*tet* mutanto z okvarjenim genom za sintezo eksocelularnih polimernih substanc (EPS) in z tetraciklinsko rezistenco kot selekcijskim markerjem. Pri eksperimentih, v katerih smo proučevali biorazgradljivost, so nas zanimale zgolj razlike med začetnim in končnim stanjem

biorazgradnje. Pri teh eksperimentih smo želeli imeti kulturo, ki bo derivate razgradila v najkrajšem možnem času, zato smo izbrali bakterijo *Cellulomonas uda* DSM 20108.

3.2.1 Inkubacijski eksperimenti z *Bacillus subtilis* NCIB 3610

V inkubacijskih eksperimentih z *B. subtilis* smo uporabljali sev *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* sev NCIB 3610 (*epsA-O*::*tet* mutanto, ki ne more proizvajati eksocelularnih polisaharidov in ima tetraciklinsko rezistenco. Sev nam je podaril prof. dr. Steven Branda (Branda in sod., 2006). Celulazno aktivnost tega seva smo določili na agarjevih ploščah z jodovico (Kasana in sod., 2008). Kulturo *B. subtilis* smo gojili aerobno v 300 mL prilagojenega Bushnell Haas (BHM) rastnega medija (Bushnel in Haas, 1941), z 1 ali 2 % CMC kot edinim virom organskega ogljika, v temi na orbitalnem stresalniku (200 rpm) pri temperaturi 37 °C. V eksperimentih z *B. subtilis* smo uporabljali le CMC z DS = 0,7 in Mw 90 kDa, ki je bila 99,5 % čistosti glede na specifikacije proizvajalca Sigma – Aldrich. Inokulum smo pripravili s prenosom kolonij kulture *B. subtilis* iz PKE plošč v 100 mL BHM rastnega medija ter prekonočno aerobno inkubacijo na temperaturi 37 °C, v temi, na orbitalnem stresalniku (200 rpm). Nato smo aseptično prenesli po 3 mL (1 %) prekonočne kulture v sveže BHM gojišče ter inkubirali 34 dni. Zaradi dolgotrajnosti eksperimenta je tekom eksperimenta prihajalo do znatnih izgub vode zaradi izhlapevanja. Kot smo ocenili na podlagi vzporednega eksperimenta, tekom tako dolge inkubacije pri danih pogojih izhlapi približno 10 % vode. Zato smo v izogib spremembam koncentracije pred vsakim vzorčenjem nadomestili izhlapelo vodo z aseptičnim dodajanjem sterilne vode, količino le-te pa smo določili gravimetrično. Tako po vzorčenju smo spektrofotometrično izmerili optično disperzijo pri 650 nm (OD_{650}) na mikrotiterski plošči z mikrotiterskim čitalcem Multiscan spectrum optical reader (Thermo Electron Corp., Waltham, MA, USA). Celice smo iz vzorcev odstranili z 20-minutnim centrifugiranjem pri 13000 RCF, ter supernatante za nadaljnje analize shranili pri temperaturi -20 °C, kjer je bila celulazna aktivnost zanemarljiva. Število kolonij (CFU = ang. colony forming unit) smo določali na PKE ploščah, ki smo jih inkubirali aerobno 2 dni pri temperaturi 37 °C. Po končani inkubaciji smo preverili porabo celokupne količine sladkorjev s fenol-sulfurično metodo (Dubois in sod., 1956). Morebitno porabo

karboksimetilnih skupin po končani inkubaciji smo preverjali s kromotropično metodo (Graham, 1972). Zaradi nizke prirasti biomase je bila poraba celuloze in karboksimetilnih skupin pod mejo detekcije uporabljenih metod, kar je bilo v našem primeru 0,1 g/L pri fenol-sulfurični ter 0,04 g/L pri kromotropični metodi. Tekom inkubacijskega eksperimenta smo pod mikroskopom (Axio Observer.Z1, Carl Zeiss, Oberhocken, Nemčija) v faznokontrastni tehniki pod 1000-kratno povečavo periodično opazovali prisotnost endospor v kulturi *B. subtilis*. Endospor med inkubacijo nismo zaznali.

3.2.2 Inkubacijski eksperimenti s *Cellulomonas uda* za preverjanje vpliva DS na biorazgradnjo

Kulturo *Cellulomonas uda* DSM 20108 smo iz trdnega PKE gojišča (hranjenega pri temperaturi 4 °C) precepili na novo PKE ploščo in jo inkubirali aerobno preko noči pri temperaturi 28 °C. Za gojenje bakterij na CMC smo svežo kulturo iz PKE plošče nacepili v tekoče BHM gojišče z 1 % CMC ($M_w = 90$ kDa, DS = 0,7) in jo aerobno inkubirali preko noči pri temperaturi 37 °C s stresanjem pri 200 rpm. S prekonočno kulturo smo nacepili tekoča BHM gojišče z 1 % CMC, tako da je inokulum predstavljal 3 % celotne vsebine. Da smo zagotovili dovolj intenzivno mešanje, smo pri vseh poskusih za gojenje uporabili erlenmajerice z utori, saj sicer *C. uda* raste v agregatih. Delali smo v treh ponovitvah, kot kontrolo pa smo uporabili nenacepljeno gojišče. Pred vsakim vzorčenjem smo gravimetrično, s tehtanjem erlenmajeric, ugotavljali količino med inkubacijo izhlapele vode. Izhlapelo vodo smo nadomestili s sterilno destilirano vodo. Pri vsakem vzorčenju smo odvzeli 5,5 mL gojišča. Od tega smo 0,3 mL uporabili za spektrofotometrično določevanje optične gostote pri 650 nm, preostanku smo z 10-minutnim centrifugiranjem pri 13000 RCF odstranili celice. Pridobljen supernatant smo razdelili v tri paralelke in jih zamrznili na temperaturi -20 °C. Za vsako analizo (meritev viskoznosti ali določanje koncentracije reducirajočih sladkorjev) smo uporabili eno paralelko, ki smo jo predhodno odtalili.

3.2.3 Inkubacijski eksperiment za preverjanje vpliva substituente na biorazgradljivost

Inkubacijski eksperimenti za preverjanje vpliva tipa substituente smo izvajali v BHM gojiščih, ki so vsebovala 1 % komercialnih gostil: Culminal 7000 PF – metil celuloza (MC), Natrosol 250 MR – hidroksietil celuloza (HEC) in Blanose 12M31P – karboksimetil celuloza (CMC). Eksperimente smo izvajali podobno kot je opisano v prejšnji točki (inkubacijski eksperimenti s *Cellulomonas uda* za preverjanje vpliva DS na biorazgradnjo). Razlika je bila zgolj v načinu priprave inokuluma, ki je v tem primeru predstavljal suspenzijo bakterijske kulture v sterilni fiziološki raztopini (0,9 % NaCl).

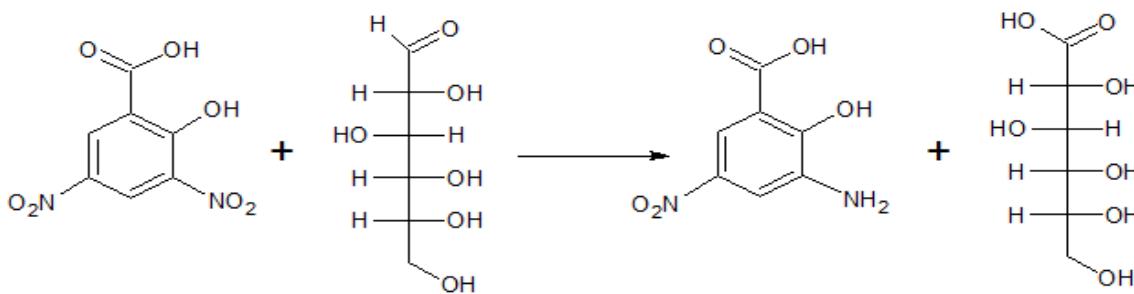
3.2.4 Inkubacijski eksperiment za preverjanje biorazgradljivosti TsCMC

Vse bakterijske seve smo shranjevali pri temperaturi 4 °C na trdnih PKE + glukoza (3 g/L) gojiščih. Vsak drugi teden smo bakterijske seve precepili na sveža PKE + glukoza gojišča. Za pripravo inokuluma smo nacepljena gojišča z bakterijskimi sevi *Cellulomonas uda* DSM 20108, *Bacillus firmus*, *Bacillus mycoides*, *Salmonella typhimurium*, *Alcaligenes* sp. NCIB 11015, *Bacillus subtilis* JH 642, *Bacillus subtilis* IS 75, *Bacillus subtilis* 3610 wt in *Chromobacterium violaceum* inkubirali aerobno preko noči pri temperaturi 37 °C. Nacepljena gojišča z bakterijskima sevoma *Azospirillum brasiliense* ATCC 29145 in *Streptomyces coelicolor* smo inkubirali aerobno pet dni pri temperaturi 28 °C. Za inkubacijske poskuse na celuloznih derivatih smo inokume pripravili v fiziološki raztopini (0,9 % NaCl), z namenom, da ne vnesemo že sintetiziranih celulaz v gojišča. Volumen inokuluma glede na volumen BHM gojišča je bil 1 %. Izjema so bili bakterijski sevi *Bacillus firmus*, *Bacillus mycoides*, *Salmonella typhimurium*, *Azospirillum brasiliense* ATCC 29145 in *Alcaligenes* sp. NCIB 11015, kjer je inokulum predstavljal 3 % gojišča, ker je bil OD_{650} teh suspenzij nižji. Bakterijske kulture smo pred inokulacijo dvakrat sprali s fiziološko raztopino. Suspendirano bakterijsko kulturo smo centrifugirali pri 13000 RCF za 10 minut, nato smo odpipetirali fiziološko raztopino in bakterijsko kulturo resuspendirali v fiziološki raztopini. Inkubacija z bakterijskimi sevi na gojiščih s celuloznimi derivati je vedno potekala aerobno, v temi, s stresanjem pri 200

rpm, pri temperaturi 37 °C. Kot negativno kontrolo smo gojišču dodali sterilno fiziološko raztopino. Biorazgradnjo smo ocenjevali po sedmih dneh inkubacije, kot porast v koncentraciji reducirajočih sladkorjev in padec v viskoznosti.

3.3 DNS METODA ZA DOLOČANJE KONCENTRACIJE REDUCIRajočIH SLADKORJEV

Z ugotavljanjem koncentracije reducirajočih sladkorjev spremljamo razgradnjo derivatov celuloze ali drugih polisaharidov. Višja kot je izmerjena koncentracija, več polisaharidnega skeleta je razgrajenega. Reducirajoče konce smo določali z metodo, ki jo je opisal Miller (1959), razlika pa je bila zgolj v formulaciji DNS reagenta. V steklene epruvete odpipetiramo 1 mL vzorca oz. ustrezne standardne raztopine glukoze in dodamo 1 mL DNS reagenta, s katerim tudi ustavimo encimsko reakcijo. Epruvete pokrijemo s kovinskimi zamaški in vsebino premešamo, nato jih inkubiramo v vodni kopeli na 100 °C za 15 min. V teh pogojih poteče reakcija, v kateri nastane barvni produkt, ki absorbira pri 575 nm (reakcija je prikazana na sliki 6). Po inkubiraju epruvete ohladimo v hladni vodi in prenesemo 0,3 mL vzorca v jamice mikrotiterske plošče ter spektrofotometrično izmerimo A₅₇₅. Iz 50 mM založne raztopine glukoze smo pripravili umeritveno krivuljo do koncentracije 5 mM. Na podlagi znanih koncentracij glukoze in njihovih izmerjenih absorbanc dobimo enačbo umeritvene krivulje, s pomočjo katere izračunamo koncentracijo reducirajočih sladkorjev v analiziranih vzorcih.



Slika 6: Shema reakcije, ki daje barvni produkt pri določanju reducirajočih sladkorjev z DNS metodo.

Figure 6: Reaction scheme of color development during reducing sugar determination by the DNS method.

3.4 MERITVE VISKOZNOSTI

Viskoznost smo merili z rotacijskim reometrom Anton Paar Physica MCR 301. Uporabili smo sistem plošča–plošča s premerom 49,975 mm, razmik med meritvenima ploščama je bil 0,25 mm, merjenje je potekalo pri temperaturi $25 \pm 0,01^\circ\text{C}$. Za opravljeno meritve smo potrebovali približno 490 μL vzorca, da smo zapolnili prostor med ploščama. Viskoznosti so bile izmerjene v 29 korakih v območju strižnih hitrosti od 2 do 1000 s^{-1} v 5 sekundnih intervalih. Intrinzične viskoznosti smo določali z meritvami razredčenih vzorcev, pri čemer smo jih redčili z raztopino BHM brez celuloznih gostil. Intrinzične viskoznosti smo določili z grafično ekstrapolacijo reducirane viskoznosti na koncentracijo 0 (enačba 4).

3.5 KVALITATIVNO OCENJEVANJE PRISOTNOSTI NESUBSTITUIRANIH REGIJ

Poleg stopnje substituiranosti je zelo pomemben dejavnik, ki vpliva na reologijo tudi distribucija dodanih skupin na celuloznem skeletu. Nesubstituirane regije celuloznega gostila ohranijo lastnosti celuloze, zato lahko s sosednjimi molekulami tvorijo vodikove vezi, kar vodi v tvorbo 3-D mreže. Posledica tvorbe 3-D mreže je izguba tekočnosti, medij pa se prične obnašati kot gel. Za dokazovanje prisotnosti nesubstituiranih regij smo koncentriranim raztopinam CMC dodali NaCl, ki zasenči odbojne interakcije med karboksilnimi skupinami. To omogoči, da se sosednji verigi dovolj približata, da se med njima lahko tvorijo vodikove vezi med nesubstituiranimi regijami. Pri nižji stopnji substituiranosti ima polimer več nesubstituiranih regij, posledično tvori gostejšo in kompaktnejšo 3-D mrežo, kar rezultira v najmanj tekočem gelu. Pripravili smo 3 % raztopine CMC (z DS 0,7; 0,9; 1,2) in jih razdelili v dve paralelki. Eni paralelki smo dodali 5 % NaCl, v drugi paralelki pa smo imeli samo CMC. Vzorce različno substituiranih CMC z NaCl smo nanesli na vodoravno postavljeno plastično podlago in poslikali začetno stanje. Nato smo podlago postavili navpično za približno 30 sekund in slikali novo stanje. Razlike v deležih nesubstituiranih regij v vzorcih primerljivih Mw se kažejo v različni hitrosti potovanja po podlagi; vzorci z višjim deležem nesubstituiranih regij potujejo hitreje.

3.6 VELIKOSTNO IZKLJUČITVENA KROMATOGRAFIJA – SEC

S to metodo smo določali razlike v masni distribuciji med razgrajenimi in nerazgrajenimi vzorci celuloznih gostil. Kot nerazgrajene vzorce smo uporabili kontrolo, torej sterilno BHM gojišče s proučevanim celuloznim gostilom, razgrajeni vzorci pa so bili odvzeti zadnji dan inkubacijskega eksperimenta z *B. subtilis* ali *C. uda*. Za ločevanje smo uporabili velikostno izključitveno kromatografsko tehniko, kjer ločitev poteka zaradi različnega zadrževanja molekul v porah stacionarne faze (manjše molekule se v koloni zadržijo dalj časa).

Injicirali smo $20 \mu\text{L}$ 0,5 % vzorca, redčenega z 0,4 M acetatnim pufrom s pH 5, ki smo ga sicer uporabljali kot mobilno fazo (Eremeeva in Bykova, 1998). Pretok je bil 1 mL/min. Ločba je potekala na zaporedno vezanih kolonah PSS Suprema analytical 100, 1000 in 10000 Å, pri temperaturi 30 °C. Detekcijo nam je omogočil RI (ang. refractive index = lomni količnik) detektor (KNAUER, Advanced scientific instruments).

3.7 MERJENJE OPTIČNE GOSTOTE BAKTERIJSKIH KULTUR

Z merjenjem optične gostote pri 650 nm smo ugotavljali hitrost rasti *C. uda* v tekočem BHM gojišču z izbranim derivatom celuloze. Meritev smo opravili spektrofotometrično, tako da smo 0,3 mL vzorca prenesli v jamico mikrotiterske plošče in z optičnim čitalcem Multicsan spectrum, Thermo electron corporation izmerili OD₆₅₀. Od izmerjenih OD₆₅₀ vrednosti vzorcev smo odšteli začetne vrednosti vzorcev.

3.8 PRIPRAVA VZORCEV ZA PREVERJANJE VPLIVA pH VREDNOSTI NA STRUKTURO CMC

Vzorce smo pripravili kot 2 % (m/v) raztopine CMC z Mw = 90 kDa in DS = 0,7 v 0,1 M elektrolitu z različnimi pH vrednostmi. Najprej smo pripravili 3 % raztopine CMC v demineralizirani vodi in 0,3 M raztopine elektrolitov HCl in NaCl, ki smo jih mešali v različnih razmerjih: 1 : 0 (HCl : NaCl) za pH 1,6; 1 : 1 za pH 3,1; 7 : 13 za pH 3,6; 19 : 1 za pH 5; in 0 : 1 za pH 7. Nato smo dva dela 3 % raztopine CMC mešali z enim delom

zmesi 0,3 M elektrolitov, kar je rezultiralo v 2 % raztopinah CMC v 0,1 M elektrolitu z omenjenimi pH vrednostmi.

3.9 OZKOKOTNO SIPANJE RENTGENSKIH ŽARKOV – SAXS

Sipalne krivulje ozkokotnega sisanja rentgenskih žarkov (SAXS) so bile posnete kot je opisal Dogša (Dogša in sod., 2005, 2008). Vzorce smo merili pri temperaturi 25 °C s Kratky kamero (Anton Paar KG, Graz, Avstrija; Kratky in Stabinger, 1984), nadgrajeno z dodatnimi optičnimi elementi (Göbel mirror, MAX-FLUX™ Osmic optimised, Rigaku, ZDA). Kamera je bila združena s konvencionalnim generatorjem rentgenskih žarkov Kristalloflex 760 (Bruker AXS GmbH, Nemčija), opremljenim z zaprto rentgensko cevjo (Cu K α X – žarki z valovno dolžino $\lambda = 0,154$ nm), delovala pa je pri 40 kV in 35 mA. Z Göbelovimi zrcali in z režnim kolimatorjem smo dosegli intenziven monokromatski primarni žarek, ki je bil oslabljen z nikljevo folijo primerne debeline, kar je bilo potrebno zaradi omejitev detektorja. Uporabili smo tudi programski monokromator, ki je beležil le rentgenske fotone v predhodno definiranem energijskem oknu. Vzorce smo merili v standardni kvarčni kapilari premera 1 mm in debeline stekla 10 μm . Intenzitete sianih rentgenskih žarkov smo detektirali s pozicijsko občutljivim detektorjem PSD ASA (M. Braun GmbH, Garching, Nemčija) v ozkokotnem režimu sipalnih vektorjev $0,016 < q < 0,52 \text{ \AA}^{-1}$ za 1% CMC in $0,009 < q < 0,52 \text{ \AA}^{-1}$ za 2% CMC, pri čemer $q = 4\pi/\lambda \cdot \sin(\vartheta/2)$, ϑ pa predstavlja sipalni kot. Vzorci so bili merjeni najmanj 20 ur, da smo pridobili zadostno število meritov za statistično analizo. Sipalni podatki so bili korigirani z meritvijo prazne kapilare in čistega topila brez CMC, nato pa pretvorjeni v absolutno skalo z uporabo vode kot sekundarnega standarda (Orthaber in sod., 2000).

3.10 MODELIRANJE SAXS PODATKOV

Zaradi sorazmerno slabega razmerja signal/šum smo za modeliranje lahko uporabljali le meritve vzorcev 2 % CMC. Strukture CMC so bile na podlagi SAXS sipalnih krivulj modelirane z modelom biserne ogrlice, kot opisujejo Dogša (Dogša in sod., 2008). V tem modelu je polimerna veriga obravnavana kot linearna veriga N kroglic z radijem r .

Pozicijo kroglice glede na njenega predhodnika lahko opišemo z veznim kotom Θ in s torzijskim kotom Φ , ki lahko varirata glede na verjetnost p^* . Denimo, če je vrednost $p^* = 1$, bodo vsi monomeri imeli naključne vrednosti Θ in Φ kotnih parov, če pa je $p^* = 0$, bodo vsi kotni pari imeli konstantne vrednosti, kar pomeni da polimer tvori rigidno helično strukturo. Togost modeliranega polimera je pogojena z oženjem naključno izbranih veznih kotov z nastavljivo zgornje mejo Θ_{plim} . V simulaciji je bilo modeliranih 60.000 struktur z različnimi vrednostmi oblikovnih parametrov (Θ_p , Φ_p , Θ_{plim} , in p^*), nato pa so bili vsaki strukturi izračunani reprezentativni form faktorji verige $\overline{P(q)}$, radij giracije R_g , in perzistenčna dolžina l_p . Simulacije so potekale bodisi brez inter-verižnega interakcijskega potenciala ali z Gausovim odbojnim potencialom. Odbojni potencial opisuje odbojna korelacijska dolžina ζ in konstanto K, ki je sorazmerna koncentraciji polimera in jakosti interakcije (Dogsa in sod., 2008; Yuguchi in sod., 1996). Reprezentativni form faktor verige $\overline{P(q)}$, kombiniran z inter-verižnimi interakcijami, omogoča konstruiranje teoretičnih sipalnih intenzitet $I(q)$, ki jih nato primerjamo z eksperimentalno SAXS sipalno krivuljo. Pri simulaciji nismo uporabili predhodnih predpostavk glede velikosti polimernih verig; simulirali smo verige z 100 – 1200 monomeri v korakih po 100 monomerov.

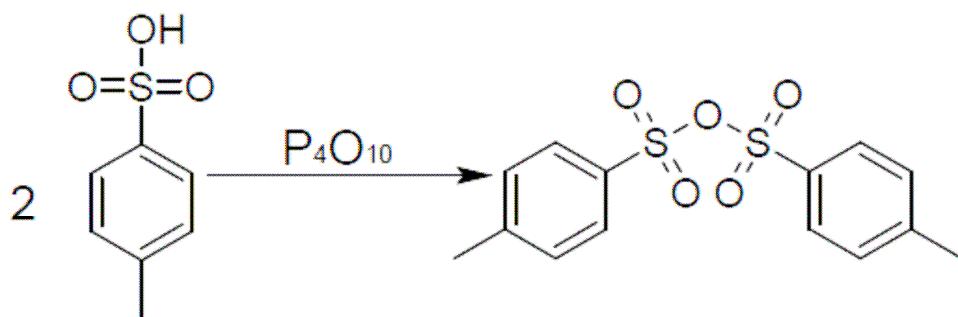
3.11 FTIR SPEKTROSKOPIJA

IR spektre smo posneli na Perkin Elmer Spectrum 100 FTIR spektrofotometru v tehniki difuznega odboja s pripomočkom Perkin Elmer Diffuse Reflectance Sampling Accessory. Vzorci so bili pripravljeni kot 5 % (m/m) zmes v dehidriranem KBr. Na posameznemu vzorcu je bilo pri sobni temperaturi izvedenih 12 povprečenih posnetkov z ločljivostjo 4 cm^{-1} v območju valovnih števil 450 – 4000 cm^{-1} .

3.12 PRIPRAVA TOZILATA KARBOKSIMETIL CELULOZE

16 g kaboksimetil celuloze (CMC) smo raztopili v 350 mL DMSO, dodali 11 g (61 mmol) *p*-toluensulfonske kisline (TSA) in 3 g (11 mmol) P_4O_{10} . TSA pretvori karboksimetilne skupine v protonirano obliko, kar je ključno za topnost CMC v DMSO.

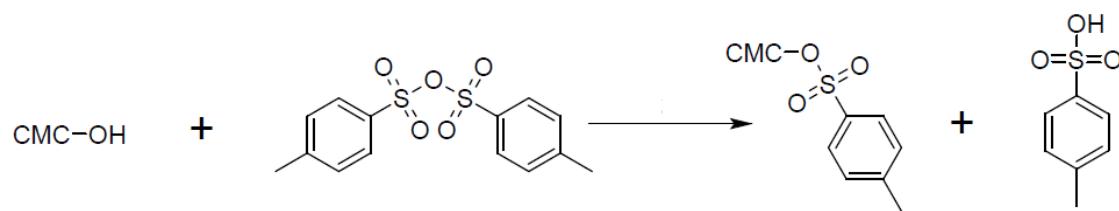
P_4O_{10} služi kot sredstvo za vezavo vode raztopljeni v topilu (DMSO), s čimer prepreči hidrolizo CMC.



Slika 7: Shema sinteze tozilanhidrida.

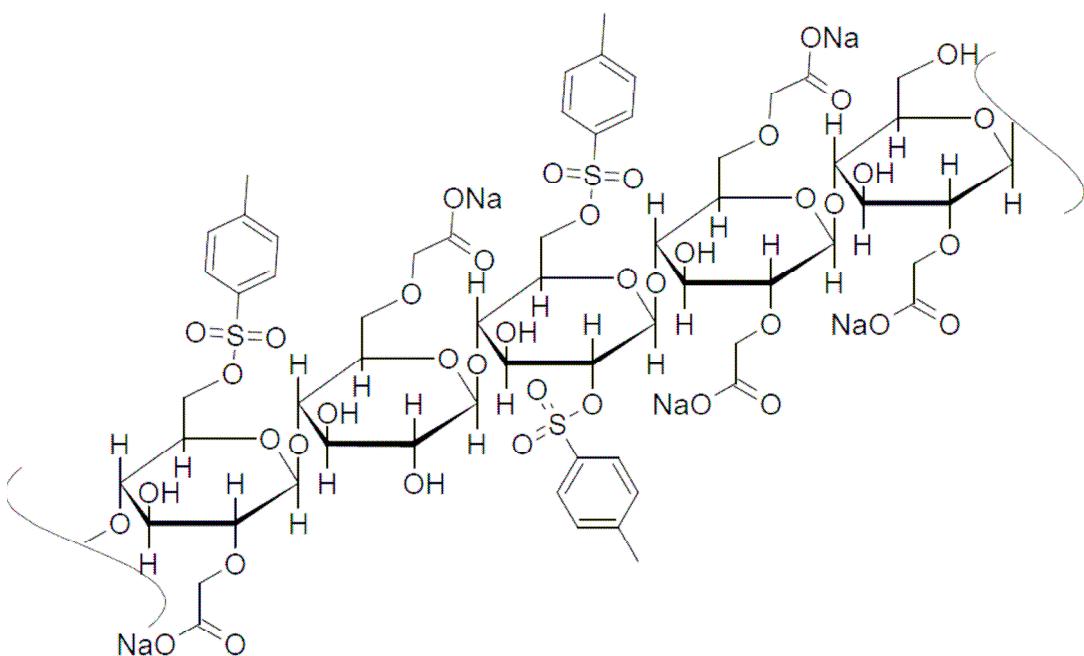
Figure 7: Scheme of tosylanhydride synthesis.

CMC smo nato zaestrili s tozilanhidridom. Tozilanhidrid smo pripravili tako, da smo med mešanjem na magnetnem mešalu pri $100 \pm 2^\circ\text{C}$ 100 mL dimetilsulfoksida dodali 10 g P_4O_{10} in 50 g dehidrirane TSA ter mešali 20 min (slika 7). TSA smo dehidrirali s segrevanjem pri 105°C 2 dni, uspešnost dehidracije smo preverili s temperaturo tališča, ki za dehidrirano TSA znaša 38°C (Armarego in Chai, 2003), za njen monohidrat pa kot navaja proizvajalec $103 - 105^\circ\text{C}$. V tako pripravljeni raztopini tozilanhidrida smo dodali predhodno pripravljeni raztopino CMC in nastalo reakcijsko zmes mešali na magnetnem mešalu pri 1200 rpm pri temperaturi $100 \pm 2^\circ\text{C}$ do zgostitve reakcijske zmesi.



Slika 8: Shema reakcije estrenja –OH skupin CMC s tozilanhidridom.

Figure 8: Scheme of esterification of –OH groups of CMC using tosylanhydride.



Slika 9: Shema strukture tozilata karboksimetil celuloze (TsCMC).

Figure 9: Scheme of carboxymethyl cellulose tosylate (TsCMC) structure.

Po končani reakciji (slika 8) smo produkt (slika 9) oborili v 2 L absolutnega etanola. Oborino smo filtrirali skozi Schleicer & Schuell black ribbon filter papir in produkt 3-krat sprali z 2 L absolutnega alkohola med 15-minutnim intenzivnim (1200 rpm) mešanjem na magnetnem mešalu. Vsakemu spiranju je sledila filtracija skozi filter papir. Oborino smo nato nevtralizirali v 2 L etanola, ki smo mu dodali 2 g trdnega NaOH, nevtralizacija je potekala pol ure pri intenzivnem mešanju na magnetnem mešalu. Po končani nevtralizaciji smo produkt filtrirali in spirali z alkoholom (2 x 2 L), kot smo to izvajali pred nevtralizacijo. Oborino smo osušili v sušilniku pri temperaturi 45 °C do konstantne mase (2 dni).

3.13 PREVERJANJE EMULGACIJSKE UČINKOVITOSTI

Za ocenitev emulgacijske učinkovitosti smo pripravili raztopini 50 mg TsCMC in CMC v 9 mL demineralizirane vode. Tej raztopini smo dodali 1 mL parafinskega oljaobarvanega z lizokromom Sudan III (Srakova in sod., 2004). Emulzije smo pripravili z enostavnim 1-

minutnim stresanjem v roki. Stabilnost emulzije smo spremljali vizualno po 1 uri, 1 dnevnu, po enem tednu in po enem mesecu.

3.14 MERITVE DINAMIČNIH KONTAKTNIH KOTOV

Meritve dinamičnih kontaktnih kotov so bile opravljene na FIBRO DAT 1100 Dynamic Absorption Tester. Testno površino smo pripravili z omakanjem filter papirja v 1 % raztopino CMC ali TsCMC ter osušili v konvekcijskem sušilniku pri temperaturi 45 °C. Na testirano podlago smo kapnili 6 µL kapljice ter po času merili kontaktne kote med vodno kapljico in testirano površino. Meritve so potekale pri sobni temperaturi in so trajale 50 sekund.

3.15 CHSP ELEMENTNA ANALIZA

CHSP elementno analizo so izvedli na Inštitutu za celulozo in papir v Ljubljani. Elementne analize so bile izvedene po naslednjih standardiziranih metodah:

- *SIST EN 13137* za določitev ogljika (C) – določanje celokupnega organskega ogljika,
- *SIST ISO 609* za določitev vodika (H) – metoda zgorevanja pri visoki temperaturi,
- *SIST ISO 351* za določitev žvepla (S) – metoda zgorevanja pri visoki temperaturi in
- *ISO 6878* za določitev fosforja (P) – spektrofotometrična metoda z amonijevim molibdatom.

Vzorci za določanje fosforja so bili pripravljeni po metodi *SIST EN 13346*.

3.16 UV-VIS SPEKTROSKOPIJA

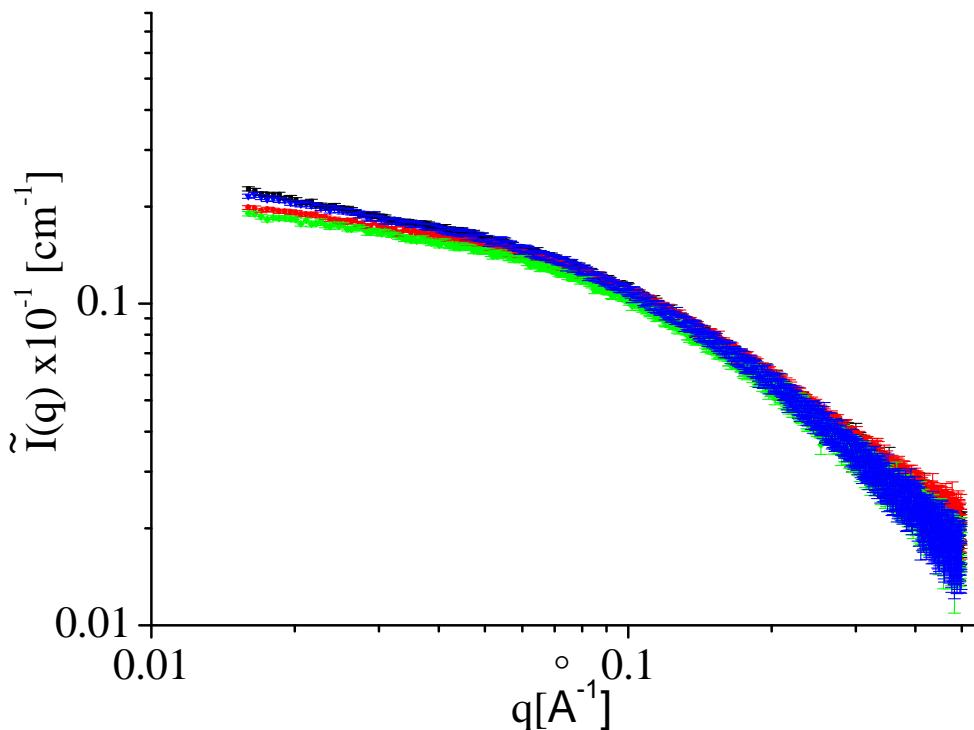
Prisotnost aromatov vezanih na celulozni skelet CMC smo preverili z UV-VIS spektroskopijo. UV-VIS spektre CMC in TsCMC smo posneli v kvarčni kiveti z optično potjo $l = 1$ cm v območju valovnih dolžin $\lambda = 200 - 600$ nm, z ločljivostjo 5 nm na spektrofotometru Multiscan spectrum optical reader (Thermo Electron Corp., Waltham, MA, USA). Spektre smo posneli na 1 % vodnih raztopinah CMC in TsCMC, ki smo ju predhodno 20 min centrifugirali pri 13.000 RCF, da smo odstranili agregate in zračne mehurčke v TsCMC.

4 REZULTATI

4.1 STRUKTURNA KARAKTERIZACIJA CMC S SAXS

4.1.1 Vpliv biorazgradnje na strukturo CMC

Strukturne razlike med biorazgradnjo CMC, kot jih opazimo s SAXS, so predstavljene na sliki 10. Slika prikazuje reprezentativne sipalne krivulje za 1 % CMC v BHM mediju, predstavljene kot absolutne vrednosti intenzitet v odvisnosti od sipalnega vektorja q . Sipalna krivulja nativnega CMC kaže na prisotnost dveh približno linearnih regij z naklonoma a in b . Naklon a je bil določen v q območju med 0,016 in 0,07 Å⁻¹, kar ustreza Braggovim razdaljam med 390 in 90 Å, naklon b pa je bil določen v q območju med 0,07 in 0,51 Å⁻¹, kar ustreza Braggovim razdaljam med 90 in 12 Å. Biorazgradnja CMC je povzročila postopno padanje naklona a med eksperimentom, medtem ko na naklon b ni imela značilnega vpliva. Padanje naklona a kaže na postopno nižanje SAXS sipalne intenzitete na večjih strukturnih elementih CMC.

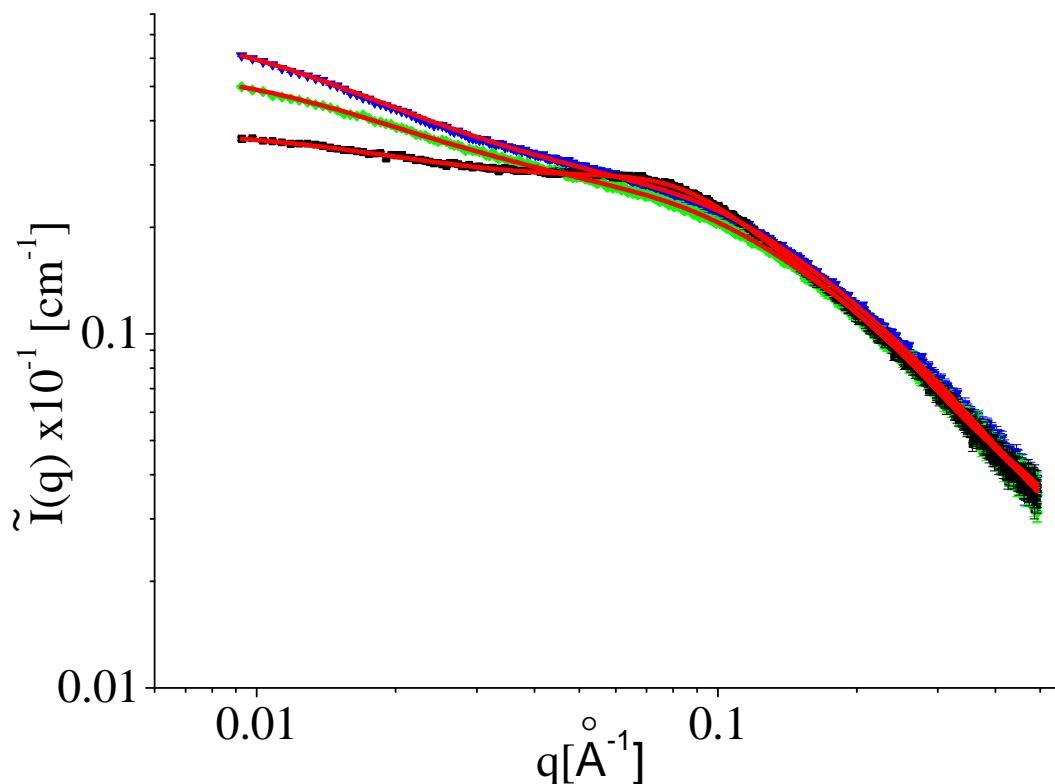


Slika 10: Eksperimentalne SAXS sipalne krivulje $\tilde{I}(q)$ 1 % CMC med biorazgradnjo z *B. subtilis* pri t = 0 (\blacktriangledown); t = 5 dni (\blacksquare), t = 15 dni (\bullet), in t = 22 dni (\blacklozenge).

Figure 10: Slit-smeared experimental SAXS curves $\tilde{I}(q)$ of 1 % CMC during biodegradation with *B. subtilis* at t = 0 (\blacktriangledown); t = 5 days (\blacksquare), t = 15 days (\bullet), and t = 22 days (\blacklozenge).

Razmerje signal – šum na sliki 10 je preslabo za zanesljivo modeliranje. Za izboljšanje kakovosti podatkov smo podvojili koncentracijo CMC na 2 %, poleg tega smo podaljšali čas meritev (slika 11). S tem smo dobili dvakratno povečanje sipalne intenzitete. Povišanje koncentracije CMC iz 1 na 2 % je povzročilo spremembo q območja naklona a , iz 0,016 do 0,07 Å⁻¹ v primeru 1 % CMC, na 0,016 do 0,14 Å⁻¹ v 2 % CMC. To je povečalo območje v katerem se sipalni krivulji razgrajenega in nativnega CMC značilno razlikujeta. Med biorazgradnjo 2 % CMC v BHM ni bilo značilnih sprememb v naklonu b , medtem ko se je naklon a z razgradnjo zmanjšal. Na sliki 11 je viden tudi vpliv topila na strukturiranost CMC. Glede na BHM medij ima nativni CMC v čisti vodni raztopini

značilno različno sipalno krivuljo. Tako naklon a kot tudi q območje sipanja CMC sta se v vodni raztopini močno zmanjšala glede na BHM rastni medij.



Slika 11: SAXS sipalne krivulje $\tilde{I}(q)$ 2 % nativnega CMC v BHM mediju (\blacktriangledown), razgrajenega 2 % CMC z *B. subtilis* (\blacklozenge) in nativnega 2 % CMC v vodi (\blacksquare). Krivulje so postavljene na absolutno skalo z uporabo vode kot sekundarnega standarda. Zvezne rdeče črte predstavljajo krivuljo najboljšega prileganja modela biserne ogllice eksperimentalnim podatkom.

Figure 11: SAXS curves $\tilde{I}(q)$ of 2 % native CMC in the BHM media (\blacktriangledown), *B. subtilis* degraded 2 % CMC (\blacklozenge), and native 2 % CMC in water (\blacksquare). The curves were put on an absolute scale using water as a secondary standard. Solid red lines represent the best fits to the experimental data according to the string-of-beads model.

Parametri rešitev simulacije SAXS sipalnih krivulj za razgrajen in nerazgrajen CMC z modelom biserne ogllice so zbrani v preglednici 1. Korelacijska dolžina odbojnih interakcij ζ , ki opisuje izključujučo razdaljo med polimernimi verigami kot tudi moč

elektrostaticične interakcije K , sta močno odvisni od prisotnosti dodanih soli. CMC raztopljen v BHM mediju ima značilno znižano moč odbojnih intermolekularnih interakcij glede na raztopino CMC v čisti vodi. Odbojna interakcija, koreacijska dolžina in moč interakcije se med nativnim in biorazgrajenim CMC ne razlikujejo značilno, kar kaže na to, da je vpliv senčenja naboja primerljiv pri razgrajenem in nerazgrajenem CMC. Med biorazgradnjo se heličnost strukture CMC ni značilno spremenila, kar nakazuje odsotnost večjih sprememb parametrov p^* , Θ_p , Φ_p , Θ_{plim} . Tudi na perzistenčno dolžino polimerne verige, l_p , biorazgradnja ni imela značilnega vpliva, kar nakazuje na strukturno podobnost nativnega in biorazgrajenega CMC na majhnih prostorskih skalah. To je konzistentno s SAXS sipalnimi krivuljami nativnega in biorazgrajenega CMC, kjer sta naklona krivulj b v q območju med 0,13 in 0,52 Å⁻¹ primerljiva. V Braggovih razdaljah to predstavlja 1 do 5 nm velike strukture, kjer se strukturi nativnega in biorazgrajenega CMC ne razlikujeta. Na velikostnih skalah, ki so večje od perzistenčne dolžine polimerne verige, strukturne razlike med nativnim in razgrajenim CMC postanejo znatne. Na primer, radij giracije polimera je iz začetnih 147 padel na 123 Å. V primerjavi z radijem giracije nativnega CMC v čisti vodi, ki je 103 Å, je radij giracije nerazgrajenega CMC nepričakovano velik. To kaže, da je kljub biorazgradnji še vedno prisotnih nekaj kontaktnih con nano-velikosti, ki združujejo sosednje verige. Ti kontakti so razpadli, ko smo CMC podvrgli strižnim silam med meritvami viskoznosti.

Preglednica 1: Parametri rešitev SAXS simulacije z modelom biserne oglice za 2 % (m/v) CMC.

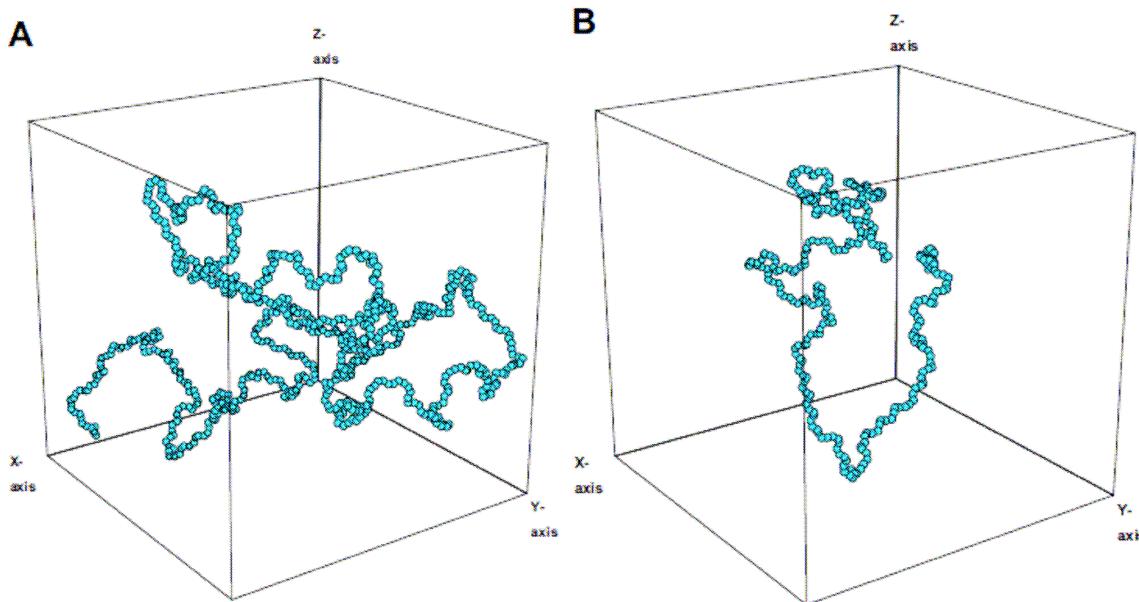
Table 1: Solution parameters of SAXS simulation with the string-of-beads model for 2 % (w/v) CMC.

Parameter modela	Nativni CMC v BHM	Biorazgrajen CMC v BHM	Nativni CMC v čisti vodi
ξ [Å]	17 ± 1	18 ± 2	23 ± 1
K	$2,4 \pm 0,6$	$2,1 \pm 0,9$	$7,0 \pm 1,3$
p^*	$0,35 \pm 0,10$	$0,28 \pm 0,15$	$0,48 \pm 0,22$
θ_{plim} [rad]	$1,5 \pm 0,25$	$1,6 \pm 0,38$	$1,15 \pm 0,75$
θ_p [rad]	$1,0 \pm 0,25$	$0,9 \pm 0,20$	$2,1 \pm 1,0$
φ_p [rad]	$1,6 \pm 0,20$	$1,5 \pm 0,4$	$2,0 \pm 1,0$
R_g [Å]	147 ± 8	123 ± 7	103 ± 16
l_p [Å]	35 ± 5	45 ± 10	35 ± 10
N	700 ± 100	400 ± 100	400 ± 100

Opis parametrov: ξ korelacijska dolžina odbojnih interakcij, K konstanta sorazmerna s koncentracijo polimera in močjo interakcije, p^* verjetnost za monomer z naključnimi Θ (vezni) in Φ (torzijski) koti, zgornja meja veznega kota θ_{plim} , R_g radij giracije polimera, l_p perzistenčna dolžina polimera. Podane so povprečne vrednosti v območju rešitev pridobljenih z rešitvami modela biserne oglice.

Parameter description: ξ repulsion interaction correlation length, K constant proportional to polymer concentration and strength of interaction, p^* probability of monomer with a random Θ (bond) and Φ (torsion) angles, the upper limit of bond angle θ_{plim} , R_g radius of gyration of the polymer, l_p persistence length of the polymer. The arithmetic mean values of the parameter range obtained by the string-of-beads model are given.

Ob upoštevanju parametrov najboljših prileganj rešitev modela biserne oglice SAXS eksperimentalnim podatkom smo pridelali reprezentativne strukture nativnega in biorazgrajenega 2 % CMC v BHM mediju (slika 12).



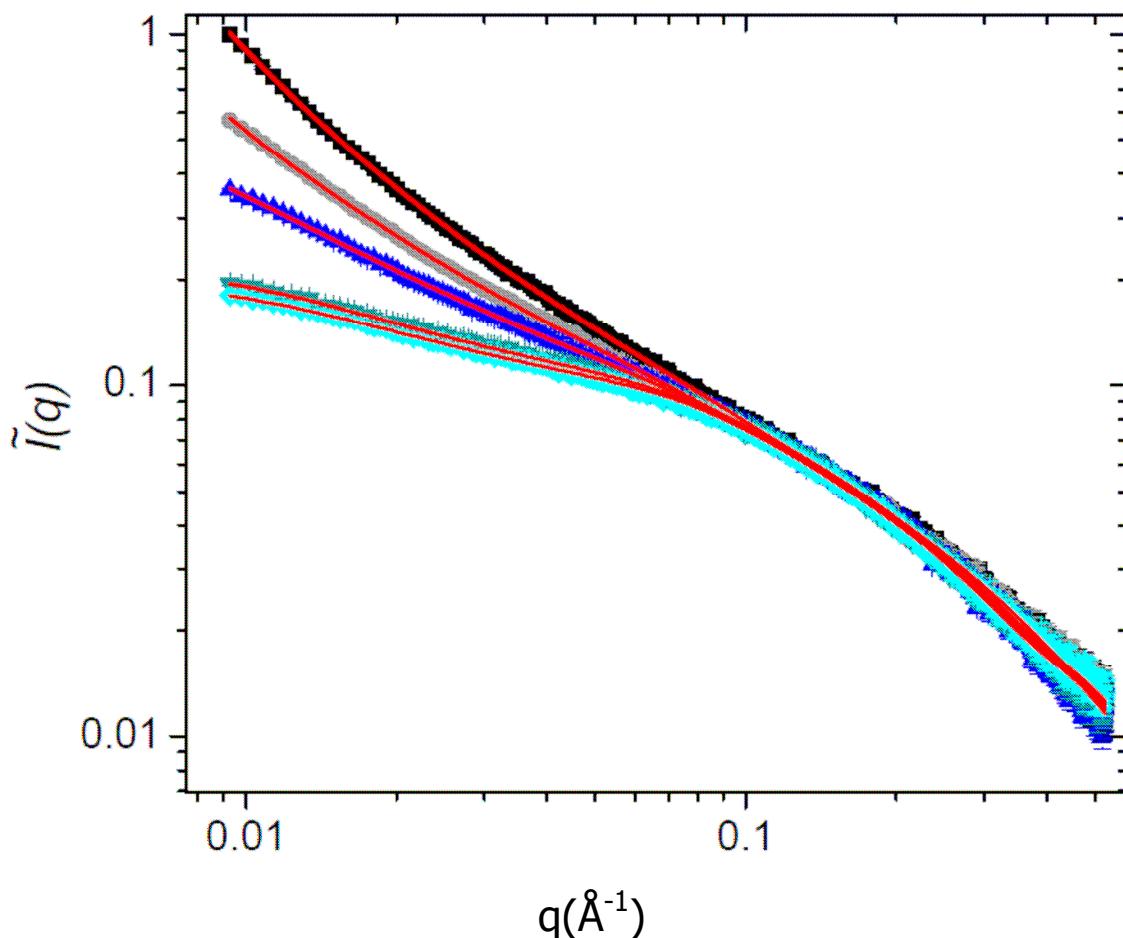
Slika 12: Reprezentativne strukture nativnega (A) in biorazgrajenega (B) 2 % CMC v BHM mediju pridobljene z najboljšim prileganjem rešitev modela biserne ogrlice eksperimentalnim SAXS podatkom. Vrednosti p^* , Θ_p , Φ_p , in Θ_{plim} za nativno strukturo so 0,35; 0,90; 1,44 in 1,75. Ustrezne vrednosti biorazgrajenega vzorca pa so 0,20; 0,90; 1,24; in 1,50.

Figure 12: Representative structures of the native (A) and biodegraded (B) 2 % CMC in BHM media obtained from the best fit to experimental SAXS data by string-of-beads modeling. Values of p^* , Θ_p , Φ_p , and Θ_{plim} for the native sample structure are as follows: 0.35; 0.90; 1.44 and 1.75, respectively. The corresponding values for biodeteriorated samples are 0.20; 0.90; 1.24 and 1.50.

4.1.2 Vpliv pH vrednosti na strukturo CMC

Pomen odbojnih interakcij na strukturo CMC smo v nadaljevanju proučevali s spremembo pH vrednosti raztopine. Posneli smo SAXS sipalne krivulje 2 % CMC ($M_w = 90 \text{ kDa}$ in $DS = 0,7$) v 0,1 M elektrolitu z različnimi pH vrednostmi (slika 13). SAXS sipalne krivulje kažejo, da ima pH vrednost velik vpliv na strukturo CMC. Vpliv se kaže predvsem na velikih prostorskih skalah, to je v območju q vrednosti manjših od 0,1. Z nižanjem pH vrednosti naklon močno narašča, kar kaže na prisotnost večjih struktur. Do izrazite spremembe v naklonu a in s tem strukturiranosti materiala pride v bližini pKa

točke za CMC ($\sim 3,6$). Delež večjih struktur v CMC raztopini se značilno poveča pod pKa vrednostjo. Na majhnih velikostnih skalah, naklon b , sprememba pH nima značilnega vpliva na strukturiranost CMC.



Slika 13: SAXS sipalne krivulje 2 % (m/v) CMC z $M_w = 90$ kDa in $DS = 0,7$ pri različnih pH vrednostih: 1,6 (■); 3,1 (●); 3,6 (▲); 5,0 (▼) in 7,0 (◆).

Figure 13: SAXS scattering curves of 2 % (w/v) CMC with $M_w = 90$ kDa and $DS = 0.7$ at different pH values: 1.6 (■); 3.1 (●); 3.6 (▲); 5.0 (▼) and 7.0 (◆).

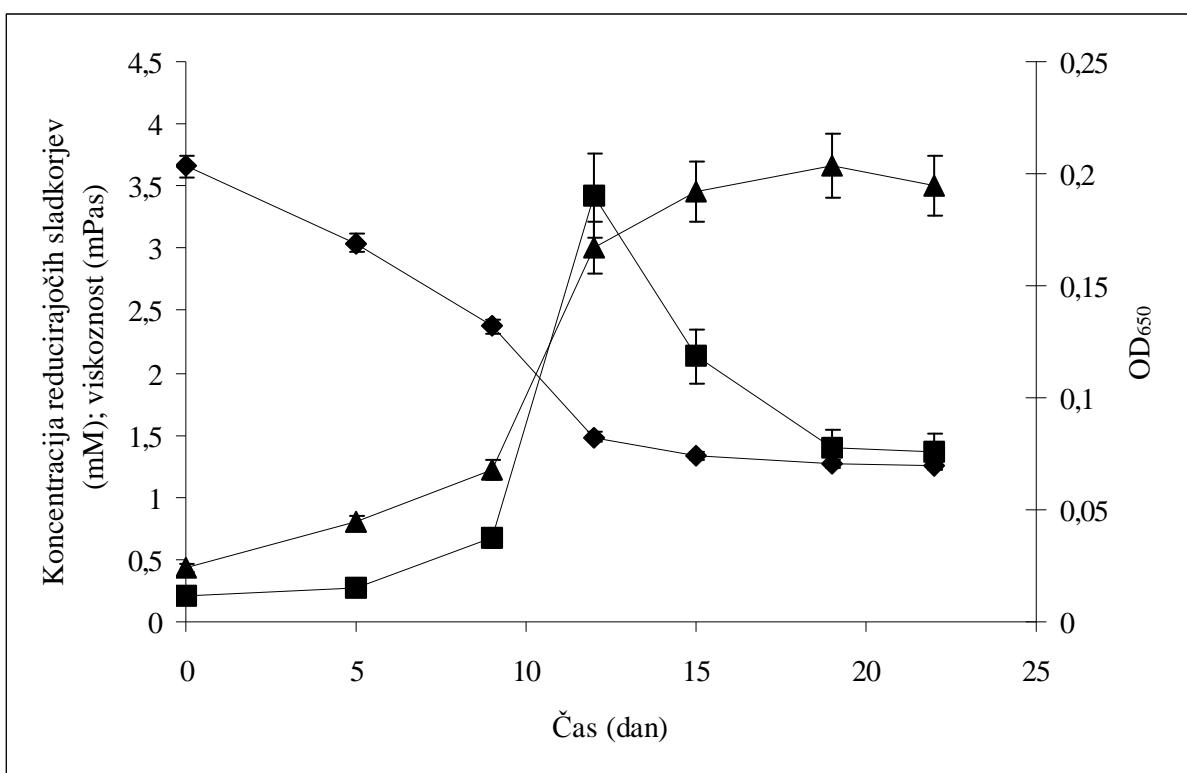
4.2 OPIS BIORAZGRADNJE CMC Z *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* NCIB 3610

Dinamiko biorazgradnje CMC smo proučevali z bakterijsko kulturo *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* NCIB 3610, ki se je izkazala za počasnega razgrajevalca. Počasnega razgrajevalca smo pri teh eksperimentih izbrali predvsem zato, da bi biorazgradnja potekala dovolj počasi, da lahko sledimo fizikalno-kemijskim spremembam v majhnih korakih. V teh eksperimentih smo proučevali časovni potek biorazgradnje preko naraščanja koncentracije reducirajočih sladkorjev, padanja viskoznosti in bakterijske rasti. Reološke spremembe smo spremljali pri različnih koncentracijah in topilih. Velikostno porazdelitev polimerov smo določili s SEC kromatografijo.

4.2.1 Bakterijska rast

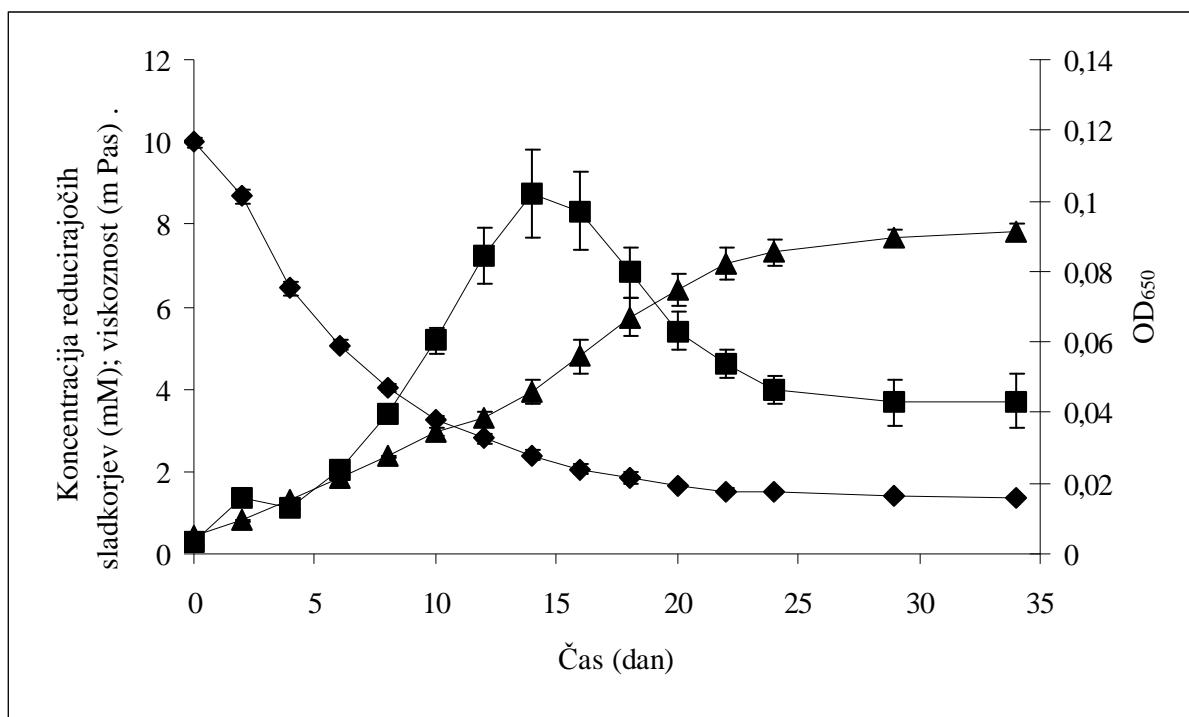
Rast *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* NCIB 3610 v gojišču BHM z 1 % CMC je predstavljena na sliki 14. Po inokulaciji je optična disperzija OD_{650} do 9. dne rasla počasi, v tem času se je OD_{650} dvignil za 0,025 absorbančne enote. Nato je kultura rasla hitro do 12. dne, ko je dosegla maksimum v $OD_{650} = 0,19$, kar predstavlja 16 ± 5 kratno povečanje glede na začetno stanje. Ko je kultura dosegla maksimum celične gostote, je optična disperzija pričela padati, kar kaže na odmiranje celične kulture.

Rast *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* NCIB 3610 v gojišču BHM z 2 % CMC je predstavljena na sliki 15. Kvalitativno je bila rast v 1- in 2 % CMC primerljiva. OD_{650} je po inokulaciji eksponentno naraščal in dosegel maksimum po 14 dneh inkubacije pri temperaturi 37°C . Povečanje OD_{650} glede na začetno stanje je bilo 31 ± 5 krat. Med inkubacijo se je število CFU povečalo za 22 ± 5 krat. Kljub rahlemu odstopanju sta količini dobro korelirali. Bakterijska kultura je med eksperimentom metabolizirala manj kot 1 % začetne mase CMC, kar smo ugotovili s fenol-sulfurično metodo za določanje celokupnih sladkorjev in s kromotropično metodo za določanje karboksimetilnih skupin. Ko je kultura dosegla maksimum v celični gostoti, je začela propadati, padec v OD_{650} pa je sovpadal s padcem CFU. Tekom inkubacije v gojišču nismo zaznali endospor *B. subtilis*.



Slika 14: Bakterijska rast merjena kot OD_{650} (■), viskoznost v mPas (◆) in koncentracija reducirajočih sladkorjev v mM (▲) tekom inkubacije *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* NCIB 3610 v BHM rastnem mediju z 1 % CMC (Mw = 90 kDa; DS = 0,7).

Figure 14: Bacterial growth measured as OD_{650} (■), viscosity in mPas (◆), and reducing sugar concentrations in mM (▲) during the incubation of *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* NCIB 3610 in BHM growth medium with 1-percent % CMC (Mw = 90 kDa; DS = 0.7).



Slika 15: Bakterijska rast merjena kot OD_{650} (■), viskoznost v mPas (◆) in koncentracija reducirajočih sladkorjev v mM (▲) tekom inkubacije *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* NCIB 3610 v BHM rastnem mediju z 2 % CMC (Mw = 90 kDa; DS = 0,7). Predstavljene so povprečne vrednosti s standardnimi odkloni ($n = 5$).

Figure 15: Bacterial growth measured as OD_{650} (■), viscosity in mPas (◆), and reducing sugar concentrations in mM (▲) during the incubation of *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* NCIB 3610 in BHM growth medium with 2 % CMC (Mw = 90 kDa; DS = 0.7). Mean values and standard deviations ($n = 5$) are given.

4.2.2 Koncentracija reducirajočih sladkorjev

Koncentracija reducirajočih sladkorjev tekom inkubacije kulture *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* NCIB 3610 v BHM gojišču z 1 % CMC ja predstavljena na sliki 14. Koncentracija reducirajočih sladkorjev se je pričela dvigovati takoj po inokulaciji in je do 9. dne naraščala s hitrostjo 0,09 mM/dan. Med 9. in 12. dnem inkubacije je koncentracija sladkorjev znatno poskočila in se nato ustalila pri 3,5 mM.

Koncentracija reducirajočih sladkorjev v BHM rastnem mediju z 2 % CMC je naraščala podobno, a nekoliko manj intenzivno kot v BHM z 1 % CMC. Koncentracija redukcijskih sladkorjev je začela naraščati takoj po inokulaciji brez izrazite lag faze (slika 15), kar nakazuje, da smo verjetno del encimske aktivnosti prenesli v sveže BHM gojišče z inokulumom. Porast v koncentraciji reducirajočih sladkorjev je bil v prvih 14 dnevih inkubacije linearen s hitrostjo 0,24 mM/dan; naslednjih 10 dni pa je koncentracija reducirajočih sladkorjev naraščala s hitrostjo 0,37 mM/dan, nato se je encimska hidroliza upočasnila, tako da je ob koncu eksperimenta koncentracija reducirajočih sladkorjev znašala približno 8 mM. Povišana produkcija reducirajočih sladkorjev sovpada s porastom biomase. V gojišču je prišlo do zasičenja koncentracije reducirajočih sladkorjev. To je v skladu s pričakovanji, saj je celulazam na voljo omejeno število mest, na katerih lahko pride do hidrolize celulognega skeleta. V odsotnosti kulture *B. subtilis* ni bilo opaziti nikakršnega porasta v koncentraciji reducirajočih sladkorjev, kar kaže na to, da je bila nebiološka razgradnja tekom eksperimenta zanemarljiva.

4.2.3 Viskoznost

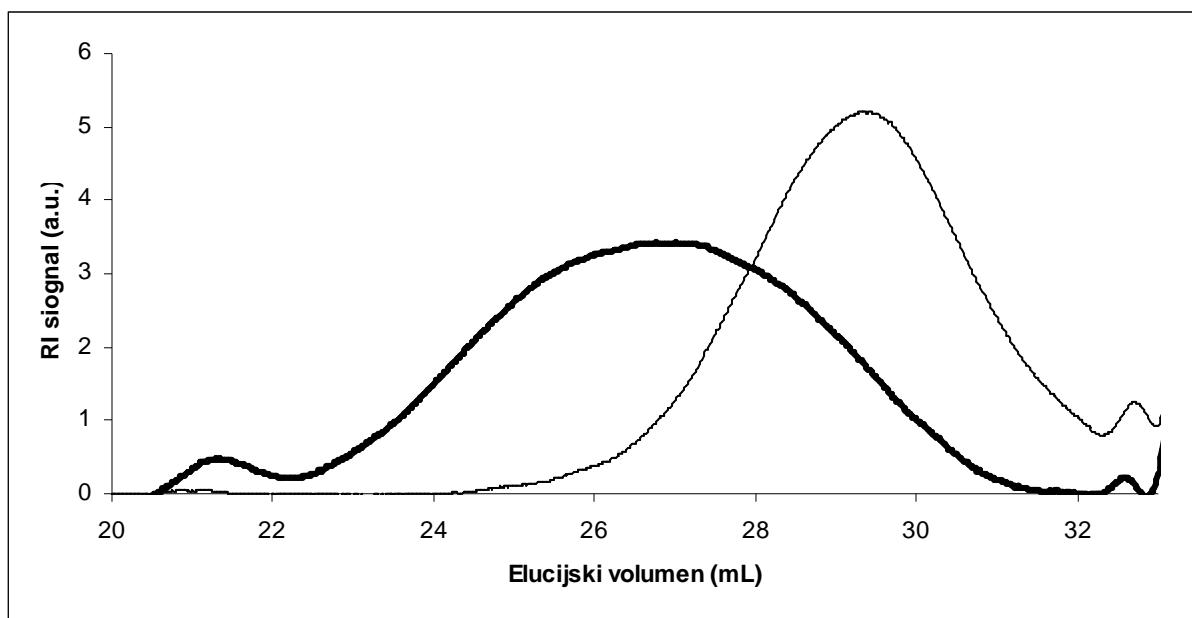
Depolimerizacijo CMC smo opazovali preko povišanja koncentracije reducirajočih sladkorjev in spremembe viskoznosti. V BHM rastnem mediju z 1 % CMC (slika 14) je ob inokulaciji viskoznost znašala $3,7 \pm 0,1$ mPas. Viskoznost je hitro padala do 12. dne inkubacije, ko je znašala $1,5 \pm 0,1$ mPas, nato pa se je padanje viskoznosti močno upočasnilo. Ob koncu eksperimenta je viskoznost znašala $1,25 \pm 0,08$ mPas, kar je nekoliko več kot raztopina BHM soli brez CMC ($0,88 \pm 0,02$ mPas).

Sprememba viskoznosti je bila primerljiva v 1- in 2 % CMC (slika 14 in 15). Ob inokulaciji je viskoznost BHM medija z 2 % CMC znašala $10,3 \pm 0,6$ mPas. Med inkubacijo je viskoznost padala hitro prvih 10 dni, nato pa se je hitrost padanja viskoznosti upočasnjevala do konca eksperimenta. Ob koncu inkubacije je viskoznost BHM medija z 2 % CMC znašala $1,40 \pm 0,05$ mPas. Padec viskoznosti med inkubacijo *B. subtilis* lahko opišemo z eksponentnim upadom prvega reda s karakteristično časovno

konstanto (1/e) 12 dni ter razpolovno dobo 6 dni. Brez *B. subtilis* v BHM z 1- ali 2 % CMC nismo zaznali signifikantnega padca viskoznosti.

4.2.4 Velikostno izključitvena kromatografija

Velikostno izključitveno kromatografijo smo izvajali zgolj na vzorcih BHM z 2 % CMC. Elugrami SEC so prikazani na sliki 16. Spodnja meja detekcije molekulskih mas je bila približno 1,3 kDa. Kot je razvidno iz slike 16 je biorazgradnja spremenila masno porazdelitev molekul CMC. Povprečna Mw, ocenjena s SEC, je bila v začetku eksperimenta 100 ± 10 kDa, kar je primerljivo z Mw, ki jo navaja proizvajalec (90 kDa). Molekule nativnega CMC so pokrivale široko masno območje od 1,3 kDa pa do 1000 kDa. Biorazgradnja je povprečni Mw znižala na 30 ± 3 kDa. Najbolj se je znižal delež molekul težjih od 100 kDa. Rezultati SEC so skladni z ugotovljenim povišanjem koncentracije reducirajočih sladkorjev in potrjujejo depolimerizacijo CMC med biorazgradnjo.



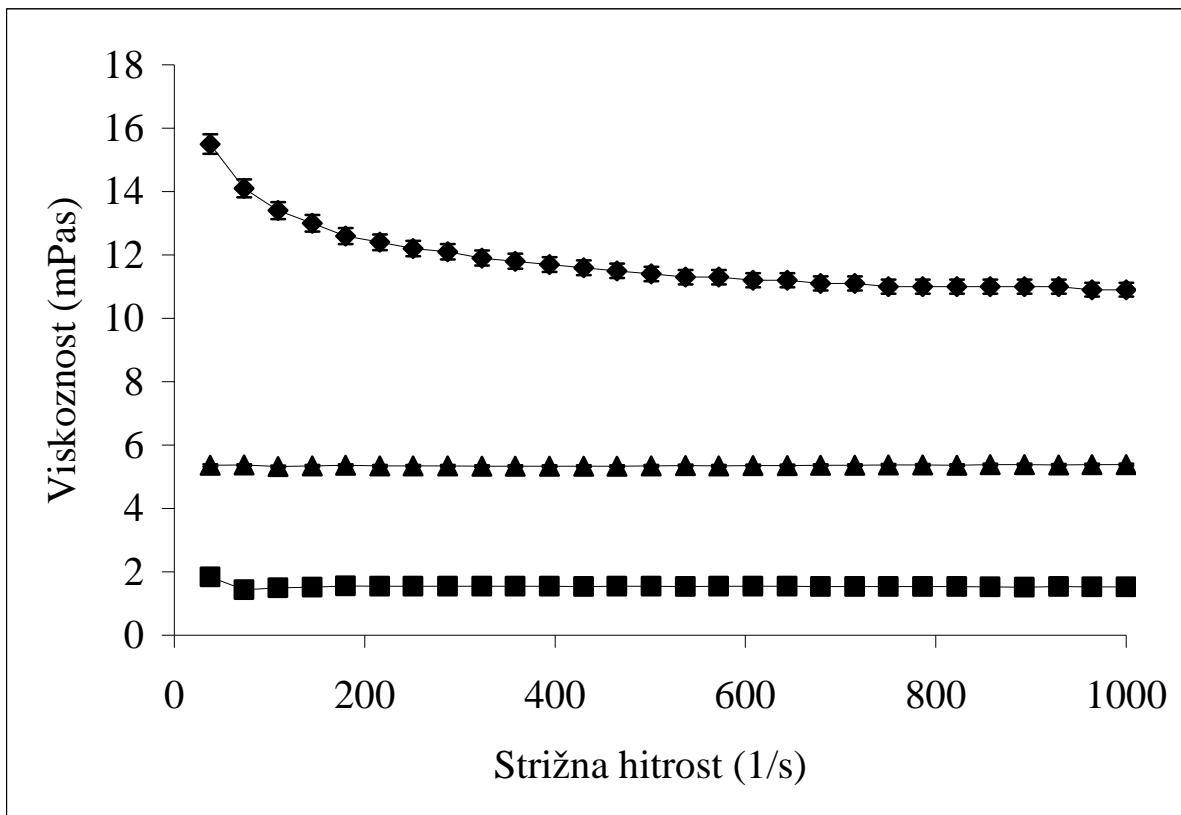
Slika 16: Elucijski diagrami velikostno izključitvene kromatografije nativnega CMC z $M_w = 90$ kDa in DS = 0,7 (odebeljena linija) in razgrajenega CMC (tanka linija). Majhna pika za $V_{el} = 32$ mL sta posledica elucije BHM hranilnih soli. Vzorca za SEC sta bila odvzeta na začetku (nativni) in na koncu (razgrajen) inkubacijskega eksperimenta z *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* NCIB 3610 v BHM gojišču z 2 % CMC.

Figure 16: Size exclusion chromatography elution diagrams of native CMC with $M_w = 90$ kDa and DS = 0.7 (thick line) and degraded (thin line) CMC. Small peaks after $V_{el} = 32$ mL are due to BHM nutrient salts elution. The samples for SEC were taken at the beginning (native) and at the end (degraded) of incubation experiment with *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* NCIB 3610 in BHM media with 2 % CMC.

4.2.5 Reološke spremembe CMC po biorazgradnji

Viskoznost nerazgrajenega 2 % CMC v BHM mediju je odvisna od strižne hitrosti kot je razvidno iz slike 17. Z naraščajočo strižno hitrostjo je viskoznost 2 % CMC v BHM padala, kar pomeni da se CMC obnaša psevdoplastično. V nasprotju z nativnim, viskoznost razgrajenega CMC ni bila odvisna od strižne hitrosti in se je v območju merjenih strižnih hitrosti obnašal kot newtonska raztopina. To kaže, da biorazgradnja ni spremenila zgolj viskoznosti, temveč je vplivala tudi na tokovno obnašanje CMC. Za razliko od 2 % CMC se 1 % CMC ni obnašal psevdoplastično. Na reološke lastnosti

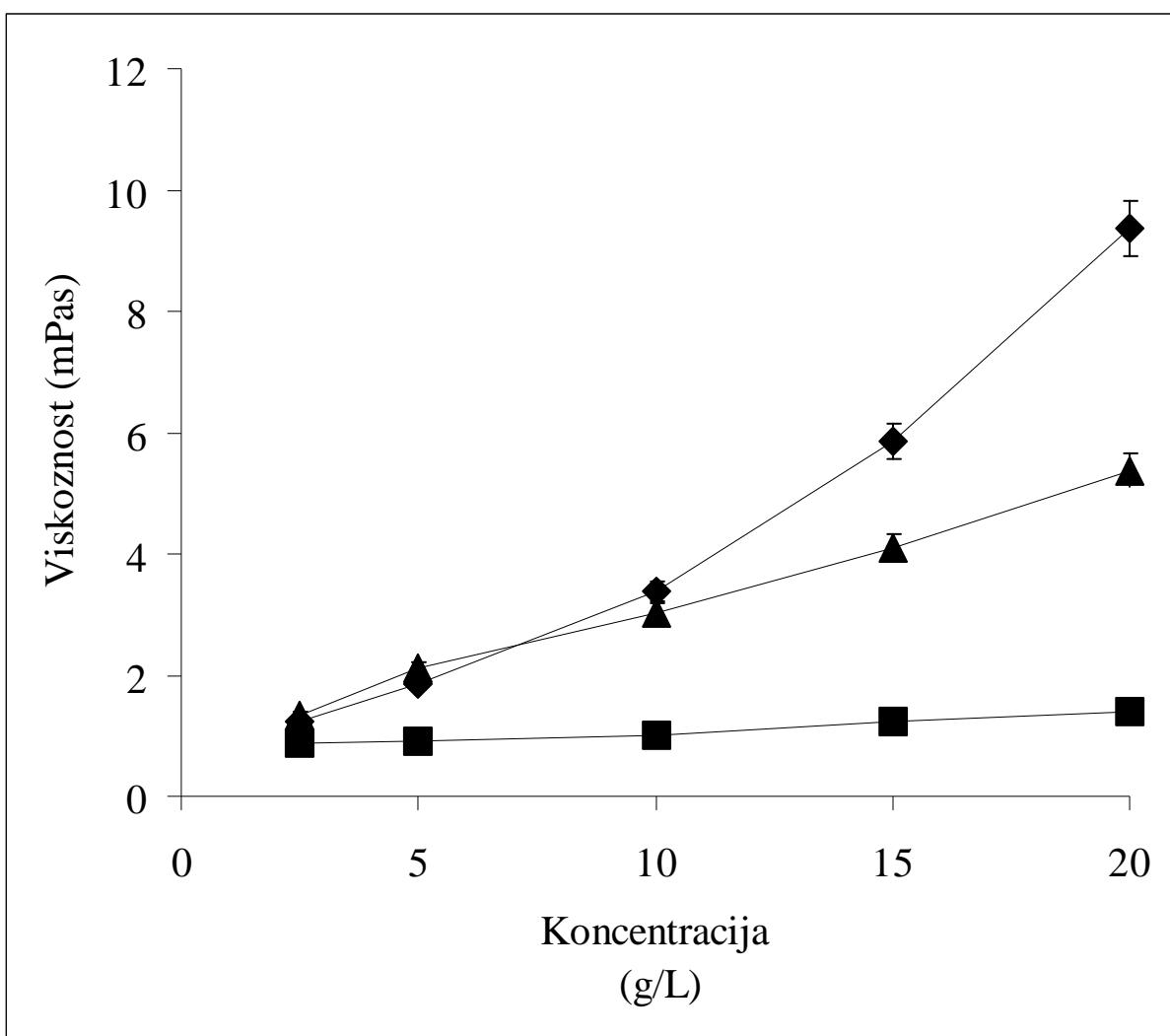
CMC je vplivalo tudi topilo. Nativni 2 % CMC se je v BHM mediju obnašal drugače kot v čisti vodi. V vodi je imel CMC nižje viskoznosti. Viskoznost je bila neodvisna od strižne hitrosti, raztopina je izkazovala newtonsko tokovno obnašanje (slika 17).



Slika 17: Viskoznosti nativnega 2 % CMC z $M_w = 90$ kDa in $DS = 0,7$ v BHM mediju (♦), nativnega 2 % CMC v vodi (▲) in razgrajenega 2 % CMC v BHM mediju (■) pri različnih strižnih hitrostih.

Figure 17: Viscosity of native 2 % CMC with $M_w = 90$ kDa and $DS = 0.7$ in BHM media (♦), native 2 % CMC in water (▲), and degraded 2 % CMC (■) at different shear rates.

Viskoznost CMC je bila odvisna od koncentracije kot je prikazano na sliki 18. V limiti ko se približujemo koncentraciji nič, smo določili intrinzične viskoznosti v BHM mediju. Za nativni CMC je intrinzična viskoznost znašala 211 ± 10 cm³/g, za razgrajen pa 79 ± 5 cm³/g. To je skladno z nižjo M_w razgrajenega CMC. Viskoznost razgrajenega CMC v BHM je naraščala linearno in z nizkim naklonom, medtem ko je viskoznost nativnega CMC v BHM naraščala eksponentno z naraščajočo koncentracijo. Viskoznost nativnega CMC v čisti vodi je naraščala linearno z naraščajočo koncentracijo.



Slika 18: Viskoznosti nativnega CMC z $M_w = 90$ kDa in $DS = 0,7$ v BHM mediju (◆), nativnega CMC v vodi (▲), in razgrajenega CMC v BHM mediju (■) pri različnih koncentracijah CMC.

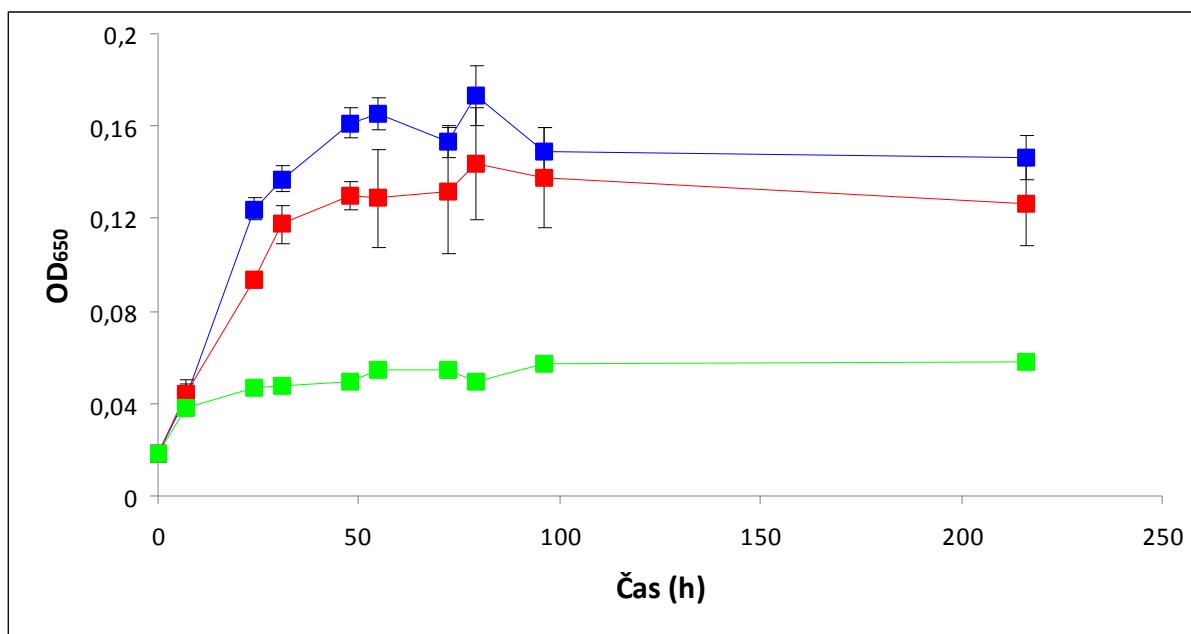
Figure 18: Viscosity of native CMC with $M_w = 90$ kDa and $DS = 0.7$ in BHM media (◆), native CMC in water (▲), and degraded CMC in BHM media (■) at different CMC concentrations.

4.3 VPLIV DS VREDNOSTI IN Mw NA BIORAZGRADNJO CMC S *Cellulomonas uda* DSM 20108

Vpliv DS vrednosti in Mw na biorazgradnjo CMC smo proučevali z bakterijsko kulturo *Cellulomonas uda* DSM 20108, ki se je izkazala za hitrega in učinkovitega razgrajevaleca CMC. Ker nas je predvsem zanimal vpliv substituent in velikosti polimera, manj pa dinamika razgradnje, smo *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* NCIB 3610, ki je počasen razgrajevalec CMC, zamenjali s *C. uda*.

4.3.1 Bakterijska rast pri različnih DS in Mw vrednostih za CMC

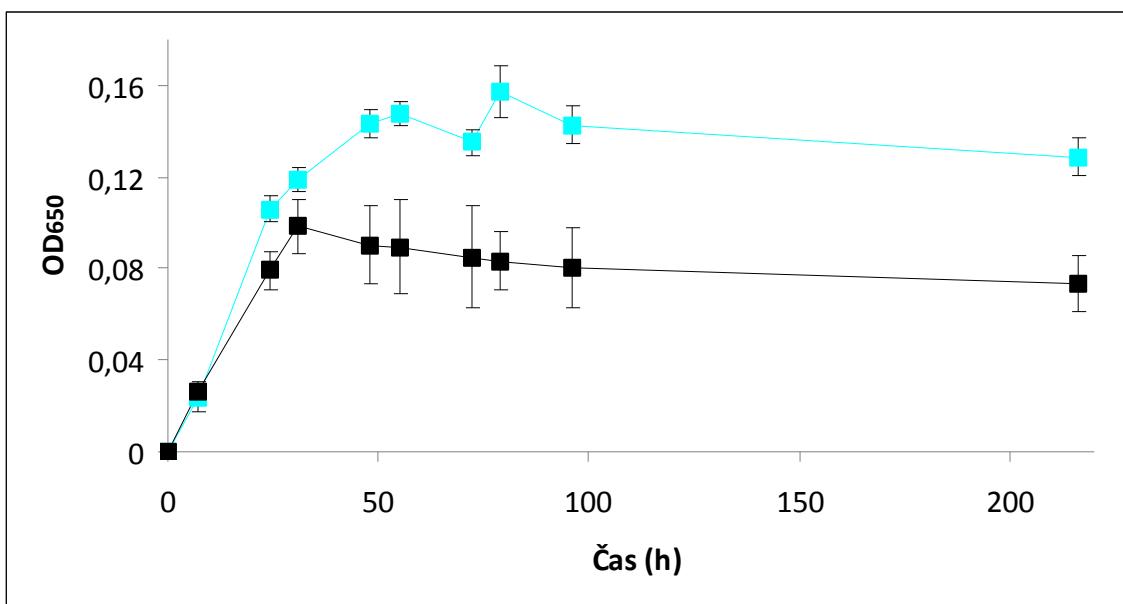
Hitrosti rasti bakterijske kulture *Cellulomonas uda* DSM 20108 na 250 kDa CMC z različnimi stopnjami substituiranosti (DS) so prikazane na sliki 19. Iz slike je razvidno, da DS znatno vpliva na hitrost rasti, prve razlike se pojavijo že po 24 urah aerobne inkubacije pri temperaturi 37 °C. Stopnja substituiranosti določa nosilnost okolja oziroma OD_{650} do katerega lahko kultura zraste. Ugotovili smo, da najmanj substituiran CMC (DS = 0,7) omogoča najhitrejšo rast in največjo nosilnost okolja. Na tem derivatu je maksimalna OD_{650} , približno 4-krat višja kot na najbolj substituiranem CMC (DS = 1,2). Rast na CMC z DS 0,7 in 0,9 je najbolj aktivna v prvih 55 urah, nato razlike med polimeroma niso več značilne. Najslabše je kultura *Cellulomonas uda* rasla na CMC z DS = 1,2, saj je rast intenzivna le v prvih 24 urah, ko se OD_{650} podvoji, nato pa optična gostota zelo počasi narašča.



Slika 19: Rast kulture *Cellulomonas uda* v BHM gojiščih 1 % CMC z Mw = 250 kDa in DS vrednostmi 0,7 (■); 0,9 (■) in 1,2 (■). Kultura je rasla aerobno v temi, pri 37 °C, stresana na orbitalnem stresniku pri 200 rpm. Predstavljene so povprečne vrednosti s standardnimi odkloni ($n = 3$).

Figure 19: Growth of *Cellulomonas uda* culture in the BHM growth media containing 1 % CMC with Mw = 250 kDa and DS values 0.7 (■); 0.9 (■) and 1.2 (■). The culture was grown aerobically in dark, at temperature 37 °C, shaken on orbital shaker with 200 rpm. The mean values with standard deviations ($n = 3$) are stated.

Kot je prikazano na sliki 20, ima na rast kulture *Cellulomonas uda* DSM 20108 vpliv tudi molska masa uporabljenega CMC. V eksperimentu smo uporabljali vzorca CMC z enako vrednostjo DS (0,7), vendar z različnima molskima masama (90 kDa in 250 kDa). Na CMC z višjo Mw (250 kDa) je bil maksimum v OD_{650} dosežen pozneje kot na CMC z nižjo Mw. Kultura *Cellulomonas uda* DSM 20108 je poleg višje hitrosti rasti na CMC z 250 kDa dosegla tudi višjo nosilnost okolja. Razlike v izmerjenih vrednostih optične gostote so signifikantne in se pojavijo že po 24 urah inkubacije.



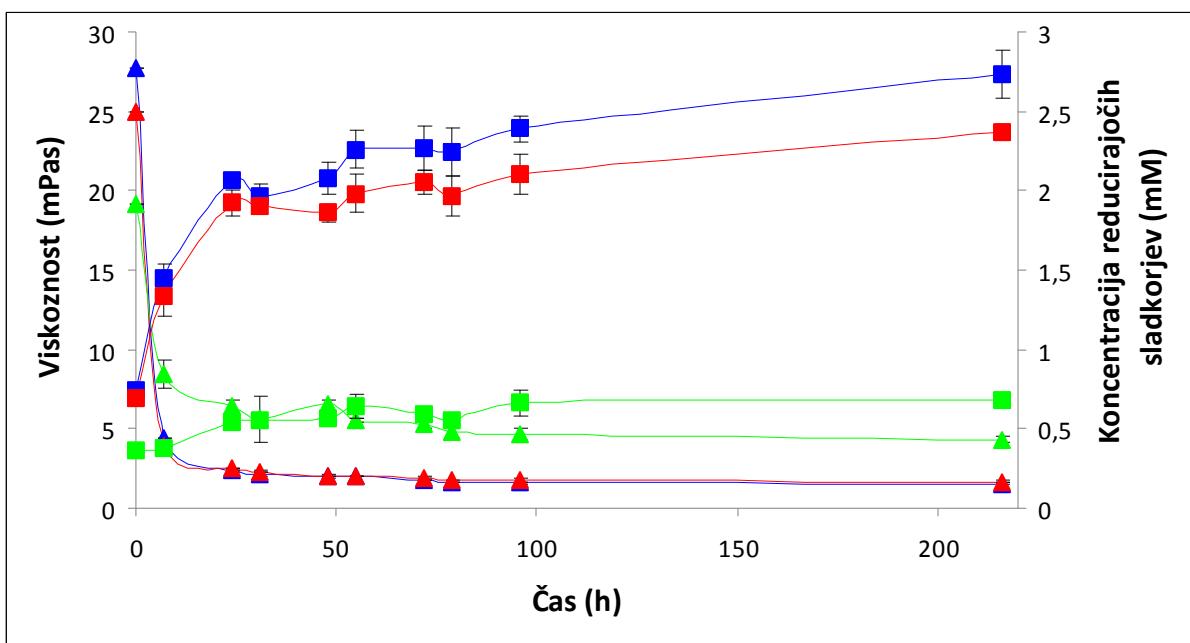
Slika 20: Rast kulture *Cellulomonas uda* v BHM gojiščih 1 % CMC z DS vrednostjo 0,7 in Mw = 250 kDa (■) in 90 kDa (■). Kultura je rasla aerobno v temi, pri temperaturi 37 °C, stresana na orbitalnem stresalniku pri 200 rpm. Predstavljene so povprečne vrednosti s standardnimi odkloni ($n = 3$).

Figure 20: Growth of *Cellulomonas uda* culture in the BHM growth media containing 1 % CMC with DS value 0.7 and Mw = 250 kDa (■) and 90 kDa (■). The culture was grown aerobically in dark, at temperature 37 °C, shaken on orbital shaker with 200 rpm. The mean values with standard deviations ($n = 3$) are stated.

4.3.2 Biorazgradnja pri različnih DS in Mw vrednostih za CMC

Bakterijska razgradnja različno substituiranih CMC je prikazana na sliki 21. Pri vseh CMC viskoznost pada in koncentracija reducirajočih sladkorjev raste, vendar so opazne znatne razlike med različno substituiranimi CMC. Naraščanje koncentracije reducirajočih sladkorjev pozitivno korelira s hitrostjo rasti. V vseh primerih so najvišje koncentracije reducirajočih koncev dosežene v zadnji točki vzorčenja, pri DS = 0,7 je končna koncentracija reducirajočih koncev 4-krat višja kot pri DS = 1,2. Viskoznost po drugi strani negativno korelira s hitrostjo rasti. Pri vseh treh obravnavanih tipih CMC je izrazit padec v viskoznosti že 2 uri po inokulaciji gojišč z bakterijsko kulturo. Z nadaljnjo inkubacijo se viskoznost malo spreminja. Dinamika spremembe viskoznosti je bila pri

CMC z DS vrednostma 0,7 in 0,9 primerljiva. Pri CMC z DS vrednostjo 1,2 je viskoznost med inkubacijo najmanj padla.

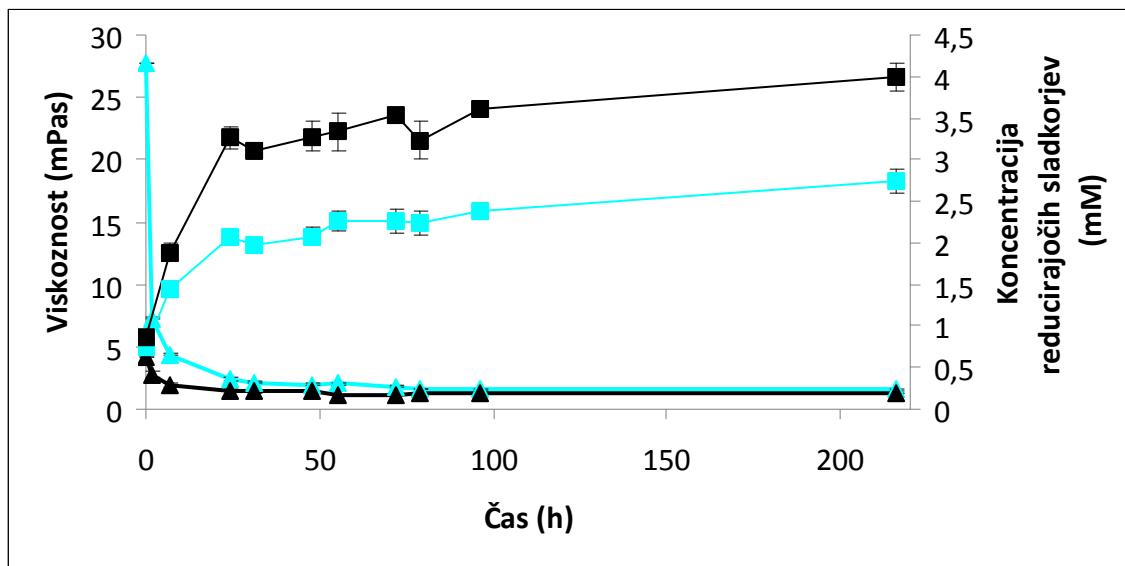


Slika 21: Vpliv stopnje substituiranosti CMC na biorazgradnjo. Biorazgradnjo smo spremljali preko padanja viskoznosti BHM gojišč z 1 % CMC z Mw = 250 kDa in DS = 0,7 (▲); 0,9 (▲) in 1,2 (▲), ter preko naraščanja koncentracije reducirajočih sladkorjev 0,7 (■); 0,9 (■) in 1,2 (■). Kultura je rasla aerobno v temi, pri temperaturi 37 °C, stresana na orbitalnem stresalniku pri 200 rpm. Prikazana sta povprečna vrednost in standardni odklon ($n = 3$).

Figure 21: The effect of degree of substitution on biodegradation. Biodegradation was monitored by viscosity loss of the BHM growth media of 1 % CMC with Mw = 250 kDa and DS = 0.7 (▲); 0.9 (▲) and 1.2 (▲), and through the increase of reducing sugar concentration 0.7 (■); 0.9 (■) and 1.2 (■). The culture was grown aerobically in dark, at temperature 37 °C, shaken on orbital shaker with 200 rpm. The mean values with standard deviations ($n = 3$) are stated.

Pri spremļjanju biorazgradnje CMC z različnima Mw smo ugotovili signifikantno višje koncentracije reducirajočih koncev na CMC z nižjo Mw. Ob koncu inkubacije je koncentracija reducirajočih sladkorjev v BHM gojišču s CMC z Mw = 90 kDa znašala 4,0 mM, v BHM s CMC z Mw = 250 pa 2,8 mM (slika 22). Kljub temu, da se viskoznosti gojišč pred inokulacijo s kulturo *Cellulomonas uda* DSM 20108 močno razlikujeta, opazimo podobno dinamiko padanja v obeh gojiščih. Ob koncu inkubacije je bila

viskoznost BHM medija s CMC z Mw = 250 kDa 1,6 mPas, viskoznost BHM s CMC z 90 kDa pa 1,2 mPas (slika 22).



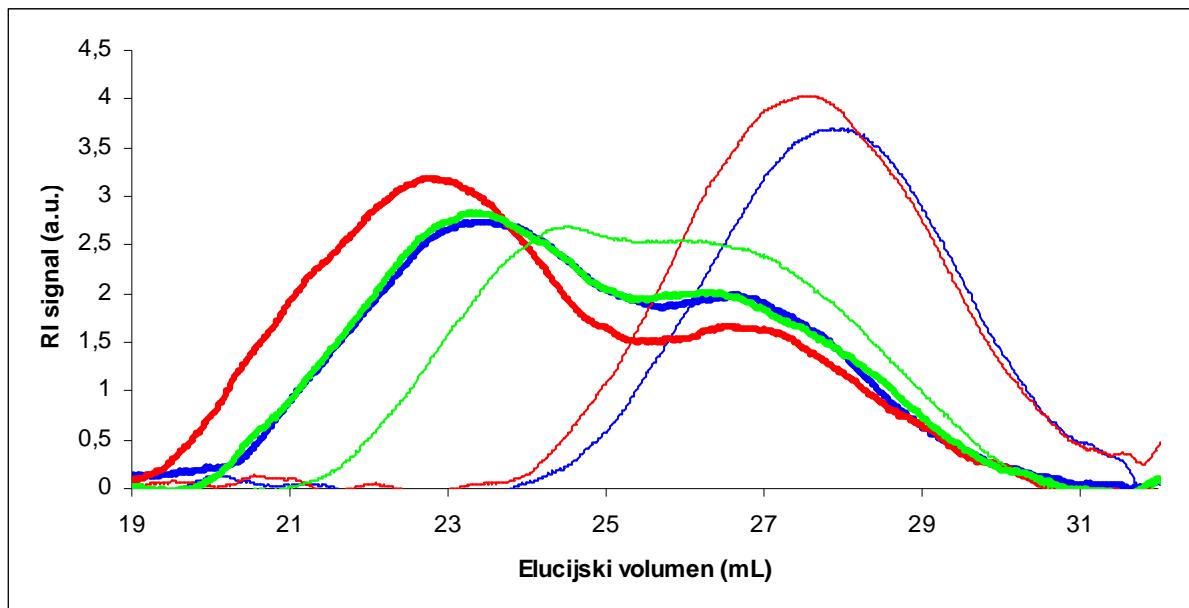
Slika 22: Vpliv molske mase CMC na biorazgradnjo. Biorazgradnjo smo spremljali preko padanja viskoznosti BHM gojišč z 1 % CMC z DS = 0,7 in Mw = 250 kDa (\blacktriangle) in 90 kDa (\blacktriangle) ter preko naraščanja koncentracije reducirajočih sladkorjev 250 kDa (\blacksquare) in 90 kDa (\blacksquare). Kultura je rasla aerobno v temi, pri temperaturi 37 °C, stresana na orbitalnem stresalniku pri 200 rpm. Prikazana sta povprečna vrednost in standardni odklon ($n = 3$).

Figure 22: The effect of molar mass on biodegradation. Biodegradation was monitored by viscosity loss of the BHM growth media of 1 % CMC with DS = 0.7 and Mw = 250 kDa (\blacktriangle) and 90 kDa (\blacktriangle), and through the increase of reducing sugar concentration 250 kDa (\blacksquare) in (\blacksquare). The culture was grown aerobically in dark, at temperature 37 °C, shaken on orbital shaker with 200 rpm. The mean values with standard deviations ($n = 3$) are stated.

4.3.3 Velikostno izključitvena kromatografija HPLC – SEC pri različnih DS in Mw vrednostih za CMC

Razlike med razgrajenimi in nerazgrajenimi vzorci CMC z 250 kDa smo ugotavljali z velikostno izključitveno kromatografijo HPLC – SEC. Kot je razvidno iz slike 23 imajo kromatogrami nerazgrajenih vzorcev dva vrhova in v splošnem široko masno porazdelitvijo. Prvi kromatografski vrh zasledimo okoli $V_{el} = 23$ mL, drugi pa okoli $V_{el} =$

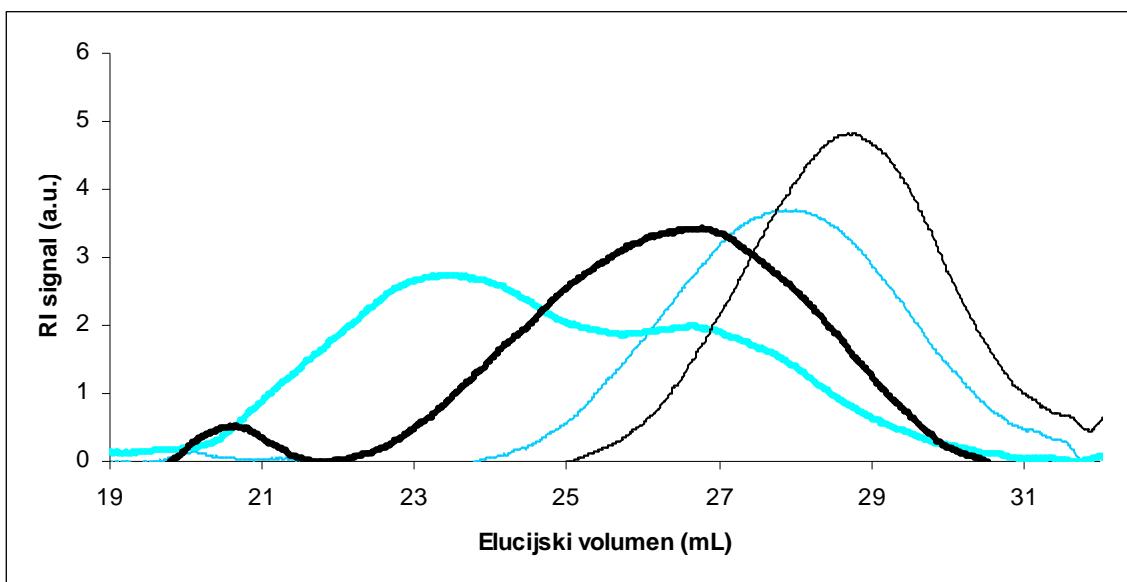
27 mL. Nerazgrajena vzorca CMC z DS 0,9 in 1,2 imata podoben kromatogram, medtem ko se CMC z DS = 0,7 razlikuje, saj se je večji delež eluiral pri $V_{el} = 23$ mL. Elucijski volumni razgrajenih vzorcev CMC so bili večji. Za razgrajene vzorce CMC z DS 0,7 in 0,9 je značilen en izrazit kromatografski vrh pri približno $V_{el} = 28$ mL. Razgrajen CMC z DS = 1,2 pa eluirja pri manjših elucijskih volumnih in ima dva kromatografska vrhova.



Slika 23: SEC elugrami razgrajenih in nerazgrajenih BHM gojišč z 1 % CMC z $M_w = 250$ kDa in $DS = 0,7$ (modro); 0,9 (rdeče) in 1,2 (zeleno). Odebeljene linije predstavljajo elugrame nativnih, tanke linije pa elugrame razgrajenih vzorcev CMC.

Figure 23: The SEC elugrams of degraded and native BHM medias with 1 % CMC with $M_w = 250$ kDa and $DS = 0,7$ (blue); 0,9 (red) and 1,2 (green). Thick lines present elugrams of native and thin lines present elugrams of degraded CMC samples.

Elugrami nativnih in razgrajenih CMC z $DS = 0,7$ in $M_w = 250$ kDa oziroma 90 kDa so predstavljeni na sliki 24. SEC rezultati kažejo, da se nativni CMC z $M_w = 250$ kDa eluirja pri manjših elucijskih volumnih kot CMC z $M_w = 90$ kDa. Podobno je tudi v primeru razgrajenih BHM gojišč, kjer se vzorec CMC z $M_w = 250$ eluirja pri manjših elucijskih volumnih kot CMC z $M_w = 90$ kDa.



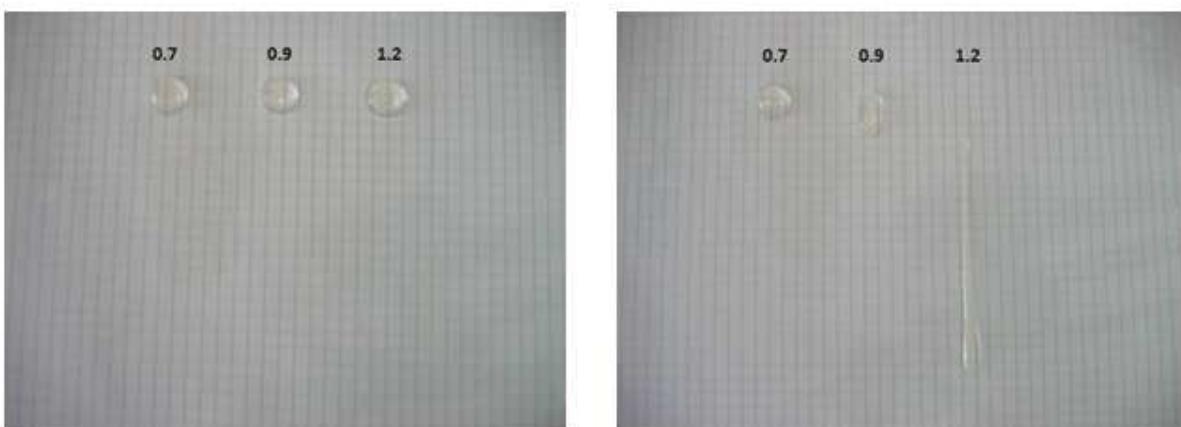
Slika 24: SEC elugrami razgrajenih in nerazgrajenih BHM gojišč z 1 % CMC z DS = 0,7 in Mw = 250 kDa (modro) oziroma 90 kDa (črno). Odebeljene linije predstavljajo elugrame nativnih, tanke linije pa elugrame razgrajenih vzorcev CMC.

Figure 24: The SEC elugrams of degraded and native BHM medias with 1 % CMC with DS = 0.7 and Mw = 250 (blue) and 90 kDa (black). Thick lines present elugrams of native and thin lines present elugrams of degraded CMC samples.

4.3.4 Kvalitativno določanje deleža nesubstituiranih regij

Stopnja substituiranosti kaže na povprečno stopnjo modifikacij na anhidroglukozno enoto. V realnih polimerih lahko pričakujemo regije, kjer je stopnja substituiranosti znatno različna od povprečne. Zaradi tega lahko prihaja do različnih interakcij vzdolž polimernih verig. Posledično se lahko spreminja dostopnost za biorazgradnjo, topnost in tokovne lastnosti CMC. Razlike v homogenosti distribucije vezanih skupin smo ugotovljali kvalitativno, glede na reološke lastnosti nastalih gelov, ki smo jih formirali z dodatkom NaCl. Lastnosti gelov smo spremljali brez in z aplicirano strižno silo. Razlike v deležih nesubstituiranih regij se kažejo v različni hitrosti potovanja po podlagi; vzorec z najmanjšim deležem nesubstituiranih regij (povežejo medsebojne verige) slabše kljubuje deformacijam in zato potuje hitreje. Na sliki 25 vidimo, da po uporabi strižne sile CMC z DS = 0,7 tvori najbolj kompakten gel, nekoliko manj stabilen gel tvori CMC z DS = 0,9.

Najbolj tekoč gel po aplikaciji strižne sile pa nastane v primeru CMC z DS = 1,2. Primerjava vzorcev CMC z različnima Mw in enakima DS vrednostma na takšen način ni korektna zaradi vpliva Mw na zamreženje gelov.



Slika 25: Delež nesubstituiranih regij v CMC z različnimi DS vrednostmi. Uporabili smo 250 kDa CMC s stopnjami substituiranosti 0,7; 0,9 in 1,2; kot je označeno na sliki. Na levi strani je prikazano začetno stanje kapljic nanesenih na vodoravno postavljenou plastičnu podlago. Na desni strani slike pa je predstavljen stanje 30 s po nagibu podlage v navpični položaj.

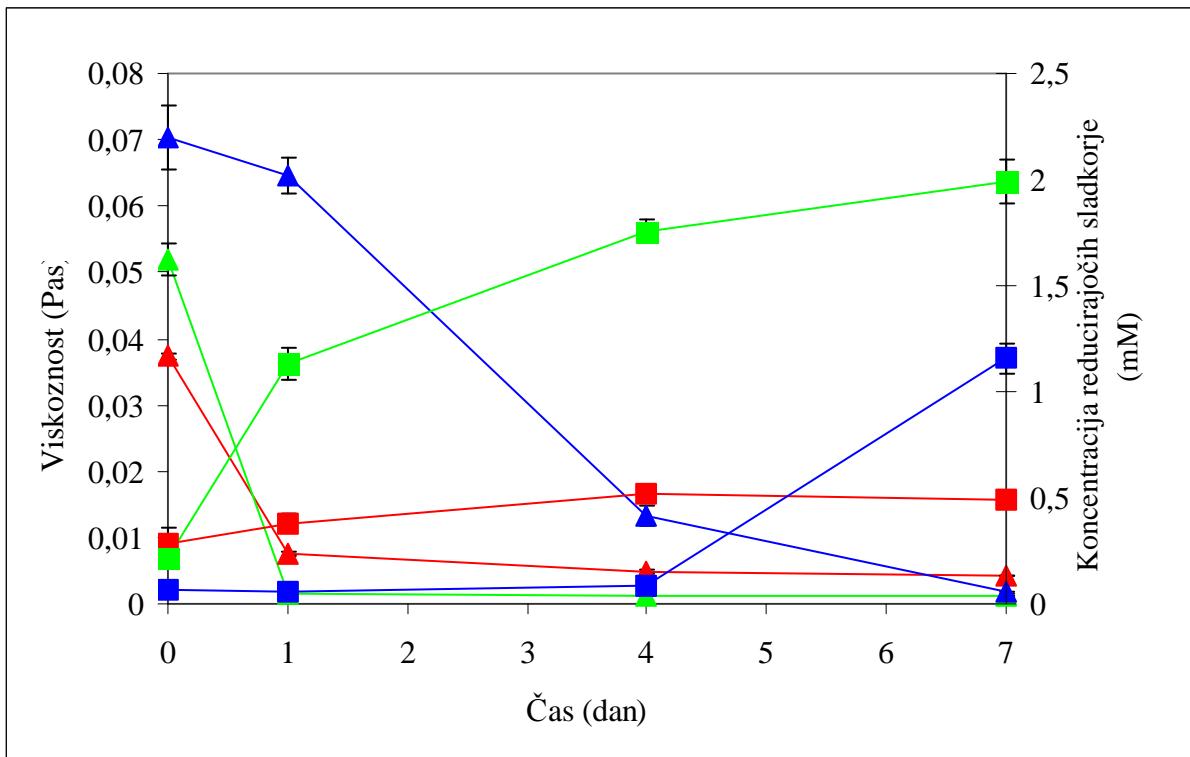
Figure 25: Share of unsubstituted regions of CMC with different DS values. We used 250 kDa CMC with degrees of substitution 0.7; 0.9 and 1.2; as marked in figure. The picture on the left side shows the state of CMC drops set on horizontal plastic basis at the beginning of the experiment. The picture on the right side shows the state of drops 30 s after the basis was tilted vertically.

4.4 VPLIV TIPA SUBSTITUENTE NA BIORAZGRADNJO CELULOZNIH GOSTIL S *Cellulomonas uda* DSM 20108

4.4.1 Dinamika biorazgradnje različno substituiranih celuloznih gostil

Primerjali smo vpliv tipa substituente na biorazgradljivost celuloznega skeleta. Za preverjanje vpliva substituente na biorazgradnjo smo izbrali: metil celulozo (MC) Culminal 7000 PF, hidroksietil celulozo (HEC) Netrosol 250 MR in karboksimetil celulozo (CMC) Blanose 12M31P. Gostila so bila izbrana tako, da so imela kar se da

podobne parametre DP in DS, pri izbiri pa nam je svetoval proizvajalec, ki nas je tudi opozoril, da parametri niso kontrolirani in da gre zgolj za okvirno primerljivost. Tekom inkubacije smo biorazgradnjo s kulturo *Cellulomonas uda* spremljali preko naraščanja koncentracije reducirajočih sladkorjev in padanja viskoznosti BHM medijev (slika 26).



Slika 26: Biorazgradnja različnih tipov gostil s kulturo *Cellulomonas uda* DSM 20108 preko padanja viskoznosti BHM media z 1 % MC – Culminal 7000 PF (▲), HEC – Natrosol 250 MR (■) in CMC – Blanose 12M31P (▲) in preko naraščanja koncentracij reducirajočih sladkorjev MC (■), HEC (■) in CMC (■).

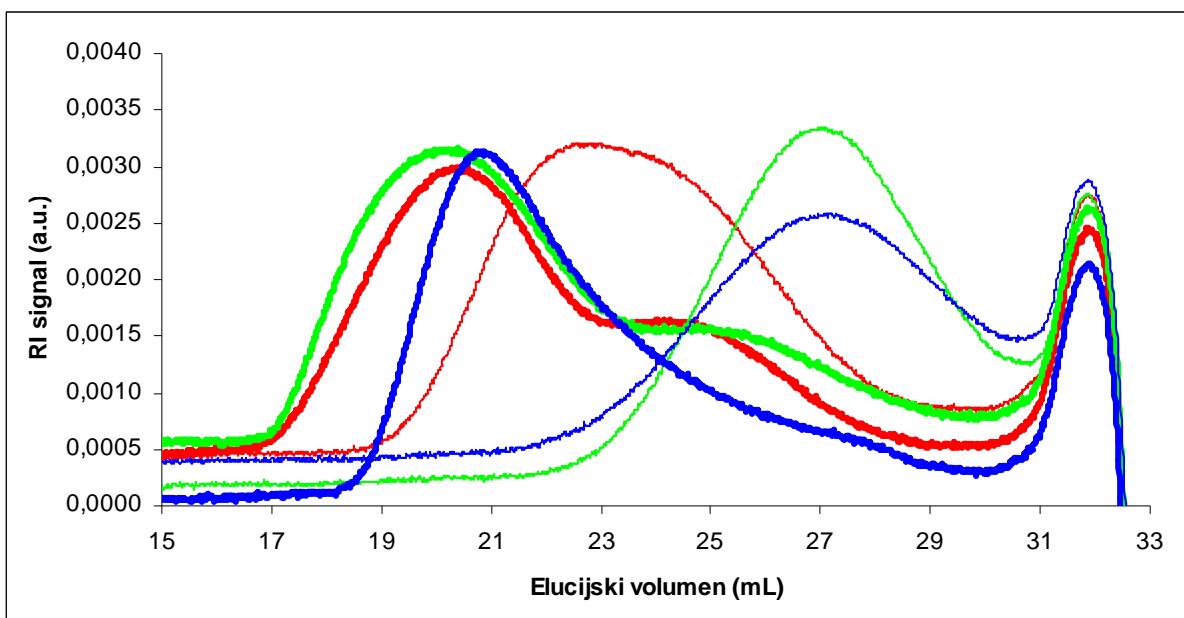
Figure 26: Biodegradation of various types of cellulose thickeners by using the culture *Cellulomonas uda* DSM 20108 through viscosity loss of the BHM media containing 1 % MC – Culminal 7000 PF (▲), HEC – Natrosol 250 MR (■) and CMC – Blanose 12M31P (▲) and through the increase of reducing sugar concentrations MC (■), HEC (■) and CMC (■).

Viskoznost je najhitreje padla v primeru HEC, najpočasneje pa je padala v MC. V MC je v prvih 24 urah inkubacije viskoznost padla le za 8 %, medtem ko je v enakem času v CMC padla za 82 %, v HEC pa kar za 99 %. Skladno z relativno počasnim padanjem viskoznosti v MC smo opazili tudi počasno naraščanje koncentracije reducirajočih

sladkorjev, saj do 4. dne inkubacije nismo opazili znatnega povišanja. Kljub temu je bila MC ob koncu eksperimenta razgrajena, saj je koncentracija reducirajočih sladkorjev narasla na 1,1 mM, viskoznost pa je padla na 1 % začetne vrednosti. Zanimivo je, da je CMC, ki je imel najnižjo začetno viskoznost (0,037 Pas), ob koncu eksperimenta po biorazgradnji ohranil najvišjo viskoznost (0,004 Pas) in skladno s tem imel najnižjo koncentracijo reducirajočih sladkorjev (0,21 mM).

4.4.2 Velikostno izključitvena kromatografija SEC

SEC elugrami razgrajenih in nativnih gostil, ki smo jih proučevali, so predstavljeni na sliki 27. Nativni MC ima najnižjo M_w, vendar najvišjo viskoznost. Nativna HEC in CMC imata primerljive M_w, čeprav ima HEC znatno višjo viskoznost. Rezultati potrjujejo depolimerizacijo vseh tipov gostil. Najdaljše verige so se ohranile v primeru CMC, med tem ko sta se MH in HEC razgradila do krajsih polimerov primerljivih molekulskih mas. Elugrami razgrajenih gostil so korelirali z viskoznostmi razgrajenih gostil.

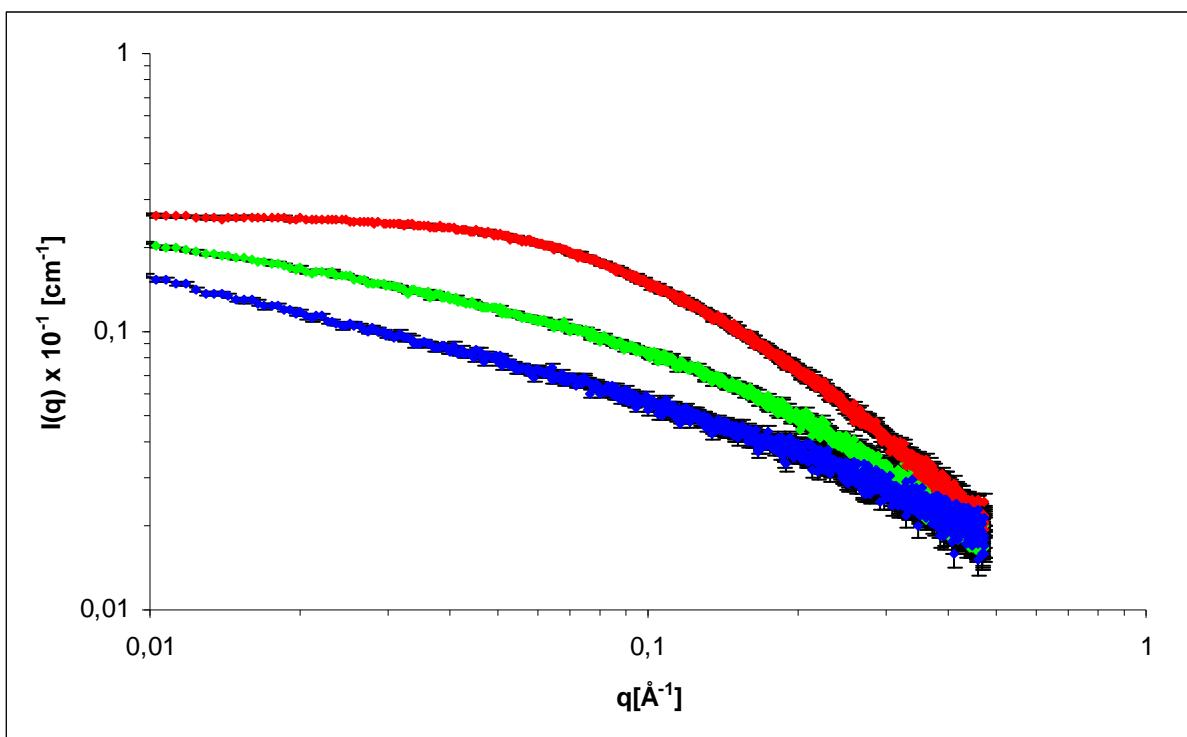


Slika 27: SEC elugrami MC – Culminal 7000 PF (modro), CMC – Blanose 12M31P (rdeče) in HEC – Natrosol 250 MR (zeleno); odebeljene linije predstavljajo nerazgrajena, tanke linije pa razgrajena gostila.

Figure 27: The SEC elugrams of MC – Culminal 7000 PF (blue), CMC – Blanose 12M31P (red) and HEC – Natrosol 250 MR (green); thick lines represent native and thin lines represent degraded samples.

4.4.3 SAXS

SAXS sipalne krivulje proučevanih gostil so predstavljene na sliki 28. Sipalne krivulje kažejo izrazite strukturne razlike med gostili. MC ima strukturo najbolj podobno konformaciji iztegnjene verige. V primeru HEC opazimo podobno konformacijo kot pri MC, vendar je različen naklon pri višjih q vrednostih. Popolnoma drugačna pa je struktura CMC, kjer opazimo, da ima sipalna krivulja izrazito višji naklon pri višjih q vrednostih in značilno nižji naklon pri nižjih q vrednostih. To je verjetno posledica odbojnih interakcij med negativno nabitimi karboksimetilnimi skupinami, ki preprečujejo naključne kontakte med sosednjimi verigami na večjih prostorskih skalah.

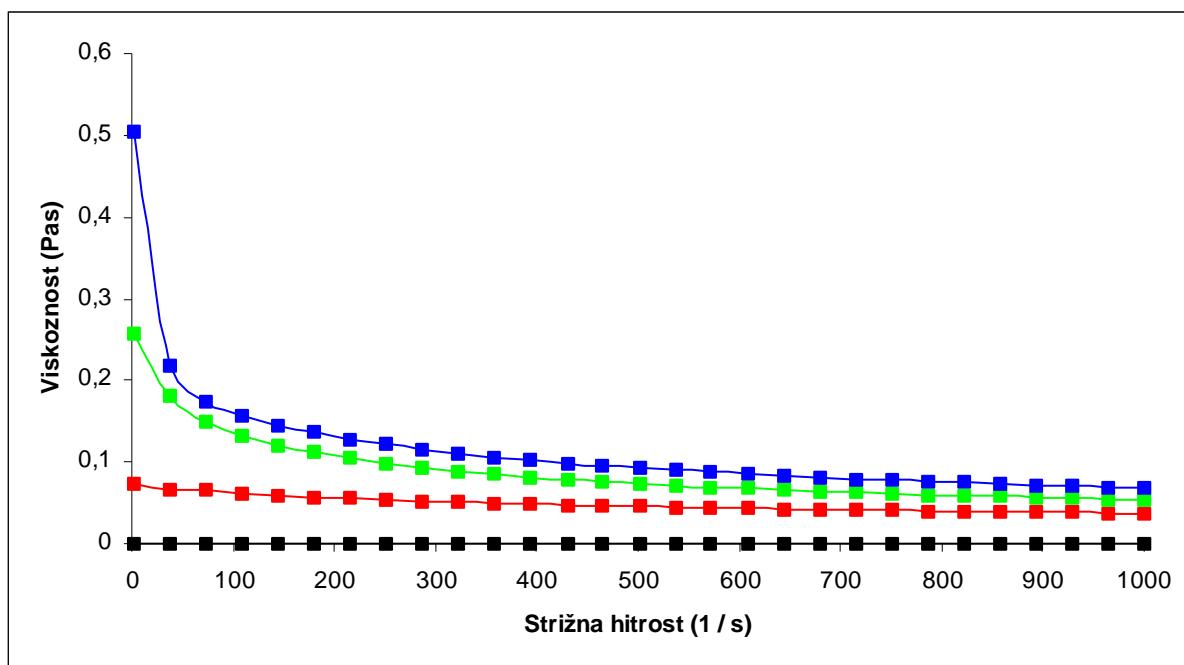


Slika 28: SAXS sipalne krivulje $I(q)$ 1 % gostil v BHM rastnem mediju: MC – Culminal 7000 PF (modro), CMC – Blanose 12M31P (rdeče) in HEC – Natrosol 250 MR (zeleno).

Figure 28: The SAXS scattering curves $I(q)$ of 1 % thickeners in the BHM growth media: MC – Culminal 7000 PF (blue), CMC – Blanose 12M31P (red) and HEC – Natrosol 250 MR (green).

4.4.4 Sprememba reologije

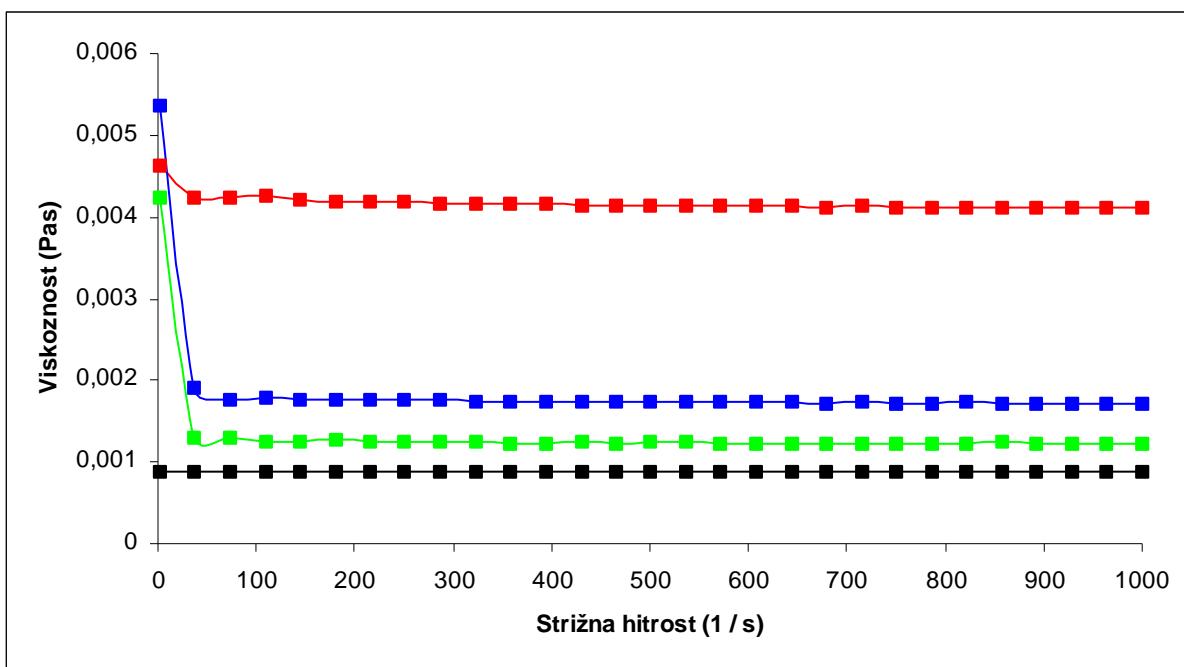
Reogrami nerazgrajenih MC, HEC in CMC so prikazani na sliki 29. Nerazgrajen MC izkazuje najbolj izrazito psevdoplastično tokovno obnašanje. Nasprotno razgrajeni CMC izkazuje najmanj psevdoplastičnosti.



Slika 29: Reogrami nerazgrajenih 1 % gostil v BHM rastnem mediju: MC – Culminal 7000 PF (■), CMC – Blanose 12M31P (■), HEC – Natrosol 250 MR (■) in vode (■).

Figure 29: Rheograms of native 1 % thickeners in the BHM growth media: MC – Culminal 7000 PF (■), CMC – Blanose 12M31P (■), HEC – Natrosol 250 MR (■) and water (■).

Po končani biorazgradnji se je tokovno obnašanje gostil značilno spremenilo. Razgrajen CMC je imel najvišjo viskoznost, kar je skladno z rezultati SEC, ki kažejo da je CMC imel po biorazgradnji tudi najvišji Mw. Opazili smo, da so vsa gostila po biorazgradnji psevdoplastičnost obdržala le v območju najnižjih strižnih hitrosti (slika 30), kar je posledica depolimerizacije.



Slika 30: Reogrami razgrajenih 1 % gostil v BHM rastnem mediju: MC – Culminal 7000 PF (■), CMC – Blanose 12M31P (■), HEC – Natrosol 250 MR (■) in vode (■).

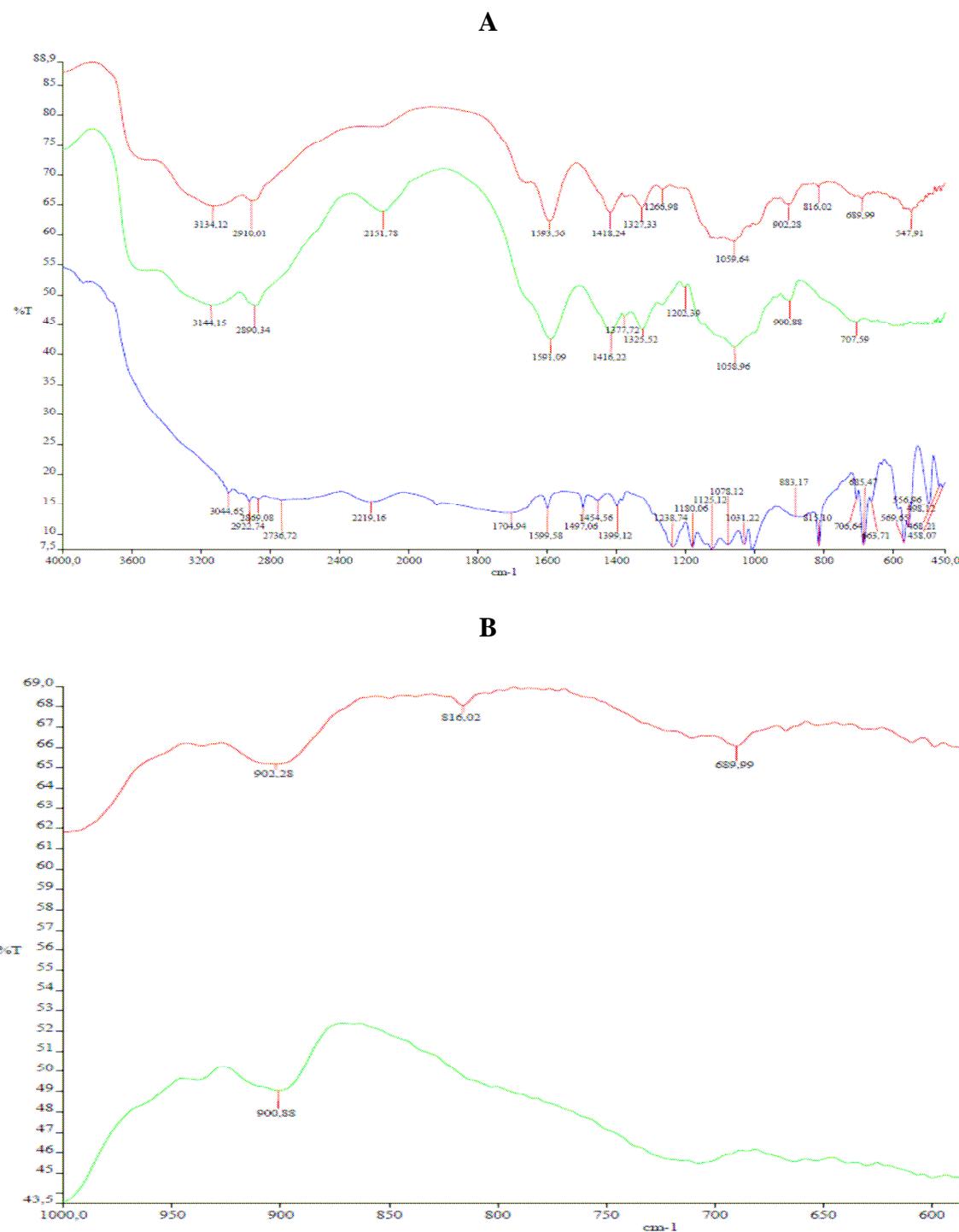
Figure 30: Rheograms of degraded 1 % thickeners in the BHM growth media: MC – Culminal 7000 PF (■), CMC – Blanose 12M31P (■), HEC (■) – Natrosol 250 MR and water (■).

4.5 SINTEZA, KARAKTERIZACIJA IN BIORAZGRADNJA TsCMC

V nalogi smo s sintezo pripravili novo celulozno gostilo, kjer smo hidroksilne skupine CMC tozilirali. Novo celulozno gostilo smo strukturno in kemijsko okarakterizirali in preverili njegovo biorazgradljivost v primerjavi s komercialno dostopnimi celuloznimi gostili. Osnovni namen sinteze novega celuloznega gostila je bilo znižanje biorazgradljivosti ob sočasni ohranitvi reoloških lastnosti izvirnega CMC.

4.5.1 FTIR spektroskopija CMC in TsCMC

Kot vidimo na sliki 31A, imata FTIR spektra CMC in TsCMC globalno zelo podobne vibracijske strukture. Spektra se razlikujeta v nekaterih vibracijskih trakovih, ki so bodisi razširjeni bodisi pomaknjeni k višjim ali nižjim valovnim številom. Najbolj značilno različni so trakovi pri 816 in 690 cm^{-1} , ki so prisotni v TsCMC, ne pa tudi v CMC (slika 31B). Ti dve valovni števili ustrezata vibracijam izvenravninskih C – H deformacij in izvenravninskih deformacij *p*-substituiranega aromatskega obroča. Ti dve nihanji ustrezata strukturi *p*-toluensulfonske kisline, njuna prisotnost v TsCMC pa kaže na to, da je bil CMC toziliran.

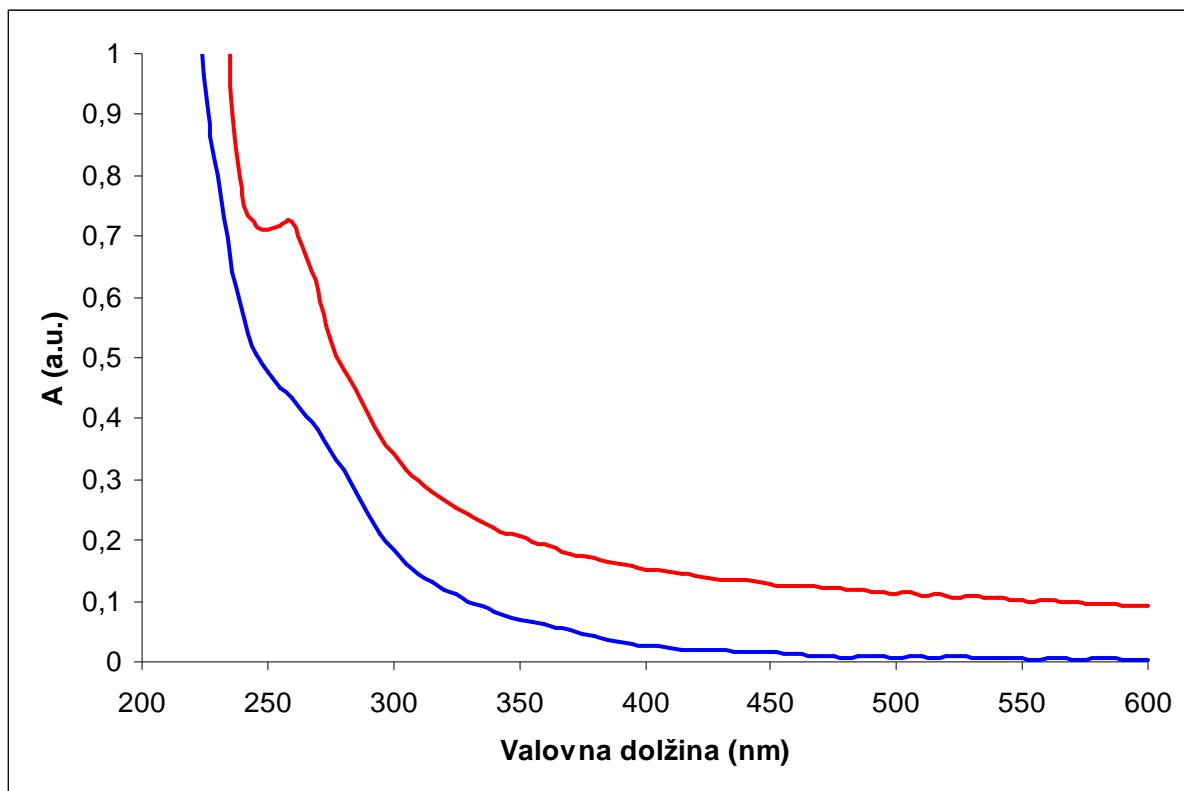


Slika 31: Celotni FTIR spektri CMC (—), TSA (—) in TsCMC (—) (A); Izsek, kjer so opazne ključne razlike v FTIR spektrih CMC (—) in TsCMC (—) (B).

Figure 31: Complete FTIR spectra of CMC (—), TSA (—) and TsCMC (—) (A); Section with key differences in FTIR spectra of CMC (—) and TsCMC (—) (B).

4.5.2 UV – VIS spektroskopija CMC in TsCMC

UV – VIS spektra 1 % vodnih raztopin CMC z $M_w = 90$ kDa in TsCMC sta predstavljena na sliki 32. Kot je razvidno iz spektra, TsCMC absorbira po celotnem spektralnem območju, medtem ko CMC absorbira le v UV delu, absorbanca narašča proti krajšim valovnim dolžinam. Raztopine TsCMC so na videz nekoliko motne, kar je najverjetnejše razlog za opaženo absorbanco po celotnem spektru. Spekter TsCMC je v večjem delu zelo podoben spektru CMC, ključno pa se razlikuje v območju valovnih dolžin $\lambda = 250 – 280$ nm, kjer je v spektru TsCMC izrazit vrh. Ta vrh pripisujemo aromatskim tozilnim skupinam vezanim na TsCMC (Socrates, 2001).



Slika 32: UV – VIS spektra 1 % vodnih raztopin CMC z $M_w = 90$ kDa (modro) in TsCMC (rdeče).

Figure 32: UV – VIS spectra of 1 %-percent water solutions of CMC with $M_w = 90$ kDa (blue) and TsCMC (red).

4.5.3 CHSP elementna sestava CMC in TsCMC

Rezultati analiz elementne sestave so zbrani v preglednici 2, primerjalno pa so predstavljene še referenčne vrednosti izračunane na podlagi predpostavljenih kemičnih struktur. Teoretični izračuni elementne sestave so temeljili na predpostavkah, da je bila DS vrednost CMC 0,7, da se DS vrednost karboksimetilnih tekom derivatizacije ni spremenila in da so vse kislinske skupine vedno v obliki Na – soli. Glede na določeno elementno sestavo TsCMC v primerjavi s teoretično sestavo sklepamo, da je stopnja substituiranosti CMC s tozilnimi skupinami okrog 0,1. V materialu je prisotno tudi nekaj nečistoč v obliki fosforjevih spojin, verjetno ostanki hidrolize P_4O_{10} do Na_3PO_4 , ki je nastala med postopkom priprave toziliranega CMC v stopnji nevtralizacije z NaOH.

Preglednica 2: Rezultati CHSP elementne masne analize in teoretično izračunana elementna sestava CMC in TsCMC

Table 2: Results of CHSP elemental mass analysis and theoretically calculated elemental composition of CMC and TsCMC

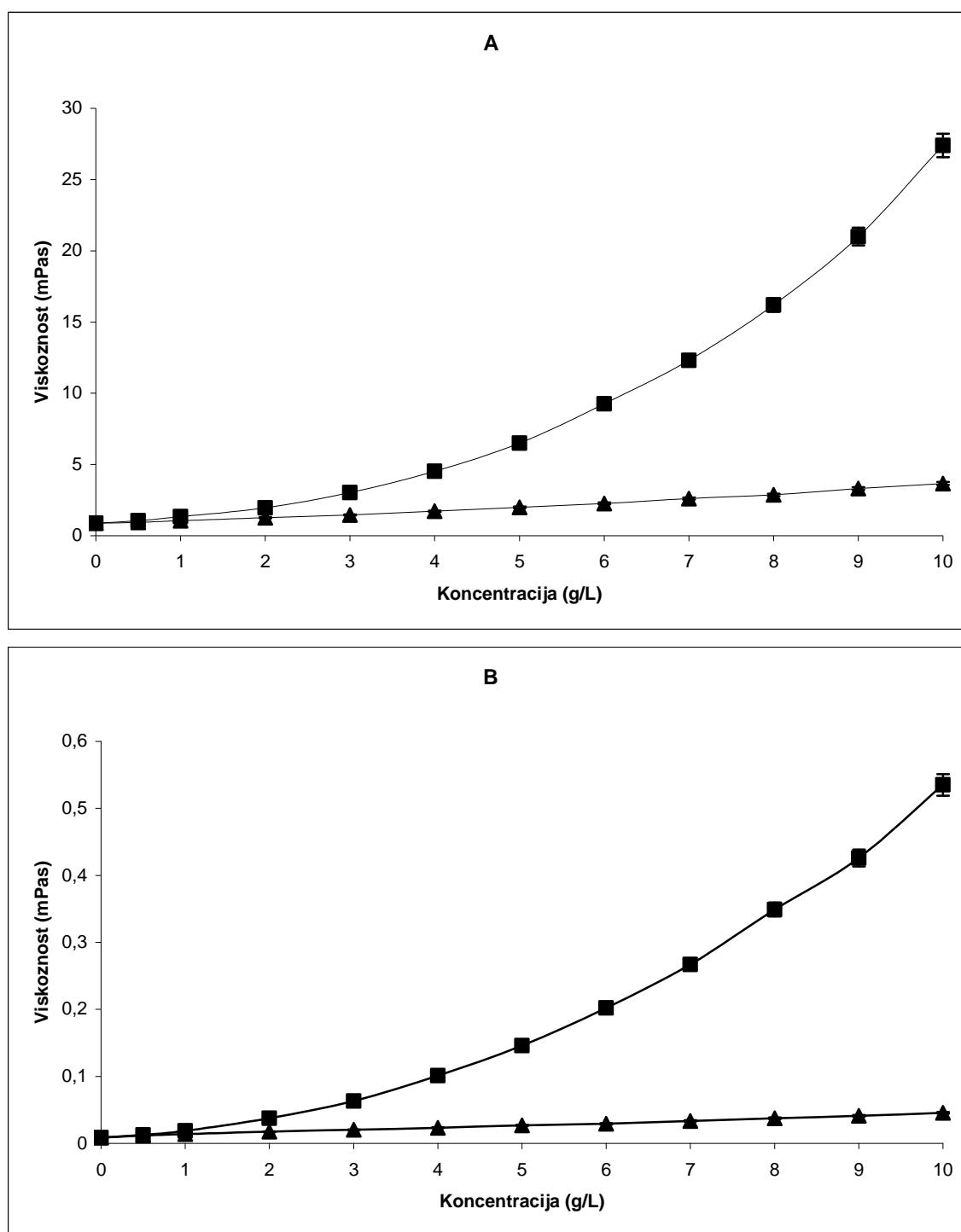
Element	CMC _t	CMC _d	TsCMC _t	TsCMC _d
C (%)	40,5	38,8	38,9	38,5
H (%)	4,9	5,0	4,6	5,00
S (%)	0	< 0,02	1,3	1,5
P (%)	0	< 0,02	1,24	0,8

Legenda: CMC_t = teoretična elementna masna sestava izračunana za CMC z DS vrednostjo 0,7; CMC_d = eksperimentalno določena elementna sestava; TsCMC_t = teoretična elementna sestava TsCMC z DS karboksimetilnih skupin 0,7, z DS tozilnih skupin 0,1 in ob prisotnosti ene molekule Na_3PO_4 na 10 – anhidroglukoznih enot kot nečistoče; TsCMC_d = eksperimentalno določena elementna sestava.

Legend: CMCT = theoretical elemental mass composition calculated for CMC with DS value 0.7; CMCD = experimentally determined elemental composition; TsCMCT = Theoretically calculated elemental composition for TsCMC with DS of carboxymethylic groups 0.7 nad DS of tosylic groups 0.1 in presence of one molecule of Na_3PO_4 per 10 – anhydroglucosic units as impurities; TsCMCD = experimentally determined elemental composition.

4.5.4 Reološka primerjava CMC in TsCMC

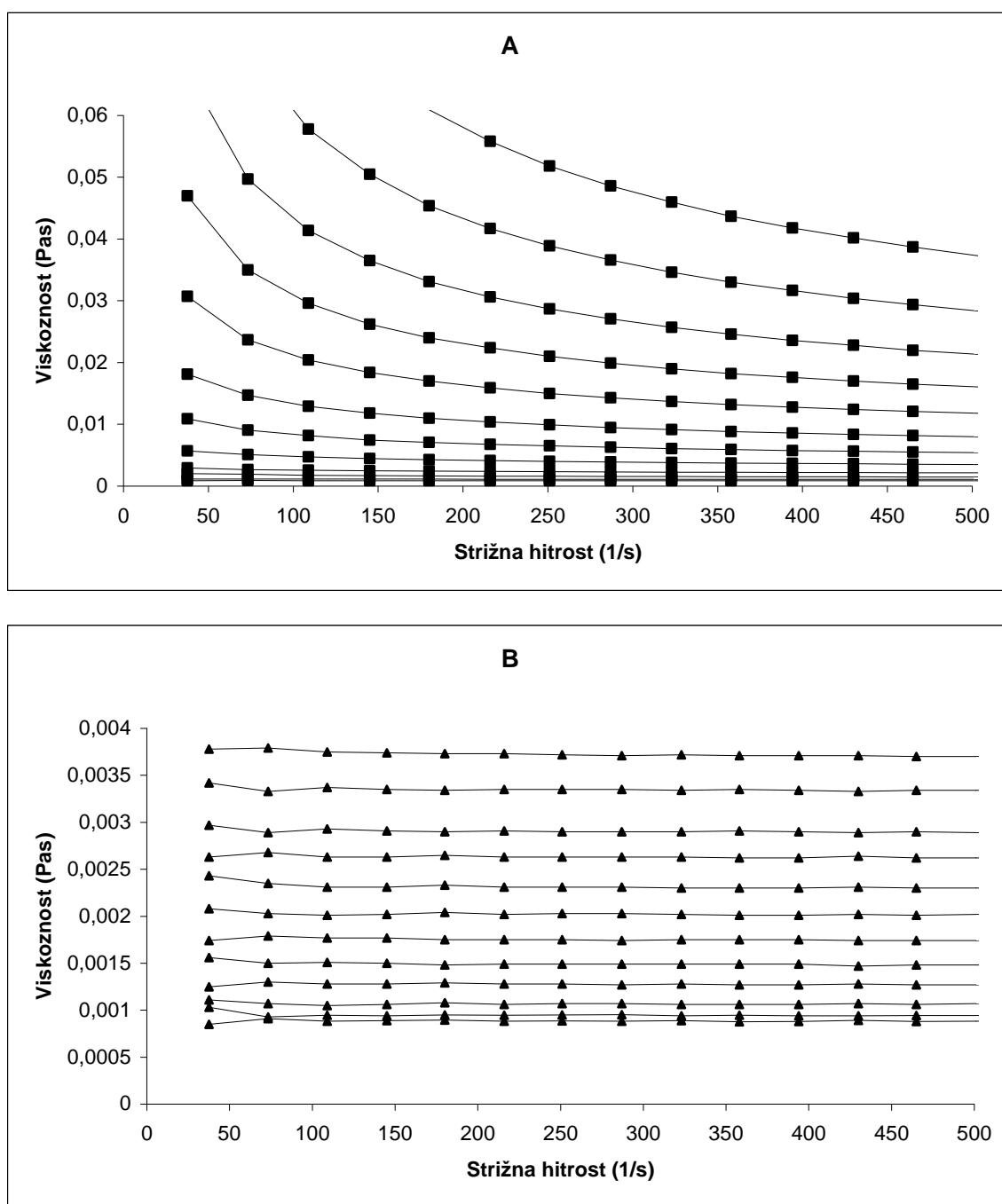
TsCMC smo reološko primerjali z izhodnim CMC. Kot je razvidno iz slike 33, je viskoznost raztopine TsCMC signifikantno večja kot raztopine CMC. Tako denimo 1 % raztopina TsCMC v BHM ima viskoznost 27,1 mPas, medtem ko je viskoznost 1 % CMC v BHM znašala le 3,5 mPas (pri strižni hitrosti 1000 s^{-1}). Viskoznost je bila v čisti vodi še nekoliko višja – 53,5 mPas pri TsCMC in 4,6 mPas pri CMC. To kaže, da so soli prisotne v BHM mediju preko senčenja odbojnih interakcij imele vpliv na viskoznosti obeh polimerov. Poleg viskoznosti se TsCMC od izhodne CMC razlikuje tudi v odvisnosti viskoznosti od koncentracije polimerov. Medtem ko je CMC viskoznost naraščala linearno z naraščajočo koncentracijo, v primeru TsCMC viskoznost narašča eksponentno z naraščajočo koncentracijo. Nelinearno naraščanje viskoznosti TsCMC z naraščajočo koncentracijo smo opazili tako v vodni raztopini kot tudi v BHM mediju (slika 33).



Slika 33: Odvisnost viskoznosti CMC (▲) in TsCMC (■) od koncentracije v BHM mediju (A) in v vodni raztopini (B).

Figure 33: Viscosity dependence of concentration for CMC (▲) and TsCMC (■) in the BHM growth media (A) and in aqueous solution (B).

Tozilacija CMC je poleg povišanja viskoznosti imela tudi izrazit vpliv na tokovno obnašanje raztopin polimerov, kot je razvidno iz slike 34. Pred tozilacijo se je CMC v proučevanem koncentracijskem območju obnašala kot newtonska raztopina, po tozilaciji pa je izkazoval močno psevdoplastičnost in eksponentno rast viskoznosti z naraščajočo koncentracijo polimera. Da bi lahko izključili morebitno polimerizacijo tekom derivatizacije, ki bi lahko povzročila opisane reološke spremembe, smo za CMC in TsCMC raztopine določili intrinzične viskoznosti. Intrinzični viskoznosti določeni v BHM mediju sta znašali $350 \pm 10 \text{ cm}^3/\text{g}$ za TsCMC in $330 \pm 10 \text{ cm}^3/\text{g}$ za CMC, v vodni raztopini pa $830 \pm 30 \text{ cm}^3/\text{g}$ za TsCMC in $830 \pm 20 \text{ cm}^3/\text{g}$ za CMC, kar kaže na to, da imata polimera primerljive Mw.

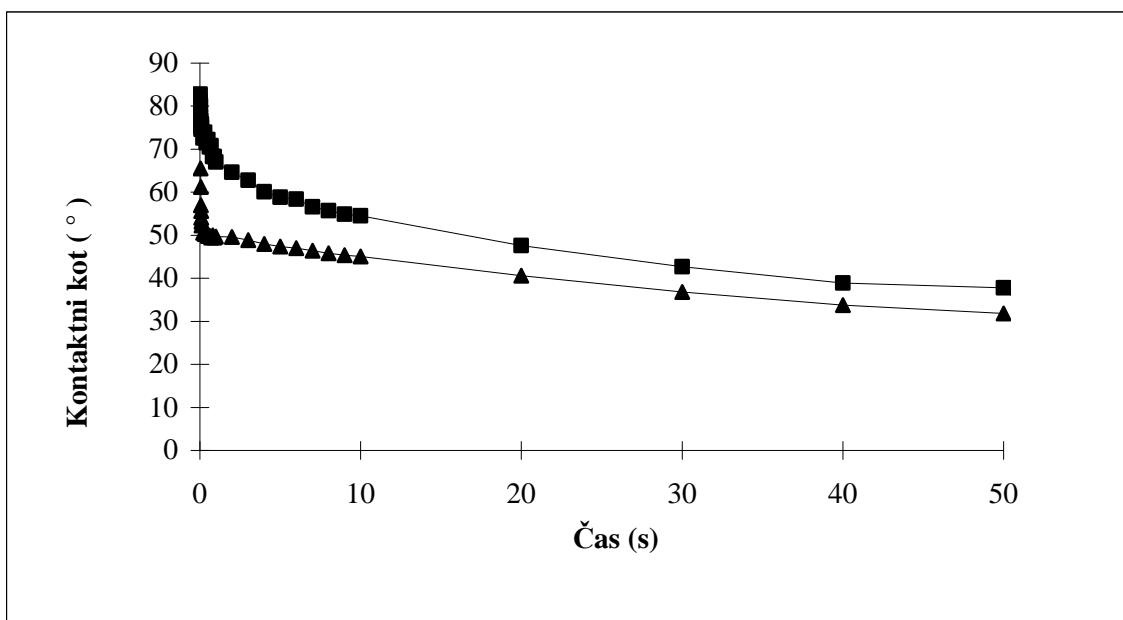


Slika 34: Tokovno obnašanje TsCMC (■) (A) in CMC (▲) (B) 0; 0,05; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7; 0,8; 0,9 in 1 % (w/v) koncentracija polimerov v BHM rastnem mediju (koncentracije si v tem zaporedju sledijo od spodaj proti vrhu).

Figure 34: Flow behavior of TsCMC (■) (A) and CMC (▲) (B) for 0; 0.05; 0.1; 0.2; 0.3; 0.4; 0.5; 0.6; 0.7; 0.8; 0.9 and 1 % (w/v) polymer concentration in the BHM growth medium (from bottom to the top respectively).

4.5.5 Meritve dinamičnega kontaktnega kota

Rezultati meritev dinamičnih kontaktnih kotov proučevanih polimerov so predstavljeni na sliki 35. Podatki kažejo, da je TsCMC glede na CMC manj omočljiv. Filter papir prepojen s TsCMC je namreč počasneje absorbiral vodo kot filter papir prepojen z izhodno CMC. Začetni kontaktni kot med vodo in TsCMC je znašal 85° in je nato počasi padal proti 40° ob koncu meritve. Začetni kontaktni kot med vodo in CMC je v začetku znašal 65° , nakar je hitro padel na 48° , nato pa počasi do 35° ob koncu meritve. Rezultati kažejo, da je TsCMC bolj hidrofoben polimer kot izhodni CMC. Opaženo povišanje hidrofobnosti je skladno z vezavo hidrofobnih tozilnih skupin na ogrodje CMC.



Slika 35: Diagram dinamičnih kontaktnih kotov CMC (▲) in TsCMC (■).

Figure 35: Dynamic contact angle diagram for CMC (▲) and TsCMC (■).

4.5.6 Emulgacijska učinkovitost

CMC se v industrijskih aplikacijah največ uporablja zaradi njenih zgoščevalnih lastnosti. V komercialnih produktih pa se pogosto pojavi tudi potreba po uporabi emulgatorjev, ki omogočajo homogenost produktov, kjer so združene komponente z različno polarnostjo. Rezultati preverjanja emulgacijske učinkovitosti so pokazali, da CMC nima učinka na

stabilnost emulzije. Po eni uri sta se oljna in vodna faza popolnoma ločili. Emulzija stabilizirana s TsCMC je ostala stabilna tekom celotnega obdobja trajanja eksperimenta. Po enem mesecu je bila zmes še vedno homogena z le tanko plastjo oljne faze na površini (slika 36).



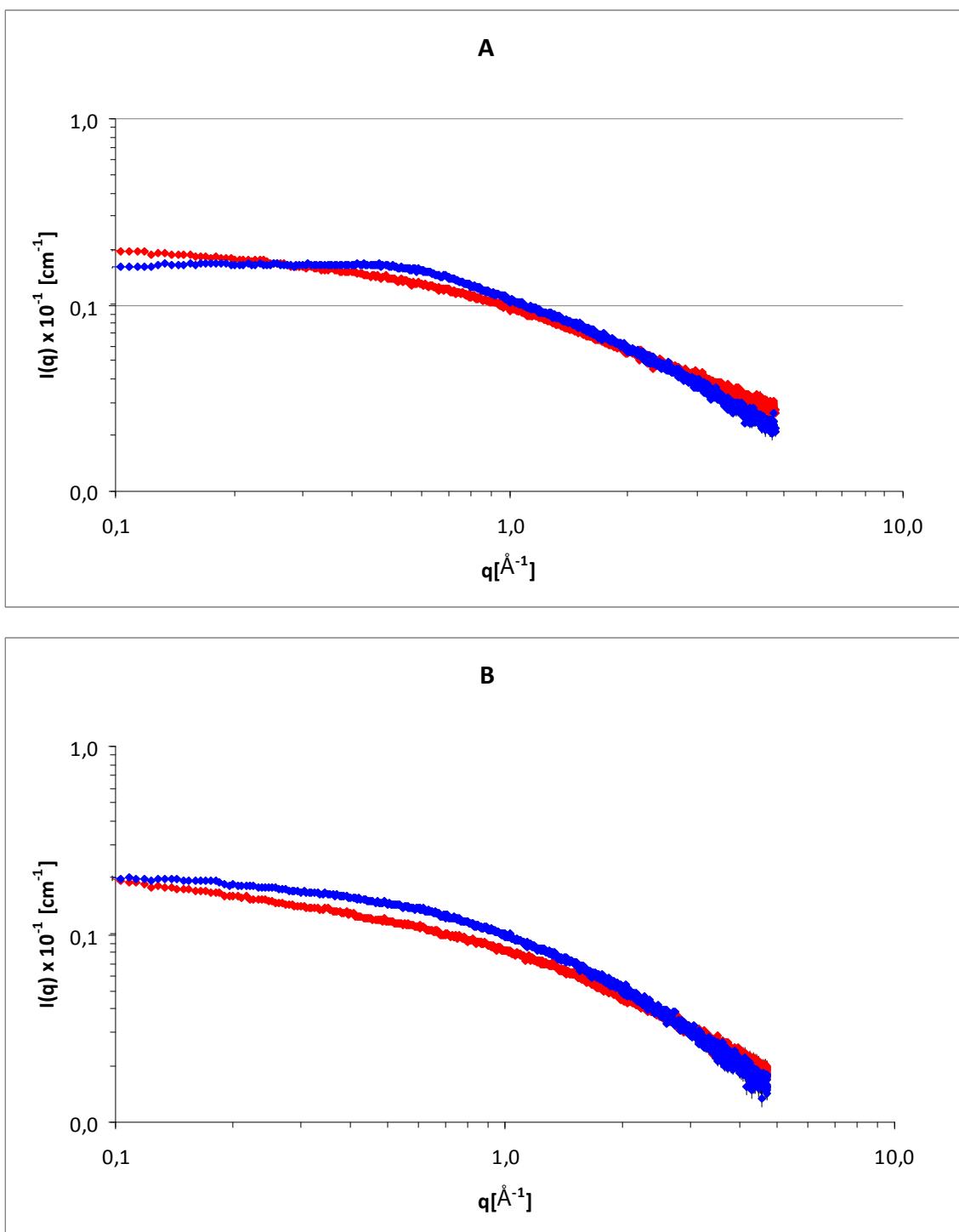
Slika 36: Stabilnost emulzije po enem mesecu: levo CMC, desno TsCMC: V primeru CMC sta se fazi že po 1 h popolnoma ločili, medtem ko je po 1 mesecu emulzija s TsCMC ostala homogena, ločila se je le zelo tanka plast oljne faze na površini.

Figure 36: Emulsion stability after one month: left CMC and right TsCMC: In case of CMC, the phases were completely separated after 1 h, meanwhile in case of the TsCMC emulsion remained homogenous with only a thin layer of oil fraction.

4.5.7 SAXS meritve CMC in TsCMC v BHM mediju in v vodi

Sipalne krivulje SAXS CMC in TsCMC v vodi so predstavljene na sliki 37A. Rezultati kažejo izrazite razlike v strukturiranosti materialov. Razlike v jakosti odbojnih interakcij se zelo izrazito kažejo pri nizkih q , kjer vidimo, da se naklona sipalnih krivulj CMC in TsCMC zelo razlikujeta. Naklon sipalne krivulje CMC je bil precej bolj položen kot v

primeru TsCMC, kar kaže na spremenjen odboj med sosednjimi molekulami CMC. SAXS sipalne krivulje v BHM (slika 37B) kažejo, da ima topilo precej manjši vpliv na strukturiranost TsCMC kot na CMC. Sipalna krivulja TsCMC v BHM se ni bistveno razlikovala od sipalne krivulje v vodi. Pri CMC pa je bila slika povsem drugačna, saj je bila sipalna krivulja v BHM mediju izrazito različna od sipalne krivulje v vodi. Najbolj izrazito se je razlika opazila pri manjših q , kjer se je naklon v BHM glede na vodo močno povišal.

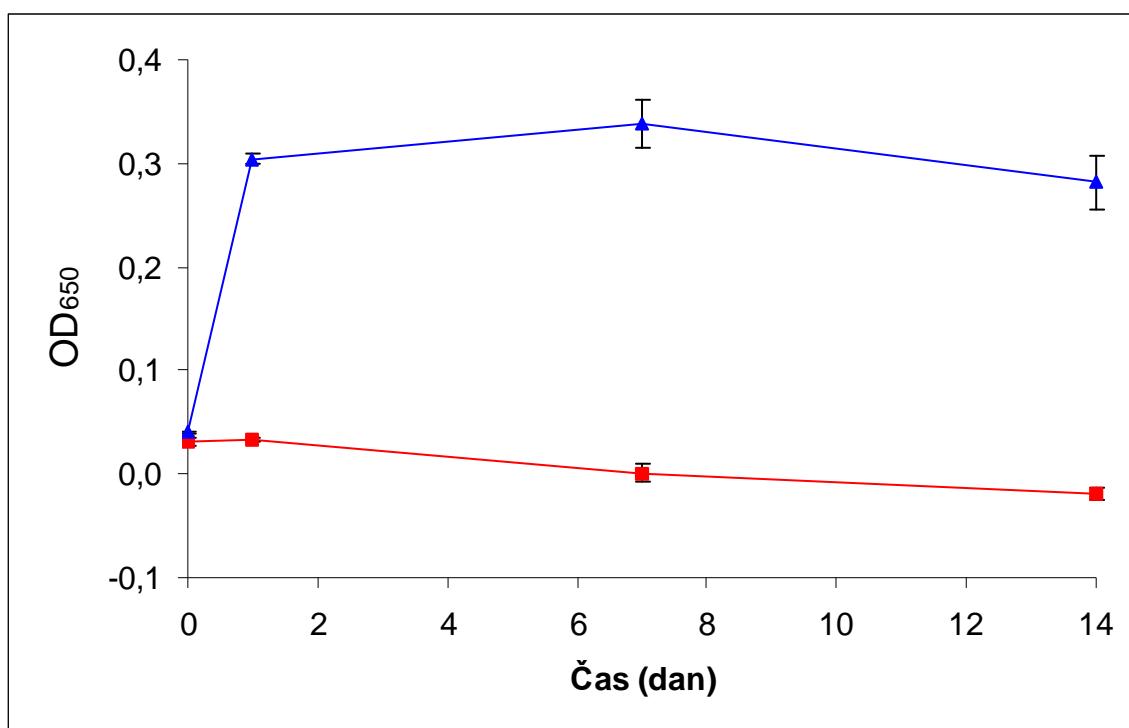


Slika 37: Relativne SAXS sipalne krivulje $I(q)$ 1 % gostil v vodni raztopini (A) in v BHM rastnem mediju (B): CMC z $M_w = 90$ kDa in $DS = 0,7$ (modro) in TsCMC (rdeče).

Figure 37: Relative SAXS scattering curves $I(q)$ of 1 % thickeners in aqueous solution (A) and in the BHM growth media (B): CMC with $M_w = 90$ kDa and $DS = 0.7$ (blue) and TsCMC (red).

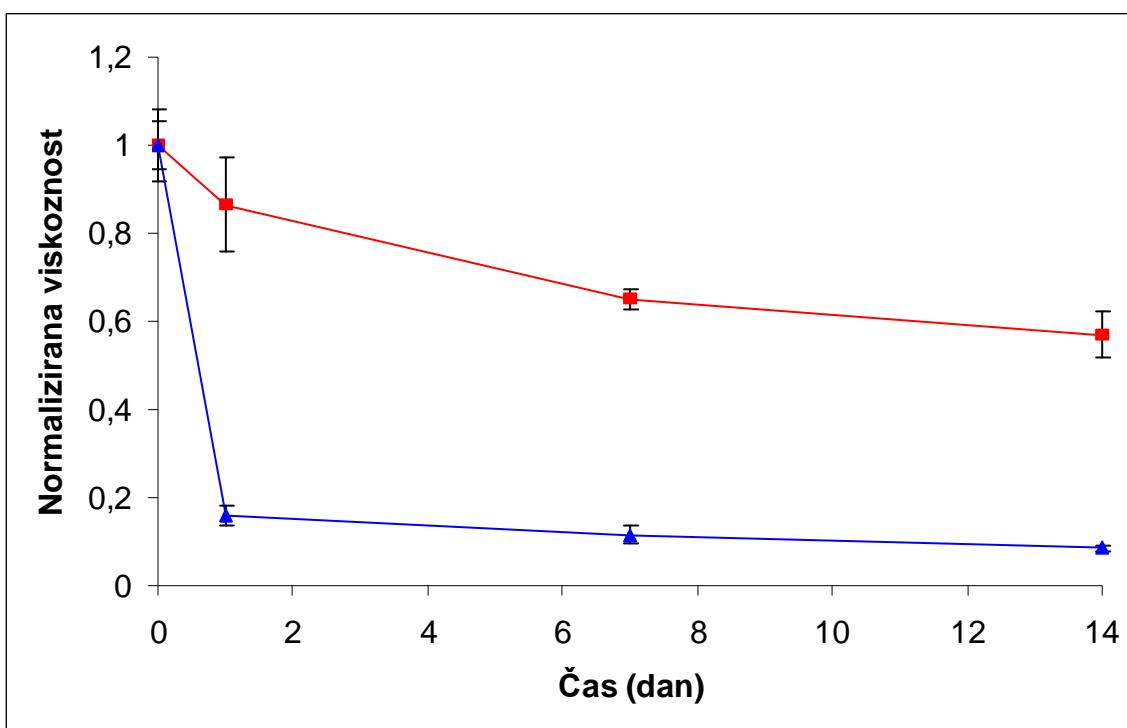
4.5.8 Biorazgradnja TsCMC glede na izhodni CMC

Glavni namen sinteze TsCMC je bil znatno znižati biološko razgradljivost CMC z uvedbo dodatnih substituent. Rezultati inkubacijskega eksperimenta s TsCMC kot edinim virom organskega ogljika so predstavljeni na sliki 38. Dodani TsCMC kulturi *Cellulomonas uda* ni omogočil rasti (slika 38). Kultura je kljub temu, da je OD_{650} nekoliko padel, ostala živa preko celotnega obdobja inkubacijskega eksperimenta in je rasla, če smo jo precepili na sveže gojišče ali če smo BHM gojišču s TsCMC dodali glukozo. To izključuje toksičnost TsCMC in kaže na to, da kultura iz TsCMC enostavno ne zmore pridelati dovolj enostavnih sladkorjev, ki bi jih lahko uporabila za svojo rast. To pa je bilo v ostrem nasprotju z rastjo *C. uda* v BHM gojišču s CMC, kjer se je OD_{650} že v prvih 24 urah inkubacije dvignil z začetnih 0,03 na 0,3 absorbančne enote, kar kaže na signifikantno povišanje števila bakterijskih celic. Skladno z bakterijsko rastjo smo v BHM mediju s CMC zaznali 7-kratno povišanje koncentracije reducirajočih sladkorjev in hitri padec v viskoznosti (slika 39). Po 24 urah inkubacije je bila viskoznost BHM gojišča s CMC primerljiva viskoznosti vode. Med 14-dnevno inkubacijo v TsCMC je pri kulturi *C. uda* prišlo do nizkega, vendar signifikantnega porasta koncentracije reducirajočih sladkorjev ($p = 0,0096$). Porast v koncentraciji reducirajočih sladkorjev ni koreliral z bakterijsko rastjo, je pa koreliral s padanjem viskoznosti BHM medija (slika 40). Začetna viskoznost TsCMC je tekom 14-dnevne inkubacije padla na 40 %. Ne glede na to je bila viskoznost biološko razgrajenega TsCMC ob koncu eksperimenta še vedno znatno višja kot viskoznost nerazgrajenega izhodnega CMC (16 ± 1 mPas TsCMC in $3,5 \pm 0,1$ mPas CMC). V odsotnosti kulture *C. uda* nismo zaznali padca viskoznosti niti CMC niti TsCMC kar kaže, da je vpliv nebiološke razgradnje zanemarljiv.



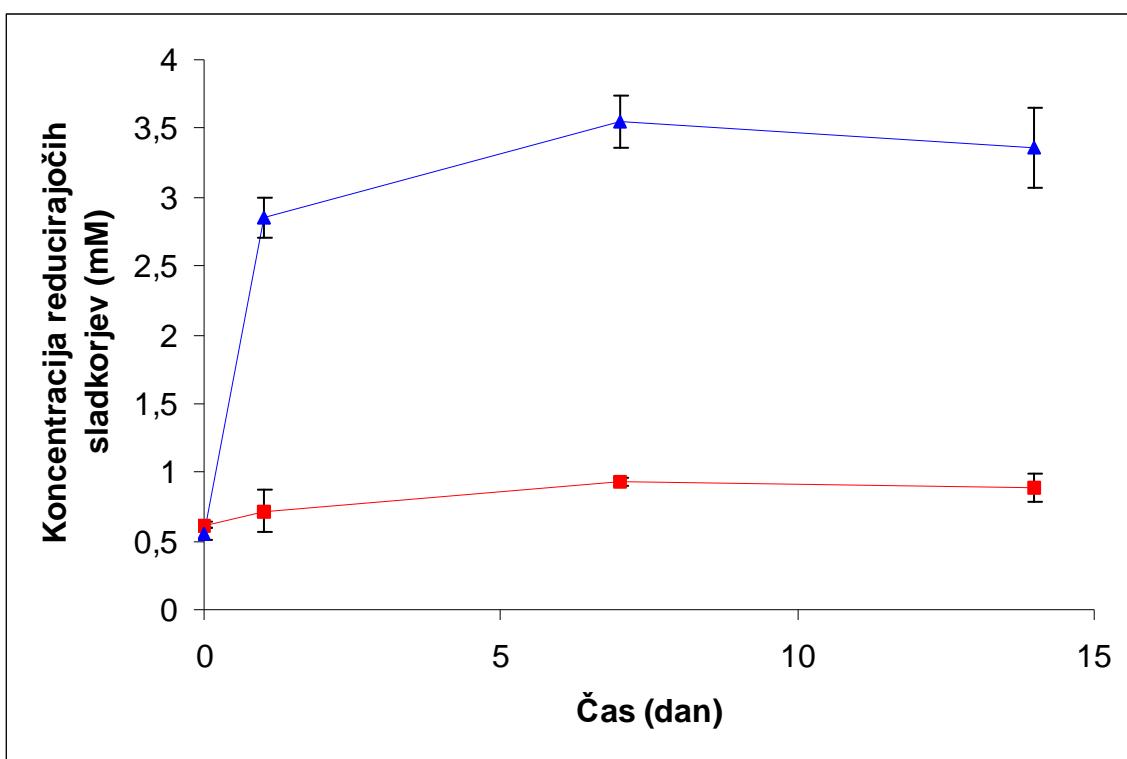
Slika 38: Rast kulture *Cellulomonas uda* v BHM gojiščih z 1 % CMC (▲) in 1 % TsCMC (■).

Figure 38: Growth of *Cellulomonas uda* culture in the BHM growth media containing 1 % CMC (▲) and 1 % TsCMC (■).



Slika 39: Normalizirana viskoznost BHM gojišč z 1 % CMC (\blacktriangle) in 1 % TsCMC (\blacksquare) tekom inkubacije s kulturo *Cellulomonas uda*.

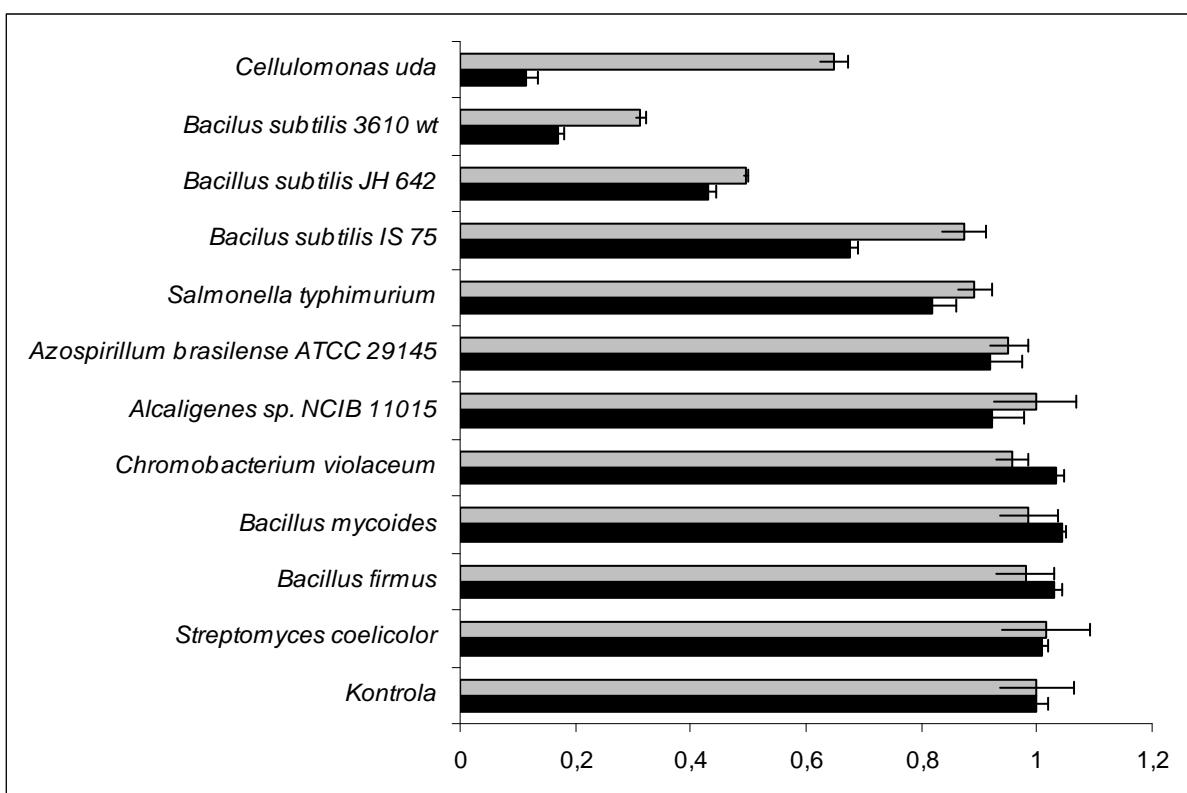
Figure 39: Normalized viscosity of the BHM growth media containing 1 % CMC (\blacktriangle) and 1 % TsCMC (\blacksquare) during the incubation with the *Cellulomonas uda* culture.



Slika 40: Koncentracija reducirajočih sladkorjev v BHM rastnem mediju z 1 % CMC (▲) in 1 % TsCMC (■) tekom inkubacije s kulturo *Cellulomonas uda*.

Figure 40: Reducing sugar concentration of the BHM growth media containing 1 % CMC (▲) and 1 % TsCMC (■) during the incubation with the *Cellulomonas uda* culture.

Odpornost TsCMC na razgradnjo z ostalimi bakteriji je predstavljena na sliki 41. Bakterije lahko razdelimo v dve skupini: (i) bakterije, ki niso mogle razgraditi niti CMC niti TsCMC; in (ii) bakterije, ki so razgradile CMC in precej slabše TsCMC. V prvi skupini so bile bakterije *Cellulomonas uda* in sevi *Bacillus subtilis*. Nobena od testiranih bakterij med inkubacijo ni popolnoma uničila reoloških lastnosti TsCMC za razliko od CMC. Biorazgradnja TsCMC je bila v vseh primerih nižja kot biorazgradnja CMC. Kljub temu, da je bil nabor testiranih bakterij relativno skromen, rezultati nedvoumno kažejo na to, da je TsCMC manj razgradljiv kot izhodni CMC.



Slika 41: Biorazgradnja CMC (črno) in TsCMC (sivo). Relativna izguba viskoznosti po 7-dnevni inkubaciji z različnimi bakterijskimi sevi.

Figure 41: Biodeterioration of CMC (black bars) and TsCMC (grey bars). Relative viscosity loss after 7 days of incubation with different bacterial strains.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

V doktorski nalogi nas je zanimalo, kako tip in delež substituent vplivajo na biorazgradljivost celuloznih derivatov, kar predstavlja velik gospodarski problem v številnih industrijskih sektorjih, kjer uporabljajo celulozna gostila. Zato smo proučili reološke in strukturne spremembe med biorazgradnjo obstoječih celuloznih gostil. Pridobljene rezultate smo uporabili kot osnovo za sintezo novega celuloznega gostila z zmanjšano stopnjo biorazgradljivosti.

5.1.1 Vpliv tipa in deleža substituente na strukturo in biorazgradnjo celuloznih gostil

Rast kulture *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* NCIB 3610 v BHM s CMC je bila počasna. Kultura *B. subtilis* je med inkubacijskim eksperimentom metabolizirala zgolj del organskega ogljika; manj kot 0,1 g/L razpoložljive glukoze, ter manj kot 0,04 g/L karboksimetilnih skupin. Glede na predhodne ugotovitve (Wirick, 1968; Kalsulke in sod., 1988), ki kažejo, da do cepitve celuloznega skeleta CMC lahko pride le na mestih, kjer so zaporedno vezane tri nesubstituirane anhidroglukozne enote, je slaba bakterijska rast pričakovana. Delež nesubstituiranih regij določa količino hrani, ki so dostopna celulolitičnim mikrobom, s tem pa je pogojena celična rast. Tekom bakterijske rasti kultura v gojišče sprošča celulaze, poleg tega pa lahko tudi druge ekstracelularne polimerne substance. Te bi lahko imele določen prispevek k viskoznosti medija, a smo njihov prispevek zanemarili, glede na ugotovitev, da je kultura metabolizirala manj kot 1 % razpoložljivega ogljika in da je bil donos biomase majhen. Ne glede na koncentracijo CMC v gojiščih je sčasoma prišlo do zasičenja koncentracije reducirajočih sladkorjev, kar je posledica omejenega števila cepitvenih mest na CMC.

Rezultati inkubacijskih eksperimentov kažejo, da so hitrosti hidrolize CMC v primerih uporabe čistih celulaz ali ob uporabi živih mikrobnih kultur precej različne. Medtem ko lahko očiščene celulaze razgradijo CMC v nekaj minutah ali urah (Vlasenko in sod.,

1998), *B. subtilis* subsp. *subtilis* NCIB 3610 potrebuje 30 dni, da CMC razgradi do enake stopnje, kar je nekaj velikostnih redov počasneje. Viskoznost BHM medija s CMC tekom inkubacije s kulturo *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* NCIB 3610 negativno korelira z naraščanjem koncentracije reducirajočih sladkorjev. Viskoznost ne pada sorazmerno s koncentracijo reducirajočih sladkorjev. Razlog za nesorazmerno padanje viskoznosti z naraščanjem koncentracije reducirajočih sladkorjev je v tem, da ima encimska cepitev daljše molekule večji vpliv na padec viskoznosti kot cepitev krajše molekule. Rezultati SEC kažejo na široko masno distribucijo molekul CMC po biorazgradnji. To pomeni, da so cepitvena mesta vzdolž molekul CMC razporejena neenakomerno, kar implicira neenakomerno razporeditev karboksimetilnih skupin vzdolž molekule. Po razgradnji je prišlo do zmanjšanja delcev z višjo maso, kar je skladno z rezultati SAXS, ki kažejo, da biorazgradnja signifikantno vpliva predvsem na strukturne elemente, ki so večji od 5 nm. To nakazuje, da biorazgradnja ne spreminja strukture osnovne verige CMC, saj bi se to videlo na manjših velikostnih skalah SAXS sipalnih krivulj, kar pa nismo opazili. Posledica biorazgradnje je tudi značilno znižanje viskoznosti medija, kar dobro korelira z opaženimi spremembami pri SEC in SAXS.

Na reologijo CMC poleg biorazgradnje močno vpliva tudi topilo, kot je pokazal Kulicke (Kulicke in sod., 1996). Višjo viskoznost nativnega 2 % CMC ($M_w = 90$ kDa in $DS = 0,7$) v BHM mediju glede na vodno raztopino kot tudi psevdoplastično tokovno obnašanje raztopine pripisujemo vplivu prisotnih elektrolitov v BHM. Ti namreč preko senčenja odbojnih interakcij omogočijo večje medmolekularno prepletanje (Wach in sod., 2003). V nesubstituiranih regijah zaradi znižanja odbojnih interakcij lahko prihaja do šibkih medmolekularnih H-povezav, ki se pod vplivom strižne sile prekinejo. Takšno prepletanje razloži tudi psevdoplastično tokovno obnašanje. V vodni raztopini so medmolekularni odboji močnejši, zato ne pride do prepletanja, niti do medmolekularnih povezav. Ker biorazgradnja poteka na nesubstituiranih regijah (Wirick, 1968; Kalsulke in sod., 1988) in razgrajen CMC le-teh ne vsebuje, kljub zasenčenim odbojem ne prihaja do močnejših medmolekularnih povezav. To je skladno z ugotovitvami Kulicke in sod. (1996), da nesubstituirane regije CMC lahko tvorijo mikrokristalinične, celulozi podobne odseke, kar omogočajo nekovalentne povezave (H-vezi). Vpliv elektrolitov na

strukturiranosti raztopin opazimo tudi s SAXS. Z modelom biserne ogllice smo določili vrednosti interakcijskih in oblikovnih parametrov reprezentativne makromolekule CMC. Z modelom smo ugotovili izrazito močnejše medmolekulske odbojne interakcije v vodni raztopini kot v BHM mediju, kar je skladno s pričakovanji. V BHM mediju so namreč odboji med karboksimetilnimi skupinami zasenčeni z elektroliti, zato je jakost odbojnih interakcij nižja. Znižana moč odbojnih interakcij omogoča, da se sosednje verige CMC lahko približajo in prepletejo, kar je skladno s povišano viskoznostjo in psevdoplastičnostjo v BHM mediju glede na vodno raztopino. Kontaktov, kjer se dve molekuli stikata, SAXS ne prepozna kot dveh ločenih delcev. To je razlog, zakaj smo z modelom biserne ogllice določili višje število monomernih enot v molekulah nativnega in razgrajenega 2 % CMC v BHM mediju in relativno velik radij giracije. V 2 % vodni raztopini, kjer so bili odboji med posameznimi verigami dovolj močni, do tega pojava ni prišlo in model biserne ogllice določi število monomernih enot, ki ustreza Mw polimera.

Da imajo na strukturo CMC ključen vpliv odbojne interakcije smo pokazali tudi z ugotavljanjem strukture 2 % CMC pri različnih pH vrednostih. Rezultati namreč kažejo, da se naklon sipalnih krivulj zvišuje s padanjem pH vrednosti od 7 do 1,6, kar kaže na prisotnost vedno večjih struktur v raztopinah z nižjimi pH vrednostmi. Nižanje pH vrednosti povečuje koncentracijo protonov, le-ti pa se delno vežejo na karboksilne skupine CMC in s tem znižajo število nabojev na molekuli. Zmanjšano število nabojev pomeni znižano moč odbojnih interakcij, zato CMC lahko tvori več nekovalentnih inter-in intramolekularnih H-povezav. Slednje pa privede do večjih supramolekularnih struktur, ki prispevajo k sisanju rentgenskih žarkov pri nižjih q vrednostih. Vpliv pH vrednosti na strukturo CMC je skladen z ugotovitvami Yang in sod. (1999), ki so proučevali vpliv pH vrednosti na viskoznost EPSa bakterije *Lactococcus lactis* in ugotovili, da je pri temperaturi 60 °C viskoznost EPS padala z nižanjem pH vrednosti.

Rezultati biorazgradnje CMC s *Cellulomonas uda* so razkrili, da z naraščajočo stopnjo substituiranosti biorazgradnja pada, kar je skladno z literaturo (Reese in sod., 1950; Reese, 1957; Wirick, 1968). Tako glede na naraščanje koncentracije reducirajočih sladkorjev kot tudi glede na padanje viskoznosti sta si vzorca CMC z DS vrednostma 0,7

in 0,9 podobna in značilno bolje razgradljiva kot CMC z DS vrednostjo 1,2. To opažanje kaže, da biorazgradljivost ni pogojena samo z DS vrednostjo, temveč je pomemben dejavnik tudi porazdelitev karboksimetilnih skupin vzdolž celulognega skeleta. Glede na biorazgradljivost sklepamo, da imajo v povprečju molekule CMC z DS vrednostma 0,7 in 0,9 znatno več nesubstituiranih regij z vsaj tremi zaporedno vezanimi nesubstituiranimi glukoznimi enotami, na katerih lahko pride do cepitve celulognega skeleta, kot molekule CMC z DS vrednostjo 1,2. Zmožnost cepitve glikozidnih vezi je dobro korelirala z rastjo bakterijske kulture. Vzorca z nižjo DS vrednostjo nimata le več nesubstituiranih regij, na katerih poteče hidroliza, temveč kultura iz njih lahko pridela več glukoze, ki jo lahko bakterija uporabi za rast.

Na potek biorazgradnje kot tudi na strukturiranost polimera v raztopini ima velik vpliv tip substituente vezane na celulozni skelet (npr. karboksimetil, hidroksietil, metil). Kultura *Cellulomonas uda* je pri danih inkubacijskih pogojih najmanj razgradila karboksimetil celulozo. Nižjo biorazgradljivost CMC smo pokazali tako preko najnižjega padca v viskoznosti, preko najmanjšega povišanja koncentracije reducirajočih sladkorjev, kot tudi preko najnižje stopnje depolimerizacije v primerjavi s HEC in MC. Rezultati kažejo na to, da je bilo v uporabljenem CMC manj mest, na katerih je lahko prišlo do encimske hidrolize celulognega skeleta kot v primeru HEC in MC. Predvidevamo, da so karboksimetilne substituente v CMC zaradi odbojnih interakcij razporejene bolj homogeno kot substituente v HEC in MC. Negativno nabite karboksilne skupine preko odbojev najverjetneje tekom sinteze usmerjajo vezavo naslednjih skupin na manj nabite regije. Primerjava biorazgradnje komercialnih CMC, HEC in MC kaže, da tip substituente lahko vpliva tudi na hitrost biorazgradnje s kulturo *Cellulomonas uda*. Rezultati kažejo, da kultura *Cellulomonas uda* razgradi CMC in HEC skoraj popolnoma že po enem dnevnu inkubacije. Po drugi strani pa ista kultura po enem dnevnu inkubacije pri istih pogojih zniža viskoznost MC zgolj za 8 %. Razlog za zmanjšano hitrost biorazgradnje MC glede na CMC in HEC je zelo verjetno v hidrofobnosti metilnih skupin, kar lahko vpliva na hidratiranost molekule in dostopnost celulognega skeleta za celulaze, suprastrukturne organizacije celulognega gostila v raztopini in posledično

znižane mobilnosti bakterij in difuzije celulaz, ali interakcije hidrofobnih substituent s hidrofobnimi aminokislinskimi ostanki celulaz.

Narava substituente izrazito vpliva tudi na strukturiranosti raztopin celuloznih gostil in na njihove reološke lastnosti. Kljub primerljivim molekulskim masam HEC in CMC, kot smo ocenili s SEC ima namreč HEC bistveno višjo viskoznost in bolj izrazito psevdoplastično tokovno obnašanje kot CMC. Glede na SEC ima MC nekoliko nižjo Mw kot CMC in HEC, a najvišjo viskoznost in najbolj izraženo psevdoplastično tokovno obnašanje. Na CMC so vezane negativno nabite karboksimetilne skupine, ki preko odbojnih interakcij preprečujejo prepletanja med molekulami, do kakršnih prihaja v MC in HEC. Prepletanje med molekulami pa prispeva k povišanju viskoznosti in psevdoplastičnosti raztopin. V primeru MC so prepletanja med molekulami dodatno omogočena preko hidrofobnega efekta, ki združuje metilne skupine. Oblike sipalnih krivulj kažejo, da sta HEC in MC v raztopini strukturirana kot togi iztegnjeni molekuli, medtem ko ima CMC bolj fleksibilno strukturo. Pridobljene SAXS sipalne krivulje so skladne z odsotnostjo izrazitih odbojnih interakcij v MC in HEC. Rezultati reologije skupaj s SAXS kažejo, da imajo raztopine polimerov z bolj fleksibilno konformacijo nižjo viskoznost in so manj psevdoplastične, raztopine polimerov s togo iztegnjeno konformacijo pa imajo višjo viskoznost in so bolj psevdoplastične (Morris in Harding, 2009).

5.1.2 Sinteza in karakterizacija novega derivata CMC

Glede na študij biorazgradnje različnih komercialno dostopnih celuloznih gostil smo pripravili strategijo za sintezo novega gostila na celulozni osnovi, ki bi imelo nižjo biorazgradljivost. Predpostavili smo, da bi vezava aromatskih skupin lahko naredila celulozno ogrodje bolj togo in hidrofobno, kar bi zmanjšalo dostopnost za biorazgradnjo. Pri sintezi smo izhajali iz CMC ($M_w = 90 \text{ kDa}$ in $DS = 0,7$). Na CMC smo preko sulfonskih estrov vezali aromatske tozilne skupine, s čimer smo preferenčno želeti znižati biorazgradljivost. Pričakovali smo spremenjene fizikalno-kemijske lastnosti, ki pa naj bi v največji možni meri ohranile psevdoplastično obnašanje izhodne CMC raztopine.

Sintezni postopek priprave tozilata karboksimetil celuloze (TsCMC) je bil načrtovan tako, da je bila v vseh korakih sinteze *p* – toluensulfonska kislina (TSA) v pribitku, s čimer smo preprečili možnost neposredne tvorbe esterskih vezi, kar bi lahko povzročilo zvišanje DP preko estrena karboksilnih in hidroksilnih skupin CMC.

Strukturo TsCMC smo kvalitativno ugotavljali z IR in UV-VIS spektroskopijo. Obe metodi kažeta na prisotnost aromatske substituente vezane na CMC. Kvantitativno smo DS vrednost tozilnih skupin ocenili z CHSP elementno analizo. Rezultati CHSP elementne analize kažejo DS vrednost tozilnih skupin okrog 0,1, kar pomeni, da se tozilna skupina v povprečju pojavi na 10 anhidroglukoznih enot TsCMC. Glede na relativno nizek delež substitucije tozilnih skupin so izrazito spremenjene fizikalno-kemijske lastnosti glede na izhodni CMC presenetljive.

TsCMC ima glede na izhodni CMC močno povišano viskoznost, ki pa za razliko od CMC ne narašča linearno z naraščajočo koncentracijo. Nelinearno naraščanje viskoznosti z naraščajočo koncentracijo polimera kaže na asociativno obnašanje. To pomeni, da viskoznost raztopine ni zgolj vsota prispevkov viskoznosti posameznih molekul, temveč je pomemben tudi prispevek medsebojnih interakcij med molekulami polimera. Molekule lahko medsebojno interagirajo bodisi preko prepletanja, bodisi preko privlačnih interakcij kot so vodikove vezi, hidrofobni efekt in podobno. Tako privlačne interakcije kot prepletanje verig se poleg asociativnega obnašanja kažejo tudi na povečanju psevdoplastičnosti raztopine (El-Hefian in sod., 2010). Da je na novo sintetizirani polimer ohranil naboj, kaže reološki odziv na prisotnost elektrolitov v raztopini. Tako kakor izhodni CMC ima tudi TsCMC v vodi znatno nižjo viskoznost kot v BHM mediju. Vpliv elektrolitov se še bolj signifikantno kaže na intrinzičnih viskoznostih CMC in TsCMC. Ker imata oba polimera v čisti vodni raztopini višjo intrinzično viskoznost, lahko sklepamo, da je to posledica večje ekspanzije kot v BHM mediju. BHM medij namreč vsebuje elektrolite, ki lahko zasenčijo odboje med karboksilnimi skupinami. Ker se intrinzična viskoznost določa v raztopinah z nizko koncentracijo polimera, ima polimer na voljo dovolj prostora, da zavzame poljubni prostor in konformacijo, neodvisno od sosednjih molekul. Senčenje naboja ima v takšnem primeru vpliv predvsem

na intermolekularne odboje, kar rezultira v zmanjšani ekspanziji polimerne verige. Primerljivi intrinzični viskoznosti CMC in TsCMC, tako v čisti vodi kot tudi v BHM mediju, kažeta na primerljivi molekulski masi polimerov. Primerljiva molekulska masa polimerov pomeni, da so razlike v reoloških lastnostih TsCMC glede na CMC predvsem posledica uvedbe dodatnih substituent. Glede na naravo tozilnih skupin lahko le-te preko močnih aromatskih » $\pi - \pi$ stacking« interakcij (Sinnkhort in sod., 2002; McGourghey in sod., 1998) med tozilnimi skupinami povezujejo polimerne verige TsCMC v kompaktno 3-D mrežo. Število povezav in s tem gostota mrežne strukture se povečuje s koncentracijo TsCMC, zato viskoznost ne narašča linearno s koncentracijo, temveč eksponentno (Bataile in sod., 1997; Charpentier in sod., 1997). Z naraščajočo strižno silo se aromatske povezave med tozilnimi skupinami TsCMC prekinjajo, posledično pa se ruši strukturiranost 3-D mreže, kar omogoča psevdoplastično tokovno obnašanje raztopin TsCMC.

Prisotnost tozilnih skupin vezanih na celulozno ogrodje CMC vpliva tudi na hidrofobnost polimera. Glede na dinamične meritve kontaktnih kotov ima TsCMC zmanjšano omočljivost. Znižana omočljivost je posledica hidrofobnosti TsCMC, kar rezultira v kompaktnejši strukturi TsCMC glede na CMC in zmanjša topnost v vodi. Tozilne skupine vezane na celuloznem skeletu CMC omogočajo tudi emulgatorske lastnosti TsCMC, ki jih CMC ni imel. S TsCMC lahko učinkovito stabiliziramo emulzijo, kar z izhodno raztopino CMC ni mogoče. Emulzija TsCMC je stabilizirana z adsorpcijo na oljno kapljico preko tozilnih skupin, medtem ko nabite karboksimetilne skupine, ki so locirane na površini oljne kapljice nase vežejo vodo, kar pa preprečuje združevanje oljnih kapljic in s tem ločbo oljne faze. To je primerljivo z opažanji Sroková in sodelavcev (2004), ki so emulgacijske lastnosti proučevali na CMC derivativih z vezanimi maščobnimi kislinami. Kombinacija močno polarnih karboksimetilnih in nepolarnih aromatskih tozilnih skupin omogoča topnost TsCMC v vodnih medijih, hkrati pa so omogočene inter- in intra-molekularne asociacije polimernih molekul. To je edinstvena kombinacija, ki ima zaradi svojih lastnosti potencial v industrijskih aplikacijah premazov na vodni osnovi.

Tozilne skupine imajo tudi vpliv na strukturiranost raztopin. V vodni raztopini ima TsCMC slabše izražen elektrostatičen odboj glede na CMC. Razlog za slabše izražen elektrostatičen odboj v vodi pri TsCMC je najverjetneje posledica privlačnih » $\pi - \pi$ stacking« interakcij med hidrofobnimi aromatskimi tozilnimi skupinami TsCMC. Topilo ima izrazito večji vpliv na strukturiranost CMC kot na TsCMC, saj se sipalne krivulje TsCMC v vodi in BHM mediju ne razlikujejo tako izrazito kot pri CMC. Najbolj izrazito se vpliv topila opazi pri manjših q , kjer se naklon sipalne krivulje CMC v BHM glede na vodo močno poviša. Povišanje naklona v BHM kaže na tvorbo struktur večjih velikosti in nakazuje na asociacije sosednjih molekul CMC. Asociacije CMC so v BHM mediju omogočene zaradi senčenja odbojnih interakcij med karboksimetilnimi skupinami sosednjih molekul CMC. Efekt v primeru TsCMC ni bil tako izrazit, saj dodatek elektrolitov ni povzročil novih kontaktov med sosednjimi verigami, ker so bili le-ti že vzpostavljeni preko » $\pi - \pi$ stacking« interakcij.

Najbolj pomemben rezultat te naloge je, da je uvedba dodatnih substituent močno znižala biorazgradljivost TsCMC glede na izhodni CMC. Začetna viskoznost TsCMC je tekom 14-dnevne inkubacije padla na 60 % začetne vrednosti, medtem ko je bil CMC v tem času popolnoma razgrajen in je bila viskoznost raztopine približno enaka viskoznosti vode. Biorazgradnjo TsCMC najhitreje opazimo preko spremembe viskoznosti. To ni tako nenavadno, saj že ena sama cepitev polimerne verige TsCMC povzroči velik padec v viskoznosti. Rezultati so jasno pokazali, da je CMC po 14-dnevni inkubaciji popolnoma neuporaben kot zgoščevalalec. Na drugi strani je bil TsCMC delno razgrajen, vendar še vedno poseduje del svojih začetnih reoloških lastnosti in je kot tak še nadalje uporaben kot zgoščevalalec. S tem smo dosegli glavni cilj sinteze TsCMC, to je zmanjšanje biorazgradljivosti in ohranitev zgoščevalnih lastnosti. Sklepamo, da DS vrednost sintetiziranega novega derivata CMC ni ključna za zmanjšano biorazgradljivost, saj je skupna DS vrednost TsCMC zgolj nekoliko nad 0,8, material pa je slabše razgradljiv kot CMC z DS vrednostjo 1,2. Tozilne skupine namreč poleg povišanja skupne vrednosti DS lahko otežijo encimski napad celuloznega ogrodja zaradi večjih steričnih ovir (tozilne skupine so večje kot karboksimetilne) (Glasser in sod., 1994), zaradi znižane solvatacije polimera, preko suprastrukturne organizacije polimera, ki preko zamreženosti raztopine

zniža mobilnost bakterij in difuzijo celulaz ali preko interakcije hidrofobnih substituent s hidrofobnimi aminokislinskimi ostanki celulaz. Predpostavljamo, da smo tekom sinteze TsCMC velik del tozilnih skupin vezali na mesta, ki so bila pred tem nesubstituirana (na njih bi namreč lahko potekla encimska hidroliza).

Biorazgradljivost novega derivata celuloze smo preverili tudi z uporabo v industrijskem izdelku. Primerjali smo razgradljivost komercialnega izdelka stenskih barv, ki je vseboval CMC, z izdelkom, kjer smo CMC zamenjali s TsCMC. V omenjena izdelka smo dodali standardni inkokulum mikroorganizmov brez dodatka protimikrobnih sredstev. Rezultati spremljanja viskoznosti kažejo, da je v opazovanem času (dva meseca) viskoznost komercialnega izdelka s CMC kot gostilom občutno padla in ni več ustrezala predpisanim vrednostim. Po drugi strani pa je bil izdelek s TsCMC kot gostilom po dveh mesecih inkubacije delno razgrajen, vendar je bila viskoznost izdelka še vedno v okviru vrednosti, ki omogočajo normalno uporabo izdelka. Ti rezultati potrjujejo vrednost podatkov pridobljenih v laboratorijskih poskusih in kažejo, da ima na novo sintetiziran TsCMC izboljšano odpornost na biorazgradnjo.

5.2 SKLEPI

- Strukturiranost raztopin celuloznih gostil določena s SAXS metodo korelira z reologijo raztopin.
- Strukturiranost CMC v raztopini je odvisna od uporabljenega topila, prisotnost elektrolitov poveča radij giracije CMC.
- PH raztopine ima zelo velik vpliv na strukturiranost CMC v raztopini, saj se s padanjem pH vrednosti od 7 proti 1,6 povečuje velikost delcev v raztopini.
- Biorazgradnja celuloznih gostil ni pogojena samo s stopnjo substituiranosti, temveč ima pomembno vlogo tudi razporeditev substituent vzdolž celuloznega skeleta.

- Biorazgradnja CMC spremeni predvsem strukture na velikostnih skalah večjih od 5 nm, biorazgradnja celuloznih gostil z višjimi DS vrednostmi pa ne pokaže opaznih strukturnih sprememb s SAXS.
- Tip substituente celuloznih gostil (karboksimetil, hidroksietil, metil) značilno vpliva na strukturiranost in reološko obnašanje gostila v raztopini.
- Uvedba tozilnih skupin na CMC je značilno znižala biorazgradljivost in hitrost biorazgradnje novo sintetiziranega derivata – TsCMC.
- Poleg znižane biorazgradljivosti smo s tozilacijo spremenili reološke lastnosti CMC in tako pridobili gostilo, ki izkazuje asociativnost, močno povišano viskoznost ter izrazito psevdoplastičnost. S tozilacijo CMC smo znižali omočljivost gostila ter mu omogočili emulgatorske lastnosti.

6 POVZETEK (SUMMARY)

6.1 POVZETEK

Celulozna gostila se zaradi ugodnih fizikalno-kemijskih lastnosti uporabljajo v različnih industrijskih panogah. Fizikalno-kemijske lastnosti celuloznega gostila so pogojene s tipom in deležem substituent vezanih na celulozni skelet. Med pomembnejše lastnosti, ki celulozna gostila naredijo uporabna v številnih industrijskih panogah, sodijo njihove reološke lastnosti. Denimo, pri barvah na vodni osnovi je ključnega pomena njihova psevdoplastičnost, ki naredi barvo primerno za nanos. Težave v industriji predstavlja biološka razgradnja celuloznih gostil, kjer pride do depolimerizacije in posledično izgube ključnih reoloških lastnosti. V tej doktorski nalogi smo proučevali vpliv substituent vezanih na celulozni skelet na biorazgradljivost, na strukturne in reološke lastnosti. Poleg tega smo sintetizirali nov celulozni derivat, ki ima zmanjšano biorazgradljivost.

Biorazgradnjo gostil na celulozni osnovi smo spremljali v inkubacijskih eksperimentih z uporabo bakterijskih kultur *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* NCIB 3610 in *Cellulomonas uda* DSM 20108. Med inkubacijo smo spremljali bakterijsko rast, naraščanje koncentracije reducirajočih sladkorjev ter padanje viskoznosti medija. Depolimerizacijo gostil v procesu biorazgradnje smo ocenjevali s SEC, s SAXS metodo pa smo opazovali spremembo strukturnih lastnosti med razgradnjo. Med biorazgradnjo je prišlo do strukturnih sprememb, predvsem na večjih velikostnih skalah (večjih od 5 nm). Na strukturo CMC je imelo velik vpliv topilo, ki lahko preko ionske jakosti in pH vrednosti vpliva na odbojne interakcije med karboksilnimi skupinami. Vpliv topila se lahko kaže kot senčenje odbojnih interakcij, kadar imamo v vodnem mediju prisotne elektrolite ali preko spremembe pH vrednosti, ki s protonacijo karboksilnih skupin znižuje nabitost polimera in tako znižuje jakost odbojih interakcij. Na biorazgradljivost vpliva tudi stopnja substitucije, ki z naraščanjem deleža substituiranosti znižuje število mest, na katerih lahko poteče encimsko katalizirana hidroliza celuloznega skeleta. Poleg stopnje substituiranosti je za biorazgradljivost ključnega pomena tudi distribucija substituent. Višja kot je homogenost v porazdelitvi substituent vzdolž celuloznega skeleta slabša je

biorazgradljivost. Vpliv tipa substituente se v procesu biorazgradnje kaže na dveh ravneh. Substituenta lahko vpliva na stopnjo biorazgradljivosti, kar je posledica distribucije substituent vzdolž celuloznega skeleta. Tip substituente vpliva tudi na hitrost biorazgradnje, kar je lahko posledica suprastrukturne organizacije celuloznega gostila v raztopini, slabše dostopnosti celuloznega skeleta za delovanje celulaz, slabše hidratiranosti molekule ali interakcije hidrofobnih substituent s hidrofobnimi aminokislinskimi ostanki celulaz.

Z estrenjem prostih hidroksilnih skupin z anhidridom *p*-tolensulfonske kisline smo v tem doktorskem delu pripravili novo celulozno gostilo tozilat karboksimetil celuloze (TsCMC). TsCMC ima glede na elementno sestavo modificiranih okrog 10 % anhidroglukoznih enot v molekuli CMC. Glede na izhodni material so biorazgradljivost in fizikalno-kemijske lastnosti spremenjene. TsCMC je bolj viskozen kot CMC, tokovno obnašanje je izrazito psevdoplastično, poleg tega pa izkazuje asociativnost. TsCMC je tudi slabše omočljiv od CMC in se lahko uporablja kot stabilizator emulzije, kar s CMC ni mogoče. Tozilacija CMC je močno znižala biorazgradljivost, kar je bil ključni cilj derivatizacije. Poleg znižanja biorazgradljivosti je tozilacija tudi znatno znižala hitrost biorazgradnje.

Rezultati te naloge kažejo, da je kombinacija sipalnih tehnik in meritev viskoznosti gostil na celulozni osnovi primeren način za določitev reoloških in strukturnih sprememb, ki se dogajajo med biorazgradnjo. Nobeno od proučenih celuloznih gostil ni bilo popolnoma odporno na bakterijsko razgradnjo. Razgradnja je bila izrazito odvisna od tipa substituente. Na novo sintetiziran toziliran CMC se je glede na svoje lastnosti in biorazgradljivost izkazal bolje kot komercialno dostopni derivati celuloznih gostil.

6.2 SUMMARY

Cellulose thickeners are used in various industrial sectors due to their favorable physical-chemical attributes. Physical-chemical attributes of cellulose thickener depend on type and degree of substitution, and distribution along the cellulose backbone. Among the most desirable attributes making cellulose thickeners interesting for various industrial applications, are their rheological properties. For instance, in water-borne paints, pseudoplasticity of cellulose thickeners is crucial for their application. In industrial use, the biodegradation of cellulose thickeners causes a serious problem, as it results in a loss of product integrity. In this doctoral work, we have examined the effect of different substituents bound to cellulose backbone on biodegradability as well as on structural and rheological properties. In addition, we have prepared a new cellulose derivative with lowered biodegradability.

Biodegradation of cellulose thickeners was studied in incubation experiments using the bacterial cultures *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* NCIB 3610 and *Cellulomonas uda* DSM 20108. During the incubation, we periodically examined bacterial growth, reducing sugar concentration, and viscosity. The depolymerization of cellulose thickeners during the biodegradation process was estimated by SEC, while structural properties were determined by SAXS. Structural changes during the biodegradation of CMC were observed mainly on larger scales (structures larger than 5 nm), which significantly decreased share of larger structures. Different solvents had a major effect on the structure of cellulose thickeners, because they affected, to a different extent, the repulsive interactions between carboxylic groups through changes of ionic strength and pH value. The biodegradation was affected by the degree of substitution (DS); increased DS lowered the number of sites where cellulases can hydrolyze cellulose. Beside the DS value, the distribution of substituents along the backbone is very important for biodegradation of cellulose thickeners. More uniform the distribution of substituents along the cellulose backbone, the lower is the biodegradability of the polymer. The type of substituent affects the biodegradation process of cellulose thickener on two levels. The substituent affects the degree of biodegradability, which is a consequence of distribution

of substituents along the cellulose backbone. Second, the type of substituent affects the rate of biodegradation, which could be a consequence of suprastructural organization of thickener in a solution, lower accessibility of cellulose backbone due to poor salvation, or interactions with hydrophobic amino acid residues of cellulases.

Esterification of free hydroxyl groups using anhydride of *p*-toluenesulfonic acid resulted in a new type of cellulose thickener; carboxymethyl cellulose tosylate (TsCMC). In the newly synthesized TsCMC approximately 10 % of anhydroglucose units have been substituted with tosylic group. Compared to the parental material biodegradability and physical-chemical attributes of TsCMC were changed. TsCMC is more viscous than parental CMC, it has more pronounced pseudoplastic flow behavior, and increased associative performance. The newly synthesized TsCMC is also less wettable than CMC and can be used as emulsion stabilizer. The tosylation of CMC significantly reduced biodegradability, which was the primal goal of derivatisation. Beside lower biodegradability, tosylation also lowered the rate of biodegradation.

The results of this work indicate that a combination of SAXS and viscosity measurements may provide valuable rheological and structural information during biodegradation of cellulose thickeners. None of the examined cellulose thickeners was completely resistant to bacterial degradation. The degradation was dependent on the type of substituent. In this regard, the newly synthesized tosylated CMC showed increased resistance to biodegradation compared to commercially available cellulose thickeners.

7 VIRI

- Adinugraha M.P., Marseno D.W., Haryadi P.Y. 2005. Synthesis and characterization of sodium carboxymethylcellulose from Cavendish banana pseudo stem (*Musa cavendishii* LAMBERT). Carbohydrate Polymers, 62: 164-169.
- Akiyoshi K., Deguchi S., Morigushi N., Yamagushi S., Sunamoto J. 1993. Self-aggregates of hydrophobized polysaccharide as a host for macromolecular guests. Macromolecules, 26, 12: 3062-3068.
- Armarego W.L.F., Chai C.L.L. 2003. Purification of laboratory chemicals. 6th ed. Burlington, Butterworth-Heinemann, 743 str.
- Bataille I., Huguet J., Mocanu G., Carpov A., Muller G. 1997. Associative behavior of hydrophobically modified carboxymethylpullulan derivatives. International Journal of Biological Macromolecules, 20: 179-191.
- Batelaan J.G., van Ginkel C.G., Balk F. 1992. Carboxymethyl cellulose (CMC). V: The handbook of environmental chemistry. Vol. 3. Hutzinger O. (ed.). Berlin, Heidelberg, Springer-Verlag: 329-336.
- Bär A., Til H.P., Timonen M. 1995a. Subchronic oral toxicity study with regular and enzymatically depolymerized sodium carboxymethylcellulose in rats. Food and Chemical Toxicology, 33: 909-917.
- Bär A., Van Ommen B., Timonen M. 1995b. Metabolic disposition in rats of regular and enzymatically depolymerized sodium carboxymethylcellulase. Food and Chemical Toxicology, 33: 901-907.
- Béguin P., Lemaire M. 1996. The cellulosome: An exocellular, multiprotein complex specialized in cellulose degradation. Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology, 31, 3: 201-236.
- Bemiller J.N. 1986. Encyclopedia of polymer science and engineering. Vol. 7. New York, Wiley: 601 str.
- Branda S.S., Chu F., Kearns D.B., Losick R., Kolter R. 2006. A major protein component of the *Bacillus subtilis* biofilm matrix. Molecular Microbiology, 59: 1229-1238.
- Brant D.A. 1999. Novel approaches to the analysis of polysaccharide structures. Current Opinion in Structural Biology, 9: 556-562.
- Brinnick F.E., Reilly A. 1957. Coated paper planographic printing plate. United States Patent Office 2 778 301: 6 str.

- Bushnell L.D., Haas H.F. 1941. The utilization of certain hydrocarbons by microorganisms. *Journal of Bacteriology*, 41: 653-673.
- Charpentier D., Mocanu G., Carpov A., Chapelle S., Merle L., Muller G. 1997. New hydrophobically modified carboxymethylcellulose derivatives. *Carbohydrate Polymers*, 33, 2–3: 177-186.
- Charpentier-Valenza D., Merle L., Mocanu G., Picton L., Muller G. 2005. Rheological properties of hydrophobically modified carboxymethylcelluloses. *Carbohydrate Polymers*, 60: 87-94
- Cao Y., Li H.L., Xu X. 1997a. A study of ultrasonic copolymerization of polymer surfactants based on carboxymethyl cellulose. *Chemical Journal of China University*, 18, 6: 985-989.
- Cao Y., Li H.L., Xu X. 1997b. Studies on structure and surface activity of carboxymethyl cellulose-based polymer surfactants. *Oilfield Chemistry*, 14, 3: 257-260.
- Cheroni S., Formantici C., Galante Y.M. 2010. Depolymerization of carboxymethylcellulose in a hydro-alcoholic medium by a mono-component endocellulase. *Enzyme and Microbial Technology*, 47: 348-354.
- Chin Y.P., Aiken G., O'Loughlin E. 1994. Molecular weight, polydispersity, and spectroscopic properties of aquatic humic substances. *Environmental Science & Technology*, 28: 1853-1858.
- Clasen C., Kulicke W.M. 2001. Determination of viscoelastic and rheo-optical material functions of water-soluble cellulose derivatives. *Progress in Polymer Science*, 26: 1839-1919.
- Cohen-Stuart M.A., Fokkink R.G., van der Horst P.M., Lichtenbelt J.W.Th. 1998. The adsorption of hydrophobically modified carboxymethylcellulose on a hydrophobic solid: effects of pH and ionic strength. *Colloid and Polymer Science*, 27: 335-341.
- da Silva R., Lago E.S., Merheb C.W., Macchione M.M., Park Y.K., Gomes E. 2005. Production of xylanase and CMCase on solid state fermentation in different residues by *Thermoascus aurantiacus* miehe. *Brazilian Journal of Microbiology*, 36: 235-241.
- Dashtban M., Maki M., Leung K.T., Mao C., Qin W. 2010. Cellulase activities in biomass conversion: Measurement methods and comparison. *Critical Reviews in Biotechnology*, 30: 302-309.
- Dermoun Z., Gaudin C., Belaich J.P. 1988. Effects of end-product inhibition of *Cellulomonas uda* anaerobic growth on cellobiose chemostat culture. *Journal of Bacteriology*, 170, 6: 2827-2831.

- Dhillon N., Chibber S., Saxena M., Pajni S., Vadehra D.V. 1985. A constitutive endoglucanase (CMCase) from *Bacillus licheniformis*-1. *Biotechnology Letters*, 7, 9: 695-697.
- Dogsa I., Štrancar J., Laggner P., Stopar D. 2008. Efficient modeling of polysaccharide conformations based on small-angle X-ray scattering experimental data. *Polymer*, 49: 1398-1406.
- Dogša I., Kriechbaum M., Stopar D., Laggner P. 2005. Structure of bacterial extracellular polymeric substances at different pH values as determined by SAXS. *Biophysical Journal*, 89: 2711-2720.
- Dore J.C., North A.N., Rigden J.S. 1995. Small-angle scattering studies of meso-scopic structures with synchrotron X-ray. *Radiational Physical Chemistry*, 45, 3: 413-426.
- Draget I. K., Stokke B. T., Yuguchi Y., Urakawa H., Kajiwara K. 2003. Small-angle X-ray scattering and rheological characterization of alginate gels. III. Alginic acid gels. *Biomacromolecules*, 4: 1661-1668.
- Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A., Smith F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28: 350-356.
- Earl A.M., Losick R., Kolter R. 2008. Ecology and genomics of *Bacillus subtilis*. *Trends in Microbiology*, 16, 6: 269-275.
- El-Hefian E.A., Elgannoudi E.S., Mailnal A., Yahaya A.H. 2010. Characterization of chitosan in acetic acid: Rheological and thermal studies. *Turkish Journal of Chemistry*, 34: 47-56.
- Eldib I. A. 1971. Carboxylated starches as detergent builders. United States Patent Office 3 629 121: 22 str.
- Eremeeva T.E., Bykova T.O. 1998. SEC of mono-carboxymethyl cellulose (CMC) in a wide range of pH; Mark–Houwink constants. *Carbohydrate Polymers*, 36: 319-326.
- Feller R.L., Wilt M. 1990. Evaluation of cellulose ethers for conservation. Los Angeles, Paul Getty Trust: 163 str.
- Fogarty W.M., Griffin P.J. 1973. Some Observations on the production and elaboration of extracellular enzymes by *Bacillus polymyxa*. *Biochemical Society Transactions*, 1: 263-265.
- Gamini A., Paoletti S., Toffanin R., Micali F., Michielin L., Babvilacqua C. 2002 Structural investigations of cross-linked hyaluronan. *Biomaterials*, 23: 1161-1167.

- Gómez-Díaz D., Navaza J. M. 2002. Rheological characterization of aqueous solutions of the food additive carboxymethyl cellulose. *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry*, 1, 1: 12-22.
- Graham H.D., 1972. Determination of carboxymethylcellulose with chromotropic acid. *Journal of Dairy Science*, 55, 42-50.
- Greaves H. 1971. The effect of substrate availability on cellulolytic enzyme production by selected wood-rotting microorganisms. *Australian Journal of Biological Sciences*, 24, 4: 1169-1180.
- Hirata Y., Sano Y., Aoki M., Shohji H., Katoh S., Abe J., Hitsukuri S., Yamamoto H. 2003. Small-angle X-ray scattering studies of moderately concentrated dextran solution. *Carbohydrate Polymers*, 53: 331-335.
- Hollabaugh C.B., Burt L.H., Peterson Walsh A. 1945. Carboxymethylcellulose: uses and applications. *Industrial and Engineering Chemistry*, 37, 10: 943-947.
- Horner S., Puls J., Saake B., Klohr E.-A., Thielking H. 1999. Enzyme-aided characterisation of carboxymethylcellulose. *Carbohydrate Polymers*, 40: 1-7.
- ISO 6878. Water quality – Determination of phosphorous – Ammonium molybdate spectrometric method. 2nd ed. 2004: 21 str.
- Jones D.S., Woolfson A.D., Brown A.F. 1997. Textural, viscoelastic and mucoadhesive properties of pharmaceutical gels composed of cellulose polymers. *International Journal of Pharmaceutics*, 151: 223-233.
- Karsheva U., Georgieva S., Handijeva S. 2007. The choice of the thickener – a way to improve the cosmetics sensory properties. *Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy*, 42, 2: 187-194.
- Kasana R.C., Salwan R., Dhar H., Dutt S., Gulati A. 2008. A rapid and easy method for the detection of microbial cellulases on agar plates using Gram's iodine. *Current Microbiology*, 57: 503-507.
- Kasulke U., Linow K.J., Philip B., Dautzenberg H. 1988. Untersuchungen zum hydrolytischen Abbau wasserlöslicher Cellulosederivate unter homogenen Reaktionsbedingungen. 4. Mitteilung: Mechanismus der enzymatischen Hydrolyse. *Acta Polymerica*, 39: 127-130.
- Kikland W.J., Lukach C.A., McLachian W.C. 1990. Composition comprising water-soluble, nonionic hydrophobically modified hydroxyethyl cellulose and water-soluble, nonionic hydroxyethyl cellulose. United States Patent 4 892 589: 10 str.

- Knösel D. 1971. Continued investigations for pectolytic and cellulolytic activity of different *Bacillus*-species. *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene*, 126, 6: 604-609.
- Koide Y., Nakamura A., Uozumi T., Beppu T. 1986. Cloning and sequencing of the major intracellular serine protease gene of *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 167, 1: 110-116.
- Kulicke W.M., Henning Kull A., Kull W., Thielking H. 1996. Characterization of aqueous carboxymethylcellulose solutions in terms of their molecular structure and its influence on rheological behaviour. *Polymer*, 37, 13: 2723-2731.
- Kuga S., Brown M.R.JR. 1991. Physical structure of cellulose microfibrils: Implications for biogenesis. V: Biosynthesis and biodegradation of cellulose. Haigler C. H., Weimer P. J. (eds.). New York, Marcel Dekker, Inc.: 125-142.
- Kulicke W.M., Henning Kull A., Kull W., Thielking H. 1996. Characterization of aqueous carboxymethylcellulose solutions in terms of their molecular structure and its influence on rheological behaviour. *Polymer*, 37, 13: 2723-2731.
- Kunst F., Ogasawara N., Moszer I., Albertini A.M., Alloni G., Azevedo V., Bertero M.G., Bessières P., Bolotin A., Borchert S., Borrius R., Boursier L., Brans A., Braun M., Brignell S.C., Bron S., Brouillet S., Bruschi C.V., Caldwell B., Capuano V., Carter N.M., Choi S.K., Codani J.J., Connerton I.F., Danchin A. in sod. 1997. The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature*, 390: 249-256.
- Landoll L.M. 1982. Non-ionic polymer surfactants. *Journal of Polymer Science Part A-Polymer Chemistry*, 20: 443-455.
- Lindenfors S.G., Westberg S.O.J. 1975. Nonionic cellulose ethers. United States Patent 3 926 951: 14 str.
- Lohmann F., Eckhardt C., Kleiber K. 1974. Detergents. United States Patent 3 846 324: 10 str.
- Lynd L.R., Weimer P.J., van Zyl W.H., Pretorius I. S. 2002. Microbial cellulose utilization: Fundamentals and biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66: 506-577.
- McGaughey G.B., Gagné M., Rappé A.K., 1998. Pi-Stacking interactions. Alive and well in proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 273: 15458-15463.
- Merle L., Charpentier, D., Mocanu G., Chapelle S. 1999. Comparison of the distribution of associative carboxymethylcellulose derivatives. *European Polymer Journal*, 35: 1-7.

- Miller G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31: 426-428.
- Montes-Bayón M., DeNicola K., Caruso J.A. 2003. Liquid chromatography-inductively coupled plasma mass Spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1000: 457-476.
- Morris G, Harding S. 2009. Polysaccharides microbial. V: *Encyclopedia of microbiology*. 3rd ed. Schaechter M. (ed.). Sutton Bonington, Elsevier Inc: 482-484.
- Nakano M.M., Dailly Y.P., Zuber P., Clark D.P. 2008. Characterization of anaerobic fermentative growth of *Bacillus subtilis*: identification of fermentation end products and genes required for growth. *Journal of Bacteriology*, 179: 6749-6755.
- Orthaber D., Bergmann A., Glatter O. 2000. SAXS experiments on absolute scale with Kratky systems using water as a secondary standard. *Journal of Applied Crystallography*, 33: 218-222.
- Pal K., Banthia A.K., Majumdar D.K. 2005. Esterification of carboxymethyl cellulose with acrylic acid for targeted drug delivery system. *Trends in Biomaterials & Artificial Organs*, 19, 1: 12-14.
- Priest F.G. 1977. Extracellular Enzyme Synthesis in the Genus *Bacillus*. *Bacteriological Reviews*, 41, 3: 711-753.
- Reese E.T. 1957. Biological degradation of cellulose derivatives. *Industrial & Engineering Chemistry*, 49, 1: 89-93.
- Reese E.T., Siu R.G.H., Levinson H.S. 1950. The biological degradation of soluble cellulose derivatives and its relationship to the mechanism of cellulose hydrolysis. *Journal of Bacteriology*, 59: 485-497.
- Robson L.M., Chambliss G.H. 1989. Cellulases of bacterial origin. *Enzyme and Microbial Technology*, 11, 10: 626-644.
- Saqib A.A.N., Whitney P.J. 2006. Role of fragmentation activity in cellulose hydrolysis. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 58: 180-185.
- Schulz D.N., Bock J. 1991. Synthesis and fluid properties of associating polymer systems. *Journal of Macromolecular Science and Engineering*, Part A, 28, 11-12: 1235-1243.
- Sieger C.H.N., Kroon A. G.M., Batelaan J.G., van Ginkel C.G. 1995. Biodegradation of carboxymethyl celluloses by *Agrobacterium CM-1*. *Carbohydrate Polymers*, 27: 137-143.
- Sinnkhort M.O., Valeev E.F., Sherrill C.D. 2002. Estimates of the ab initio limit for pi-pi interactions: The benzene dimer. *Journal of American Science*, 124: 10887-10893.

- Sirisena D.M., Manamendra T.P. 1995. Isolation and characterization of cellulolytic bacteria from decomposing rice straw. Journal of National Science Council of Sri Lanka, 23, 1: 25-30.
- SIST EN 13137. Characterization of waste - Determination of total organic carbon (TOC) in waste, sludges and sediments. 2002: 20 str.
- SIST EN 13346. Characterization of sludges - Determination of trace elements and phosphorus - Aqua regia extraction methods. 2001: 28 str.
- SIST ISO 351. Solid mineral fuels - Determination of total sulfur - High temperature combustion method. 1998: 6 str.
- SIST ISO 609. Solid mineral fuels - Determination of carbon and hydrogen - High temperature combustion method. 1998: 11 str.
- Socrates G., 2001. Infrared and Raman characteristic group frequencies. Tables and Charts, 3: 157-167.
- Sroková I., Tomanová V., Ebringerová A., Malovíková A., Heinze T. 2004. Water-soluble amphiphilic O-(carboxymethyl)-cellulose derivatives - synthesis and properties. Macromolecular Materials and Engineering, 289: 63-69.
- Stoppok W., Rapp P., Wagner F. 1982. Formation, location, and regulation of endo-1,4- β -glucanases and β -glucosidases from *Cellulomonas uda*. Applied and Environmental Microbiology, 44, 1: 44-53.
- Tada T., Matsumoto T., Masuda T. 1999. Dynamic viscoelasticity and small-angle x-ray scattering studies on the gelation mechanism and network structure of curdlan gels. Carbohydrate Polymers, 39: 53-59.
- Thayer D.W. 1984. Motility and flagellation of cellulomonads. International Journal of Systematic Bacteriology, 34, 2: 218-219.
- Thayer D.W., Lowther S.V., Phillips J. G. 1984. Cellulolytic activities of strains of the genus *Cellulomonas*. International Journal of Systematic Bacteriology, 34, 4: 432-438.
- Thielking H., Schmidt M. 2011. Cellulose ethers. V: Ullmann's encyclopedia of industrial chemistry. Vol. 7. 7th ed. Bellussi G., Bohnet M., Bus J., Drauz K., Greim H., Jäckel K.-P., Karst U., Kleemann A., Kreysa G., Laird T., Meier W., Ottow E., Röper M., Scholtz J., Sundmacher K., Ulber R., Wietelmann U. (eds.). Weinheim, Wiley-VCH Verlag: 381-397.

- Toğrul H., Arslan N. 2003. Production of carboxymethyl cellulose from sugar beet pulp cellulose and rheological behaviour of carboxymethyl cellulose. *Carbohydrate polymers*, 54, 1: 73-82.
- Tothill I.E., Seal K.J. 1993. Biodeterioration of waterborne paint cellulose thickeners, review. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 31: 241-254.
- Vlasenko E.Y., Ryan A.I., Shoemaker C.F., Shoemaker S.P. 1998. The use of capillary viscometry, reducing end-group analysis, and size exclusion chromatography combined with multi-angle laser light scattering to characterize endo-1,4- β -D-glucanases on carboxymethylcellulase: a comparative evaluation of the three methods. *Enzyme and Microbial Technology*, 23: 350-359.
- Yuguchi Y., Mimura M., Urakawa H., Kitamura S., Ohno S., Kajiwara K. 1996. Small angle X ray characterization of gelan gum containing a high content of sodium in aqueous solution. *Carbohydrate Polymers*, 30: 83-93.
- Yuguchi Y., Thuy T.T.T., Urakawa H., Kajiwara K. 2002b. Structural characteristics of carrageenan gels: temperature and concentration dependence. *Food Hydrocolloids*, 16: 191-195.
- Yuguchi Y., Urakawa H., Kajiwara K. 2002a. The effect of potassium salt on the structural characteristics of gellan gum gel. *Food Hydrocolloids*, 16: 191-195.
- Yuguchi Y., Urakawa H., Kajiwara K. 2003. Structural characteristics of carrageenan gels: various types of counter ions. *Food Hydrocolloids*, 17: 481-485.
- Wach R.A., Mitomo H., Nagasawa N., Yoshii F., 2003. Radiation crosslinking of carboxymethylcellulose of various degree of substitution at high concentration in aqueous solutions of natural pH. *Radiation Physics and Chemistry*, 68: 771-779.
- Wirick M.G. 1968. A study of the enzymic degradation of CMC and other cellulose ethers. *Journal of Polymer Science*, 6: 1965-1974.
- Zhang J., Zhang L.M., Li Z.M. 1999a. Properties of hydrophobically associating water-soluble cellulosic thickeners. *Chinese Journal of Applied Chemistry*, 16, 6: 71-73.
- Zhang J., Zhang L.M., Li Z.M. 1999b. Synthesis and properties of hydrophobically modified water-soluble cellulosic graft copolymers. *Journal of Cellulose Science and Technology*, 7, 2: 9-15.
- Zhang L. M. 2001. Cellulosic associative thickeners. *Carbohydrate Polymers*, 45: 1-10.
- Zhou Q., Cabaniss S.E., Maurice P.A. 2000. Considerations in the use of High-pressure size exclusion chromatography (HPSEC) for determining molecular weights of aquatic humic substances. *Water Research*, 34: 3505-3514.

ZAHVALA

Mentorju prof. dr. Davidu Stoparju se zahvaljujem za mentorstvo, usmerjanju mojega raziskovalnega dela, vse praktične nasvete, ter številne zanive razprave glede znanstveno raziskovalnega dela.

Asistentu dr. Iztoku Dogši za pomoč in številne koristne nasvete pri raziskovalnem delu, za snemanje sipalnih krivulj SAXS, za modeliranje sipalnih krivulj SAXS, ter za vse razlage glede principov tehnike SAXS ter interpretacije rezultatov.

Prof. dr. Andreju Jamniku, ki je omogočil uporabo SAXS, za vse nasvete in razlage, ter pregled in oceno doktorske disertacije.

Asistentu dr. Matiji Tomšič, za snemanje sipalnih krivulj SAXS in številne koristne napotke in informacije.

Vsem zaposlenim na Katedri za Mikrobiologijo na Oddelku za živilsvo BF-UL s prof. dr. Ines Mandič Mulec na čelu, za vse koristne napotke glede raziskovalnega dela.

Predsednici komisije prof. dr. Branki Javornik za pregled in oceno doktorske disertacije.

Izr. prof. dr. Mihu Humarju za pregled in oceno doktorske disertacije.

Doc. dr. Dragu Kočarju za pomoč pri HPLC analizah.

Upravi JUB-H d.d. s Sašom Kokaljem na čelu, direktorici TRC-JUB d.o.o. Bernardi Bardutzky in direktorici Oskrbovalne verige JUB d.o.o. dr. Nataši Iršič Bedenik, za izkazano zaupanje na moji dosedanji skupni poti s skupino JUB, ter za nudenje nadaljnje zaposlitve.

Dr. Evgenu Erženu in Andreju Banku za pomoč pri vseh reoloških meritvah.

Vsem sodelavcem iz TRC-JUB d.o.o. in oddelka KIO JUB d.o.o. za pomoč in nasvete tekom študija.

Nevenki Kobal za odlično opravljano administrativno delo, s čimer je močno olajšala moje raziskovalno delo.

Staršem za vso podporo in vse oblike pomoči v času študija.

Ter moji Simoni za vso podporo, potrpežljivost in razumevanje v času študija.

Operacijo je delno financirala Evropska unija, in sicer iz Evropskega socialnega sklada. Operacija se je izvajala v okviru Operativnega programa razvoja človeških virov za obdobje 2007 – 2013, 1. razvojne prioritete: Spodbujanje podjetništva in prilagodljivosti, prednostne usmeritve 1.1.: Strokovnjaki in raziskovalci za konkurenčnost podjetij.