

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Klemen PETEK

**BIORAZGRADLJIVOST CELULOZNIH  
DERIVATOV**

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij - 2. stopnja Biotehnologija

Ljubljana, 2013

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Klemen PETEK

**BIORAZGRADLJIVOST CELULOZNIH DERIVATOV**

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij - 2. stopnja Biotehnologija

**BIODEGRADABILITY OF CELLULOSE DERIVATIVES**

M. SC. THESIS

Master Study Programmes - Biotechnology

Ljubljana, 2013

Magistrsko delo je zaključek magistrskega študija – 2. stopnja Biotehnologija. Meritve viskoznosti so bile opravljene v TRC-JUB d.o.o, meritve SAXS so bile opravljene na Katedri za fizikalno kemijo, Fakultete za kemijo in kemijsko tehnologijo, ostalo delo je bilo opravljeno na Katedri za mikrobiologijo, Oddelka za živilstvo, Biotehniške fakultete, Univerze v Ljubljani.

Komisija za študij 1. in 2. stopnje je za mentorja magistrskega dela imenovala prof. dr. Davida Stoparja, za somentorja asist. dr. Iztoka Dogšo in za recenzentko prof. dr. Natašo Poklar Ulrih.

Mentor: prof. dr. David Stopar

Somentor: asist. dr. Iztok Dogša

Recenzentka: prof. dr. Nataša Poklar Ulrih

Komisija za oceno in predstavitev:

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: asist. dr. Iztok Dogša

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Članica: prof. dr. Nataša Poklar Ulrih

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Datum zagovora:

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisani se strinjam z objavo svojega dela na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je delo, ki sem ga oddal v elektronski obliki, identično tiskani verziji.

Klemen Petek

**KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA**

ŠD	Du2
DK	UDK 579.66: 602.4: 661.728.89: 532.135 (043) = 163.6
KG	karboksimetil celuloza/tozilat karboksimetil celuloza/hidroksitetil celuloza/metil celuloza/biorazgradnja/ <i>Cellulomonas uda</i> / <i>Bacillus subtilis</i> /celulaze/ viskoznost/redukcijski sladkorji/HPLC/SAXS/reologija
AV	PETEK, Klemen
SA	STOPAR, David (mentor)/DOGŠA, Iztok (somentor)/POKLAR ULRIH, Nataša (recenzentka)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije
LI	2013
IN	BIORAZGRADLJIVOST CELULOZNIH DERIVATOV
TD	Magistrsko delo (Magistrski študij - 2. stopnja Biotehnologija)
OP	XI, 40 str., 1 pregl., 19 sl., 2 pril., 64 vir.
IJ	sl
JI	sl/en

AI V delu smo uporabljali celulozne derivate s karboksimetilnimi (CMC), hidroksietilnimi (HEC), metilnimi (MC), ter karboksimetilnimi in tozilnimi substituentami (TsCMC). Celulozni derivati v vodnih raztopinah se uporabljajo kot zgoščevalci, veziva, emulgatorji in stabilizatorji. Viskoznost 1% raztopine TsCMC je nekajkrat višja kot 1 % raztopina CMC, čeprav je intrinzična viskoznost ista. Višja viskoznost TsCMC bi lahko bila posledica intermolekularnih povezav med aromatskimi tozilnimi skupinami in bolj toge konformacije. TsCMC ima psevdoplastično tokovno obnašanje, CMC ima Newtonsko tokovno obnašanje. Sipalne krivulje ozkokotno rentgenskega sipanja (SAXS) kažejo zmanjšanje odbojnih interakcij pri TsCMC in bolj togo konformacijo kot pri CMC ( $DS = 0,7$ ). CMC in TsCMC lahko razgradijo nekateri sevi *Bacillus subtilis* in bakterija *Cellulomonas uda*. Po razgradnji je tokovno obnašanje TsCMC ostalo psevdoplastično. MC in HEC imata psevdoplastično tokovno obnašanje. MC in HEC imata psevdoplastično tokovno obnašanje. Za razliko od CMC ( $DS = 0,7$ ) pri MC in HEC nismo zaznali odbojnih interakcij, glede na SAXS sipalne krivulje pa imata MC in HEC bolj togo konformacijo kot CMC. HEC je zelo dobro biorazgradljiv, MC je slabše razgradljiv. Razgrajen HEC ima Newtonsko tokovno obnašanje, razgrajen MC pa ima psevdoplastično tokovno obnašanje. Analiza rasti bakterije *Cellulomonas uda* pokaže, da bakterija najbolje raste na CMC, precej slabše na MC in HEC, medtem ko na TsCMC bakterija ni rasla.

**KEY WORDS DOCUMENTATION**

ND Du2

DC UDC 579.66: 602.4: 661.728.89: 532.135 (043) = 163.6

CX carboxymethyl cellulose/tosylat carboxymethyl cellulose/hidroxyethyl cellulose/methyl cellulose/bidegradation/*Cellulomonas uda*/*Bacillus subtilis*/cellulase/viscosity/reducing sugars/HPLC/SAXS/rheology

AU PETEK, Klemen

AA STOPAR, David (supervisor)/DOGŠA, Iztok (co-advisor)/POKLAR ULRIH, Nataša (reviewer)

PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101

PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Academic Study in Biotechnology

PY 2013

TY BIODEGRADABILITY OF CELLULOSE DERIVATIVES

DT M. Sc. Thesis (Master Study Programmes - Biotechnology)

NO XI, 40 p., 1 tab., 19 fig., 2 ann., 64 ref.

LA sl

Al sl/en

AB In this MSc thesis cellulose derivatives with carboxymethyl (CMC), hydroxyethyl (HEC), methyl (MC), and carboxymethyl and tosylic substituents (TsCMC) were investigated. Cellulose derivatives in aqueous solutions are used as thickeners, binding agents, emulsifiers and stabilisers. Viscosity of 1 % TsCMC solution was several times greater than viscosity of 1 % CMC solution, although the intrinsic viscosity of the two derivatives was the same. Increased TsCMC viscosity is likely a consequence of the intermolecular interactions between aromatic tosylic groups and increased chain rigidity. TsCMC has pseudoplastic flow behaviour, whereas CMC has Newtonian flow behaviour. Small angle X-ray scattering (SAXS) scattering curves showed a decrease in repulsive interactions in TsCMC and increased rigid conformation compared to CMC (DS = 0,7). CMC and TsCMC can be degraded by some *Bacillus subtilis* strains and by bacteria *Cellulomonas uda*. After the degradation a flow behaviour of TsCMC remained pseudoplastic. MC and HEC had pseudoplastic flow behaviour. According to SAXS scattering curves, unlike in CMC, the repulsive interactions in MC and HEC were absent, and had more rigid conformation than CMC. HEC displayed high biodegradability, whereas MC was less biodegradable. Degraded HEC had Newtonian flow behaviour, whereas degraded MC had pseudoplastic flow behaviour. The growth of bacteria *Cellulomonas uda* was best on CMC, significantly lower on MC and HEC, while there was no growth on TsCMC.

**KAZALO VSEBINE**

<b>KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA .....</b>	<b>III</b>
<b>KEY WORDS DOCUMENTATION .....</b>	<b>IV</b>
<b>KAZALO VSEBINE.....</b>	<b>V</b>
<b>KAZALO PREGLEDNIC .....</b>	<b>VII</b>
<b>KAZALO SLIK .....</b>	<b>VIII</b>
<b>KAZALO PRILOG .....</b>	<b>X</b>
<b>OKRAJŠAVE IN SIMBOLI .....</b>	<b>XI</b>
<b>1 UVOD .....</b>	<b>1</b>
1.1 NAMEN DELA .....	2
1.2 HIPOTEZE .....	2
<b>2 PREGLED OBJAV .....</b>	<b>3</b>
2.1 CELULOZA .....	3
2.2 CELULOZNI DERIVATI .....	4
<b>2.2.1 Karboksimetil celuloza (CMC) .....</b>	<b>5</b>
<b>2.2.2 Metil celuloza .....</b>	<b>6</b>
<b>2.2.3 Hidroksietil celuloza .....</b>	<b>6</b>
<b>2.2.4 Tozilat karboksimetilceluloza (TsCMC) .....</b>	<b>7</b>
2.3 RAZGRADNJA CELULOZE IN NJENIH DERIVATOV .....	8
2.4 ROD BAKTERIJ <i>Cellulomonas</i> .....	10
<b>2.4.1 <i>Cellulomonas uda</i> .....</b>	<b>10</b>
2.5 ROD BAKTERIJ <i>Bacillus</i> .....	11
<b>2.5.1 <i>Bacillus subtilis</i>.....</b>	<b>11</b>
<b>3 MATERIALI IN METODE .....</b>	<b>12</b>
3.1 MATERIALI .....	12
3.2 METODE.....	14
<b>3.2.1 Gojenje bakterijskih kultur.....</b>	<b>14</b>
<b>3.2.2 Vzorčenje in shranjevanje vzorcev .....</b>	<b>15</b>
<b>3.2.3 Merjenje optične gostote .....</b>	<b>16</b>
<b>3.2.4 Merjenje koncentracije redukcijskih sladkorjev .....</b>	<b>16</b>
<b>3.2.5 Merjenje viskoznosti .....</b>	<b>16</b>
<b>3.2.6 HPLC-SEC.....</b>	<b>17</b>
<b>3.2.7 SAXS.....</b>	<b>17</b>
<b>4 REZULTATI.....</b>	<b>18</b>
4.1 REOLOŠKE IN STRUKTURNE LASTNOSTI CMC IN TsCMC RAZTOPIN.....	18
4.2 BIORAZGRADNJA CMC IN TsCMC Z RAZLIČNIMI BAKTERIJSKIMI SEVI	21
4.3 DINAMIKA BIORAZGRADNJE CMC IN TsCMC Z BAKTERIJO <i>Cellulomonas</i>	
<i>uda</i> .....	24
4.4 STRUKTURA, REOLOGIJA IN BIORAZGRADNJA MC IN HEC Z BAKTERIJO	
<i>Cellulomonas uda</i> .....	26

4.5 RAST BAKTERIJE <i>Cellulomonas uda</i> NA RAZLIČNIH DERIVATIH CELULOZE .....	32
<b>5 RAZPRAVA IN SKLEPI.....</b>	<b>33</b>
5.1 RAZPRAVA.....	33
5.2 SKLEPI.....	35
<b>6 POVZETEK.....</b>	<b>36</b>
<b>7 VIRI .....</b>	<b>37</b>
<b>ZAHVALA</b>	
<b>PRILOGE</b>	

## KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Rast bakterije <i>Cellulomonas uda</i> na različnih derivatih celuloze.....	32
--	----



## KAZALO SLIK

Slika 1: Struktura nativne celuloze (Clasen in Kulicke, 2001: 1846) .....	3
Slika 2: Struktura vodotopnih celuloznih derivatov (R = H ali CH <sub>3</sub> ali CH <sub>2</sub> COONa ali CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OH) (Clasen in Kulicke, 2001: 1847).....	4
Slika 3: Struktura metil celuloze (MC) z DS 2 (Feller in Wilt, 1990: 16) .....	6
Slika 4: Struktura hidroksietil celuloze (HEC) z DS=1 in MS=1,5 (Seidel, 2013).....	7
Slika 5: Struktura tozilat karboksimetil celuloze (TsCMC) (Doblekar, 2012: 19) .....	8
Slika 6: Vpliv koncentracije celuloznega derivata in avtoklaviranja na viskoznost raztopine. ....	18
Slika 7: Reološko obnašanje nerazgrajenih karboksimetil celuloze (CMC) (Mw = 90 kDa, DS = 0,7) in tozilat karboksimetil celuloze (TsCMC) pri naraščajočih strižnih hitrostih.....	19
Slika 8: SAXS sipalne krivulje nerazgrajenih vzorcev karboksimetil celuloze (CMC) in tozilat karboksimetil celuloze (TsCMC) v BHM gojišču in vodi. ....	20
Slika 9: Razgradnja karboksimetil celuloze (CMC) in tozilat karboksimetil celuloze (TsCMC) z različnimi bakterijskimi sevi.....	21
Slika 10: Razgradnja različnih koncentracij karboksimetil celuloze (CMC) in tozilat karboksimetil celuloze (TsCMC) s <i>Cellulomonas uda</i> .....	22
Slika 11: Reološko obnašanje karboksimetil celuloze (CMC) (Mw = 90 kDa, DS = 0,7) in tozilat karboksimetil celuloze (TsCMC) po enotedenski razgradnji s <i>Cellulomonas uda</i> .....	23
Slika 12: Biorazgradnja karboksimetil celuloze (CMC) in tozilat karboksimetil celuloze (TsCMC) z bakterijo <i>Cellulomonas uda</i> . ....	24
Slika 13: Reološko obnašanje tozilat karboksimetil celuloze (TsCMC) pri naraščajočih strižnih hitrostih.....	25
Slika 14: Reološko obnašanje nerazgrajenih metil celuloze (MC) in hidroksietil celuloze (HEC) pri naraščajočih strižnih hitrostih.....	26
Slika 15: SAXS sipalne krivulje nerazgrajenih vzorcev hidroksietil celuloze (HEC), karboksimetil celuloze (CMC) (Mw = 90 kDa, DS = 0,7) in metil celuloze (MC) v BHM gojišču .....	27
Slika 16: Biorazgradnja hidroksietil celuloze (HEC) z bakterijo <i>Cellulomonas uda</i> .....	28
Slika 17: Biorazgradnja metil celuloze (MC) z bakterijo <i>Cellulomonas uda</i> . ....	29

Slika 18: HPLC-SEC kromatogrami nerazgrajenih in razgrajenih vzorcev hidroksietil celuloze (HEC) in metil celuloze (MC).....	30
Slika 19: Reološko obnašanje razgrajenih hidroksietil celuloze (HEC) in metil celuloze (MC) pri naraščajočih strižnih hitrostih.....	31

## KAZALO PRILOG

Priloga A: Biorazgradnja karboksimetil celuloze CMC (DS = 1,2) z bakterijo

*Cellulomonas uda*.

Priloga B: Reološko obnašanje karboksimetil celuloze (CMC) DS = 1,2 pri naraščajočih strižnih hitrostih.

**OKRAJŠAVE IN SIMBOLI**

BHM	gojišče po Bushnellu in Haasu
CMC	karboksimetil celuloza
DNS	3,5-dinitrosalicilna kislina
DP	stopnja polimerizacije
DS	stopnja substituiranosti
DSM	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen
EC	encimski razred
HEC	hidroksietil celuloza
HPLC	tekočinska kromatografija visoke učinkovitosti
MC	metil celuloza
MS	molarna stopnja substitucije
$M_w$	molska masa
OD 650	optična gostota pri 650 nm
PKE	pepton kvasni ekstrakt
RI	refrakcijski indeks
SAXS	ozkokotno rentgensko sipanje
SEC	velikostno izključitvena kromatografija
TSA	<i>p</i> -toluensulfonska kislina
TsCMC	tozilat karboksimetil celuloza

## 1 UVOD

Celulozni derivati se uporabljajo v naftni industriji (Dolz in sod., 2007), tekstilni industriji (Hashem in sod., 2009), rudarski industriji (Pawlik in sod., 2003), keramičarski industriji (Zhu in sod., 2001), živilski industriji (Diftis in Kiosseoglou, 2002), farmacevtski industriji (Jones in sod., 1997), industriji detergentov (Black, 1951), industriji barv (Hollabaugh in sod., 1945), papirni industriji (Hollabaugh in sod., 1945) in nenazadnje tudi v usnjarski industriji (Hollabaugh in sod., 1945). Najbolj prodajani celulozni etri so karboksimetil celuloze (približno 230000 ton na leto), metil in hidroksialkilmtil celuloze (približno 120000 ton na leto), hidroksietil celuloze (približno 60000 ton na leto) in hidroksipropil celuloze (manj kot 10000 ton na leto) (Thielking in Schmidt, 2011).

Omenjeni celulozni derivati se večinsko uporabljajo kot sredstava za spreminjanje viskoznosti izdelkov. Pri razgradnji celuloznih derivatov se viskoznost zmanjša, s tem pade kvaliteta izdelkov. Springle in sod. (1988) so pokazali, da je večina primerov izgube viskoznosti v skladiščenih barvah posledica encimatskega delovanja. Sprememba viskoznosti je torej nezaželena, saj spremeni lastnosti in uporabnost izdelka. Različni mikroorganizmi in različne endoglukanaze izolirane iz mikroorganizmov razgrajujejo celulozne derivate (Karlsson in sod., 2002; Sieger in sod., 1995; Zhou in Ingram, 2000; Saqib in Whitney, 2006; Reese in sod., 1950; Thayer in sod., 1984). Viskoznost raztopin celuloznih derivatov je primarno funkcija stopnje polimerizacije (Reese in sod., 1950), na viskoznost raztopin celuloznih derivatov s hidrofobnimi substituentami pa vpliva tudi tvorba intermolekularnih povezav (Charpantier-Valenza in sod., 2005). Stopnja substitucije vpliva na topnost (Reese in sod., 1950), razgradljivost (Glasser in sod., 1994; Reese in sod., 1950, Sieger in sod., 1995; Simčič, 2011) in tiksotropnost (Simčič, 2011) celuloznega derivata.

## 1.1 NAMEN DELA

Naš namen je spremljanje razgradnje celuloznih derivatov (CMC, HEC, MC, TsCMC) z različnimi bakterijskimi sevi. Zanima nas kako različne substituentne v celuloznih derivatih vplivajo na učinkovitost razgradnje s *Cellulomonas uda* ter kakšno je reološko obnašanje raztopin celuloznih derivatov pri naraščajočih strižnih hitrostih. Poleg tega bomo preverili kakšna je konformacija polimerov celuloznih derivatov v raztopinah.

## 1.2 HIPOTEZE

V magistrskem delu smo postavili naslednje hipoteze:

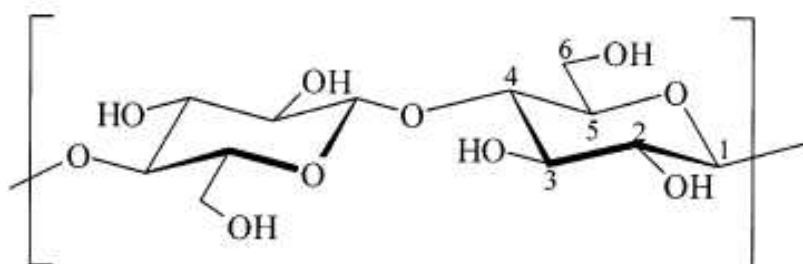
- Substituentne celuloznih derivatov vplivajo na tokovno obnašanje raztopin
- TsCMC je manj biorazgradljiv kot CMC
- Biorazgradnja derivatov je povezana z njihovo hidrofobnostjo.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 CELULOZA

Celuloza je fibrilarna, čvrsta, v vodi netopna substanca, ki jo najdemo v celičnih stenah rastlin, predvsem v steblih, deblih, pecljih in ostalih olesenelih delih rastlinskih tkiv (O'Sullivan, 1997). Celuloza je nerazvejan homopolisaharid sestavljen iz  $\beta$ -D-glukopiranoznih enot povezanih z (1  $\rightarrow$  4) glikozidnimi vezmi (Purves, 1954; Marchessault in Sundararajan, 1983). Piranozni obroči so v konformaciji stola  ${}^4C_1$ , s hidroksilnimi skupinami v ekvatorialnem položaju. V naravi imajo celulozne verige stopnjo polimerizacije (DP) približno 10 000 glukopiranoznih enot v lesu in 15 000 glukopiranoznih enot v nativni bombažni celulozi (Sjoström, 1981). Gozdni in kmetijski organski odpadki so bogati viri celuloze, hemiceluloze in lignina v povprečnem razmerju 4:3:3 (Brauns in Brauns, 1960).

Nativna celuloza je sestavljena iz kristaliničnih in amorfnih regij (Saqib in Whitney, 2006). Višji kot je odstotek kristaliničnih regij nasproti amorfnim regijam v celuloznem substratu, bolj je substrat odporen na encimsko razgradnjo (Robson in Chambliss, 1989). Približno 30 posameznih celuloznih molekul je sestavljenih v večje enote, ki jih poimenujemo elementarne fibrile (protofibrile), ki se sestavijo v večje enote mikrofibrile, te pa se sestavijo v celulozno vlakno (Lynd in sod., 2002).



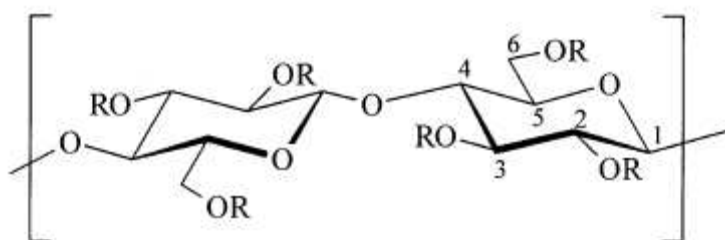
Slika 1: Struktura nativne celuloze (Clasen in Kulicke, 2001: 1846)

## 2.2 CELULOZNI DERIVATI

Vodotopne polimere lahko razdelimo v tri skupine: naravni, sintetični ali semisintetični kot so celulozni etri (Sieger in sod., 1995). Celulozni etri so netoksični, ponavadi vodotopni in v obliki belih do rumenkastih praškov ali granul (Thielking in Schmidt, 2011). Aktivacijske energije za hidrolizo glikozidnih vezi v HEC, MC in CMC so podobne: 31,1, 31,7 in 31 kcal/mol (Vink, 1966), kar se ujema z energijami, ki so potrebne za hidrolizo glikozidnih vezi v celuloznih materialih (Feller in Wilt, 1990). Razlike v nabrekanju in raztapljanju različnih celuloznih etrov so posledica interakcij vodikovih vezi med prostimi OH skupinami po eni strani, ter hidrofilnih in hidrofobnih substituentov po drugi strani. Te interakcije si lahko predstavljamo kot postopno uvajanje hidrofobnih substituentov na nativno celulozo. Nativna celuloza ima kristalno strukturo, ki bazira na vodikovih povezavah. Substituente povzročijo delno nepravilnost kristalne strukture, ki se kaže v prostih hidroksilnih skupinah. Posledica je višja topnost v vodnih medijih z višanjem DS. Nadaljnje eterifikacije s hidrofobnimi substituentami povzročijo topnost v organskih topilih. (Thielking in Schmidt, 2011).

Molekularna struktura in konformacija polimera v raztopini je bistvenega pomena za tokovno obnašanje polimernih raztopin. Konformacija polimera v raztopini je primarno odvisna od kemijske strukture polimera. Molska masa, koncentracija, temperatura in topilo so še drugi parametri, ki vplivajo na strukturo polimera v raztopini. Togost verige, ekspanzija polimerne spirale in prostorska potreba določajo hidrodinamski volumen individualne molekule, kar posledično vpliva na tokovno obnašanje polimerne raztopine v primerjavi s čistim topilom (Clasen in Kulicke, 2001).

Clasen in Kulicke (2001) kot možne substituyente na celulozi omenjata celulozne estre: celuloza acetat, celuloza ksantogenat, celuloza sulfat, celuloza fosfat, celuloza ftalat; celulozne etre: karboksimetil celuloza, sulfoetil celuloza, metil celuloza, etil celuloza, hidroksietil celuloza, hidroksipropil celuloza, cianoetil celuloza.



**Slika 2: Struktura vodotopnih celuloznih derivatov (R = H ali CH<sub>3</sub> ali CH<sub>2</sub>COONa ali CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH)  
(Clasen in Kulicke, 2001: 1847)**



### 2.2.1 Karboksimetil celuloza (CMC)

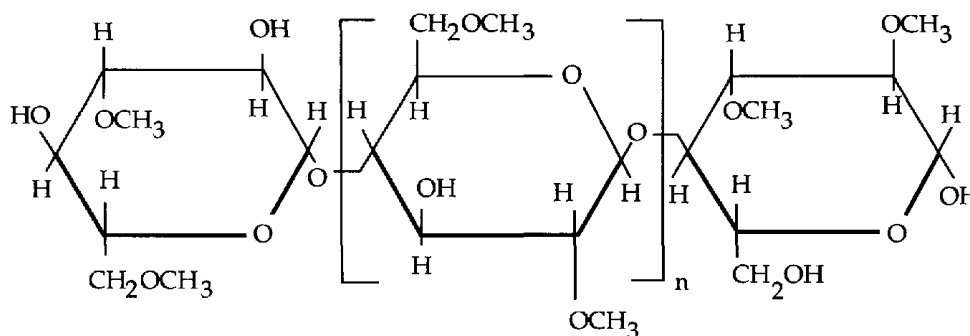
CMC je po barvi brezbarven do kremast material, proizveden z reakcijo celuloznih hidroksilnih skupin s kloroacetatom (Sieger in sod., 1995). V CMC variacije v stopnji polimerizacije močno vplivajo na lastnosti produkta (npr. reološke lastnosti), kar ga dela bolj ali manj primerne za specifične aplikacije (Enebro in sod., 2009). Za vsak sistem polimer-topilo sta molska masa raztopljenih makromolekul in njihova koncentracija v raztopini ključna parametra, ki vplivata na reološke lastnosti raztopine. Višja viskoznost se lažje doseže z višjo koncentracijo polimera kot pa z višjo molsko maso polimera. Ko se DS povečuje v območju  $DS < 1$ , se viša tudi topnost (Kulicke in sod., 1996). Na vsaki glukozni enoti so lahko do tri substituenti, maksimalna stopnja substitucije (DS) je 3. CMC je topen v vodi, ko ima DS nad 0,4 (Karlsson in sod., 2002). Raztopine CMC se obnašajo psevdoplastično (Gomez-Diaz in Navaza, 2002).

Sposobnost celulaz za razgradnjo CMC je močno povezana s stopnjo substitucije in velikostjo substituent. Manjša kot je substituenta, večja je stopnja substitucije, ki jo lahko tolerirajo celulozni encimi (Glasser in sod., 1994). Stopnja polimerizacije ne vpliva na encimsko hidrolizo CMC (Reese in sod., 1950). Hidroliza celuloznih derivatov je omejena na regije molekul brez ali z malo substituentami, ker karboksimetilne skupine predstavljajo ovire (sterične ali eklektrostatske) ali otežujejo nastanek vodikovih vezi med encimom in substratom. Kemijska struktura in koncentracija encimskih produktov je zato odvisna od selektivnosti encima in strukture substrata (CMC) (Enebro in sod., 2009). Enakomerno substituiran vzorec CMC z DS 0,5 ima približno 40 odstotkov anhidroglukoznih enot monosubstituiranih, 5 odstotkov disubstituiranih in 55 odstotkov anhidroglukoznih enot nesubstituiranih. Vzorec CMC z DS 1,2 ima samo 10 odstotkov anhidroglukoznih enot nesubstituiranih (Spurlin, 1939). Razmerje med substituentami na CMC pridobljeno s  $^{13}\text{C}$  NMR na mestih C2 : C3 : C6 je 3,0 : 1,0 : 2,1 (Baar in sod., 1994). CMC je dober substrat za endoglukanaze in se pogosto uporablja kot standardni substrat v testih endoglukanazne aktivnosti (Ghose, 1987). CMC je varen za uporabo v prehrani in ni toksičen (Bär in sod., 1995a; Bär in sod., 1995b).

### 2.2.2 Metil celuloza

Metil celuloza se pripravlja z eterifikacijo alkalne celuloze z metil kloridom (Park in sod., 2001). 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 – 2,8) pa je netopna v vodi, a je topna v organskih (Feller in Wilt, 1990).

Leta 2003 se je prodalo okoli 120000 ton metil celuloze in hidroksialkil metil celuloze. Daleč največ se metil celuloza uporablja v segmentu gradbenih materialov. V Evropi se MC 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 se izkorišča zgoščevalne in emulgacijske lastnosti metil celuloze, zato da se doseže zaželeno konsistenco in teksturo produkta (Thielking in Schmidt, 2011).



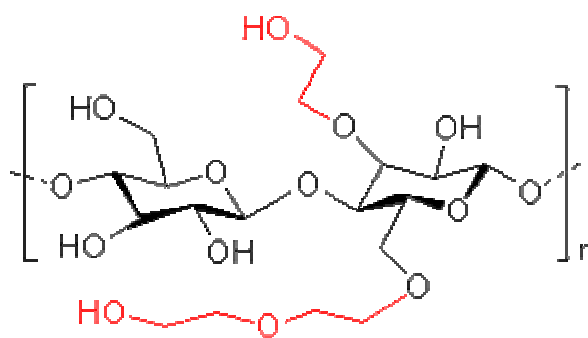
Slika 3: Struktura metil celuloze (MC) z DS 2 (Feller in Wilt, 1990: 16)

### 2.2.3 Hidroksietil celuloza

Hidroksietil celuloza (HEC) nastane z reakcijo celuloze z etilen oksidom. HEC je neionski derivat in je topen v hladni in vroči vodi. Hidroksietil celuloze so na trgu na voljo z viskoznostmi med 10 mPas in 100000 mPas in molarnimi substitucijami (MS) med 1,5 do 3 (Thielking in Schmidt, 2011). Hidroksietil celuloze z DS 0,11 do 0,31 (MS 0,17 - 0,42) so topne v 7 % natrijevem hidroksidu, HEC z DS 0,66 do 1,66 (MS 1,0 - 4,1) je topen v vodi (Feller in Wilt, 1990). Molarna substitucija predstavlja število substituent vezanih na

anhidroglikozno enoto. Če ima substituenta reaktivne skupine, npr. hidroksilne skupine, potem se lahko odvijejo dodatne substitucije in se bo MS razlikovala od DS in lahko preseže število 3 (Clasen in Kulicke, 2001). DS industrijsko proizvedenih serij se giblje okoli 1, višja hidroksietilacija pa v glavnem vodi do sekundarne, terciarne in kvartarne substitucije hidroksialkilne substituenta (formacija stranskih verig etilen oksida) (Thielking in Schmidt, 2011).

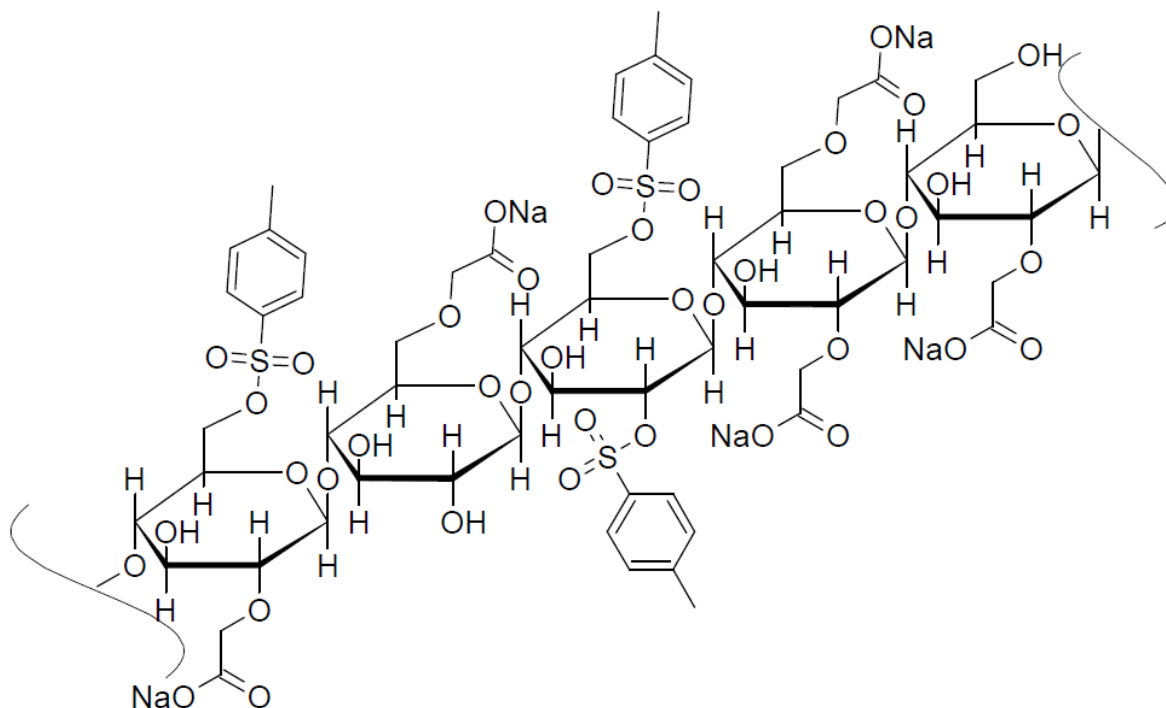
Letna prodaja HEC znaša okoli 60000 ton. Najbolj se uporablja v gradbeni industriji, še posebej v površinskih premazih. V industriji barv je HEC skupina celuloznih etrov z največjim tržnim deležem. (Thielking in Schmidt, 2011).



Slika 4: Struktura hidroksietil celuloze (HEC) z DS=1 in MS=1,5 (Seidel, 2013)

#### 2.2.4 Tozilat karboksimetilceluloza (TsCMC)

TsCMC je bil pripravljen kot ester CMC in *p*-toluensulfonske kisline (TSA) prek prostih OH skupin na glukoznih enotah. Viskoznost TsCMC v BHM gojišču znaša 27,2 mPas, viskoznost CMC pa le 3,5 mPas. Viskoznost TsCMC v vodi pa znaša 53,5 mPas. TsCMC je bolj hidrofoben polimer kot CMC, kar je posledica adicije relativno hidrofobnih skupin na CMC. TsCMC ima veliko boljše emulzifikacijske sposobnosti kot CMC. Prek polarnih karboksimetilnih skupin TsCMC ohranja topnost v vodnih medijih, prek nepolarnih aromatskih tozilnih skupin pa zvišuje viskoznost.



Slika 5: Struktura tozilat karboksimetil celuloze (TsCMC) (Doblekar, 2012: 19)

### 2.3 RAZGRADNJA CELULOZE IN NJENIH DERIVATOV

Katabolizem celuloze vključuje encimsko depolimerizacijo netopne celuloze in celično izrabo produktov hidrolize celuloze (Lynd in sod., 2002). V proces razgradnje celuloze so vključene tri vrste encimov: endoglukanaze (EC 3.2.1.4.), ki cepijo dolge celulozne verige na naključnih mestih; eksoglukanaze (EC 3.2.1.74) odcepljajo glukoze monomere ali celobiozne molekule z reducirajočih ali nereducirajočih koncev celulozne verige;  $\beta$ -glukozidaze ali celobiazaze (EC 3.2.1.21) hidrolizirajo celobiozo v glukoze monomere (Saqib in Whitney, 2006). Celobioza inhibira sintezo endoglukanaz in eksoglukanaz s povratno inhibicijo (Bisaria in Ghose, 1981).

Bakterijske endoglukanaze so lahko izključno celično vezane, ekstracelularne, ali pa celično vezane in ekstracelularne. Bakterijske  $\beta$ -glukozidaze so vedno celično vezane (Stoppok in sod., 1982). Večina anaerobnih vrst, ki uporablja celulozo, ne sprošča ekstracelularnih celulaz, imajo pa lokalizirane kompleksirane celulaze neposredno na površini celice ali celičnega-glikokaliks matriksa. Aerobni celulozni razgrajevalci, bakterijski in glivni, uporabljajo celulozo s pomočjo velikih količin ekstracelularnih celulaz (Rapp in Beerman, 1991; Schwarz, 2001). Ekstracelularne celulaze ne tvorijo

stabilnih kompleksov z visoko molekularno maso in se zato imenujejo nekompleksirani celulozni sistemi. Kompleksirani celulozni sistemi ali celulosomi, običajno anaerobnih bakterij, delujejo sinergistično na mestu hidrolize celuloze, kar olajšuje ter omogoča boljši dostop do produktov celulozne razgradnje (Lynd in sod., 2002).

Endoglukanaze ponavadi povzročijo drastičen dvig specifične fluidnosti v primerjavi z relativno počasnejšim dvigom redukcijskih sladkorjev. Eksoglukanaze pa obratno povzročijo počasen dvig specifične fluidnosti v primerjavi s hitrim dvigom redukcijskih sladkorjev (Robson in Chambliss, 1989). Nekatere endoglukanaze izkazujejo tudi eksoglukanazno aktivnost (Petre in sod., 1986). Nekatere endoglukanaze so sposobne hidrolizirati glikozidne vezi ob mono-substituirani anhidroglukozni enoti, če je substituenta locirana na O-6 poziciji (Horner in sod., 1999). Depolimerizacijska aktivnost endoglukanaze je mnogo večja kot saharifikacijska aktivnost (Thayer in sod., 1984). V primerjavi s številom organizmov, ki lahko uporabljajo glukozo, je relativno malo organizmov sposobno privzema celobioze v celico in direktnega intracelularnega metabolizma (Zhou in Ingram, 2000).

Celulozni sistemi izkazujejo višjo kolektivno aktivnost kot je vsota aktivnosti posameznih encimov, to je fenomen, ki ga poimenujemo sinergizem. Obstajajo štiri vrste sinergizmov: (1) endo-ekso sinergija med endoglukanazami in eksoglukanazami, (2) ekso-ekso sinergija med eksoglukanazami, (3) sinergija med eksoglukanazami in  $\beta$ -glukozidazami, ki odstranjujejo celobiozo, in (4) sinergija med katalitičnimi domenami in CBM-ji (oglikovodik-vezni modul) (Din in sod., 1994; Teeri, 1997). Najbolj pogosto preučevani celulozolitni organizmi so: glive rodov *Trichoderma*, *Hemicola*, *Penicillium*, *Aspergillus*; bakterije rodov *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Cellulomonas*; aktinomicete rodov *Streptomyces* in *Actinomucor* (Sukumaran in sod., 2005). Bile so identificirane celulozolitne arheje rodu *Thermogladius cellulolyticus* 1633 (Mardanov in sod., 2012).

## 2.4 ROD BAKTERIJ *Cellulomonas*

Predstavniki rodu *Cellulomonas* so korineforme bakterije, katerih najbolj prepoznavna lastnost je zmožnost razgradnje celuloze (Thayer in sod., 1984). Na agarjem gojišču s kvasnim ekstraktom in glukozo sevi *Cellulomonas* tvorijo gladke, lesketajoče bele ali rumene kolonije s premerom okoli 5 mm. Predstavniki rodu *Cellulomonas* odlično rastejo pri aerobnih pogojih, pri anaerobnih pogojih pa je rast močno upočasnjena (Stackebrandt in Kandler, 1979). Thayer in sod. (1984) so razdelili bakterije rodu *Cellulomonas* v dve skupini glede na CMC depolimerizacijsko aktivnost (relativno visoka aktivnost ali relativno nizka aktivnost). V skupino z relativno visoko aktivnostjo spadajo *C. uda* ATCC 491, *C. gelida* ATCC 488, *C. cellasea* ATCC 487, “*C. subalbus*” ATCC 489 in *Cellulomonas* sp. sev ATCC 21399; v skupino z relativno nizko aktivnostjo pa *C. biazotea* ATCC 486, *C. fimi* ATCC 484, *C. flavigena* ATCC 482. Optimalna temperatura za depolimerizacijo CMC pri predstavnikih rodu *Cellulomonas* je 40 °C, optimalna temperatura za rast pa je 30 °C. Encimska aktivnost je najvišja pri pH 6 in 7 (Thayer in sod., 1984).

### 2.4.1 *Cellulomonas uda*

*Cellulomonas uda* je gram pozitivna bakterija in ima peptidoglikan tipa Orn-Gly. Vsebnost gvanina in citozina v DNA *Cellulomonas uda* je 72 %. Je negibljiva, proizvaja polimer glukoze, kurdlan in kislino iz arabinoze, maltoze, saharoze in trehaloze, a ne iz riboze. Ne reducira nitrata v nitrit. *Cellulomonas uda* dokaj hitro razgradi mikrokristalinično celulozo in časopisni papir. Endoglukanaze pri *Cellulomonas uda* so večinoma ekstracelularne, 1 % ali manj pa je celično vezanih.  $\beta$ -glukozidaze pri *Cellulomonas uda* so vedno povezane s celico. Končna produkta hidrolize celuloze s *Cellulomonas uda* sta celobioza in glukoza v razmerju 6:1 (Stoppok in sod., 1982).

## 2.5 ROD BAKTERIJ *Bacillus*

Bakterije rodu *Bacillus* so gram pozitivne bakterije, ki tvorijo endospore in izločajo širok nabor encimov, med drugim amilaze, proteaze,  $\beta$ -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* (Robson in Chambliss, 1984; Knösel, 1971; Orehek in sod., 2013), *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).

### 2.5.1 *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) so identificirali gene za nitrat reduktazo v *Bacillus subtilis*. Nakano in sod. (1997) pa so eksperimentalno demonstrirali anaerobno rast *Bacillus subtilis* ob prisotnosti nitrata. *Bacillus subtilis* lahko formira zelo odporne dormantne endospore kot odziv na pomanjkanje hranil 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  $50\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ , optimalni pH za celulazno aktivnost je v območju med 5,0 do 6,0 (Robson in Chambliss, 1989).

### 3 MATERIALI IN METODE

#### 3.1 MATERIALI

##### Kemikalije

- 3,5 – dinitrosalicilna kislina  $C_7H_4N_2O_7 \cdot H_2O$   $M_w = 246,12$  g/mol (Sigma, Nemčija)
- 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)
- hidroksietil celuloza (Natrosol 250 MR; Ashland, Nemčija)
- K,Na–tartrat  $C_4H_4KNaO_6 \cdot 4H_2O$   $M_w = 282,23$  g/mol (Merck, Nemčija)
- kalcijev klorid  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$   $M_w = 219,09$  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  $M_w = 90$  kDa, DS = 0,7 (Aldrich Chemistry, ZDA)
- karboksimetilceluloza DS = 1,2 (Blanose 12M31P, Ashland, Nemčija)
- metilceluloza CULMINAL 7000 PF (Ashland, Nemčija)
- magnezijev sulfat heptahidrat  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$   $M_w = 246,48$  g/mol (Merck, Nemčija)
- natrijev hidroksid NaOH  $M_w = 40,00$  g/mol (Merck, Nemčija)
- natrijev klorid NaCl  $M_w = 58,44$  g/mol (Sigma – Aldrich, Danska)
- agar (Fluka, Španija)
- peptokompleks (Biolife, Italija)
- kvasni ekstrakt (Biolife, Italija)
- destilirana voda

TsCMC je bil pridobljen z esterifikacijsko reakcijo med –OH skupinami CMC in tozil anhidridom. Tozil anhidrid je bil pripravljen tako, da se je med mešanjem na magnetnem mešalu pri  $(100 \pm 2)$  °C dimetilsulfoksidu dodalo  $P_4O_{10}$  in dehidrirano TSA, mešanje je potekalo 20 minut (Doblekar, 2012).



## Sestava gojišč

Prilagojeno BHM gojišče (Bushnell in Haas, 1941) z 1 % CMC ali TsCMC:

- 0,2 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- 1 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$
- 1 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$
- 1 g  $\text{NH}_4\text{NO}_3$
- 0,2 ml  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (100 g/l)
- 10 g CMC ali 10 g TsCMC
- 1000 mL destilirane vode

Za 1 L 0,75 % raztopine CMC in TsCMC smo uporabili 7,5 g celuloznega derivata. Za 1 L 1,25 % raztopine CMC in TsCMC smo uporabili 12,5 g celuloznega derivata. Gojišča BHM s CMC in TsCMC niso imela dodanega NaCl, ker so že sama po sebi vsebovali  $\text{Na}^+$  ki je bil vezan na  $\text{COO}^-$  skupine. Dodajanje NaCl bi povzročilo agregacijo CMC in TsCMC v raztopini. V primeru MC in HEC smo dodali NaCl, ker celulozna derivata ne vsebujeta  $\text{Na}^+$ . Nobeno izmed naših BHM gojišč ni vsebovalo vira železa, ker železo povzroči agregacijo CMC in TsCMC preko keliranja  $\text{COO}^-$  skupin.

Prilagojeno BHM gojišče (Bushnell in Haas, 1941) z 1 % HEC ali MC:

- 0,2 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- 1 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$
- 1 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$
- 1 g  $\text{NH}_4\text{NO}_3$
- 0,2 ml  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (100 g/l)
- 1 g NaCl
- 10 g HEC ali 10 g MC
- 1000 mL destilirane vode

Trdno PKE + glukoza gojišče:

- 6 g peptokompleksa
- 3 g kvasnega ekstrakta
- 3 g glukoze
- 15 g agarja
- 1000 mL destilirane vode

DNS reagent (Miller, 1959):

- V 100 mL destilirane vode smo raztopili 8 g NaOH, tako smo dobili 100 mL 2 M NaOH,
- v 100 ml 2 M NaOH smo med segravanjem raztopili 5 g 3,5-dinitrosalicilne kisline,
- v 25 mL destilirane vode smo med segrevanjem raztopili 150 g K,Na-tartrata,
- obe raztopini smo združili v bučki in dopolnili z destilirano vodo do oznake 500 mL,
- raztopino smo pustili mešati na magnetnem mešalu dokler ni postala bistra.

Bakterijski sevi:

- *Cellulomonas uda* DSM 20108
- *Bacillus firmus*
- *Bacillus mycoides*
- *Salmonella typhimurium*
- *Azospirillum brasilense* ATCC 29145
- *Alcaligenes* sp. NCIB 11015
- *Bacillus subtilis* JH 642
- *Bacillus subtilis* IS 75
- *Bacillus subtilis* 3610 wt
- *Streptomyces coelicolor*
- *Chromobacterium violaceum*

Sevi brez oznake knjižnic so izolati pridobljeni na Katedri za mikrobiologijo, Oddelka za živilstvo ali na drugih katedrah Oddelka za živilstvo Biotehniške fakultete.

## 3.2 METODE

### 3.2.1 Gojenje bakterijskih kultur

Vse bakterijske seve smo imeli shranjene na 4 °C na PKE + glukoza gojiščih. Vsaki drugi teden smo bakterijske seve precepili na nova PKE + glukoza gojišča. 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* smo inkubirali aerobno preko noči pri 37 °C.

Nacepljena gojišča z bakterijskima sevoma *Azospirillum brasilense* ATCC 29145 in *Streptomyces coelicolor* smo inkubirali aerobno pet dni pri 28 °C.

Za inkubacijske poskuse na celuloznih derivatih smo pripravili inokolum bakterij v fiziološki raztopini (0,9 % NaCl). Volumen inokoluma glede na volumen BHM gojišča je bil 1 %. Razen pri bakterijskih sevih *Bacillus firmus*, *Bacillus mycoides*, *Salmonella typhimurium*, *Azospirillum brasilense* ATCC 29145 in *Alcaligenes* sp. NCIB 11015, kjer je inokolum predstavljal 3 % gojišča, ker je bil OD<sub>650</sub> teh suspenzij nižji. Bakterijske kulture smo pred inokulacijo dvakrat sprali s fiziološko raztopino. Suspendirano bakterijsko kulturo smo centrifugirali pri 12000 rpm za 10 minut, nato smo odpipetirali fiziološko raztopino, nato smo zopet dodali fiziološko raztopino in bakterijsko kulturo resuspendirali. Inkubacija z bakterijskimi sevi na gojiščih s celuloznimi derivati je vedno potekala aerobno, v temi, s stresanjem pri 200 obratih na minuto, pri 37 °C. Kot negativno kontrolo smo gojišče inokulirali s fiziološko raztopino.

Pri eksperimentih s *Cellulomonas uda* na CMC, MC in HEC smo uporabljali 400 mL erlenmajerice z utorji z 100 mL gojišča, inkubacija je potekala pri 37 °C, s stresanjem pri 200 rpm, aerobno in v temi. Poleg tega smo uporabljali 50 mL epruvete pri poskusu z različnimi bakterijskimi sevi na CMC in TsCMC. V 50 mL epruvete smo dali 7 mL gojišča (bakterijska kultura) ali 11 mL fiziološke raztopine (negativna kontrola). Iz epruвет z 11 mL gojišča smo ob času  $t_0$  odvzeli 4 mL gojišča za vzorčenje. Inkubacija v epruветah je potekala pri 37 °C, s stresanjem pri 200 rpm, aerobno in v temi.

### 3.2.2 Vzorčenje in shranjevanje vzorcev

Pred vsakim vzorčenjem smo stehali erlenmajerice ali epruvete, ter tako ugotavljali volumen izhlapele vode med inkubacijo. Izhlapelo vodo smo nadomestili s sterilno demineralizirano vodo. Pri vzorčenjih smo odvzeli različne količine gojišča. Za pripravo vzorca za merjenje koncentracije redukcijskih sladkorjev, HPLC in SAXS meritve smo odvzeli 1400 µL gojišča, ki smo ga nato centrifugirali 10 minut pri 12000 obratih na minuto. Supernatant smo odpipetirali v novo epico in zamrznili.

### 3.2.3 Merjenje optične gostote

Hitrost rasti pri bakterijah smo ugotavljali z merjenjem optične gostote pri 650 nm. 300  $\mu\text{L}$  vzorca iz gojišča smo odpipetirali na mikrotitrsko ploščo in izmerili optično gostoto z optičnim čitalcem Multiscan spectrum, Thermo electron corporation.

### 3.2.4 Merjenje koncentracije redukcijskih sladkorjev

Koncentracija redukcijskih sladkorjev nam pove, koliko je derivat celuloze razgrajen. Višja koncentracija pomeni, da je celulozni derivat bolj razgrajen, saj ob razgradnji daljše polimerne verige razpadejo in ob tem se poveča število reducirajočih sladkorjev. Umeritveno krivuljo smo pripravili iz 50 mM založne raztopine glukoze. Pripravili smo 0, 1, 2, 3, 4 in 5 mM standardne raztopine glukoze. V stekleno epruveto smo odpipetirali 1 mL odmrznjenega vzorca in dodali 1 mL DNS reagenta. Epruvete smo prekrili s kovinskimi zamaški, označili in premešali z vrtničnim mešalom. Epruvete smo inkubirali v vodni kopeli 15 minut pri 100 °C. Pri segrevanju nastane barvni produkt, ki ima absorpcijski maksimum pri 575 nm. Po segrevanju smo epruvete ohladili v čaši z destilirano vodo in jih zopet premešali z vrtničnim mešalom. Iz vsake epruvete smo vzeli 300  $\mu\text{L}$  vzorca in ga odpipetirali na mikrotitrsko ploščo. Z optičnim čitalcem izmerimo absorbanco pri 575 nm. S pomočjo umeritvene krivulje smo določili koncentracijo redukcijskih sladkorjev.

### 3.2.5 Merjenje viskoznosti

Viskoznost smo merili z rotacijskim reometrom Anton Paar Physica MCR 301. Uporabili smo sistem »plate-plate« s premerom 49,975 mm, razmik med meritvenima ploščama je bil 0,25 mm, merjenje je potekalo pri temperaturi  $(25 \pm 0,01)$  °C. Za opravljeno meritev smo potrebovali približno 490  $\mu\text{l}$  vzorca, da smo zapolnili prostor med ploščama. Točke v območju strižne hitrosti od 2 do 1000  $\text{s}^{-1}$  so bile izmerjene zaporedno vsakih 5 sekund v 29 korakih. Rezultati meritev viskoznosti so podani pri strižni hitrosti 1000  $\text{s}^{-1}$  v kolikor ni drugače označeno. Viskoznost dobimo kot razmerje med strižno napetostjo (Pa) in strižno hitrostjo ( $\text{s}^{-1}$ ).

### 3.2.6 HPLC-SEC

S HPLC-SEC smo ugotavljali razlike v masni porazdelitvi molekul med nerazgrajenimi in razgrajenimi vzorci CMC, HEC in MC. Nerazgrajeni vzorci so bili pripravljene v sterilnem BHM gojišču z 1 % CMC (DS = 1,2), oziroma HEC ali MC. Razgrajeni vzorci so bili vzorci pridobljeni po sedemdnevni inkubaciji s *Cellulomonas uda*. Za ločevanje smo uporabili velikostno izključitveno kromatografsko tehniko, kjer ločba poteka zaradi različnega zadrževanja molekul v porah stacionarne faze (manjše molekule se v koloni zadržijo dalj časa). Injicirali smo 20  $\mu$ l 0,5 % vzorca, redčenega z acetatnim pufrom. 0,4 M acetatni pufer s pH 5 smo uporabili kot mobilno fazo. Pretok je bil 1 mL/min. Ločba je potekala na zaporedno vezanih kolonah PSS Suprema analytical 100, 1000 in 10000 Å, pri temperaturi 80 °C. Detekcijo nam je omogočil RI (ang. refractive indeks; lomni količnik) detektor (KNAUER, Advanced scientific instruments).

### 3.2.7 SAXS

Ozkokotno rentgensko sipanje (SAXS) je ozkokotna sipalna tehnika, kjer se elastično sipanje rentgenskih žarkov, ki jih povzroči vzorec z nehomogenostmi v nanometrskem merilu, zabeleži pri zelo nizkih kotih (običajno 0,1 do 10°). To ozkokotno območje vsebuje podatke o obliki in velikosti makromolekul, karakteristične razdalje delno urejenih materialov, velikosti por in ostale podatke (Glatter in Kratky, 1982).

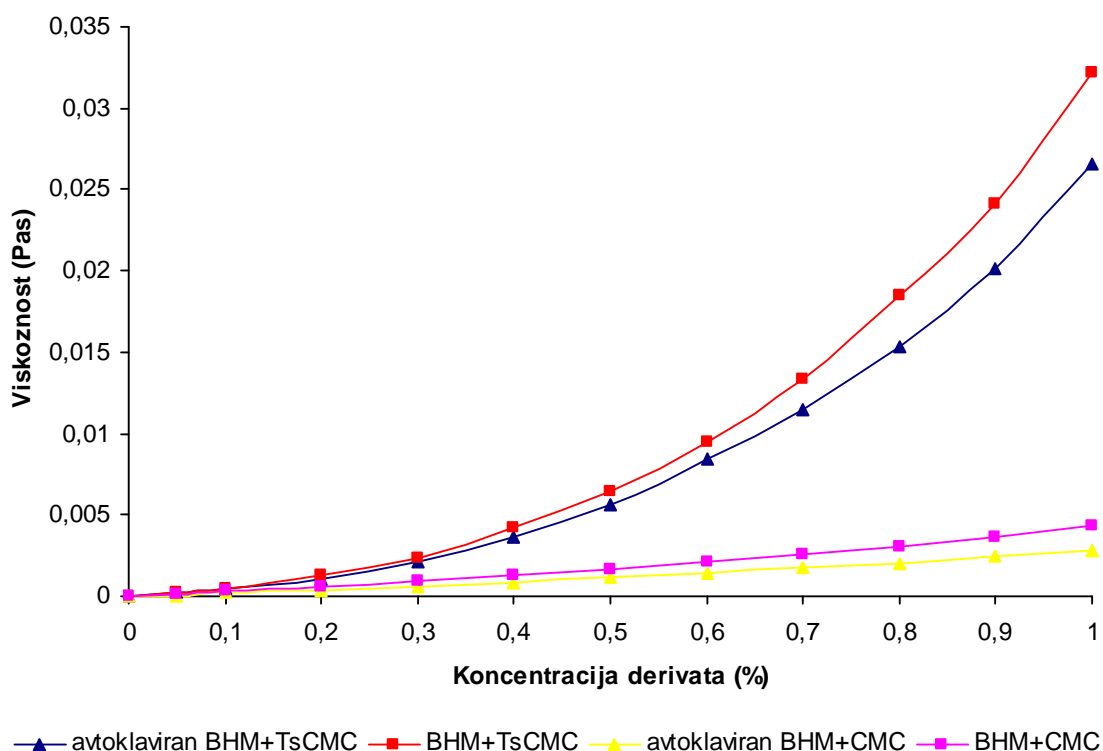
Eksperimenti ozkokotnega sipanja rentgenskih žarkov so bili izvedeni s Kratky kamero (Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Katedra za fizikalno kemijo). Generator rentgenskih žarkov je bil opremljen z rentgensko cevjo z bakrovo anodo, ki izseva rentgensko svetlobo  $\text{CuK}_\alpha$  z valovno dolžino ( $\lambda$ ) 0,154 nm z močjo 1,4 kW (40 kV, 35 mA). Meritve vzorcev so potekale pri 25 °C.

Na y osi grafov s SAXS krivuljami je podana intenziteta sipnega žarka  $I(q)$ , na x osi pa je sipalni vektor  $q$ . V prednjem delu sipalne krivulje je podana informacija o interakcijah v raztopini, v zadnjem delu sipalne krivulje pa glede na naklon določamo togost molekul v raztopini.

## 4 REZULTATI

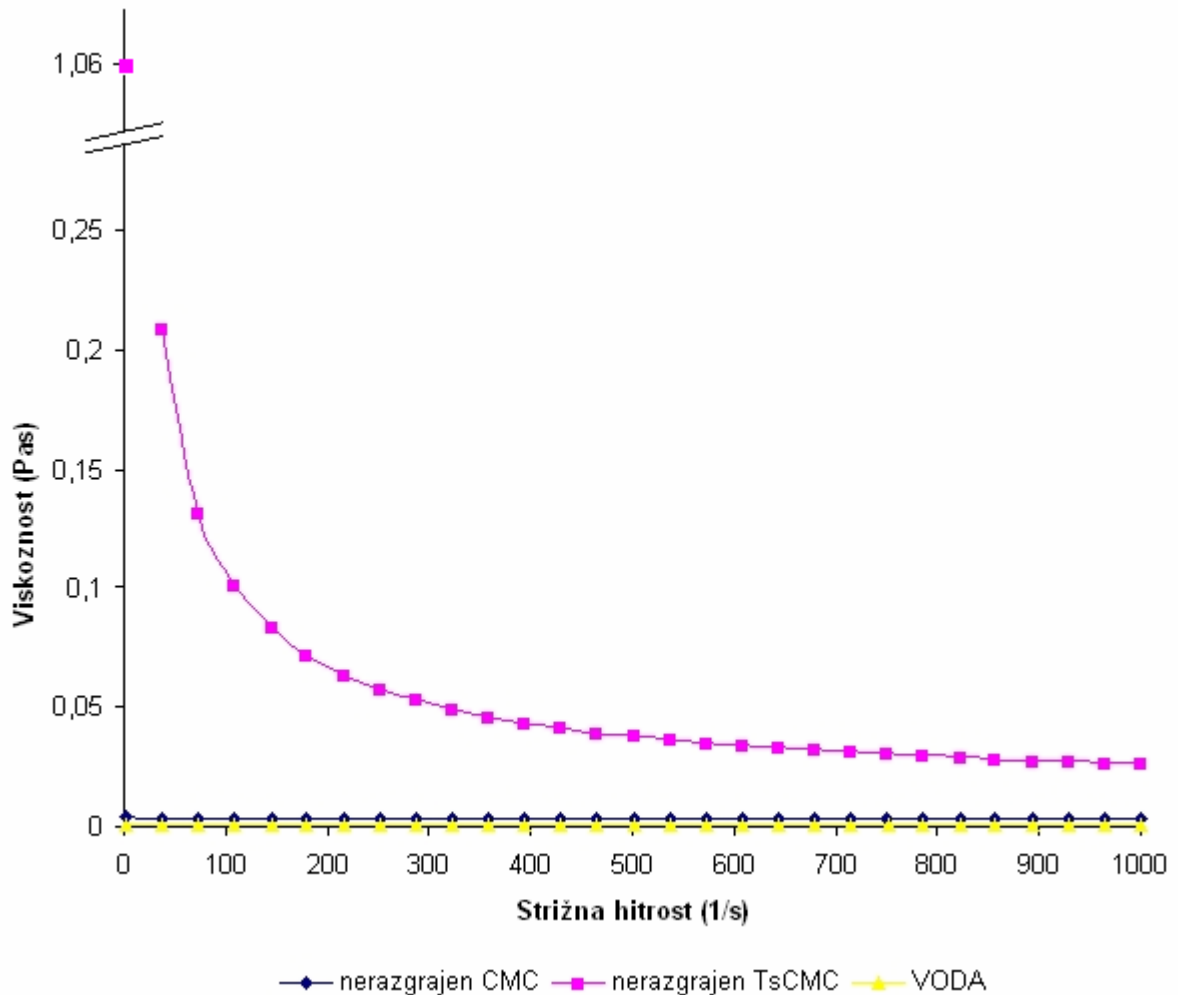
### 4.1 REOLOŠKE IN STRUKTURNE LASTNOSTI CMC IN TsCMC RAZTOPIN

Viskoznost toziliranega derivata CMC in viskoznost CMC v različnih raztopinah je prikazana na sliki 6. Viskoznost CMC in njenega toziliranega derivata je odvisna od koncentracije polimerov in od koncentracije soli. Kot kažejo krivulje na sliki 6 se z višanjem koncentracije CMC viskoznost linearno povečuje, medtem ko se viskoznosti TsCMC raztopine povečuje eksponentno. TsCMC je tudi veliko bolj moten kot CMC. Optična gostota pri 650 nm 1 % raztopine CMC ( $M_w = 90$  kDa,  $DS = 0,7$ ) v BHM je znašala 0,04 a.u., optična gostota 1 % raztopine TsCMC v BHM pa je znašala 0,20 a.u.. Po avtoklaviranju je opazno znižanje viskoznosti raztopin obeh celuloznih derivatov.



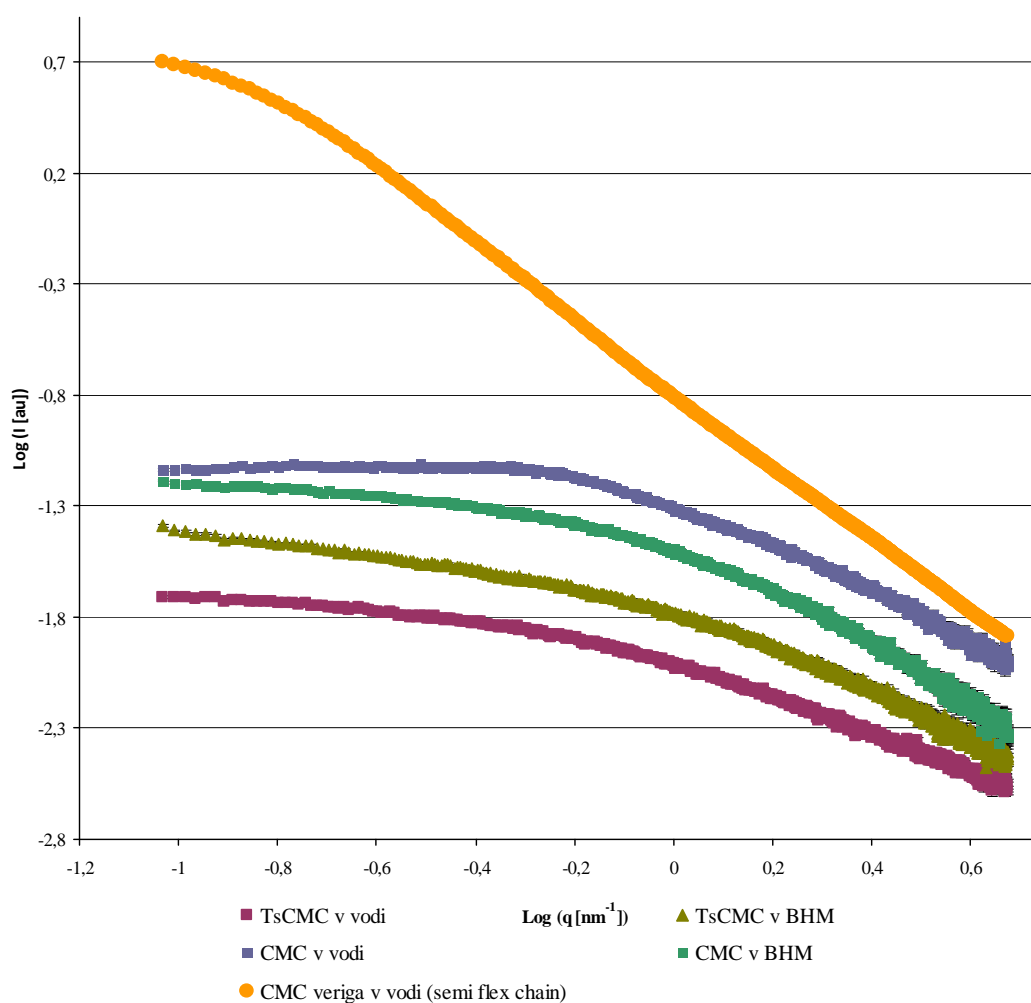
**Slika 6: Vpliv koncentracije celuloznega derivata in avtoklaviranja na viskoznost raztopine.** Uporabili smo tekoče BHM gojišče in celulozna derivata karboksimetil celulozo (CMC) ( $M_w = 90$  kDa,  $DS = 0,7$ ) in tozilat karboksimetil celulozo (TsCMC) v različnih koncentracijah. Dva vzorca sta bila avtoklavirana ( $110$  °C, 20 minut), dva pa ne.

Glede na CMC se tokovno obnašanje TsCMC precej razlikuje. Kot je razvidno iz slike 7 je tokovno obnašanje CMC Newtonsko, kar pomeni, da viskoznost ni odvisna od strižne hitrosti. Tokovno obnašanje TsCMC je izrazito pseudoplastično, tudi viskoznost TsCMC je znatno višja kot viskoznost CMC.



**Slika 7: Reološko obnašanje nerazgrajenih karboksimetil celuloze (CMC) ( $M_w = 90$  kDa,  $DS = 0,7$ ) in tozilat karboksimetil celuloze (TsCMC) pri naraščajočih strižnih hitrostih. CMC in TsCMC sta bila raztopljena v BHM gojišču in avtoklavirana.**

Na sliki 8 so prikazane sipalne krivulje vzorcev CMC in TsCMC v BHM in v vodi. Za primerjavo je prikazana teoretična sipalna krivulja polimera v konformaciji polprožne verige, velikosti, ki ustreza  $M_w = 90$  kDa, brez intermolekularnih interakcij. Konformacija polprožne verige je najmanj toga konformacija polimera v raztopini. Najbolj očitno odstopanje med teoretično krivuljo in krivuljami CMC in TsCMC je povečanje naklona v sprednjem delu krivulj. Na prednji del sipalne krivulje najbolj vplivajo strukturne lastnosti opazovanega sistema na večjih velikostnih skalah (npr. razdalje med 5 in 50 nm), kamor sodijo velikost polimera in medpolimerne interakcije. Izrazito zmanjšanje naklona pri CMC v prednjem delu je posledica odbojnih interakcij med karboksimetilnimi skupinami polimera. Pri TsCMC v vodi pride glede na CMC do zmanjšanja odbojnih interakcij. Razlika v prednjem delu se sicer dodatno zmanjša, če vodo kot topilo zamenjamo z BHM. Namesto tega postane bolj očitna razlika v zadnjem delu krivulje, kar nakazuje spremembe na majhnih skalah. Manj strm naklon v repu krivulje TsCMC nakazuje bolj iztegenjeno konformacijo TsCMC v primerjavi s CMC.

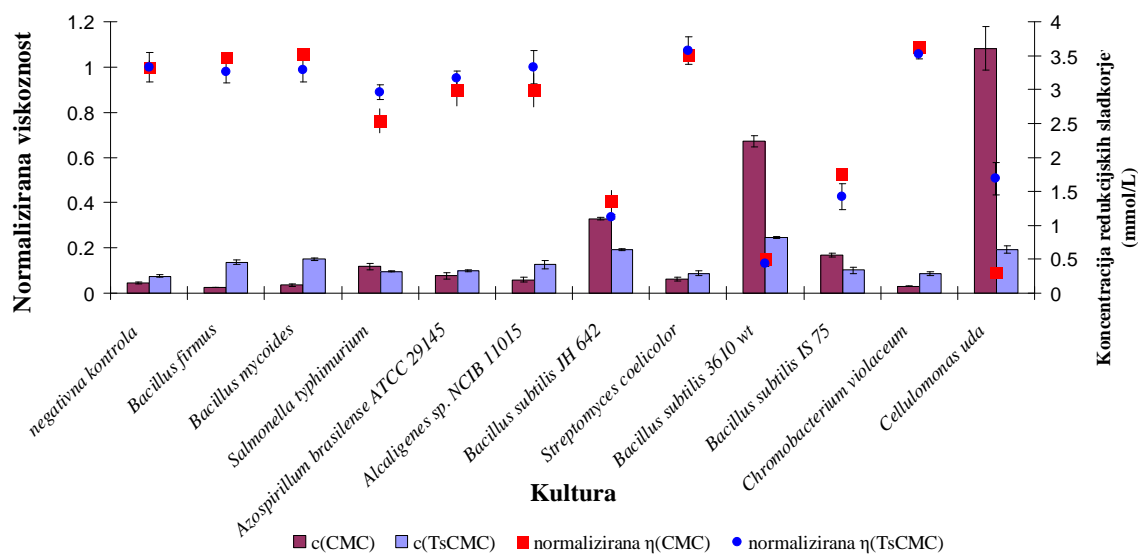


**Slika 8:** SAXS sipalne krivulje nerazgrajenih vzorcev karboksimetil celuloze (CMC) in tozilat karboksimetil celuloze (TsCMC) v BHM gojišču in vodi. Uporabili smo 1 % koncentracije derivatov.



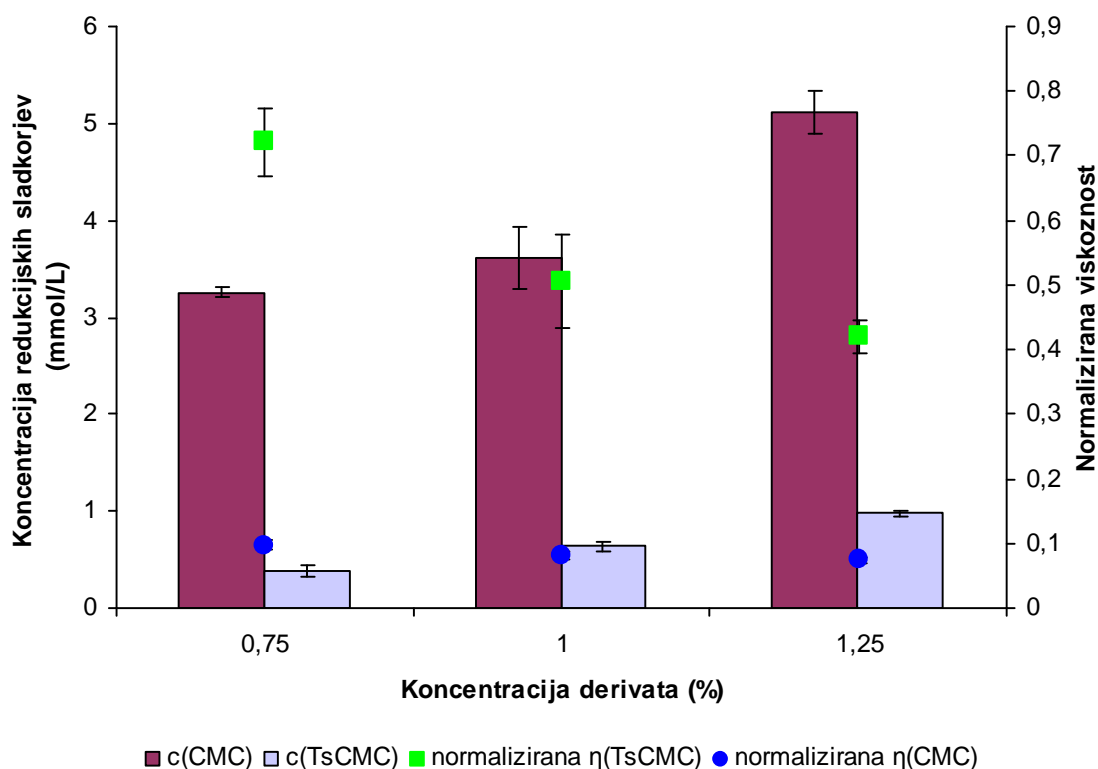
#### 4.2 BIORAZGRADNJA CMC IN TsCMC Z RAZLIČNIMI BAKTERIJSKIMI SEVI

Glede na to, da se CMC in TsCMC strukturno in reološko precej razlikujeta nas je zanimalo, kako te lastnosti vplivajo na biorazgradnjo obeh polimerov. Biorazgradnja CMC in TsCMC derivata z različnimi bakterijskimi sevi je prikazana na sliki 9. Rezultati koncentracij redukcijskih sladkorjev in viskoznosti kažejo, da je CMC najbolj razgradil sev *Cellulomonas uda*. Koncentracija redukcijskih sladkorjev je narasla na 3,6 mmol/L, medtem ko je viskoznost po končani inkubaciji padla na 9 % začetne viskoznosti. Sledijo *Bacillus subtilis* 3610 wt (2,2 mmol/L, 15 %), *Bacillus subtilis* JH 642 (1,1 mmol/L, 41 %) in *Bacillus subtilis* IS 75 (0,6 mmol/L, 53 %). TsCMC je glede na koncentracijo redukcijskih sladkorjev in normalizirano viskoznost najbolj razgradil *Bacillus subtilis* 3610 wt (0,8 mmol/L, 13 %), sledijo *Bacillus subtilis* JH 642 (0,6 mmol/L, 34 %), *Bacillus subtilis* IS 75 (0,3 mmol/L, 42 %) in *Cellulomonas uda* (0,6 mmol/L, 51 %). Bakterijski sevi *Bacillus firmus*, *Bacillus mycooides*, *Streptomyces coelicolor* in *Chromobacterium violaceum* niso uspeli rasti na CMC in TsCMC ter niso uspeli sprememni viskoznosti rastnega medija. Za nadaljnje delo smo uporabili bakterijo *Cellulomonas uda*.



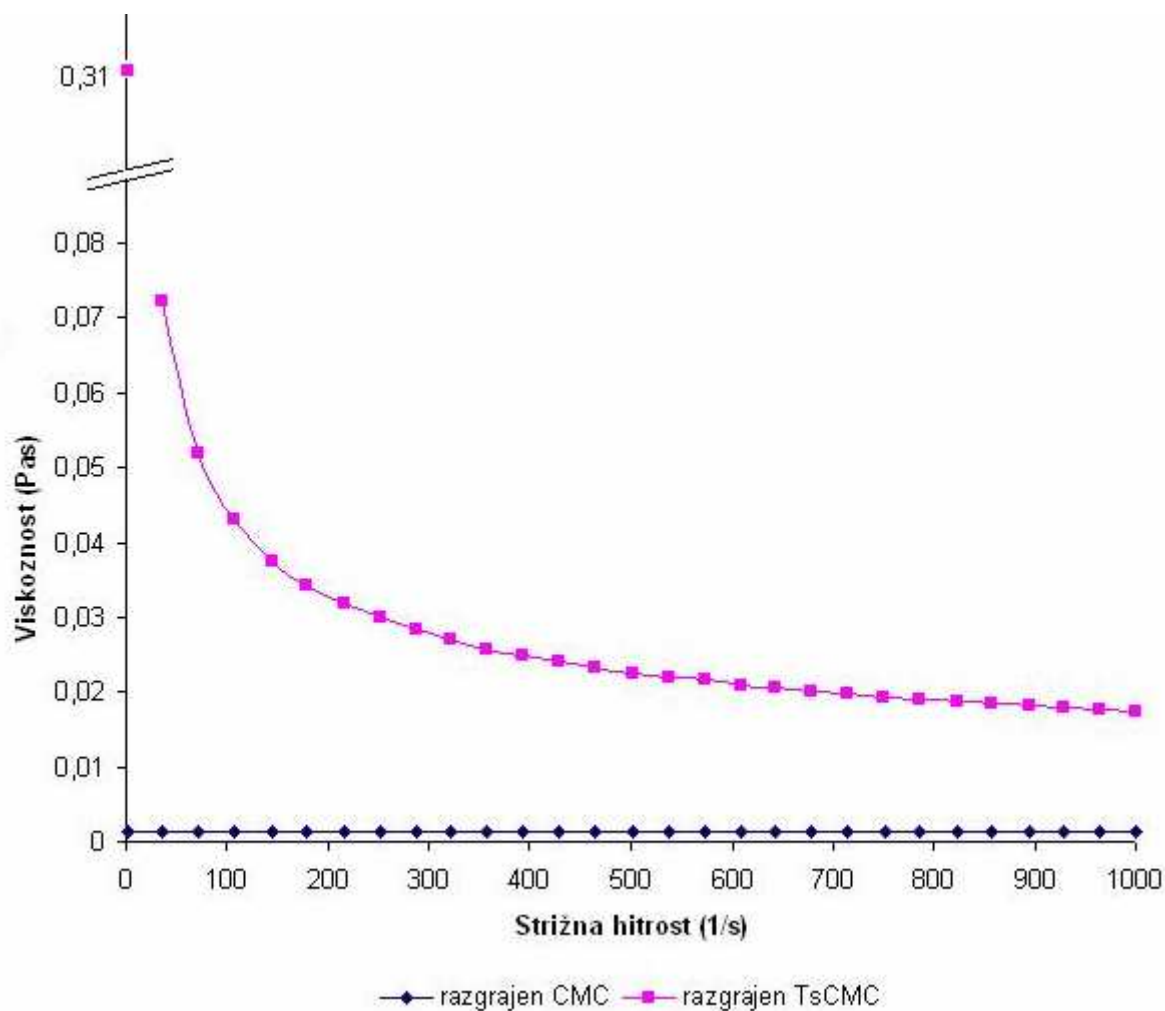
**Slika 9: Razgradnja karboksimetil celuloze (CMC) in tozilat karboksimetil celuloze (TsCMC) z različnimi bakterijskimi sevi.** Razgradnja je potekala en teden v tekočem BHM gojišču z 1 % CMC ( $M_w = 90$  kDa,  $DS = 0,7$ ) in BHM gojišču z 1 % TsCMC. Prikazana je povprečna vrednost in standardni odklon. Simbol c v legendi označuje koncentracijo redukcijskih sladkorjev, normalizirana  $\eta$  predstavlja viskoznost glede na viskoznost nerazgrajenega vzorca (negativna kontrola).

Biorazgradnja CMC in TsCMC je bila odvisna od koncentracije celuloznih derivatov. Kot je razvidno iz slike 12 je bila koncentracija redukcijskih sladkorjev pri najnižji koncentraciji celuloznih derivatov 3,3 mmol/L za CMC in 0,4 mmol/L za TsCMC. Z višanjem koncentracije celuloznih derivatov je koncentracija redukcijskih sladkorjev proporcionalno naraščala. Koncentracija redukcijskih sladkorjev v raztopinah CMC je vplivala na rast *Cellulomonas uda*. Optična gostota je bila najnižja pri najnižji koncentraciji redukcijskih sladkorjev ( $OD_{650} = 0,33$  a.u. na 0,75 % CMC). Skladno z naraščanjem koncentracije redukcijskih sladkorjev je padala vrednost za normalizirano viskoznost pri TsCMC. Normalizirana viskoznost se pri CMC z višanjem koncentracije CMC ni spreminjala.



**Slika 10: Razgradnja različnih koncentracij karboksimetil celuloze (CMC) in tozilat karboksimetil celuloze (TsCMC) s *Cellulomonas uda*.** Biorazgradnja je potekala en teden z bakterijo *Cellulomonas uda* v BHM gojiščih z 0,75 %, 1 % in 1,25 % CMC ( $M_w = 90$  kDa, DS = 0,7) in v BHM gojiščih z 0,75 %, 1 % in 1,25 % TsCMC. Prikazana je povprečna vrednost in standardni odklon. Simbol c v legendi predstavlja koncentracijo redukcijskih sladkorjev, normalizirana  $\eta$  predstavlja viskoznost glede na viskoznost nerazgredenega vzorca (negativna kontrola).

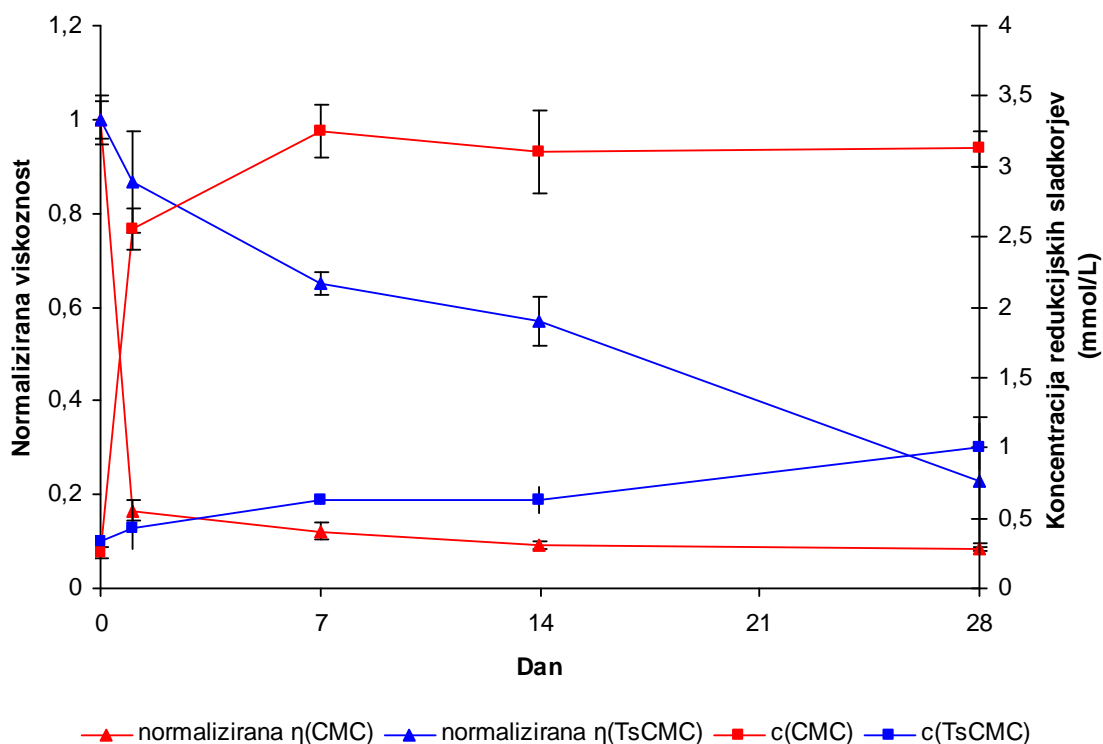
Kot je razvidno iz slike 11 je tokovno obnašanje TsCMC po enotedenski razgradnji s *Cellulomonas uda* še vedno psevdoplastično. Tokovno obnašanje CMC je po enotedenski razgradnji Newtonsko. Pri obeh derivatih se je viskoznost po razgradnji znižala. Padec je bil občutnejši pri CMC.



Slika 11: Reološko obnašanje karboksimetil celuloze (CMC) ( $M_w = 90$  kDa,  $DS = 0,7$ ) in tozilat karboksimetil celuloze (TsCMC) po enotedenski razgradnji s *Cellulomonas uda*. CMC in TsCMC sta bila raztopljena v BHM gojišču in avtoklavirana.

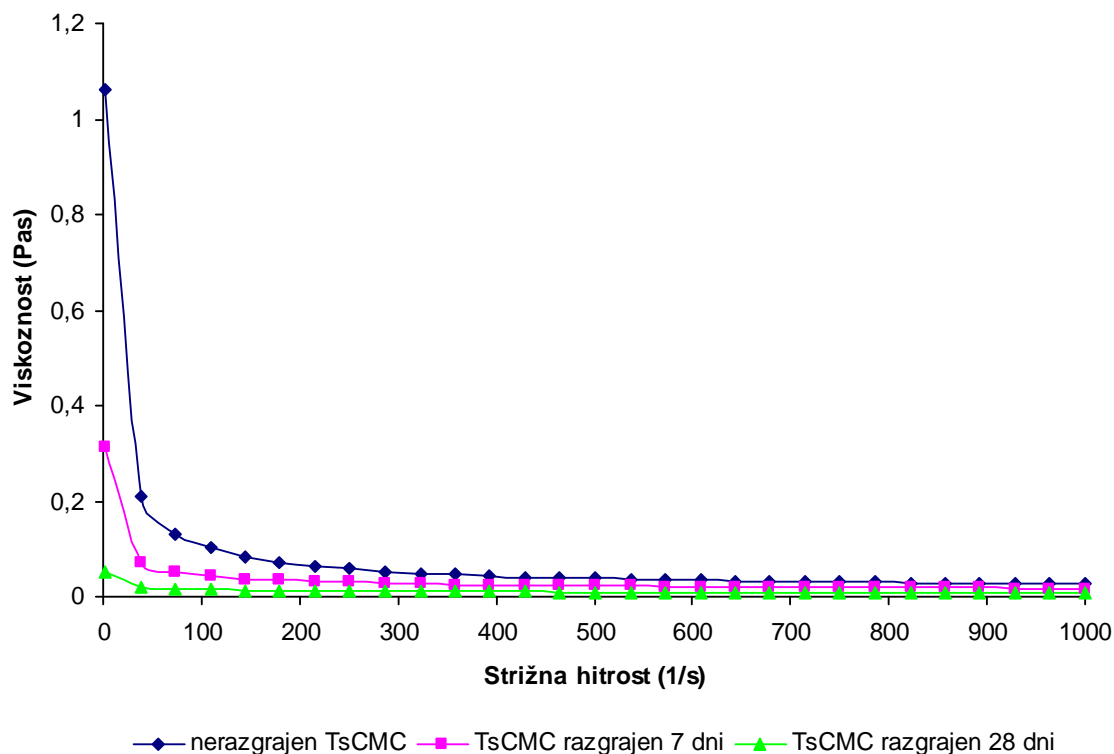
4.3 DINAMIKA BIORAZGRADNJE CMC IN TsCMC Z BAKTERIJO *Cellulomonas uda*

Dinamika razgradnje CMC in TsCMC je prikazana na sliki 12. Po enodnevni inkubaciji s CMC je koncentracija redukcijskih sladkorjev narasla na 2,6 mmol/L, kar je skoraj desetkratno povečanje glede na začetno stanje. Hkrati je viskoznost CMC po enodnevni inkubaciji padla na 17 % začetne vrednosti. Do konca poskusa (28 dni) je viskoznost CMC padla na 8 % začetne vrednosti. Maksimalna koncentracija redukcijskih sladkorjev (3,3 mmol/L) je bil dosežena po enem tednu. Na drugi strani je razgradnja TsCMC potekala postopoma. Po 7 dneh je viskoznost padla na 65 % začetne viskoznosti, koncentracija redukcijskih sladkorjev je narasla za 0,2 mmol/L. Ob koncu poskusa je koncentracija redukcijskih sladkorjev narasla na 1 mmol/L, viskoznost pa je padla na 23 odstotkov začetne viskoznosti. Končna viskoznost 1 % raztopine razgrajenega TsCMC je bila dvakrat višja kot začetna viskoznost 1 % raztopine CMC.



**Slika 12: Biorazgradnja karboksimetil celuloze (CMC) in tozilat karboksimetil celuloze (TsCMC) z bakterijo *Cellulomonas uda*.** Biorazgradnja je potekala z bakterijo *Cellulomonas uda* v BHM gojišču z 1 % CMC ( $M_w = 90$  kDa, DS = 0,7) in v BHM gojišču z 1 % TsCMC. Prikazana je povprečna vrednost in standardni odklon. Simbol c v legendi predstavlja koncentracijo redukcijskih sladkorjev, normalizirana  $\eta$  predstavlja viskoznost glede na viskoznost nerazgrejenega vzorca (negativna kontrola).

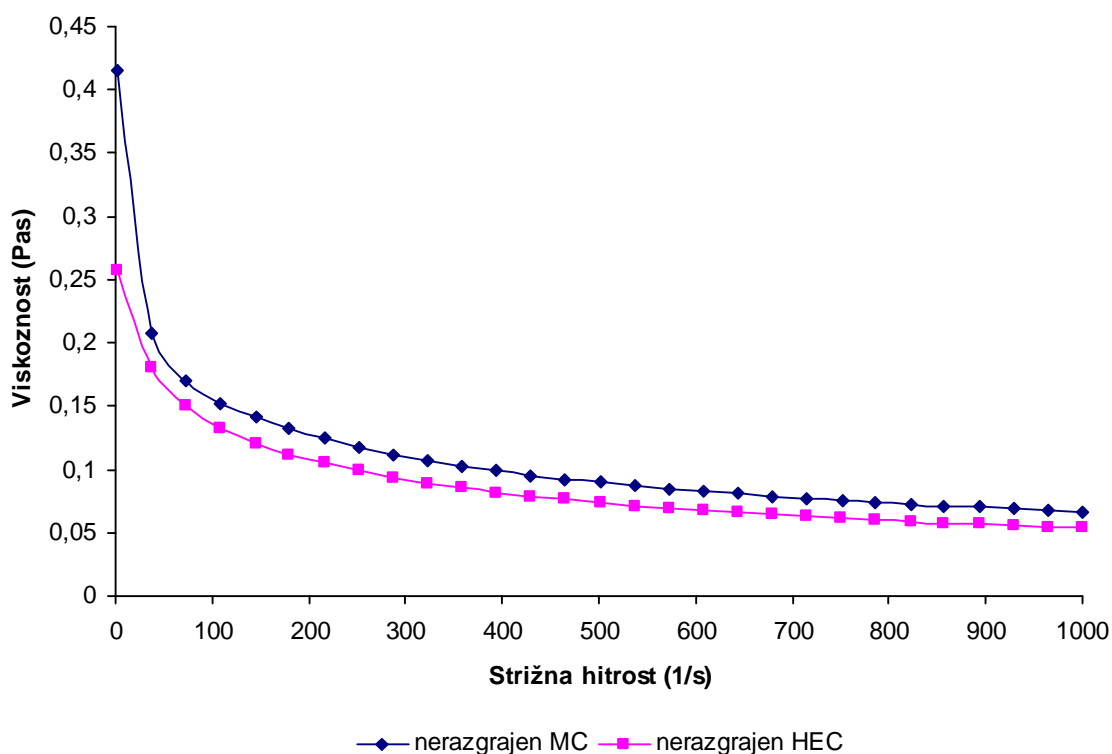
Poleg spremembe viskoznosti se je z inkubacijo spremenilo tudi reološko obnašanje TsCMC. Kot je razvidno iz slike 13 se je z daljšanjem inkubacije zmanjševala psevdoplastičnost TsCMC. Kljub temu je po 28 dneh inkubacije tokovno obnašanje delno razgrajenega TsCMC, za razliko od CMC, še vedno psevdoplastično.



**Slika 13: Reološko obnašanje tozilat karboksimetil celuloze (TsCMC) pri naraščajočih strižnih hitrostih.** TsCMC je bil raztopljen v BHM gojišču in avtoklaviran. Razgrajen TsCMC smo dobili po enotedenski in po štiritedenski inkubaciji s *Cellulomonas uda* pri 37 °C in s stresanjem pri 200 obratih na minuto.

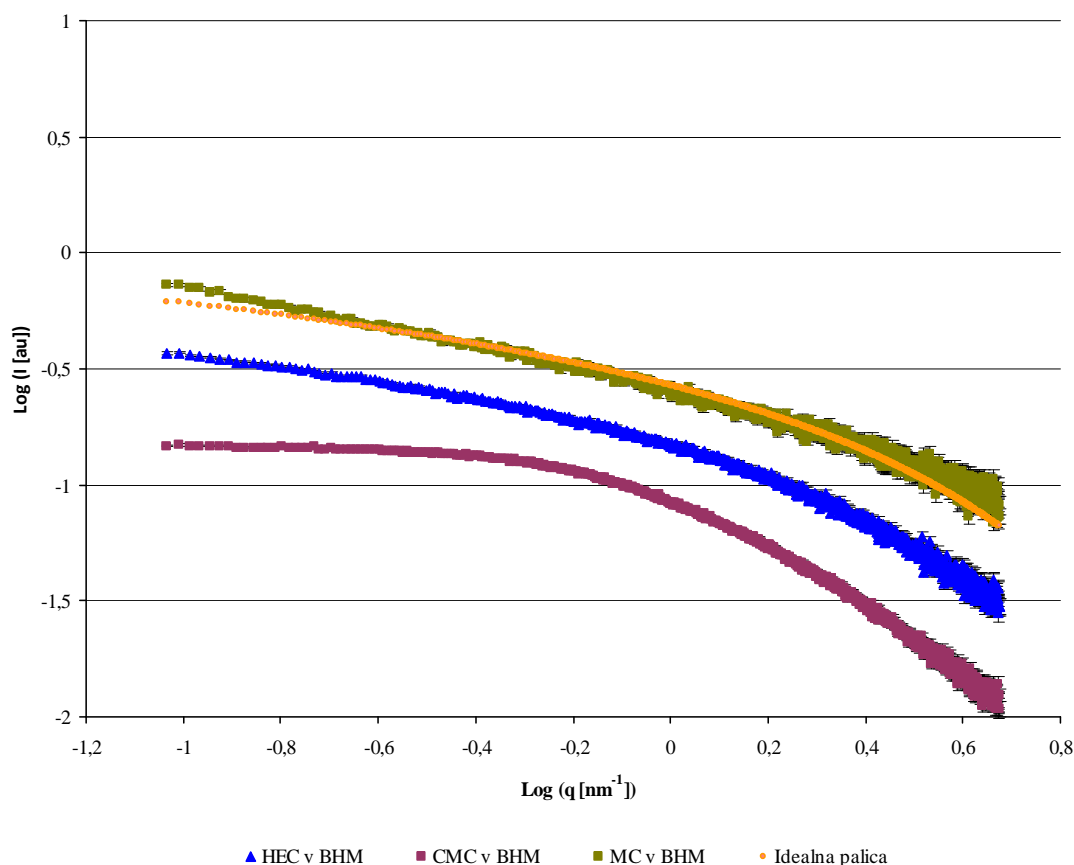
#### 4.4 STRUKTURA, REOLOGIJA IN BIORAZGRADNJA MC IN HEC Z BAKTERIJO *Cellulomonas uda*

Iz rezultatov o razgradnji novo sintetiziranega TsCMC je razvidno, da se obnaša precej različno od CMC. Da bi umestili lastnosti novo sintetiziranega TsCMC smo razgradnjo strukturo in reologijo primerjali s komercialno dostopnimi derivati celuloze MC in HEC. Na sliki 14 je prikazano tokovno obnašanje nerazgrajenih HEC in MC. Oba derivata se obnašata psevdoplastično, kar pomeni, da z naraščanjem strižne hitrosti pada viskoznost. Pri strižni hitrosti  $2 \text{ s}^{-1}$  je bila viskoznost MC 0,42 Pas, viskoznost HEC pa 0,26 Pas. Pri  $1000 \text{ s}^{-1}$  sta si viskoznosti MC (0,067 Pas) in HEC (0,054 Pas) precej podobni. Tokovno obnašanje MC in HEC je kvalitativno podobno obnašanju TsCMC.



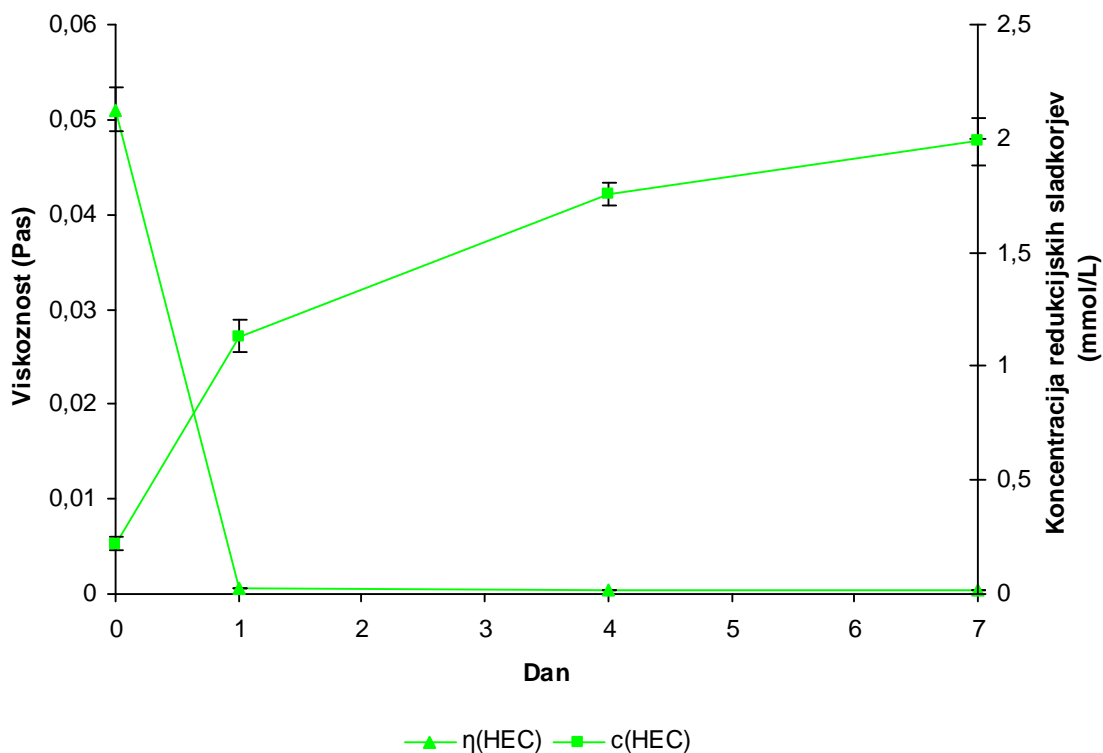
**Slika 14: Reološko obnašanje nerazgrajenih metil celuloze (MC) in hidroksietil celuloze (HEC) pri naraščajočih strižnih hitrostih.** MC in HEC sta bila raztopljena v BHM gojišču in avtoklavirana. Uporabili smo 1 % koncentracije MC in HEC.

Na sliki 15 so prikazane sipalne krivulje nerazgrajenih vzorcev HEC, MC in CMC v BHM gojišču. Za primerjavo je prikazana teoretična sipalna krivulja polimera v konformaciji toge palice, velikosti, ki ustreza  $M_w = 90$  kDa, brez intermolekularnih interakcij. Podobnost med teoretično sipalno krivuljo toge palice in krivuljo HEC in MC, nakazuje odsotnost izrazitih interakcij v raztopinah HEC in MC ter iztegnjeno konformacijo. Nasprotno se krivulja CMC v vodi, kjer so karboksimetilne skupine nabite, bistveno razlikuje od teoretične krivulje toge palice. Ker je prikazna krivulja toge palice osnovana na enaki moljski masi kot jo ima CMC, lahko sklepamo, da je razlika v prednjem delu sipalne krivulje posledica prisotnih medpolimernih interakcij. Razlika v sipalni krivulji na manjši skali nakazuje, da je CMC veriga manj toga, saj je v tem delu bolj podobna pol prožni verigi, ki je prikazana na sliki 8.



**Slika 15:** SAXS sipalne krivulje nerazgrajenih vzorcev hidroksietil celuloze (HEC), karboksimetil celuloze (CMC) ( $M_w = 90$  kDa,  $DS = 0,7$ ) in metil celuloze (MC) v BHM gojišču. Uporabili smo 1 % koncentracije derivatov CMC, HEC in MC.

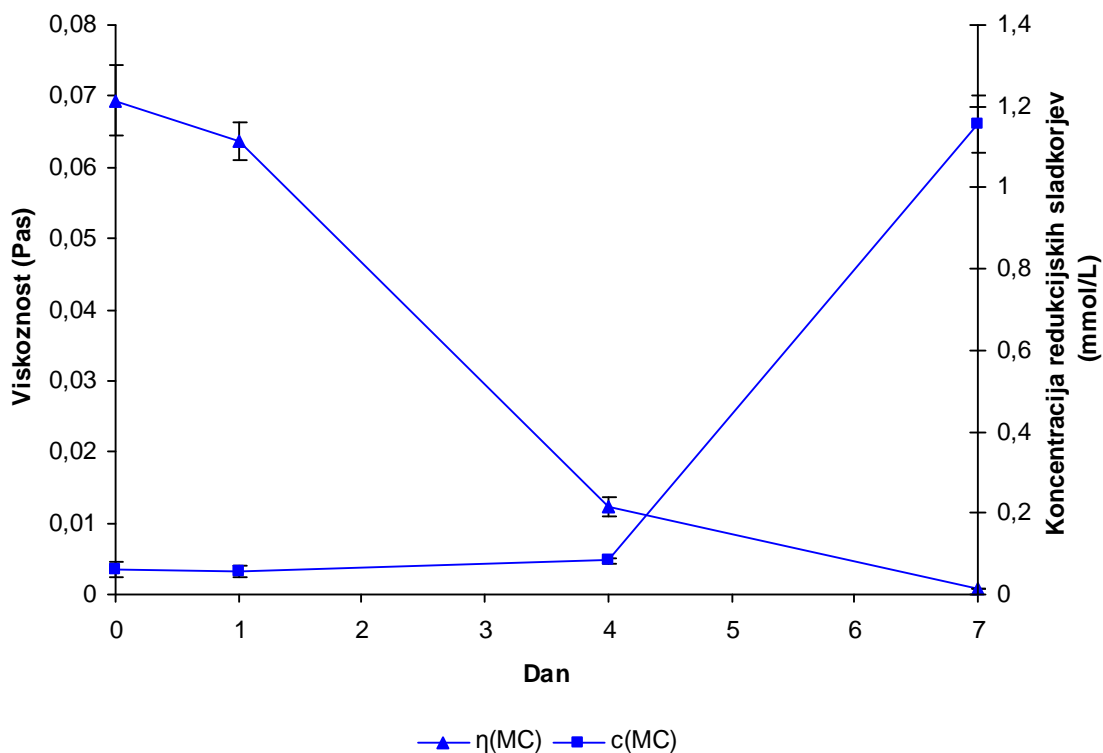
Dinamika biorazgradnje HEC je prikazana na sliki 16. Po enem dnevu inkubacije s *Cellulomonas uda* je koncentracija redukcijskih sladkorjev narasla za petkrat na 1,13 mmol/L, kar je povzročilo padec viskoznosti na manj kot odstotek začetne viskoznosti. Medtem, ko se v zadnjih šestih dneh inkubacije viskoznost skoraj ni več spreminjala se je koncentracija redukcijskih sladkorjev skoraj podvojila.



**Slika 16:** Biorazgradnja hidroksietil celuloze (HEC) z bakterijo *Cellulomonas uda*. Bakterijsko kulturo smo gojili v gojišču BHM z 1 % HEC.

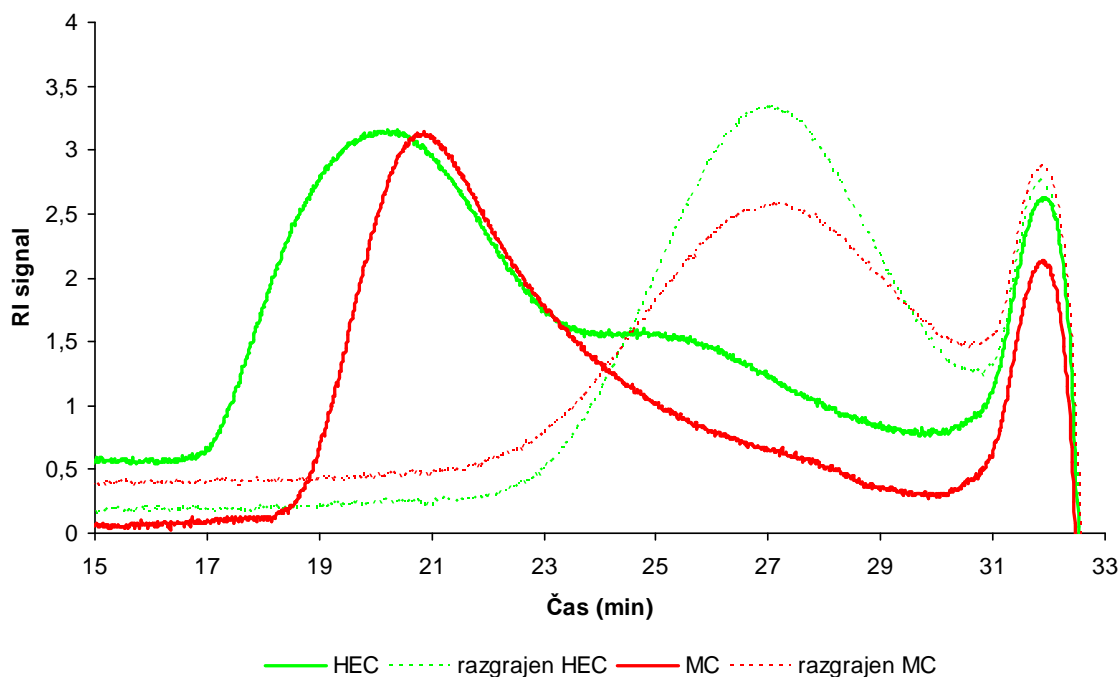


Za razliko od HEC rezultati s slike 17 nakazujejo, da je viskoznost MC po enodnevnih inkubaciji padla zelo malo. Po štirih dneh inkubacije je prišlo do večjega padca viskoznosti MC ob relativno skromnem porastu koncentracije redukcijskih sladkorjev. Po sedemdnevni inkubaciji je viskoznost MC padla na 1,1 % začetne viskoznosti, koncentracija redukcijskih sladkorjev pa je narasla na 1,2 mmol/L.



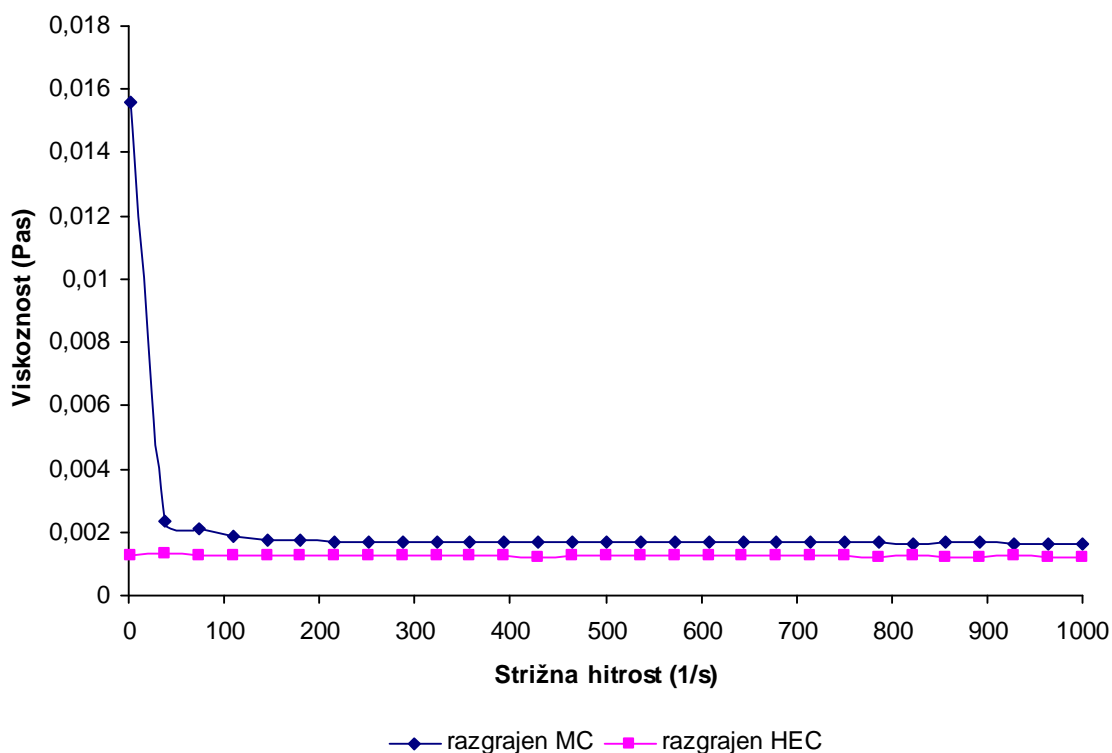
**Slika 17: Biorazgradnja metil celuloze (MC) z bakterijo *Cellulomonas uda*.** Bakterijsko kulturo smo gojili v gojišču BHM z 1 % MC.

HPLC-SEC kromatogrami na sliki 18 prikazujejo razlike v porazdelitvi velikosti delcev med razgradnjo HEC in MC. Nerazgrajena HEC in MC imata relativno velike delce. Nerazgrajeni HEC ima nekoliko širšo distribucijo in višjo molekulsko maso glede na elucijski čas. Z razgradnjo se elucijska časa obeh polimerov podaljšujeta, kar kaže, da sta polimera razgrajena na manjše enote.



**Slika 18: HPLC-SEC kromatogrami nerazgrajenih in razgrajenih vzorcev hidroksietil celuloze (HEC) in metil celuloze (MC).** Razgrajene vzorce smo pridobili po enotedenski inkubaciji s *Cellulomonas uda* pri 37 °C s stresanjem pri 200 obratih na minuto.

Biorazgradnja HEC in MC je vplivala na tokovno obnašanje MC in HEC raztopin. Kot je razvidno iz slike 19 je pri HEC prišlo do znatne spremembe tokovnega obnašanja. Medtem, ko se nerazgrajen HEC obnaša izrazito pseudoplastično, ima razgrajen HEC znatno nižjo viskoznost in Newtonsko tokovno obnašanje, ki je podobno obnašanju vodne raztopine. Razgrajen in nerazgrajen MC se obnašata pseudoplastično, vendar je viskoznost razgrajenega MC pri strižni hitrosti  $2 \text{ s}^{-1}$  (0,016 Pas) veliko nižja kot viskoznost nerazgrajenega MC (0,416 Pas) pri isti strižni hitrosti. Viskoznost razgrajenega MC pri strižni hitrosti  $1000 \text{ s}^{-1}$  je približno dvakrat večja od viskoznosti vode.



**Slika 19: Reološko obnašanje razgrajenih hidroksietil celuloze (HEC) in metil celuloze (MC) pri naraščajočih strižnih hitrostih.** MC in HEC sta bila raztopljena v BHM gojišču in avtoklavirana. Razgrajena HEC in MC smo pridobili po enotedenski inkubaciji s *Cellulomonas uda* pri  $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$  s stresanjem pri 200 obratih na minuto.

4.5 RAST BAKTERIJE *Cellulomonas uda* NA RAZLIČNIH DERIVATIH CELULOZE

Primerjava rasti bakterije *Cellulomonas uda* na različnih celuloznih derivatih, ki so predstavljali edini vir ogljika v gojišču je prikazana v preglednici 1. Bakterija je najbolj rasla na gojišču s CMC ( $M_w = 90$  kDa,  $DS = 0,7$ ), kjer je bil  $OD_{650}$  po sedmih dneh inkubacije  $0,34$  a.u. *Cellulomonas uda* na TsCMC ni uspela zrasti. Po sedmih dneh inkubacije je bil  $OD_{650} = 0,001$  a.u.. Pri MC in HEC je bila rast slabša kot na CMC.

**Preglednica 1: Rast bakterije *Cellulomonas uda* na različnih derivatih celuloze.** Uporabili smo tekoča BHM gojišča z 1 % derivata. Inkubacija je potekala 7 dni pri 37 °C. Vrednosti v tabeli predstavljajo optično gostoto,  $OD_{650}$  z enotami a.u.

Derivat \ čas (dan)	Optična gostota $OD_{650}$ (a. u.)		
	0	1	7
CMC	$0,04 \pm 0,01$	$0,30 \pm 0,01$	$0,34 \pm 0,02$
TsCMC	$0,03 \pm 0,01$	$0,03 \pm 0,01$	$0,00 \pm 0,01$
HEC	$0,03 \pm 0,01$	$0,07 \pm 0,01$	$0,09 \pm 0,01$
MC	$0,02 \pm 0,01$	$0,0 \pm 0,01$	$0,07 \pm 0,02$

## 5 RAZPRAVA IN SKLEPI

### 5.1 RAZPRAVA

Derivati celuloze so komercialno zelo pomembni polimeri, ki omogočajo spremembo viskoznosti izdelkov. Biorazgradnja derivatov na celulozni osnovi predstavlja velik gospodarski problem, saj zmanjšuje ekonomsko vrednost izdelkov. V tem delu smo strukturno in reološko opisali različne celulozne derivate. Predvsem nas je zanimalo kako različna struktura in sestava celuloznih derivatov vpliva na biorazgradnjo.

Uporabljeni celulozni derivati se razlikujejo glede na naravo substituent. CMC ima karboksimetilne substituentne ( $-\text{CH}_2\text{COONa}$ ), TsCMC ima poleg karboksimetilnih še tozilne substituentne, MC ima metilne substituentne ( $-\text{CH}_3$ ), HEC ima hidroksietilne substituentne ( $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ ). Vsi celulozni derivati imajo poleg substituent lahko še  $-\text{OH}$  skupine na mestih C2, C3 in C6. Kot kažejo rezultati imajo razlike v kemijski sestavi velik vpliv na strukturiranost polimerov v vodnih raztopinah. Medtem ko sta HEC in MC strukturno podobna iztegnjeni palici, so pri CMC zelo pomembne elektrostatske interakcije, ki izrazito spreminjajo strukturiranost celuloznih derivatov na veliki prostorski skali. V primeru, da elektrostatske interakcije zmanjšamo prihaja do povečane interakcije med sosednjimi verigami, kar je posledica zmanjšane elektrostatskega odboja. TsCMC je po svoji strukturiranosti bližje HEC in MC. Tudi odziv na dodatek soli kaže, da gre za strukturno precej spremenjen material glede na CMC. Toziliran material ima povečan hidrofobni karakter. Charpentier-Valenza in sod. (2005) so ugotovili, da so intermolekularne interakcije hidrofobno modificiranih CMC šibke in povzročijo stikajoče se preplete verig.

Strukturne razlike modificiranih celuloznih derivatov se poznajo tudi pri viskoznem obnašanju raztopin. Medtem, ko se CMC pri uporabljenih koncentracijah obnaša kot Newtonska tekočina, velja za vse ostale uporabljene celulozne derivate, da je njihovo tokovno obnašanje ne-Newtonsko. Pri višjih strižnih hitrostih pride do razvozlanja polimernih verig v raztopini oziroma do povečane orientacije polimernih verig v smeri toka (Clasen in Kulicke, 2001). Newtonsko obnašanje CMC lahko razložimo z bolj fleksibilno konformacijo v raztopini, saj so polimeri s fleksibilno konformacijo manj viskozni in imajo manjšo tendenco k psevdoplastičnosti. Psevdoplastičnost TsCMC, MC in HEC lahko razložimo z bolj togimi konformacijami glede na CMC. SAXS sipalne krivulje kažejo na zmanjšanje odbojnih interakcij v TsCMC, medtem ko sipalne krivulje nerazgrajenih vzorcev HEC in MC nakazujejo na odsotnost izrazitih interakcij v raztopinah in iztegnjeno konformacijo. Psevdoplastičnost HEC in MC je glede na SAXS sipalne krivulje posledica lažje orientacije iztegnjenih polimernih verig v smer toka, zaradi česar tudi pride do večjega padca viskoznosti že pri nižjih strižnih hitrostih.

Ker gre pri vseh derivatih celuloze za glikozidne povezave anhidridnih glukoznih enot je pričakovati, da bodo vsi celulozni derivati biorazgradljivi, vendar z različno dinamiko, ki je posledica različne kemijske sestave. Rezultati kažejo, da je najbolj razgradljiv celulozni derivat CMC (DS = 0,7), TsCMC pa je najmanj razgradljiv celulozni derivat. Sposobnost razgradnje celuloznih derivatov je pogojena z zmožnostjo proizvodnje in izločanja endogluknaz. Karlsson in sod. (2002) so pokazali, da nekatere endoglukanaze (npr. Hi Cel5A iz *Humicola insolens* in Tr Cel7B iz *Trichoderma reesei*) bolj učinkovito razgrajujejo CMC, kar se odraža v višjih koncentracijah redukcijskih sladkorjev in manjših molekulskih masah končnih produktov. Naši rezultati potrjujejo, da je sposobnost razgradnje CMC oziroma TsCMC odvisna od vrste uporabljenega bakterijskega seva.

Razgradljivost HEC je v primerjavi s CMC (DS = 0.7) dokaj podobna. Pri obeh polimerih viskoznost drastično pade po enem dnevu inkubacije. Medtem ko se koncentracija redukcijskih sladkorjev pri CMC takoj poveča se pri HEC počasi dviguje do konca inkubacije in doseže precej nižjo skupno koncentracijo. To odraža tudi pri znatni razliki med hitrostjo rasti bakterije *C. uda* na obeh polimerih; CMC omogoča relativno hitro rast, rast na HEC pa je počasna. Strukturno se polimera obnašata zelo različno. Neglede na različno dinamiko rasti je tokovno obnašanje razgrajenega CMC in HEC podobno - Newtonsko. Rezultati kažejo, da je dostopnost aktivnih mest za glikozidaze pri obeh polimerih dokaj velika, saj viskoznost pri obeh polimerih zelo hitro pade. Potrebno je poudariti, da za drastični padec viskoznosti ni potrebno verigo v celoti razgraditi. Dovolj je nekaj cepitev zelo dolgega polimera, da se viskoznost znatno spremeni.

Po drugi strani je biorazgradljivost TsCMC in MC precej drugačna od biorazgradljivosti CMC (DS = 0,7). Viskoznost z inkubacijo pada precej počasneje kot pri CMC. Koncentracije redukcijskih sladkorjev narašča počasi in ne doseže tretjine koncentracije redukcijskih sladkorjev pri CMC. Rezultati HPLC-SEC kažejo, da MC zelo verjetno ni docela razgrajen. Predpostavljamo, da na strukturiranost TsCMC v raztopini močno vplivajo hidrofobne aromatske interakcije med tozilnimi skupinami. Na zmanjšano aktivnost endoglukanaz pri TsCMC bi lahko negativno vplivale tudi vezi med aromatskimi skupinami aminokislin encima in aromatskimi tozilnimi skupinami TsCMC. Domnevamo, da tozilne skupine predstavljajo sterično oviro za dostop endogluknaz do substrata. Kljub razgradnji se MC in TsCMC še vedno obnašata psevdoplastično.

Rast bakterij je posledica privzema glukoze v celice, ki pa so ga zmožne samo bakterije, ki imajo eksoglukanaze in  $\beta$ -glukozidaze s katerimi dodatno razgradijo verige celuloznega derivata. Znano je, da je bakterija *Cellulomonas uda* sposobna razgraditi

mikrokristalinično celulozo (Stoppok in sod., 1982), kar potrjuje njeno sposobnost proizvodnje eksoglukanaz in  $\beta$ -glukozidaz. Thayer in sod. (1984) potrjujejo, da imajo endoglukanaze predvsem depolimerizacijsko aktivnost, medtem ko je njihova saharifikacijska aktivnost mnogo manjša. Saharifikacija je proces, ko encimi oligosaharide razgradijo na enostavne sladkorje, to so v primeru celuloze glukozne enote. Za saharifikacijo oligosaharidov so ključne eksoglukanaze in  $\beta$ -glukozidaze ki zvišajo koncentracijo redukcijskih sladkorjev bolj kot endoglukanaze (Robson in Chambliss, 1989). Rast *Cellulomonas uda* po enotedenski inkubaciji je bila najboljša na CMC. Na HEC in MC je *Cellulomonas uda* rasla precej slabše medtem, ko na TsCMC *Cellulomonas uda* ni rasla, kljub temu, da je koncentracija redukcijskih sladkorjev narasla. Domnevamo, da endoglukanaze *Cellulomonas uda* niso mogle nadalje razgraditi razgradnih produktov TsCMC in zato ni bila možna saharifikacija razgradnih produktov TsCMC.

## 5.2 SKLEPI

- Substituente celuloznih derivatov vplivajo na strukturo in tokovno obnašanje raztopin derivatov celuloze; tozilne, metilne in hidroksietilne substituyente povečajo psevdoplastičnost, karboksimetilne substituyente pa povzročijo Newtonsko obnašanje raztopine.
- Povečana hidrofobnost celuloznih derivatov sovпада z znižano biorazgradljivostjo.
- Novosintetizirani derivat celuloze TsCMC kaže manjšo biorazgradljivost v primerjavi s CMC, MC in HEC.

## 6 POVZETEK

Celulozni derivati nastanejo z vezavo substituent na eno izmed treh OH skupin glukozne enote v celulozni verigi. V našem magistrskem delu smo uporabljali celulozne derivate s karboksimetilnimi (CMC), hidroksietilnimi (HEC), metilnimi (MC), ter karboksimetilnimi in tozilnimi substituentami (TsCMC). Celulozni derivati v vodnih raztopinah se uporabljajo kot zgoščevalci, veziva, emulgatorji in stabilizatorji. Uporabljajo se tudi zaradi njihovega psevdoplastičnega in tiksotropnega obnašanja, kapacitete zadrževanja vode, kapacitete formiranja filmov in površinske aktivnosti (Clasen in Kulicke, 2001). Razgradnja celuloznega derivata povzroči izgubo viskoznosti in dvig koncentracije redukcijskih sladkorjev. Za depolimerizacijo celuloznih derivatov so potrebne samo endoglikanaze. Višja stopnja substitucije in večje substituentne zmanjšujejo razgradljivost celuloznih derivatov.

Rezultati kažejo, da je viskoznost 1 % raztopine TsCMC nekajkrat višja kot 1 % raztopina CMC, čeprav je intrinzična viskoznost ista. Višja viskoznost TsCMC je verjetno posledica intermolekularnih povezav med aromatskimi tozilnimi skupinami in bolj toge konformacije TsCMC. Nerazgrajen TsCMC se obnaša psevdoplastično, nerazgrajen CMC pa Newtonsko. SAXS sipalne krivulje kažejo zmanjšanje odbojnih interakcij pri TsCMC in bolj togo konformacijo kot pri CMC ( $DS = 0,7$ ). CMC in TsCMC lahko razgradijo nekateri sevi *Bacillus subtilis* in bakterija *Cellulomonas uda*. Po razgradnji je tokovno obnašanje TsCMC ostalo psevdoplastično.

MC in HEC imata psevdoplastično tokovno obnašanje. Za razliko od CMC ( $DS = 0,7$ ) pri MC in HEC nismo zaznali odbojnih interakcij, glede na SAXS sipalne krivulje pa imata MC in HEC bolj togo konformacijo kot CMC. Razgradljivost HEC je velika, kar se odraža v hitrem padcu viskoznosti in hitremu porastu koncentracije redukcijskih sladkorjev. MC je slabše biorazgradljiv, kar se odraža v počasnejšem padcu viskoznosti in manjši koncentraciji redukcijskih sladkorjev. Razgrajen HEC ima Newtonsko tokovno obnašanje, razgrajen MC pa ima psevdoplastično tokovno obnašanje.

Primerjava rasti bakterije *Cellulomonas uda* pokaže, da bakterija najbolje raste na CMC, precej slabše na MC in HEC, medtem ko na TsCMC bakterija ni rasla. To kaže, da bi TsCMC lahko bil zanimiv nov derivat celuloze z izrazito zmanjšano biorazgradljivostjo in kot tak primeren za aplikacije, kjer je bremenitev izdelkov z mikroorganizmi velika.



## 7 VIRI

- Baar A., Kulicke W.-M., Szablikowski K., Kiesewetter R. 1994. Nuclear magnetic resonance spectroscopic characterization of carboxymethylcellulose. *Macromolecular Chemistry and Physics*, 195, 5: 1483-1492.
- Bär A., van Ommen B., Timonen M. 1995a. Metabolic disposition in rats of regular and enzymatically depolymerized sodium carboxymethylcellulose. *Food and Chemical Toxicology*, 33: 901 – 907.
- Bär A., Til H.P., Timonen M. 1995b. Subchronic oral toxicity study with regular and enzymatically depolymerized sodium carboxymethylcellulose in rats. *Food and Chemical Toxicology*, 33: 909 – 917.
- Bisaria V.S., Ghose T.K. 1981. Biodegradation of cellulosic materials: substrates, microorganisms, enzymes and products. *Enzyme and Microbial Technology*, 3, 2: 90-104.
- Black H.C. 1951. Determination of sodium carboxymethylcellulose in detergent mixtures by the anthrone method. *Analytical Chemistry*, 23: 1792-1795.
- Brauns F.E., Brauns D.A. 1960. The chemistry of lignin covering the literature for the 1949-1958. San Diego, Academic Press: 804 str.
- Bushnell L. D., Haas H. F. 1941. The utilization of certain hydrocarbons by microorganisms. *Journal of Bacteriology*, 41, 5: 653-673.
- 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.
- 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.
- Diftis N., Kiosseoglou V. 2003. Improvement of emulsifying properties of soybean protein isolate by conjugation with carboxymethyl cellulose. *Food Chemistry*, 81: 1-6.
- Din N., Damude H.G., Gilkes N.R., Miller R.C., Warren R.A.J., Kilburn D.G. 1994. C<sub>1</sub>-C<sub>x</sub> revisited: intramolecular synergism in a cellulase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91: 11383-11387.
- Doblekar M. 2012. Sinteza in reološke lastnosti karboksometil celuloznih tozilatov. Diplomsko delo. Ljubljana, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Visokošolski strokovni študijski program kemijske tehnologije: 33 str.
- Dolz M., Jiménez J., Jesús Hernández M., Delegido J., Casanovas A. 2007. Flow and thixotropy of non-contaminating oil drilling fluids formulated with bentonite and sodium carboxymethyl cellulose. *Journal of Petroleum Science and Engineering*, 57: 294-302.
- Earl A.M., Losick R., Kolter R. 2008. Ecology and genomics of *Bacillus subtilis*. *Trends in Microbiology*, 16, 6: 269-275.
- Enebro J., Momcilovic D., Siika-aho M., Karlsson S. 2009. Investigation of endoglucanase selectivity on carboxymethyl cellulose by mass spectrometric techniques. *Cellulose*, 16: 271-280.
- 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.
- Ghose T.K. 1987. Measurement of cellulase activities. *Pure and Applied Chemistry*, 59, 2: 257-268.

- Glasser W.G., McCartney B.K., Samaranayake G. 1994. Cellulose derivatives with low degree of substitution. 3. the biodegradability of cellulose esters using a simple enzyme assay. *Biotechnology Progress*, 10, 2: 214-219.
- Glatter O., Kratky O. 1982. *Small angle X-ray scattering*. London, Academic Press: 515 str.
- 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.
- 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.
- Hashem H., Refaie R., Goli K., Smithand B., Hauser P. 2009. Enhancement of wrinkle free properties of carboxymethylated cotton fabric via ionic crosslinking with poly(vinylpyrrolidone). *Journal of Industrial Textiles*, 39: 57-80.
- Hollabaugh C.B., Burt L.H., Peterson Walsh A. 1945. Carboxymethyl cellulose - uses and applications. *Industrial & Engineering Chemistry*, 37: 943-947.
- Horner S., Puls J., Saake B., Klohr E.-A., Thielking H. 1999. Enzyme-aided characterisation of carboxymethylcellulose. *Carbohydrate Polymers*, 40: 1-7.
- 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.
- Karlsson J., Momcilovic D., Wittgren B., Schülein M., Tjerneld F., Brinkmalm G. 2002. Enzymatic degradation of carboxymethyl cellulose hydrolyzed by the endoglucanases Cel5A, Cel7B, and Cel45A from *Humicola insolens* and Cel7B, Cel12A, and Cel45Acore from *Trichoderma reesei*. *Biopolymers*, 63: 32-40.
- 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.
- 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., Borriss 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.
- 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.
- Marchessault R.H., Sundararajan P.R. 1983. *Cellulose. V: Polysaccharides*. Vol. 2. Aspinall G. (ed.). New York, Academic Press: 11-95.
- Mardanov A.V., Kochetkova T.V., Beletsky A.V., Bonch-Osmolovskaya E.A., Ravin N.V., Skryabin K.G. 2012. Complete genome sequence of the hyperthermophilic cellulolytic Crenarchaeon »*Thermogladius cellulolyticus*« 1633. *Journal of Bacteriology*, 194, 16: 4446-4447.
- Miller G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31, 3: 426-428.

- Nakano M.M., Dailly Y.P., Zuber P., Clark D.P. 1997. Characterization of anaerobic fermentative growth of *Bacillus subtilis*: identification of fermentation end products and genes required for growth. *Journal of Bacteriology*, 179: 6749-6755.
- Orehek J., Dogša I., Tomšič M., Jamnik A., Kočar D., Stopar D. 2013. Structural investigation of carboxymethyl cellulose biodeterioration by *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* NCIB 3610. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 77: 10-17.
- O'Sullivan A. 1997. Cellulose: the structure slowly unravels. *Cellulose*, 4: 173-207.
- Park J.-S., Park J.-W., Ruckenstein E. 2001. Thermal and dynamic mechanical analysis of PVA/MC blend hydrogels. *Polymer*, 42: 4271-4280.
- Pawlik M., Laskowski J.S., Ansari A. 2003. Effect of carboxymethyl cellulose and ionic strength on stability of mineral suspensions in potash ore flotation systems. *Journal of Colloid and Interface Science*, 260: 251-258.
- Pétre D., Millet J., Longin R., Béguin P., Girard H., Aubert J.P. 1986. Purification and properties of the endoglucanase C of *Clostridium thermocellum* produced in *Escherichia coli*. *Biochimie*, 68, 5: 687-695.
- Priest F.G. 1977. Extracellular enzyme synthesis in the genus *Bacillus*. *Bacteriological Reviews*, 41, 3: 711-753.
- Purves C.B. 1954. Chemical nature of cellulose and its derivatives. V: Cellulose and cellulose derivatives, Part 1. Ott E., Spurlin H.M., Grafflin M.W. (eds.). New York, Wiley-Interscience: 29-98.
- Rapp P., Beerman A. 1991. Bacterial cellulases. V: Biosynthesis and biodegradation of cellulose. Haigler C.H., Wiemer P.J. (eds.). New York, Marcel Dekker: 535-595.
- 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. 1984. Characterization of the cellulolytic activity of a *Bacillus* isolate. *Applied and Environmental Microbiology*, 47, 5: 1039-1046.
- 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.
- Swarcz W.H. 2001. The cellulosome and cellulose degradation by anaerobic bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 56: 634-649.
- Seidel A. 2013. Modifizierte natürliche Verdicker: Hydroxyethylcellulose. Berlin, Fachinformationszentrum Chemie: 1 str.  
<http://www.chemgapedia.de/vsengine/vlu/vsc/de/ch/9/mac/funktionspolymere/verdicker/verdickungsmittel.vlu/Page/vsc/de/ch/9/mac/funktionspolymere/verdicker/hecell.vscml.html> (januar 2013)
- 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.
- Simčič A. 2011. Biorazgradnja derivatov celuloze z bakterijo *Cellulomonas uda*. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije: 57 str.
- Sjoström E. 1981. Wood chemistry: fundamentals and applications. New York, Academic Press: 223 str.
- Spurlin H.M. 1939. Arrangement of substituents in cellulose derivatives. *Journal of the American Chemical Society*, 61, 8: 2222-2227.

- Springle W.R. 1988. Liquifaction of cellulosic paint thickeners. Part 1. degradative effects of redox and enzymic contamination. *Journal of Oil and Colour Chemists Association*, 71: 34-38.
- Stackebrandt E., Kandler O. 1979. Taxonomy of the genus *Cellulomonas*, based on phenotypic characters and deoxyribonucleic acid-deoxyribonucleic acid homology, and proposal of seven neotype strains. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 29, 4: 273-282.
- Stoppok W., Rapp P., Wagner F. 1982. Formation, location, and regulation of endo-1,4- $\beta$ -glucanases and  $\beta$ -glucosidases from *Cellulomonas uda*. *Applied and Environmental Microbiology*, 44, 1: 44-53.
- Sukumaran R.K., Singhanian R.R., Pandey A. 2005. Microbial cellulases – production, applications and challenges. *Journal of Scientific & Industrial Research*, 64: 832-844.
- Teeri T.T. 1997. Crystalline cellulose degradation: new insight into the function cellobiohydrolases. *Trends in Biotechnology*, 15: 160-167.
- Thayer D.W. 1978. Carboxymethylcellulase produced by facultative bacteria from the hind-gut of the termite *Reticulitermes hesperus*. *Journal of General Microbiology*, 106, 1: 13-18.
- 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. 7<sup>th</sup> 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.
- Vink H. 1966. Degradation of cellulose and cellulose derivatives by acid hydrolysis. *Die Makromolekulare Chemie*, 94: 1-14.
- Zhou S., Ingram L.O. 2000. Synergistic hydrolysis of carboxymethyl cellulose and acid-swollen cellulose by two endoglucanases (Cel Z and CelY) from *Erwinia chrysanthemi*. *Journal of Bacteriology*, 182, 20: 5676-5682.
- Zhu X., Jiang D., Tan S. 2001. Improvement in the strength of reticulated porous ceramics by vacuum degassing. *Materials Letters*, 51: 363-367.

## **ZAHVALA**

Zahvaljujem se mentorju prof. dr. Davidu Stoparju za pomoč in popravke, ter za strokovne nasvete pri načrtovanju poteka magistrskega dela.

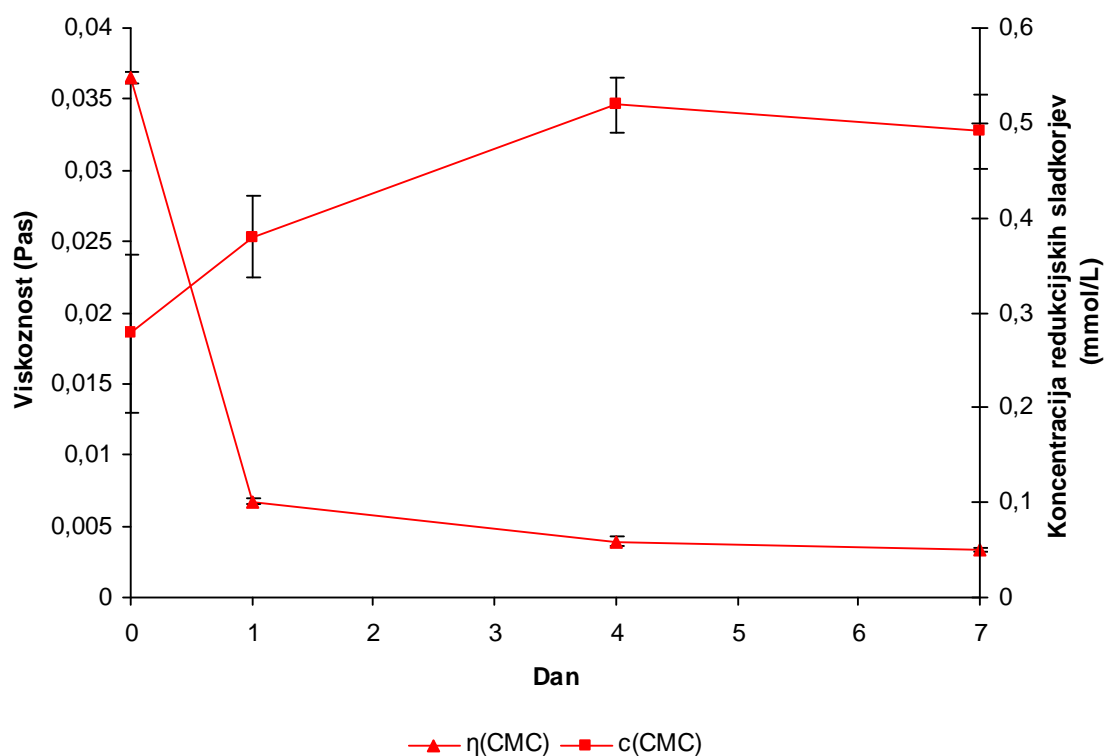
Zahvaljujem se tudi somentorju dr. Iztoku Dogši za izvedbo meritev SAXS in za pomoč pri interpretaciji rezultatov SAXS meritev. Prav tako se dr. Dogši zahvaljujem za popravke in nasvete, ki mi jih je dal med pisanjem magistrskega dela.

Posebna zahvala gre mojemu delovnemu mentorju Janezu Orehku, ki je načrtoval izvedbo laboratorijskega dela in mi pomagal s konkretnimi nasveti pri laboratorijskem delu. Hvala za vse ostale napotke in razlage.

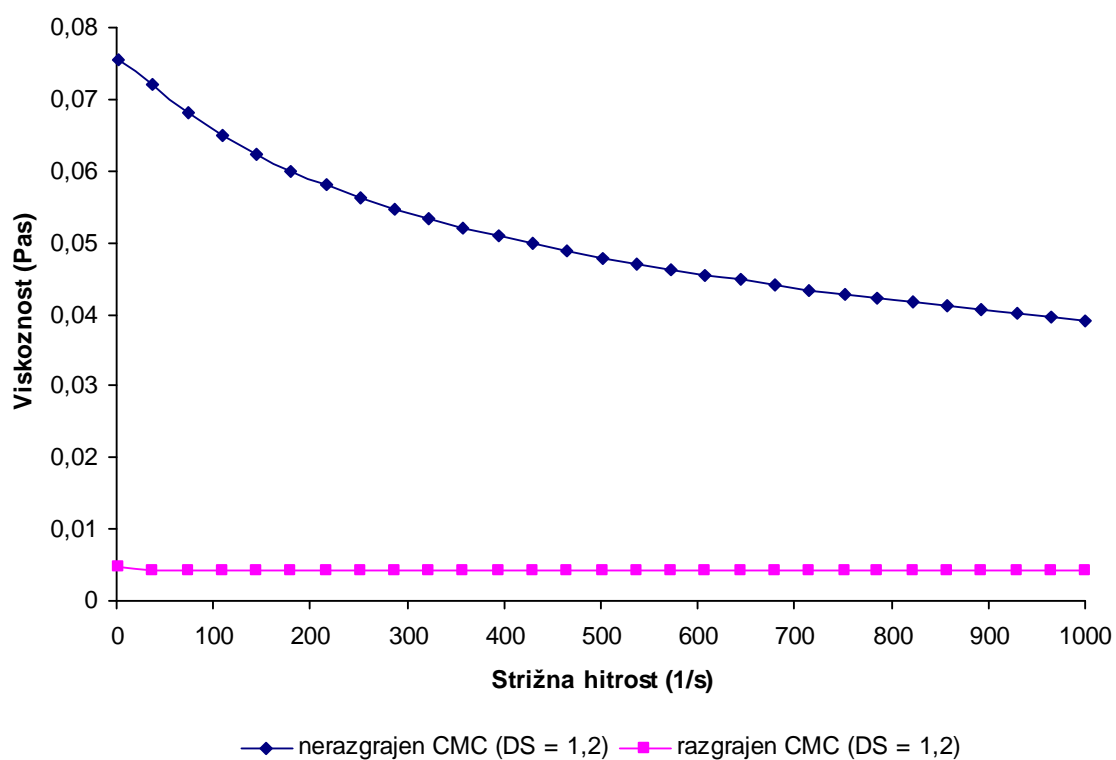
Zahvala gre tudi vsem zaposlenim na Katedri za mikrobiologijo, Oddelka za živilstvo, ki so mi kakorkoli pomagali pri nastajanju magistrskega dela.

Zahvaljujem se tudi staršem za vso moralno in finančno podporo med časom študija.

## PRILOGE



**Priloga A: Biorazgradnja karboksimetil celuloze CMC (DS = 1,2) z bakterijo *Cellulomonas uda*.** Bakterijsko kulturo smo gojili v tekočem gojišču z 1 % CMC (DS = 1,2).



**Priloga B: Reološko obnašanje karboksimetil celuloze (CMC) DS = 1,2 pri naraščajočih strižnih hitrostih.** CMC je bil raztopljen v BHM gojišču in avtoklaviran. Razgrajen CMC smo dobili po enotedenski inkubaciji s *Cellulomonas uda* pri 37 °C in s stresanjem pri 200 obratih na minuto.