

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Anja SIMČIČ

**BIORAZGRADNJA DERIVATOV CELULOZE Z
BAKTERIJO *Cellulomonas uda***

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

Ljubljana, 2011

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Anja SIMČIČ

BIORAZGRADNJA DERIVATOV CELULOZE Z BAKTERIJO
Cellulomonas uda

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

BIODEGRADATION OF CELLULOSE DERIVATIVES WITH
BACTERIUM *Cellulomonas uda*

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2011

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija mikrobiologije na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Meritve viskoznosti so bile opravljene v TRC-JUB d.o.o., ostalo raziskovalno delo je potekalo na Katedri za mikrobiologijo, Oddelka za živilstvo, Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Za mentorja diplomske naloge je imenovan prof. dr. David Stopar in za recenzentko prof. dr. Romana Marinšek-Logar.

Mentor: prof. dr. David Stopar

Recenzentka: prof. dr. Romana Marinšek-Logar

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Ines Mandić-Mulec
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

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

Članica: prof. dr. Romana Marinšek-Logar
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Datum zagovora:

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Anja Simčič

KLJUČNA INFORMACIJSKA DOKUMENTACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 579.66+602.3:579.873:661.728.89(043)=163.6
KG	karboksimetil celuloza/hidroksietil celuloza/biorazgradnja/ <i>Cellulomonas uda</i> /celulaze/reducirajoči konci/viskoznost/HPLC/reogrami
AV	SIMČIČ, Anja
SA	STOPAR, David (mentor)/MARINŠEK-LOGAR, Romana (recenzentka)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
LI	2011
IN	BIORAZGRADNJA DERIVATOV CELULOZE Z BAKTERIJO <i>Cellulomonas uda</i>
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	X, 39 str., 2 pregl., 19 sl., 3 pril., 43 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Karboksimetil celuloza (CMC) in hidroksietil celuloza (HEC) sta vodotopna etra celuloze z značilnim psevdoplastičnim reološkim obnašanjem in v raztopini opravljata vlogo gostila, stabilizatorja in emulgatorja. Uporabljata se v različnih industrijskih aplikacijah in produktih, vendar v primeru kontaminacije s celulolitičnimi mikroorganizmi produkti izgubijo značilne reološke lastnosti in postanejo neuporabni. V diplomski nalogi smo proučevali, kako različne strukturne modifikacije vplivajo na biorazgradnjo celuloznih derivatov. Kot modelni mikroorganizem smo uporabili bakterijo <i>Cellulomonas uda</i> , saj je sposobna izrabljati derivate celuloze kot edini vir ogljika. Spremljali smo hitrost rasti bakterijske kulture, reducirajoče konce in viskoznost, razlike v velikosti polimerov med razgrajenimi in nerazgrajenimi vzorci CMC smo ugotavljali s HPLC. Pri spremljanju razgradnje CMC s stopnjami substituiranosti 0.7, 0.9 in 1.2 smo ugotovili, da je razgradnja najboljša pri najnižji stopnji. Na razgradnjo vpliva tudi molska masa CMC. Razgradnja CMC je potekala primerljivo pri 28 °C in 37 °C. Potrdili smo, da so najbolj biostabilni tisti tipi HEC, ki nimajo nesubstituiranih regij. Ugotovili smo tudi, da so celulaze, pridobljene iz izrabljenega gojišča s CMC, manj učinkovite pri razgradnji HEC. Rezultati encimske in bakterijske razgradnje HEC nakazujejo, da je bakterija <i>C. uda</i> sposobna sinteze različnih tipov celulaz.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn

DC UDC 579.66+602.3:579.873:661.728.89(043)=163.6

CX carboxymethyl cellulose/hydroxyethyl cellulose/biodegradation/*Cellulomonas uda*/cellulases/reducing sugars/viscosity/HPLC/flow curve

AU SIMČIČ, Anja

AA STOPAR, David (supervisor)/MARINŠEK-LOGAR, Romana (reviewer)

PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101

PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology

PY 2011

TI BIODEGRADATION OF CELLULOSE DERIVATIVES WITH BACTERIUM *Cellulomonas uda*

DT Graduation Thesis (University studies)

NO X, 39 p., 2 tab., 19 fig., 3 ann., 43 ref.

LA sl

AL sl/en

AB Carboxymethyl cellulose (CMC) and hydroxyethyl cellulose (HEC) are water-soluble cellulose ethers with specific pseudoplastic behavior. In a solution they can be used as thickeners, stabilizers and emulsifiers. Because of their versatile properties cellulose derivatives are used in many industrial applications and products, but in the case of contamination with cellulolytic microorganisms these products lose rheological features and become useless. In a graduation thesis we have studied how different structural modifications affect biodegradation of cellulose derivatives. Bacterium *Cellulomonas uda* was used as model microorganism, because it can grow on cellulose derivatives as a sole source of carbon. We have monitored growth of microorganisms, reducing sugars concentrations, viscosity, and particle size by HPLC. Degradation of CMC with different degrees of substitution (0.7, 0.9 and 1.2) was most efficient at degree 0.7. In addition the results indicate that molar mass affects degradation of CMC. Biodegradation of CMC was as efficient at both 28 °C and 37 °C. We confirmed that HEC with all regions substituted was the most biostabile polymer. We also came to conclusion that cellulases isolated from the growth medium with CMC, are less efficient for degradation of HEC. The resultants of enzymatic and bacterial degradation of HEC suggest that bacterium *C. uda* is able to produce different types of cellulases.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA INFORMACIJSKA DOKUMENTACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO PREGLEDNIC	VII
KAZALO SLIK	VIII
KAZALO PRILOG	IX
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	X
1 UVOD	1
1.1 NAMEN DELA	1
1.2 DELOVNE HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 CELULOZA IN NJENI DERIVATI	3
2.1.1 Karboksimetil celuloza	3
2.1.2 Hidroksietil celuloza	5
2.2 BIORAZGRADNJA CELULOZE IN NJENIH DERIVATOV	7
2.2.1 Rod <i>Cellulomonas</i>	7
2.2.2 Encimska hidroliza celuloznega materiala	8
3 MATERIALI IN METODE	10
3.1 MATERIALI	10
3.1.1 Kemikalije	10
3.1.2 Opis proučevanih tipov hidroksietil celuloze	10
3.1.3 Sestava gojišč	11
3.1.4 DNS reagent	12
3.1.5 Bakterijski sev	12
3.2 METODE	12
3.2.1 Gojenje bakterijske kulture	12
3.2.2 Priprava vzorcev	12
3.2.3 Priprava izrabljenega gojišča za encimski test	13
3.2.4 Encimski test	13
3.2.5 Merjenje optične gostote	13
3.2.6 Ugotavljanje koncentracije reducirajočih koncev	13
3.2.7 Merjenje viskoznosti	14
3.2.8 Ugotavljanje deleža nesubstituiranih regij v karboksimetil celulozi	14

3.2.9	HPLC-SEC	15
4	REZULTATI	16
4.1	VPLIV STOPNJE SUBSTITUIRANOSTI KARBOKSIMETIL CELULOZE NA RAZGRADNJO	16
4.2	VPLIV MOLSKE MASE KARBOKSIMETIL CELULOZE NA RAZGRADNJO	20
4.3	VPLIV TEMPERATURE NA RAZGRADNJO KARBOKSIMETIL CELULOZE	23
4.4	BIORAZGRADNJA RAZLIČNIH TIPOV HIDROKSJETIL CELULOZE.....	25
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	30
5.1	VPLIV STOPNJE SUBSTITUIRANOSTI KARBOKSIMETIL CELULOZE NA RAZGRADNJO	30
5.2	VPLIV MOLSKE MASE KARBOKSIMETIL CELULOZE NA RAZGRADNJO	31
5.3	VPLIV TEMPERATURE NA RAZGRADNJO KARBOKSIMETIL CELULOZE	31
5.4	BIORAZGRADNJA RAZLIČNIH TIPOV HIDROKSJETIL CELULOZE.....	32
5.5	SKLEPI	34
6	POVZETEK	35
7	VIRI	36

ZAHVALA

PRILOGE

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Spremljanje biorazgradnje različnih tipov hidroksietil celuloze (HEC) z ugotavljanjem koncentracije reducirajočih koncev	29
Preglednica 2: Spremljanje biorazgradnje različnih tipov hidroksietil celuloze (HEC) z merjenjem viskoznosti.....	29

KAZALO SLIK

Slika 1: Struktura celuloze	3
Slika 2: Struktura karboksimetil celuloze (CMC) s stopnjo substituiranosti (DS) 1	4
Slika 3: Vpliv strižne hitrosti na viskoznost 1 % raztopine karboksimetil celuloze (CMC) s stopnjo substituiranosti (DS) 0.7 in z $M_w = 250$ kDa.....	4
Slika 4: Struktura hidroksietil celuloze (HEC) s stopnjo substituiranosti (DS) 1 in z molarno stopnjo substituiranosti (MS) 1	6
Slika 5: Shema encimske hidrolize celuloze.....	8
Slika 6: Reakcija, ki poteče pri ugotavljanju koncentracije reducirajočih koncev	14
Slika 7: Vpliv stopnje substituiranosti (DS) karboksimetil celuloze (CMC) na hitrost rasti bakterije <i>Cellulomonas uda</i>	16
Slika 8: Vpliv stopnje substituiranosti (DS) karboksimetil celuloze (CMC) na biorazgradnjo.....	17
Slika 9: Kvalitativno ugotavljanje deleža nesubstituiranih regij v karboksimetil celulozi (CMC).....	18
Slika 10: HPLC-SEC kromatogrami razgrajenih in nerazgrajenih vzorcev karboksimetil celuloze (CMC) z različno stopnjo substituiranosti (DS).....	19
Slika 11: Vpliv molske mase karboksimetil celuloze (CMC) na hitrost rasti bakterije <i>Cellulomonas uda</i>	20
Slika 12: Vpliv molske mase karboksimetil celuloze (CMC) na biorazgradnjo.	21
Slika 13: HPLC-SEC kromatogrami razgrajenih in nerazgrajenih vzorcev karboksimetil celuloze (CMC) z različno molsko maso	22
Slika 14: Vpliv temperature na hitrost rasti bakterije <i>Cellulomonas uda</i>	23
Slika 15: Vpliv temperature na biorazgradnjo karboksimetil celuloze (CMC).....	24
Slika 16: Tokovno obnašanje raztopin z razgrajenim in nerazgrajenim Natrosolom 250 HHR	25
Slika 17: Tokovno obnašanje raztopin z razgrajenim in nerazgrajenim Natrosolom 250 H4BR.....	26
Slika 18: Tokovno obnašanje raztopin z razgrajenim in nerazgrajenim Natrosolom PLUS 330 PA	27
Slika 19: Tokovno obnašanje raztopin z razgrajenim in nerazgrejenim Bermocollom EBM 5500.....	28

KAZALO PRILOG

- Priloga A:** Vpliv temperature na encimsko razgradnjo karboksimetil celuloze (CMC).
- Priloga B1:** Tokovno obnašanje raztopin z razgrajeno in nerazgrajeno karboksimetil celulozo (CMC) s stopnjo substituiranosti (DS) 0.7 in z $M_w = 250$ kDa.
- Priloga B2:** Tokovno obnašanje raztopin z razgrajeno in nerazgrajeno karboksimetil celulozo (CMC) s stopnjo substituiranosti (DS) 0.9 in z $M_w = 250$ kDa.
- Priloga B3:** Tokovno obnašanje raztopin z razgrajeno in nerazgrajeno karboksimetil celulozo (CMC) s stopnjo substituiranosti (DS) 1.2 in z $M_w = 250$ kDa.
- Priloga B4:** Tokovno obnašanje raztopin z razgrajeno in nerazgrajeno karboksimetil celulozo (CMC) s stopnjo substituiranosti (DS) 0.7 in z $M_w = 90$ kDa.
- Priloga C:** Hitrost rasti bakterije *Cellulomonas uda* na različnih tipih hidroksietil celuloze (HEC).

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

A_{575}	absorbanca pri 575 nm
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
GC	gvanin-citozin
HEC	hidroksietil celuloza
HPLC	tekočinska kromatografija visoke učinkovitosti
MS	molarna stopnja substituiranosti
M_w	molska masa
OD_{650}	optična gostota pri 650 nm
PKE	pepton kvasni ekstrakt
r^2	koeficient determinacije
RCF	relativna centrifugalna sila
rpm	obrati na minuto
SEC	velikostno izključitvena kromatografija

1 UVOD

Derivati celuloze v vodni raztopini delujejo kot zgoščevalci, emulgatorji in stabilizatorji, pomembne so tudi njihove psevdoplastične in tiksotropne lastnosti. Zaradi dobrih reoloških lastnosti so pogosto uporabljeni v živilskih, farmacevtskih in kozmetičnih proizvodih, kot tudi v tekstilni, papirni, barvni in strojni industriji ter v gradbeništvu (Clasen in Kulicke, 2001).

Karboksimetil celuloza je industrijsko najbolj uporabljen derivat celuloze, saj gre za poceni surovino, dostopno na tržišču (Hollabaugh in sod., 1945). Že leta 1950 je Reese s sod. ugotovil, da je ta material biorazgradljiv, kasnejše raziskave pa so potrdile, da je njegova uporaba povsem varna, saj nima toksičnih učinkov na živa bitja (Bär in sod., 1995). Biorazgradljivost materiala je zelo ugodna za okolje, saj ne prihaja do kopičenja in onesnaževanja, po drugi strani pa je ta lastnost izjemno neugodna v industrijskih aplikacijah.

Biorazgradnja materiala z encimi celulolitičnih mikroorganizmov predstavlja velik problem npr. v industriji barv (Tothill in Seal, 1993). Barve na vodni osnovi so podvržene razgradnji zaradi prisotnosti mikrobom dostopnih hranil (Obidi in sod., 2010). Do kontaminacije običajno pride že med samim industrijskim postopkom, saj je lahko okužena voda ali pa material in oprema, ki jo uporabljamo (La Rosa in sod., 2008). Največja težava, ki pri tem nastane, je izguba reoloških lastnosti materiala, barvi pade viskoznost, zaradi česar je tak proizvod neuporaben (Tothill in Seal, 1993).

1.1 NAMEN DELA

Naš namen je bil spremljati mikrobno razgradnjo različnih tipov karboksimetil celuloze (CMC) in hidroksetil celuloze (HEC) ter ugotoviti, kako se razlike v kemijski strukturi kažejo v biorazgradnji teh derivatov. Vsi proučevani celulozni derivati so pred biološko razgradnjo kazali tipično psevdoplastično obnašanje.

Pri CMC smo proučevali vpliv molske mase in stopnje substituiranosti na biorazgradnjo ter vpliv zunanjega dejavnika – temperature. Pri HEC nas je zanimal predvsem vpliv stopnje substituiranosti in vpliv dodanih substituent, kot so metilne, etilne in cetilne skupine. Spremljali smo tudi učinek celulaz, pridobljenih iz izrabljenega gojišča s CMC, na raztopino HEC. Poleg tega pa smo želeli preveriti navajanje proizvajalca, da naj bi bila dva komercialno dostopna tipa HEC odporna proti mikrobni razgradnji.

Biorazgradnjo smo opazovali v prilagojenem BHM gojišču z izbranim derivatom celuloze, ki je predstavljal edini vir ogljika. Kot modelni organizem smo izbrali bakterijo *Cellulomonas uda* (*C. uda*), saj je sposobna izrabljati topne derivate celuloze kot vir energije za rast (Lynd in sod., 2002). Razgradnjo derivatov smo spremljali z ugotavljanjem koncentracije reducirajočih koncev in merjenjem viskoznosti po času ter rezultate primerjali s hitrostjo rasti bakterijske kulture. Razlike v velikosti polimerov med razgrajenimi in nerazgrajenimi vzorci

CMC smo ugotavljali tudi z uporabo HPLC-SEC. Z reogrami smo prikazali vpliv biorazgradnje na tokovno obnašanje raztopin proučevanih derivatov celuloze.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

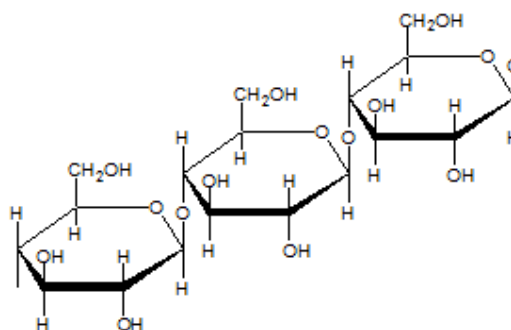
V diplomski nalogi smo postavili naslednje hipoteze:

- na rast bakterij bo vplivala stopnja substituiranosti CMC in molska masa derivata,
- pri najmanj substituiranih derivatih celuloze bo razgradnja najboljša,
- boljšo razgradnjo pričakujemo pri višji temperaturi,
- tekom rasti bakterij se bo koncentracija reducirajočih koncev povečevala, viskoznost gojišča pa padala.

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 dolgoveržni polisaharid je sestavljen iz glukoznih enot, ki so povezane z β -1,4 vezjo (Sirisena in Manamendra, 1995). Posebnost kemijske sestave je dejstvo, da so molekule D-glukoze tipično hidrofilne, polimerizirajo pa 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 močne povezave, kar onemogoči hidratacijo. S substituiranjem teh hidroksilnih skupin lahko pripravimo derivate topne v vodi (Clasen in Kulicke, 2001).



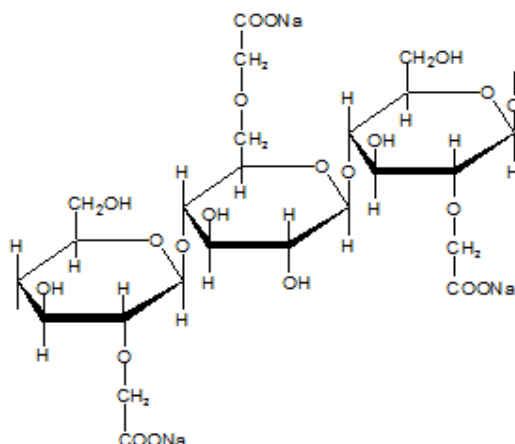
Slika 1: Struktura celuloze.

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

2.1.1 Karboksimetil celuloza

Karboksimetil celuloza (CMC, ang. *carboxymethyl cellulose*) je vodotopen eter celuloze (Reese in sod., 1950). Na tržišču 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. V reakciji med hidratiziranimi verigami in natrijevim monokloroacetatom nastaja natrijeva karboksimetil celuloza (Dean in Ferguson, 1971). V nastalih vodotopnih polimerih so karboksilne skupine etrsko vezane na glukozne enote (Pal in sod., 2005).

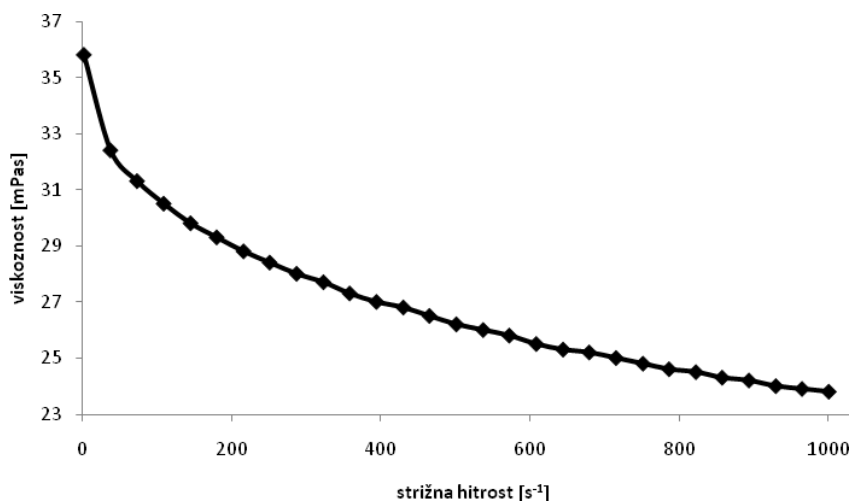


Slika 2: Struktura karboksimetil celuloze (CMC) s stopnjo substituiranosti (DS) 1.

Stopnja substituiranosti (DS, ang. *degree of substitution*) označuje število dodanih skupin na anhidroglukozno enoto molekule CMC (Reese in sod., 1950). Tako je npr. DS celuloze enak 0, popolno substituiran polimer CMC pa ima DS = 3 (Clasen in Kulicke, 2001).

Stopnja polimerizacije (DP, ang. *degree of polymerization*) 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 značilno ne-Newtonsko psevdoplastično obnašanje. Pri tem je najpomembnejša karakteristika vpliv strižne hitrosti na viskoznost tekočine; s povečanjem strižne hitrosti viskoznost psevdoplastičnih raztopin pada (Gómez-Díaz in Navaza, 2002).



Slika 3: Vpliv strižne hitrosti na viskoznost 1 % raztopine karboksimetil celuloze (CMC) s stopnjo substituiranosti (DS) 0.7 in z $M_w = 250$ kDa.

Na reološke lastnosti raztopin CMC vpliva molekularna struktura derivata, pri čemer sta najbolj pomembni molska masa in koncentracija CMC, DS ima manjši vpliv, sicer pa ključno vpliva na topnost derivata (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 tudi zadrževanje vode in tiksotropno obnašanje (Clasen in Kulicke, 2001). Zaradi vsestranskosti je CMC industrijsko najbolj uporabljen derivat celuloze (Hollabaugh in sod., 1945).

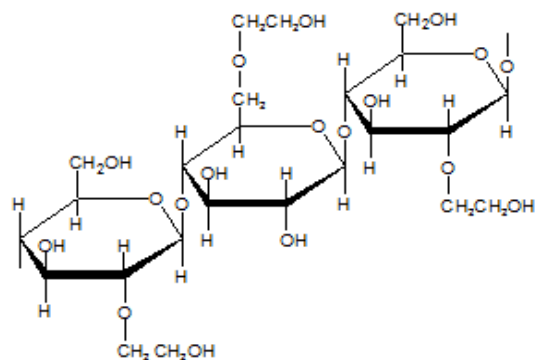
Kot zgoščevalec, vezivo, emulgator in stabilizator se CMC uporablja v predelanih živilskih produktih (npr. v sladoledu, sorbetih, pekarskih izdelkih, v solatnih prelivih), v izdelkih za osebno nego (npr. v kremah, losjonih za telo, milih, šamponih, v zobnih pastah) in v farmacevtskih pripravkih (Clasen 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).

Adhezivne lastnosti CMC izkoriščajo v tekstilni industriji, pri pridelavi usnja ter 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 ustrezno stabilnost in viskoznost (Tothill in Seal, 1993), enostaven nanos barve pa nam omogočijo njegove psevdoplastične lastnosti.

Karboksilni derivati z višjo stopnjo substituiranosti so izjemo 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 evtrofikacij (Eldib, 1971; Reese in sod., 1950).

2.1.2 Hidroksietil celuloza

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



Slika 4: Struktura hidroksietil celuloze (HEC) s stopnjo substituiranosti (DS) 1 in z molarno stopnjo substituiranosti (MS) 1.

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 osnovna sestavina čistil in detergentov (Lohmann in sod., 1974).

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. 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).

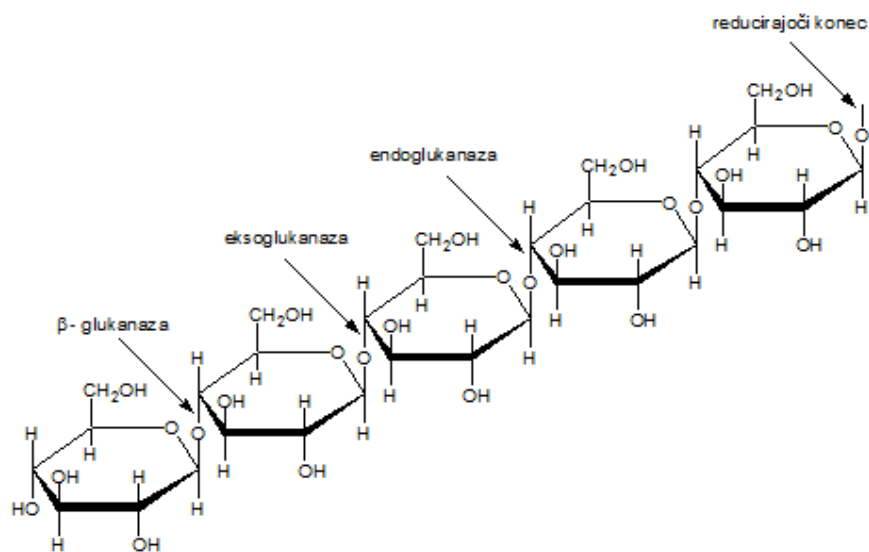
Katabolizem celuloze vključuje encimsko razgradnjo polimera in celično izrabo nastalih produktov. Poznamo dve primarni strategiji izrabe celuloznega materiala, ki temeljita na dostopnosti kisika. Anaerobne bakterije in glive se vežejo na celulozo in razgradnjo opravijo s kompleksnimi celulaznimi sistemi, imenovanimi celulosomi, pri čemer nastajajo različni produkti fermentacije. Aerobni celulolitični mikroorganizmi lahko vzpostavijo le šibko povezavo s celulozo, vendar se običajno sploh ne vežejo na substrat. Proizvajajo nekompleksne celulaze in oksidirajo produkte hidrolize do CO₂ 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).

2.2.1 Rod *Cellulomonas*

V literaturi večinoma zasledimo, da so predstavniki rodu *Cellulomonas* aerobi, vendar lahko številni sevi rastejo tudi anaerobno, kot npr. *C. uda* (Lynd in sod., 2002; Dermoun in sod., 1988). Rod *Cellulomonas* predstavljajo korineformne bakterije, ki so večinoma glibljive, 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* (Holt in sod., 1994; 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 gojišče, vendar s tem zatremo tako sintezo kot aktivnost celulaz (Thayer in sod., 1984).

2.2.2 Encimska hidroliza celuloznega materiala

Razgradnja celuloznega materiala poteka z mešanico hidrolitičnih encimov, imenovanih celulaze (Dashtban in sod., 2010). V razgradnjo so vključeni vsaj trije tipi encimov: endoglukanaze (EC 3.2.1.4), eksoglukanaze (EC 3.2.1.74) in β -glukozidaze (EC 3.2.1.21). Endoglukanaze hidrolizirajo naključne β -povezave v verigi celuloze, pri čemer nastanejo reducirajoči konci. Eksoglukanaze iz nereducirajočih koncev celuloze odstranijo 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.

Variabilnost strukture celuloze in njena netopnost sta povzročili, da se za raziskovanje celulolitične aktivnosti uporabljajo predvsem topni celulozni etri kot je CMC (Lynd in sod., 2002). Karboksimetilacija vpliva na način delovanja celulaz, endoglukanaze lahko cepijo verige CMC, eksoglukanazam pa karboksimetilacija tega ne dovoljuje. To je razlog, da tekom razgradnje CMC s celulolitičnimi mikroorganizmi (npr. z bakterijo *Agrobacterium* CM-1) ni zaznati eksoglukanazne aktivnosti. Na razgradnjo zato ključno vpliva DS. Encimska hidroliza CMC je namreč odvisna od DS; višji kot je DS, nižja je stopnja hidrolize (Reese in sod., 1950; Hankin in Anagnostakis, 1977). Če je na vsako anhidroglukozno enoto vezana ena karboksimetilna skupina, je tak derivat nedostopen za encime. Encimi, vključeni v cepitev CMC, lahko delujejo le na tistih mestih polimera, kjer imamo tri ali več sosednjih anhidroglukoznih enot, ki niso substituirane (Reese in sod., 1950; Reese, 1957; Sieger in sod., 1995; Wirick, 1968).

Pri hidrolizi nekaterih drugih derivatov celuloze (npr. pri hidroksietil celulozi) je poleg stopnje substituiranosti pomembna tudi velikost substituenta. Izkaže se, da celulaze tolerirajo višji DS v primeru manjših substituent (Glasser in sod., 1994).

Za bakterijo *C. uda* sta značilni endo-1,4- β -glukanazna in β -glukozidazna aktivnost, ki ji omogočata rast na CMC, na mikrokristalinični celulozi in na lignoceluloznem materialu. Endo-1,4- β -glukanaze so zunajcelični encimi in so v manjših koncentracijah vezani na celice in prav ti vezani encimi, naj bi opravljali osnovno endoglukanazno aktivnost. Tudi β -glukozidaza, ki jo *C. uda* sintetizira konstitutivno, ni citoplazemski encim; nahaja se zunaj citoplazemske membrane, v periplazemskem prostoru ali pa na celični steni (Stoppok in sod., 1982).

Pri biorazgradnji celuloznega materiala z bakterijo *C. uda* nastajata celobioza in glukoza v razmerju 6:1. Produkti endoglukanazne in β -glukozidazne aktivnosti inhibirajo sintezo in aktivnost celulaz. Med rastjo bakterij narašča koncentracija glukoze, ki je nekompetitivni inhibitor β -glukozidaze, zaradi česar začne koncentracija celobioze naraščati. Visoka koncentracija celobioze pa inhibira endo-1,4- β -glukanazno aktivnost in posledično se hidroliza celuloznega materiala upočasni (Stoppok in sod., 1982).

Kot edini vir ogljika lahko *C. uda* izrablja tudi ksilan, saj sta zanjo značilni β -ksilanazna (EC 3.2.1.8) in β -ksilozidazna aktivnost (EC 3.2.1.37). Ksilan sestavljajo anhidro-D-ksilozne enote, povezane z β -1,4 vezjo, na osnovni skelet pa so vezane še molekule L-arabinoze in 4-O-metil-D-glukuronske kisline. Zanimivo je, da so β -ksilanaze do neke stopnje sposobne razgraditi tudi CMC, ne pa mikrokristalinične celuloze. Na drugi strani supernatanti kultur *C. uda*, gojenih na mikrokristalinični celulozi, kažejo tudi nizko β -ksilanazno aktivnost, ki jo lahko pripišemo kar 1,4- β -glukanazam (Rapp in Wagner, 1986).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Kemikalije

- 3,5-dinitrosalicilna kislina $C_7H_4N_2O_7$ (+ H_2O) $M_w = 246,12$ g/mol (Sigma, Nemčija)
- agar (Fluka, Španija)
- amonijev nitrat NH_4NO_3 $M_w = 80,04$ g/mol (Sigma-Aldrich, Nemčija)
- Bermocoll EBM 5500 (Azko Nobel, Švedska)
- D-(+)-glukoza, brezvodna $C_6H_{12}O_6$ $M_w = 76,05$ g/mol (Kemika, Hrvaška)
- destilirana voda
- 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 $M_w = 250$ 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)
- kvasni ekstrakt (Biolife, Italija)
- 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)
- Natrosol 250 H4BR (Hercules-Aqualon)
- Natrosol 250 HHR (Hercules-Aqualon)
- Natrosol PLUS 330 PA (Hercules-Aqualon)
- peptokompleks (Biolife, Italija)

3.1.2 Opis proučevanih tipov hidroksietil celuloze

V diplomski nalogi smo spremljali razgradnjo štirih komercialno dostopnih HEC (Natrosol 250 HHR, Natrosol 250 H4BR, Natrosol PLUS 330 PA in Bermocoll EBM 5500):

- poznamo različne tipe Natrosola 250, ki se razlikujejo v viskoznosti raztopin, hidrataciji, velikosti delcev in v biostabilnosti. Biostabilni derivati (označeni s črko »B«) so rezistentni na biološko in kemijsko degradacijo. Po navajanju proizvajalca se Natrosol 250 HHR in Natrosol 250 H4BR razlikujeta v številu nesubstituiranih regij. Natrosol 250 H4BR je popolnoma substituiran, torej nima nesubstituiranih regij, in je zato nerazgradljiv,

- Natrosol PLUS 330 PA (cetil hidroksietil celuloza) je hidrofobno modificiran HEC, sestavljajo ga hidroksietilne in dolgoverižne alkilne skupine,
- Bermocoll EBM 5500 je metil etil hidroksietil celuloza. Kot navaja proizvajalec, je nerazgradljiv, saj nima nesubstituiranih regij.

Natančnejših kemijskih struktur proučevanih HEC ne poznamo, vprašljiva je tudi njihova čistost.

3.1.3 Sestava gojišč

- Prilagojeno BHM gojišče z 1 % CMC
 - 0,2 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
 - 1 g K_2HPO_4
 - 1 g KH_2PO_4
 - 1 g NH_4NO_3
 - 0,2 mL $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (100 g/l)
 - 10 g CMC
 - 1000 mL destilirane vode

Osnovna sestavina BHM gojišča (Bushnell in Haas, 1941) je tudi $\text{FeCl}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$, vendar železovih ionov nismo dodali, saj povzročijo koagulacijo CMC. Pri pripravi gojišča smo upoštevali tudi relativno vlago CMC.

- Prilagojeno BHM gojišče z NaCl in 0,7 % HEC
 - 0,2 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
 - 1 g K_2HPO_4
 - 1 g KH_2PO_4
 - 1 g NH_4NO_3
 - 0,2 mL $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (100 g/l)
 - 1 g NaCl
 - 7 g HEC
 - 1000 mL destilirane vode
- Trdno PKE gojišče
 - 6 g peptokompleksa
 - 3 g kvasnega ekstrakta
 - 15 g agarja
 - 1000 mL destilirane vode

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, Natartrata,
- obe raztopini združimo v bučki in dopolnimo z destilirano vodo do oznake 500 mL.

3.1.5 Bakterijski sev

- *Cellulomonas uda* DSM 20108

3.2 METODE

3.2.1 Gojenje bakterijske kulture

Kulturo *C. uda* smo iz trdnega PKE gojišča (hranjenega pri 4 °C) precepili na novo PKE ploščo in jo inkubirali aerobno preko noči pri 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 37 °C, s stresanjem pri 200 rpm. S prekončno kulturo smo nacepili tekoča BHM gojišča z 1 % CMC, tako da je inokulum predstavljal 3 % celotne vsebine. Za gojenje bakterij na HEC smo svežo kulturo iz PKE plošče suspendirali v sterilni fiziološki raztopini. Z bakterijsko suspenzijo smo nacepili tekoča BHM gojišča z 0,7 % HEC, tako da je inokulum predstavljal 3 % celotne vsebine. Gojenje bakterij na 1 % CMC in 0,7 % HEC je potekalo aerobno, s stresanjem pri 200 rpm. Inkubirali smo pri temperaturi 37 °C, le v primeru proučevanja vpliva temperature na razgradnjo CMC smo gojišča inkubirali tudi pri 28 °C. 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 smo uporabili nenacepljeno gojišče.

3.2.2 Priprava vzorcev

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 na tri paralelke in jih zamrznili. Za vsako analizo smo uporabili eno paralelko, ki smo jo predhodno odtalili.

3.2.3 Priprava izrabljenega gojišča za encimski test

V tekoče BHM gojišče z 1 % CMC ($M_w = 90$ kDa, $DS = 0.7$) smo nacepili kulturo *C. uda*. Nacepljeno gojišče smo inkubirali aerobno pri 37 °C, s stresanjem pri 200 rpm. Po enotedenski inkubaciji smo izrabljenemu gojišču z 10-minutnim centrifugiranjem pri 13000 RCF odstranili celice. Supernatant smo prefiltrirali preko 0,20 µm filtra in tako pridobili encimsko mešanico.

3.2.4 Encimski test

Proučevali smo razgradnjo različnih tipov HEC s celulazami, zato smo 0,7 % raztopinam teh derivatov dodali encimsko mešanico, ki je predstavljala 1/3 celotne vsebine. Encimsko reakcijo smo izvajali v sterilnih centrifugirkah. Inkubacija je potekala 7 dni, brez stresanja pri 37 °C. Pred vsakim vzorčenjem smo vsebino premešali in odvzeli 3 x 1,2 mL vzorca. Pridobljene vzorce smo zamrznili in jih pozneje uporabili za ugotavljanje koncentracije reducirajočih koncev in merjenje viskoznosti. Kot kontrolo smo uporabili 0,7 % raztopine HEC brez dodanih encimov.

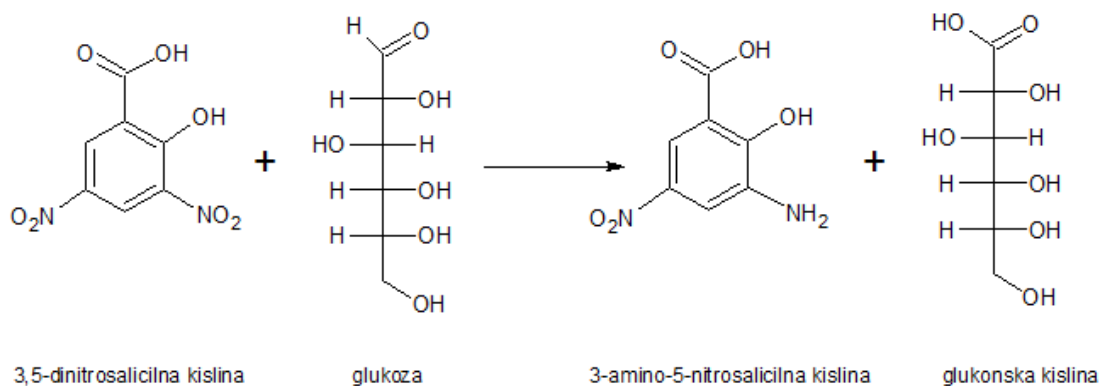
3.2.5 Merjenje optične gostote

Z merjenjem optične gostote pri 650 nm smo ugotavljali hitrost rasti bakterije *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 Multiscan spectrum, Thermo electron corporation, izmerili OD_{650} . Od vseh izmerjenih OD_{650} smo odšteli začetne vrednosti vzorcev.

3.2.6 Ugotavljanje koncentracije reducirajočih koncev

Z ugotavljanjem koncentracije reducirajočih koncev spremljamo razgradnjo derivatov celuloze. Višja kot je izmerjena koncentracija, več polimernega skeleta je razgrajenega. Koncentracije reducirajočih koncev smo merili s podobno metodo, kot jo je opisal Miller (1959). Za izvedbo testa potrebujemo umeritveno krivuljo, zato si iz 50 mM založne raztopine glukoze pripravimo 0, 1, 2, 3, 4 in 5 mM standardne raztopine. V steklene epruvete odpipetiramo 1 mL vzorca oz. ustrezne 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 pri 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 inkubiranju epruvete ohladimo v hladni vodi in prenesemo 0,3 mL vzorca v jamice mikrotiterske plošče ter spektrofotometrično izmerimo A_{575} . Na podlagi znanih

koncentracij glukoze in njihovih izmerjenih absorbanc dobimo enačbo umeritvene krivulje, s pomočjo katere izračunamo koncentracijo reducirajočih koncev v analiziranih vzorcih.



Slika 6: Reakcija, ki poteka pri ugotavljanju koncentracije reducirajočih koncev.

3.2.7 Merjenje 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 $25 \pm 0,01$ °C. Za opravljeno meritev smo potrebovali približno 490 μL vzorca, da smo zapolnili prostor med ploščama. Točke v območju strižne hitrosti od 2 do 1000 s^{-1} so bile izmerjene v 5-sekundnih intervalih v 29 korakih. Rezultati meritve viskoznosti so podani pri strižni hitrosti 1000 s^{-1} .

3.2.8 Ugotavljanje deleža nesubstituiranih regij v karboksimetil celulozi

Nesubstituirane regije polimera ohranijo lastnosti celuloze, zato lahko s sosednjimi molekulami tvorijo vodikove vezi, kar vodi v nastanek mreže. Nastajanje mreže (t.j. gela) pospešimo, če koncentriranim raztopinam CMC dodamo NaCl, ki zasenči odbojne interakcije med karboksilnimi skupinami. To omogoči, da se sosednji verigi dovolj približata, da se med njima tvorijo vodikove vezi. Razlike v deležu nesubstituiranih regij lahko ovrednotimo kvalitativno, glede na lastnosti nastalih gelov. Polimeri z visokim deležem nesubstituiranih regij tvorijo bolj kompaktne, manj tekoče gele; geli polimerov s homogeno distribucijo karboksimetilnih skupin pa so »gladki« (ang. *smooth*) in bolj tekoči (Hoeffler, 2011; Sommers, 1986).

Pripravili smo 3 % raztopine CMC (z DS 0.7, 0.9, 1.2), ki smo jim dodali 5 % NaCl. Vzorce različno substituiranih CMC z NaCl smo nanесли na vodoravno postavljeno plastično podlago in poslikali začetno stanje. Nato smo podlago postavili navpično za približno 30 sekund in

slikali novo stanje. Razlike med proučevanimi vzorci smo ovrednotili kvalitativno, glede na vizualne lastnosti nastalih gelov.

3.2.9 HPLC-SEC

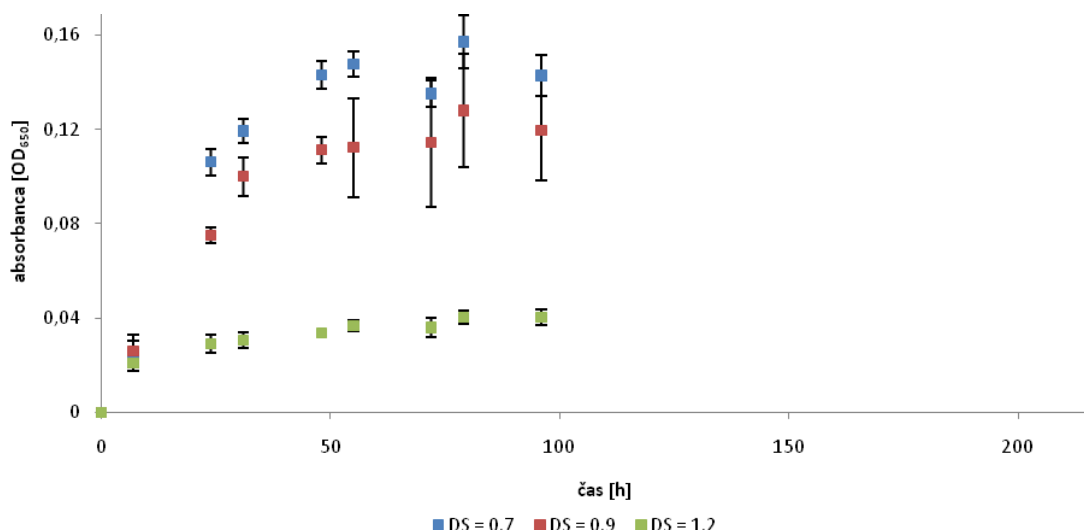
S to metodo smo ugotavljali razlike med razgrajenimi in nerazgrajenimi vzorci CMC. Kot nerazgrajen vzorec smo uporabili sterilno BHM gojišče z 1 % CMC, razgrajen vzorec pa je bil odvzet 9 dni po nacepiti z bakterijsko kulturo *C. uda*. Za ločevanje smo uporabili velikostno izključitveno kromatografsko tehniko, kjer ločba poteka zaradi različnega zadrževanja molekul v porah stacionarne faze (manjše molekule se v koloni zadržijo dalj časa).

Injicirali smo 20 μL 0,5 % vzorca, redčenega z 0,4 M acetatnim pufrom s pH 5, ki smo ga sicer uporabljali 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*) detektor (KNAUER, *Advanced scientific instruments*).

4 REZULTATI

4.1 VPLIV STOPNJE SUBSTITUIRANOSTI KARBOKSIMETIL CELULOZE NA RAZGRADNJO

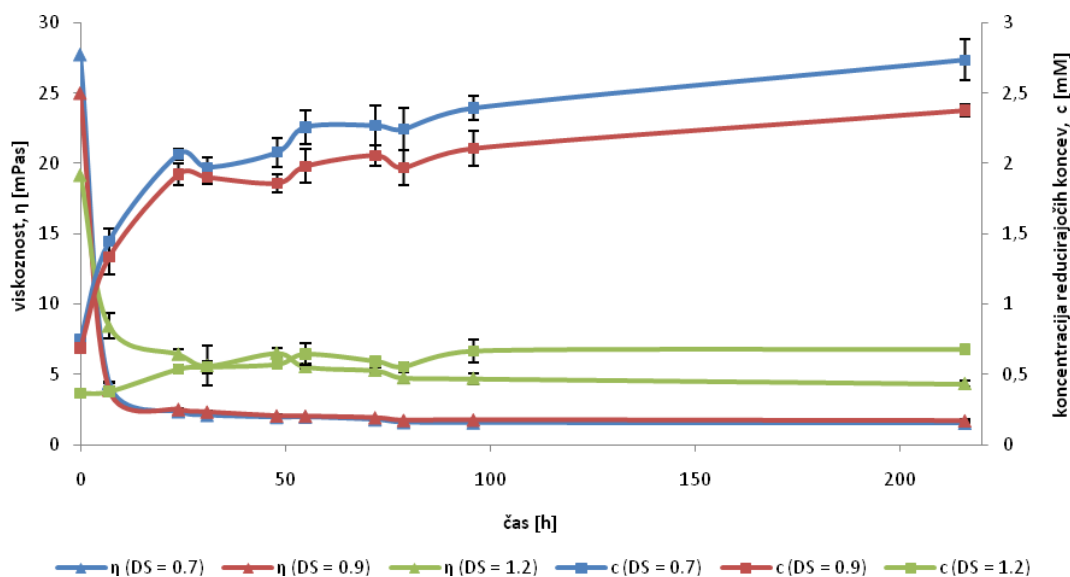
Razlike v hitrosti rasti bakterijske kulture *C. uda* na različno substituiranih CMC so prikazane na sliki 7. Iz slike je razvidno, da DS vpliva na hitrost rasti, prve razlike se pojavijo že po 24 urah. Ugotovili smo, da najmanj substituiran CMC (DS = 0.7) omogoča najboljšo rast. Na tem derivatu je rast kar 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 stopnjama niso več signifikantne. Na CMC z DS = 1.2 je rast neintenzivna, najvišjo vrednost optične gostote smo izmerili v zadnji točki vzorčenja ($OD_{650} \approx 0,04$).



Slika 7: Vpliv stopnje substituiranosti (DS) karboksimetil celuloze (CMC) na hitrost rasti bakterije *Cellulomonas uda*. Proučevali smo CMC z DS 0.7 (modra barva), 0.9 (rdeča barva) in 1.2 (zeleno barvo). Bakterijsko kulturo smo gojili v tekočem BHM gojišču z 1 % CMC pri 37 °C, s stresanjem pri 200 rpm. Na abscisni osi je čas inkubacije v urah, na ordinatni pa optična gostota. Prikazana je povprečna vrednost in standardni odklon.

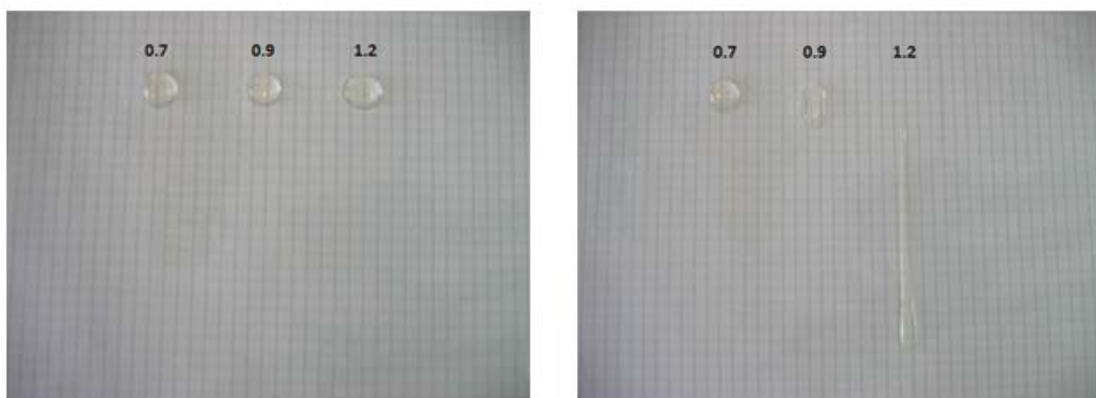
Sprememba parametrov bakterijske razgradnje različno substituiranih CMC je prikazana na sliki 8. Enako kot pri hitrosti rasti, opazimo tudi pri biorazgradnji podobnost med stopnjama 0.7 in 0.9, medtem ko razgradnja CMC z DS = 1.2 precej odstopa. Ugotovimo tudi, da rast in koncentracija reducirajočih koncev korelirata po času ($r^2 = 80\%$). 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. Tudi izmerjene viskoznosti so pri stopnjah 0.7 in 0.9 povsem primerljive po času, medtem ko je padec pri stopnji 1.2

manjši. Pri vseh treh obravnavanih tipih CMC je izrazit padec v viskoznosti že 2 uri po nacepitvi gojišč z bakterijsko kulturo. Z nadaljnjo inkubacijo se viskoznost malo spreminja.



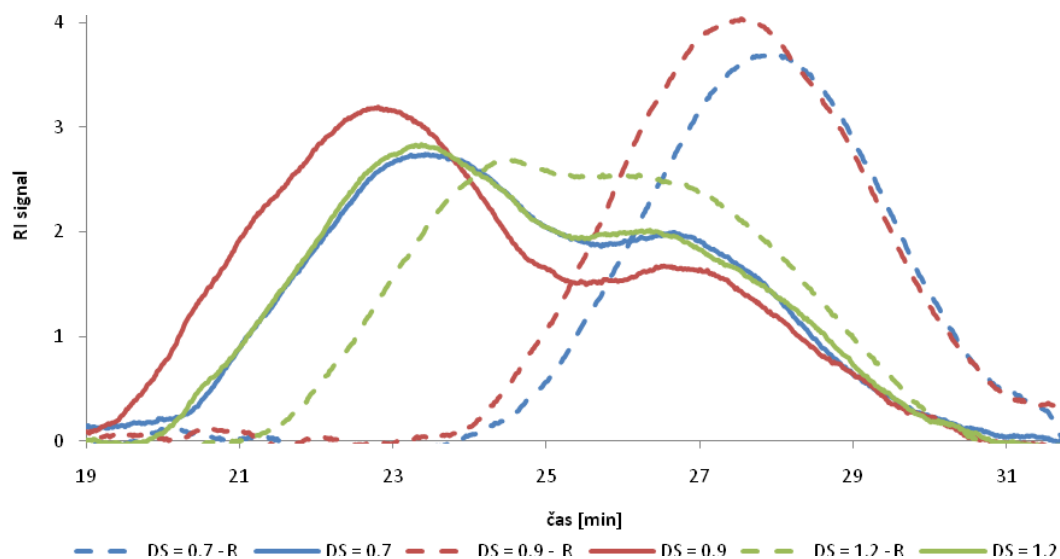
Slika 8: Vpliv stopnje substituiranosti (DS) karboksimetil celuloze (CMC) na biorazgradnjo. Proučevali smo CMC z DS 0.7 (modra barva), 0.9 (rdeča barva) in 1.2 (zelena barva). Vpliv smo spremljali z bakterijo *Cellulomonas uda* v BHM gojišču z 1 % CMC pri 37 °C, s stresanjem pri 200 rpm. Na abscisni osi je čas inkubacije v urah, na primarni ordinatni osi je viskoznost (η) prikazana s trikotniki in podana v mPas, na sekundarni ordinatni osi so koncentracije reducirajočih koncev (c) prikazane s kvadrati in podane v mM. Prikazana je povprečna vrednost in standardni odklon.

Stopnja substituiranosti kaže povprečno stopnjo modifikacij na anhidroglukozno enoto. V polimerih lahko pričakujemo regije, kjer je substituiranost 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 ugotavljali kvalitativno, glede na lastnosti nastalih gelov, ki smo jih formirali z dodatkom NaCl. Lastnosti gelov smo spremljali brez in s strižno silo. Na sliki 9 vidimo, da 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.



Slika 9: Kvalitativno ugotavljanje deleža nesubstituiranih regij v karboksimetil celulozi (CMC). Uporabili smo derivate s stopnjo substituiranosti (DS) 0.7, 0.9 in 1.2, kot je označeno na sliki. Pripravili smo 3 % raztopine CMC s 5 % NaCl. Na levi strani je prikazano začetno stanje, ko smo vzorce nanесли na vodoravno postavljeno plastično podlago. Nato smo podlago z vzorci postavili navpično za približno 30 sekund in slikali nastalo stanje, ki je prikazano na desni strani.

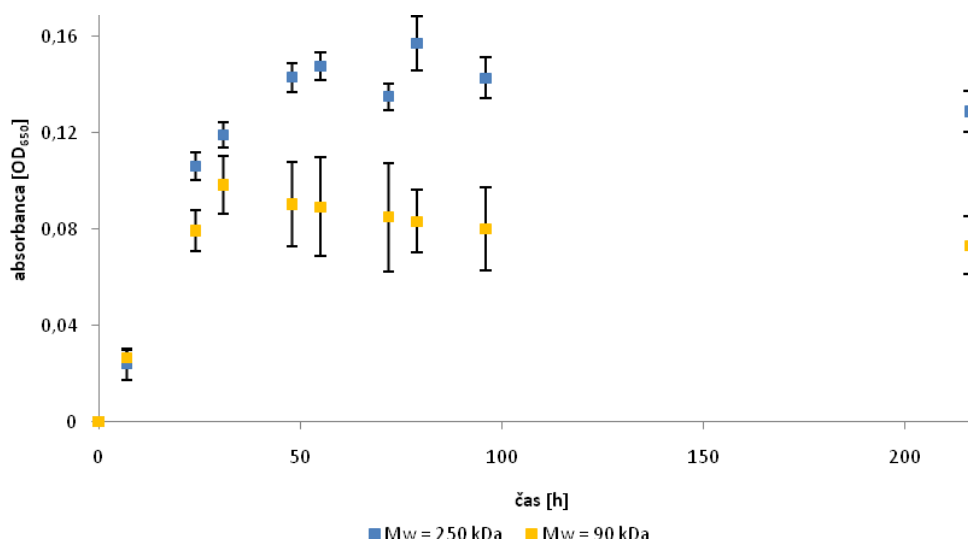
Razlike med razgrajenimi in nerazgrajenimi vzorci CMC smo ugotavljali tudi s HPLC-SEC, kot je prikazano na sliki 10. Kromatogrami nerazgrajenih vzorcev imajo dva vrhova in v splošnem široko distribucijo. Prvi kromatografski vrh zasledimo okoli 23. minute, drugi pa okoli 27. minute. Nerazgrajena vzorca CMC z DS 0.9 in 1.2 imata podoben kromatogram, medtem ko se CMC z DS = 0.7 nekoliko razlikuje. Elucijski časi razgrajenih vzorcev CMC so bili daljši; za razgrajene vzorce CMC z DS 0.7 in 0.9 je značilen en izrazit kromatografski vrh pri približno 28. minuti, razgrajen CMC z DS = 1.2 pa ima krajši čas elucije in dva kromatografska vrhova.



Slika 10: HPLC-SEC kromatogrami razgrajenih in nerazgrajenih vzorcev karboksimetil celuloze (CMC) z različno stopnjo substituiranosti (DS). Proučevali smo CMC z DS 0.7 (modra barva), 0.9 (rdeča barva) in 1.2 (zelena barva). Kot nerazgrajen vzorec smo uporabili sterilno BHM gojišče z 1 % CMC, razgrajen vzorec je bil odvzet 9 dni po nacepiti gojišča z bakterijo *Cellulomonas uda*. Inkubacija bakterijske kulture je potekala pri 37 °C, s stresanjem pri 200 rpm. Na abscisni osi je prikazan čas elucije v minutah, na ordinatni osi je RI (ang. *refractive index*) signal. Polna črta označuje nerazgrajen vzorec, prekinjena črta pa razgrajen (R).

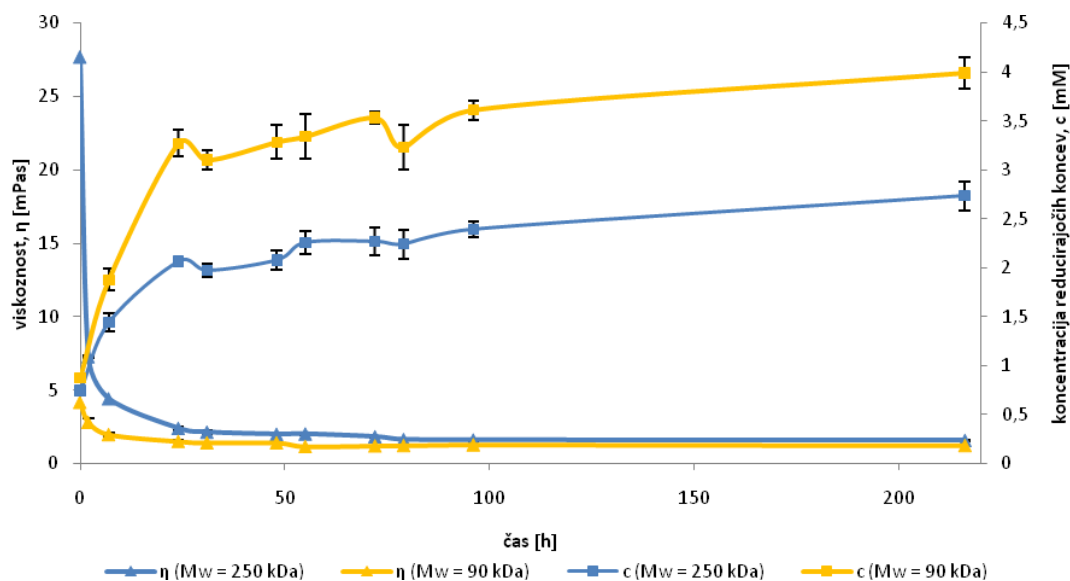
4.2 VPLIV MOLSKE MASE KARBOKSIMETIL CELULOZE NA RAZGRADNJO

Za izvedbo tega poskusa smo uporabili CMC z $M_w = 90$ kDa in $M_w = 250$ kDa. Kot je prikazano na sliki 11, ima molska masa vpliv na rast bakterijske kulture. Bakterija *C. uda* bolje izrablja CMC z $M_w = 250$ kDa in doseže večjo nosilnost okolja. Na težjem derivatu je maksimalna vrednost optične gostote ($OD_{650} \approx 0,16$) dosežena po 79 urah, na lažjem derivatu je maksimum rasti ($OD_{650} \approx 0,10$) dosežen že po 31 urah. Razlike v izmerjenih vrednostih optične gostote so significantne in se pojavijo po 24 urah inkubacije. Hitrosti rasti na CMC z $M_w = 90$ kDa ($k_{(90\text{kDa})} = 0,09/\text{h} \pm 0,01/\text{h}$) in na CMC z $M_w = 250$ kDa ($k_{(250\text{kDa})} = 0,10/\text{h} \pm 0,01/\text{h}$) se ne razlikujeta značilno.



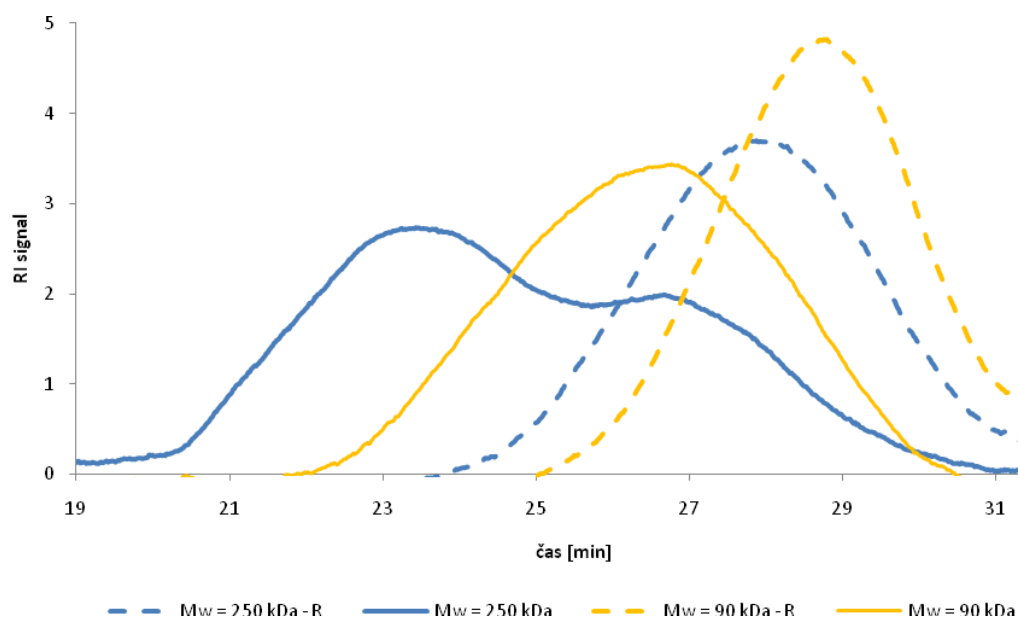
Slika 11: Vpliv molske mase karboksimetil celuloze (CMC) na hitrost rasti bakterije *Cellulomonas uda*. Proučevali smo CMC z $M_w = 90$ kDa (rumena barva) in z $M_w = 250$ kDa (modra barva). Stopnja substituiranosti (DS) je bila v obeh primerih 0.7. Bakterijsko kulturo smo gojili v tekočem BHM gojišču z 1 % CMC pri 37 °C, s stresanjem pri 200 rpm. Na abscisni osi je čas inkubacije v urah, na ordinatni osi pa optična gostota. Prikazana je povprečna vrednost in standardni odklon.

Pri spremljanju biorazgradnje CMC z različnima molskima masama smo ugotovili significantno višje koncentracije reducirajočih koncev na CMC z $M_w = 90$ kDa, kar na prvi pogled ne sovпада z rastjo na proučevanih CMC. Viskoznosti gojišč pred nacepitvijo z bakterijsko kulturo se precej razlikujejo; začetna vrednost viskoznosti gojišča z 250 kDa težkim CMC je 27,7 mPas, viskoznost 90 kDa CMC pa samo 4,15 mPas. Viskoznost težjega derivata pada počasneje kot viskoznost lažjega derivata. Po treh dneh inkubacije pa ni več significantnih razlik v viskoznosti proučevanih vzorcev.



Slika 12: Vpliv molske mase karboksimetil celuloze (CMC) na biorazgradnjo. Proučevali smo CMC z $M_w = 90$ kDa (rumena barva) in z $M_w = 250$ kDa (modra barva). Stopnja substituiranosti (DS) je bila v obeh primerih 0.7. Vpliv smo spremljali z bakterijo *Cellulomonas uda* v BHM gojišču z 1 % CMC. Inkubacija je potekala pri 37 °C, s stresanjem pri 200 rpm. Na abscisni osi je čas inkubacije v urah, na primarni ordinatni osi je viskoznost (η) prikazana s trikotniki in podana v mPas, na sekundarni ordinatni osi so koncentracije reducirajočih koncev (c) prikazane s kvadrati in podane v mM. Prikazana je povprečna vrednost in standardni odklon.

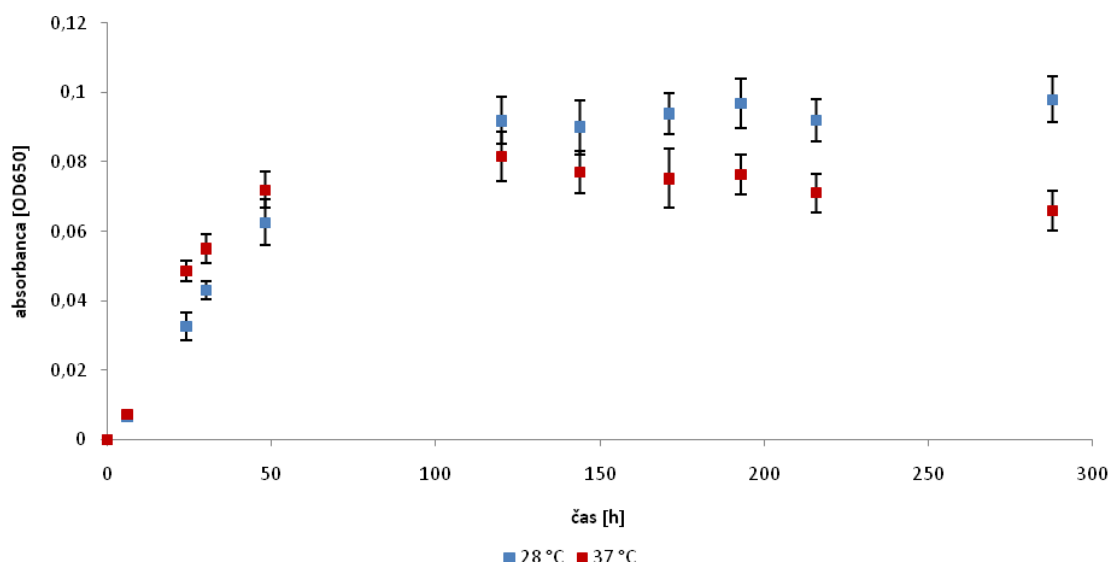
Razlike v molski masi med razgrajenimi in nerazgrajenimi vzorci smo ugotavljali s HPLC-SEC. Kromatograma nerazgrajenih CMC se razlikujeta v distribuciji in v času elucije. Za CMC z $M_w = 250$ kDa je značilna široka distribucija in dva vrhova (pri 23. in 27. minuti), na drugi strani ima CMC z $M_w = 90$ kDa le en kromatografski vrh pri 27. minuti. Distribucija razgrajenih CMC pa je precej podobna. Produkti razgradnje težjega CMC so nekoliko večji, saj opazimo kromatografski vrh pri 28. minuti, vrh razgrajenega 90 kDa težkega CMC pa je pri 29. minuti.



Slika 13: HPLC-SEC kromatogrami razgrajenih in nerazgrajenih vzorcev karboksimetil celuloze (CMC) z različno molsko maso. Proučevali smo CMC z $M_w = 90$ kDa (rumena barva) in z $M_w = 250$ kDa (modra barva). Stopnja substituiranosti (DS) je bila v obeh primerih 0.7. Kot nerazgrajen vzorec smo uporabili sterilno BHM gojišče z 1 % CMC, razgrajen vzorec je bil odvzet 9 dni po nacepiti gojišča z bakterijo *Cellulomonas uda*. Inkubacija bakterijske kulture je potekala pri 37 °C, s stresanjem pri 200 rpm. Na abscisni osi je prikazan čas elucije v minutah, na ordinatni je RI (ang. *refractive index*) signal. Polna črta označuje nerazgrajen vzorec, prekinjena črta pa razgrajen (R).

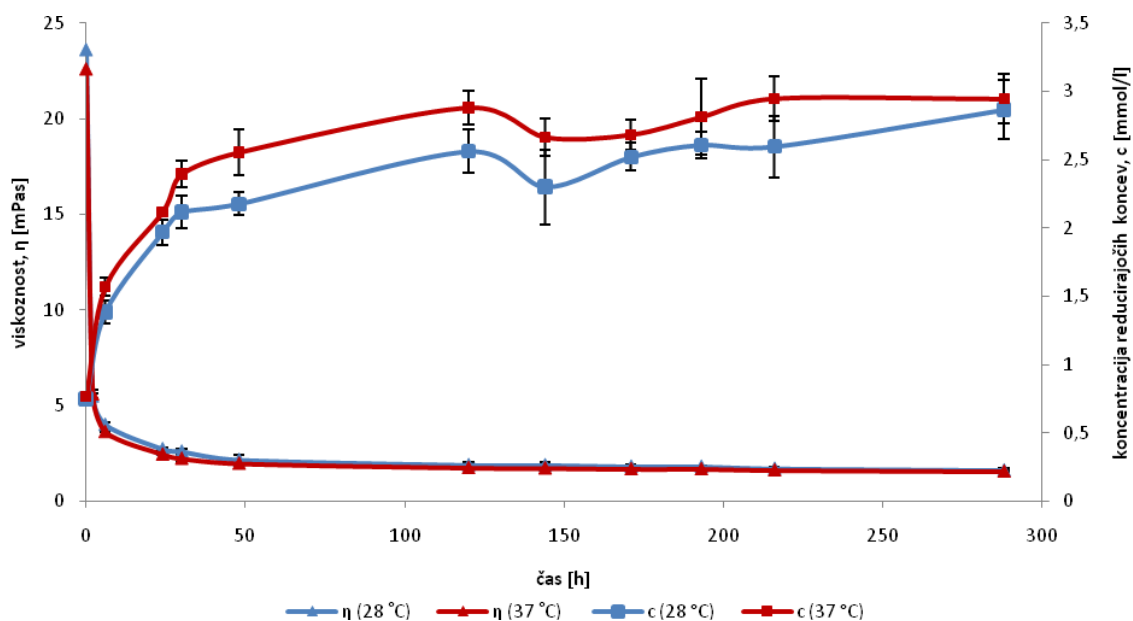
4.3 VPLIV TEMPERATURE NA RAZGRADNJO KARBOKSIMETIL CELULOZE

Temperatura vpliva na aktivnost bakterij, zato nas je zanimala razlika v razgradnji CMC pri 28 °C in 37 °C z bakterijo *C. uda*. Ker je bila v do sedaj opisanih poskusih rast bakterij najboljša na CMC z $M_w = 250$ kDa in $DS = 0.7$, smo za ugotavljanje vpliva temperature izbrali prav ta derivat. Kot prikazuje slika 14, je rast na začetku nekoliko višja pri 37 °C, po 5 dneh inkubacije pa smo izmerili višje vrednosti optične gostote pri 28 °C. Razlike so se med stacionarno fazo večale predvsem na račun upada optične gostote pri 37 °C.



Slika 14: Vpliv temperature na hitrost rasti bakterije *Cellulomonas uda*. Bakterijsko kulturo smo gojili v tekočem BHM gojišču z 1 % karboksimetil celulozo (CMC) ($M_w = 250$ kDa, stopnja substituiranosti (DS) je 0.7). Inkubacija je potekala pri 28 (modra barva) in 37 °C (rdeča barva), s stresanjem pri 200 rpm. Na abscisni osi je čas inkubacije v urah, na ordinatni osi pa optična gostota. Prikazana je povprečna vrednost in standardni odklon.

Rezultati rasti bakterijske kulture in njene sposobnosti razgradnje CMC pri 28 °C in 37 °C kažejo, da izbrani temperaturi ne vplivata znatno na viskoznost CMC (slika 15). Koncentracija reducirajočih koncev in viskoznost gojišč korelirata signifikantno ($r^2 = 97$ % oz. $r^2 = 100$ %) pri 28 °C in 37 °C. Pri obeh temperaturah je najvišja koncentracija reducirajočih koncev dosežena v zadnji točki vzorčenja in znaša okoli 3 mM. Viskoznost gojišč pada pri obeh temperaturah povsem primerljivo iz začetnih 23 mPas na 1,6 mPas, kolikor smo izmerili po končani inkubaciji.

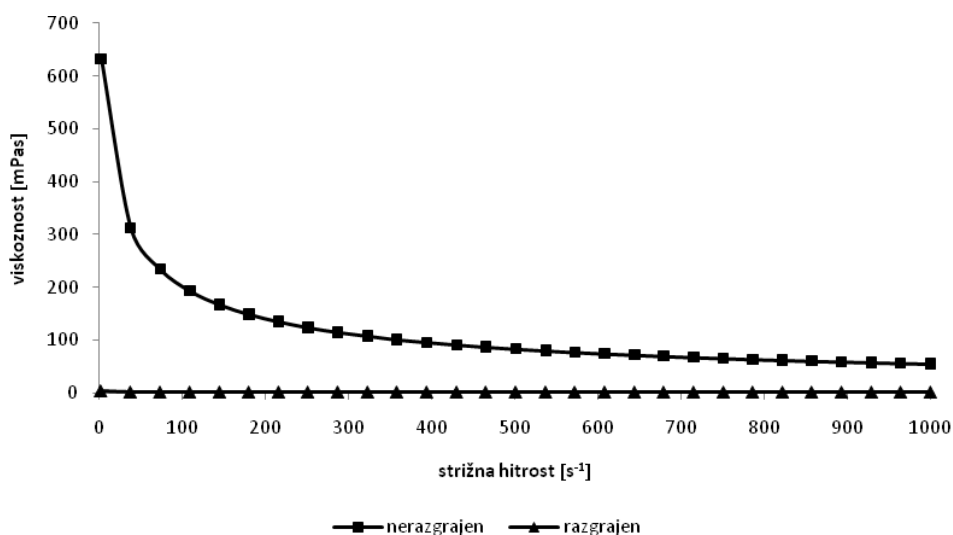


Slika 15: Vpliv temperature na biorazgradnjo karboksimetil celuloze (CMC). Vpliv smo spremljali z bakterijo *Cellulomonas uda* v BHM gojišču z 1 % CMC ($M_w = 250$ kDa, stopnja substituiranosti (DS) je 0.7) pri 28 (modra barva) in 37 °C (rdeča barva), s stresanjem pri 200 rpm. Na abscisni osi je čas inkubacije v urah, na primarni ordinatni osi je viskoznost (η) prikazana s trikotniki in podana v mPas, na sekundarni ordinatni osi so koncentracije reducirajočih koncev (c) prikazane s kvadrati in podane v mM. Prikazana je povprečna vrednost in standardni odklon.

Vpliv biorazgradnje na spremembo tokovnega obnašanja raztopin proučevanih karboksimetil celuloz je prikazan v prilogi B. Pri vseh proučevanih derivatih celuloze je biorazgradnja povzročila izgubo pseudoplastičnih lastnosti, ki so ključne v nekaterih industrijskih aplikacijah, npr. v industriji vodnih barv. Raztopine z razgrajenimi derivati celuloze so postale Newtonske.

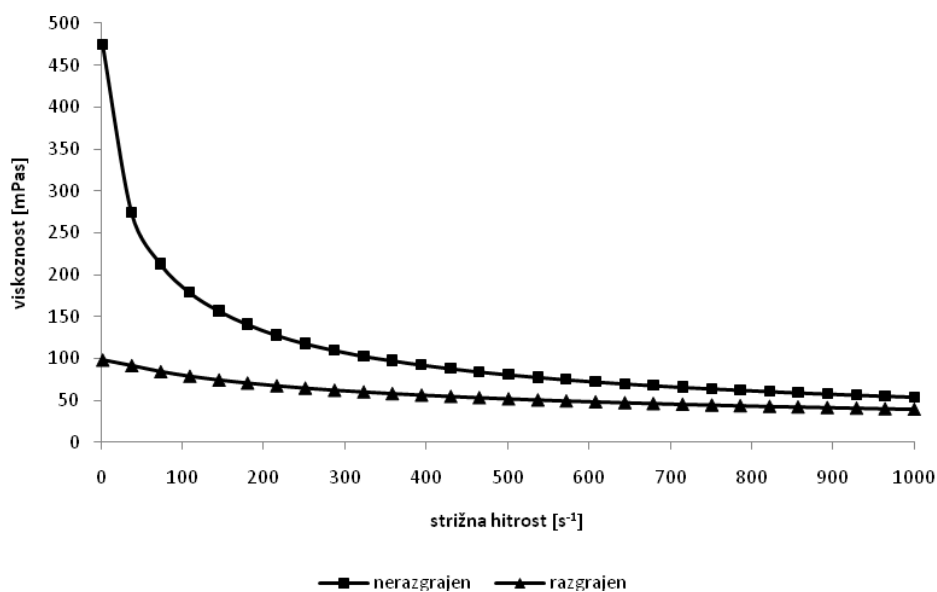
4.4 BIORAZGRADNJA RAZLIČNIH TIPOV HIDROKSJETIL CELULOZE

Spremljali smo razgradnjo štirih komercialno dostopnih tipov HEC in njihovo obnašanje v tekočem BHM gojišču pred in po nacepiti s kulturo *C. uda*. Na sliki 16 je prikazano tokovno obnašanje Natrosola 250 HHR. Ta derivat je predstavljal pozitivno kontrolo pri opazovanju mikrobne razgradnje različnih HEC, saj ima nesubstituirane regije, na osnovni skelet pa so vezane samo hidroksietilne skupine. Struktura prisotnih nesubstituiranih regij torej omogoča razgradnjo z bakterijsko kulturo. Raztopina z nativnim Natrosolom 250 HHR kaže značilno pseudoplastično obnašanje, saj viskoznost pada s povečevanjem strižne hitrosti. Na drugi strani ima raztopina z razgrajenim Natrosolom 250 HHR povsem Newtonske tokovne lastnosti.



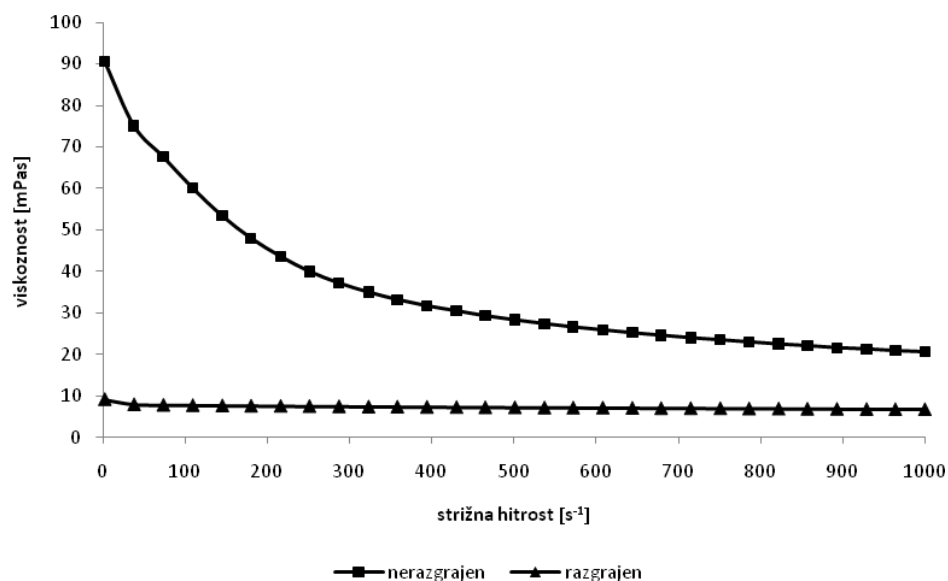
Slika 16: Tokovno obnašanje raztopin z razgrajenim in nerazgrajenim Natrosolom 250 HHR. Kot nerazgrajen vzorec smo uporabili sterilno BHM gojišče z 0,7 % Natrosolom 250 HHR, razgrajen vzorec je bil odvzet 7 dni po nacepiti gojišča z bakterijsko kulturo *Cellulomonas uda*. Inkubacija bakterijske kulture je potekala pri 37 °C, s stresanjem pri 200 rpm. S kvadratki je prikazano tokovno obnašanje raztopine z nerazgrajenim Natrosolom 250 HHR, s trikotniki pa obnašanje razgrajenega derivata. Na abscisni osi je strižna hitrost v s^{-1} , na ordinatni osi je viskoznost podana v mPas.

Tudi Natrosol 250 H4BR ima na osnovni skelet vezane samo hidroksietilne skupine, vendar za razliko od Natrosola 250 HHR nima nesubstituiranih regij. Zaradi popolne substituiranosti je zmožnost bakterijske razgradnje slabša. S tem derivatom smo proučevali vpliv substituiranosti na biorazgradnjo HEC. Slika 17 prikazuje tokovno obnašanje raztopin Natrosola 250 H4BR pred in po inkubaciji z bakterijsko kulturo. V obeh primerih je obnašanje pseudoplastično, vendar je v prisotnosti bakterijske kulture pseudoplastični efekt znatno zmanjšan.



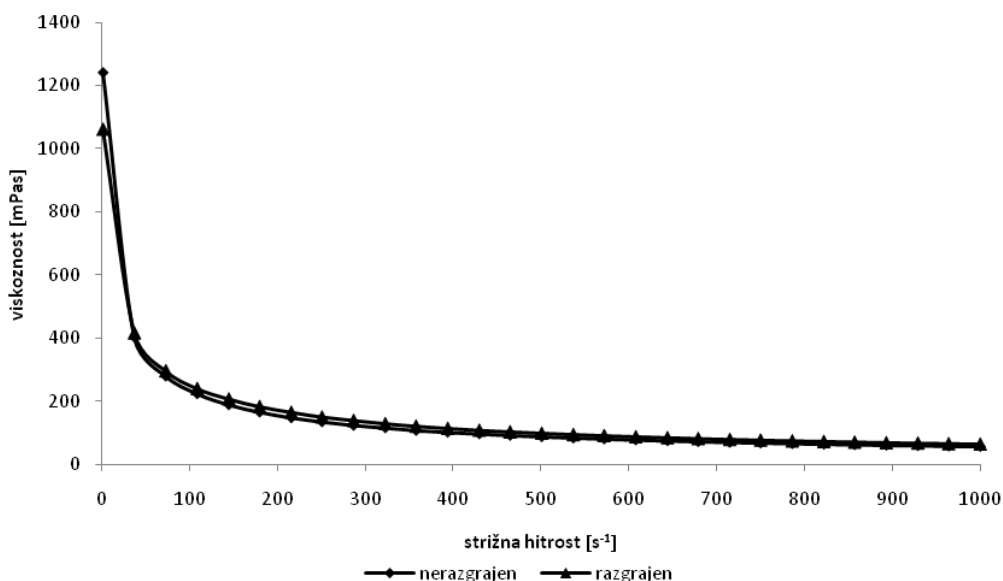
Slika 17: Tokovno obnašanje raztopin z razgrajenim in nerazgrajenim Natrosolom 250 H4BR. Kot nerazgrajen vzorec smo uporabili sterilno BHM gojišče z 0,7 % Natrosolom 250 H4BR, razgrajen vzorec je bil odvzet 7 dni po nacepiti gojišča z bakterijsko kulturo *Cellulomonas uda*. Inkubacija bakterijske kulture je potekala pri 37 °C, s stresanjem pri 200 rpm. S kvadratki je prikazano tokovno obnašanje raztopine z nerazgrajenim Natrosolom 250 H4BR, s trikotniki pa obnašanje razgrajenega derivata. Na abscisni osi je strižna hitrost v s^{-1} , na ordinatni osi je viskoznost podana v mPas.

V raziskavo smo vključili tudi Natrosol PLUS 330 PA, saj nas je zanimal učinek velikosti substituentov na razgradnjo HEC. Natrosol PLUS 330 PA ima poleg hidroksietilnih skupin vezane še dolgoverižne alkilne skupine. Za ta derivat je značilno, da ni popolnoma substituiran, vendar pa bi lahko razgradnjo sterično zmanjšala velikost dodanih substituentov. Slika 18 prikazuje psevdoplastično obnašanje raztopine nerazgrajenega Natrosola PLUS 330 PA, vzorec, odvzet po sedmih dneh inkubacije z bakterijsko kulturo, pa psevdoplastičnosti ne kaže.



Slika 18: Tokovno obnašanje raztopin z razgrajenim in nerazgrajenim Natrosolom PLUS 330 PA. Kot nerazgrajen vzorec smo uporabili sterilno BHM gojišče z 0,7 % Natrosolom PLUS 330 PA, razgrajen vzorec je bil odvzet 7 dni po nacepitvi gojišča z bakterijsko kulturo *Cellulomonas uda*. Inkubacija bakterijske kulture je potekala pri 37 °C, s stresanjem pri 200 rpm. S kvadratki je prikazano tokovno obnašanje raztopine z nerazgrajenim Natrosolom PLUS 330 PA, s trikotniki pa obnašanje razgrajenega derivata. Na abscisni osi je strižna hitrost v s^{-1} , na ordinatni osi je viskoznost podana v mPas.

Glede na strukturo naj bi bil Bermocoll EBM 5500 med proučevanimi tipi HEC najbolj stabilen, saj nima nesubstituiranih regij. Na osnovni skelet ima vezane metil etil hidroksietilne skupine, ki s svojo velikostjo še dodatno zmanjšujejo zmožnost biološke razgradnje. Tokovno obnašanje raztopin Bermocolla EBM 5500 pred in po nacepitvi z bakterijsko kulturo je prikazano na sliki 19. Obe raztopini kažeta značilno psevdoplastično obnašanje.



Slika 19: Tokovno obnašanje raztopin z razgrajenim in nerazgrajenim Bermocollom EBM 5500. Kot nerazgrajen vzorec smo uporabili sterilno BHM gojišče z 0,7 % Bermocollom EBM 5500, razgrajen vzorec je bil odvzet 7 dni po nacepiti gojišča z bakterijsko kulturo *Cellulomonas uda*. Inkubacija bakterijske kulture je potekala pri 37 °C, s stresanjem pri 200 rpm. S kvadratki je prikazano tokovno obnašanje raztopine z nerazgrajenim Bermocollom EBM 5500, s trikotniki pa obnašanje razgrajenega derivata. Na abscisni osi je strižna hitrost v s^{-1} , na ordinatni osi je viskoznost podana v mPas.

Bakterijsko in encimsko razgradnjo različnih tipov HEC smo spremljali tudi z ugotavljanjem koncentracije reducirajočih koncev in z merjenjem viskoznosti gojišča po času. Za encimsko razgradnjo smo uporabili celulazno mešanico, pridobljeno iz izrabljenega BHM gojišča z 1 % CMC (DS = 0.7 in $M_w = 90$ kDa). Proučevali smo samo odziv bakterije oz. encimov na izbrane substrate, zato je vzorčenje potekalo le dvakrat. Zanimalo nas je tudi, ali je bakterija *C. uda* sposobna rasti na izbranih tipih HEC in ali se sintetizirani encimi v primeru, ko je prisotna hidroksietil celuloza, razlikujejo od tistih, ki jih bakterija potrebuje za razgradnjo CMC. Ugotovili smo, da proučevani tipi HEC niso dober vir energije za rast bakterije *C. uda* (glej prilogo C).

Iz preglednice 1 je razvidno, da so bakterije kljub odsotnosti rasti najbolj učinkovito razgradile Natrosol 250 HHR, saj je končna koncentracija dosegla kar 5-kratno začetno vrednost. Pri ostalih primerih bakterijske razgradnje HEC bistvenega povišanja koncentracije reducirajočih koncev nismo ugotovili, enako velja tudi za razgradnjo s celulazami.

Preglednica 1: Spremljanje biorazgradnje različnih tipov hidroksietil celuloze (HEC) z ugotavljanjem koncentracije reducirajočih koncev. V preglednici so podane koncentracije reducirajočih koncev [v mM] na začetku poskusa in po 7 dneh inkubacije pri 37 °C. Bakterijsko kulturo *Cellulomonas uda* smo inkubirali aerobno v BHM gojišču z 0,7 % HEC pri 200 rpm. Mešanico celulaz in 0,7 % raztopin HEC smo inkubirali brez stresa. V preglednici so podane povprečne vrednosti in standardni odklon.

Hidroksietil celuloza	BAKTERIJSKA KULTURA		CELULAZE	
	t = 0 dni	t = 7 dni	t = 0 dni	t = 7 dni
Natrosol 250 H4BR	0,24 ± 0,03	0,14 ± 0,04	0,60 ± 0,14	0,74 ± 0,02
Natrosol 250 HHR	0,30 ± 0,03	1,53 ± 0,13	0,74 ± 0,03	0,85 ± 0,02
Natrosol PLUS 330 PA	0,15 ± 0,07	0,14 ± 0,07	0,69 ± 0,04	0,92 ± 0,15
Bermocoll EBM 5500	0,35 ± 0,07	0,61 ± 0,41	1,11 ± 0,05	1,36 ± 0,30

*Pri encimskem testu smo ugotovili višje začetne koncentracije reducirajočih koncev, saj smo imeli zaradi dodatka celulazne mešanice v raztopini tudi razgrajen CMC.

Najbolj izrazit padec v viskoznosti zaznamo pri bakterijski razgradnji Natrosola 250 HHR, kot prikazuje preglednica 2. Tudi pri encimski razgradnji tega derivata viskoznost pade, vendar ne tako izrazito. Rezultati viskoznosti Natrosola PLUS 330 PA kažejo, da je prišlo do delne razgradnje tako z bakterijami kot s celulazami. Pri bakterijski razgradnji Natrosola 250 H4BR viskoznost nekoliko pade, pri encimski razgradnji pa celo naraste. Zanimivo je, da naraščanje viskoznosti opazimo tudi v primeru Bermocolla EBM 5500.

Preglednica 2: Spremljanje biorazgradnje različnih tipov hidroksietil celuloze (HEC) z merjenjem viskoznosti. V preglednici so podane vrednosti viskoznosti [v mPas] na začetku poskusa in po 7 dneh inkubacije pri 37 °C. Bakterijsko kulturo *Cellulomonas uda* smo inkubirali aerobno v BHM gojišču z 0,7 % HEC pri 200 rpm. Mešanico celulaz in 0,7 % raztopin HEC smo inkubirali brez stresa. V preglednici so podane povprečne vrednosti in standardni odklon.

Hidroksietil celuloza	BAKTERIJSKA KULTURA		CELULAZE	
	t = 0 dni	t = 7 dni	t = 0 dni	t = 7 dni
Natrosol 250 H4BR	50,73 ± 7,50	39,60 ± 0,92	15,30 ± 1,91	26,50 ± 4,40
Natrosol 250 HHR	54,17 ± 0,81	1,13 ± 0,03	25,33 ± 3,73	4,67 ± 0,32
Natrosol PLUS 330 PA	19,77 ± 0,74	6,77 ± 0,09	11,43 ± 0,47	6,67 ± 0,66
Bermocoll EBM 5500	55,53 ± 1,81	67,77 ± 4,04	22,10 ± 6,80	31,83 ± 4,84

*Pri encimskem testu so začetne vrednosti viskoznosti nižje, saj smo imeli zaradi dodatka celulazne mešanice le približno 0,5 % raztopine HEC.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

V diplomski nalogi smo želeli pokazati,

- da je bakterijska razgradnja CMC odvisna od stopnje substituiranosti, od molske mase in od temperature inkubacije ter
- da na biorazgradljivost HEC in tokovne lastnosti vpliva predvsem delež nesubstituiranih regij v derivatu.

5.1 VPLIV STOPNJE SUBSTITUIRANOSTI KARBOKSIMETIL CELULOZE NA RAZGRADNJO

Razgradnjo različno substituiranih CMC (z DS 0.7, 0.9, 1.2) smo spremljali z bakterijo *C. uda* v prilagojenem BHM gojišču z 1 % CMC. Ker smo CMC uporabili kot edini vir ogljika, smo sklepali, da prisotnost bakterijske rasti kaže na razgradnjo derivata. Primerjava hitrosti rasti bakterijskih kultur je pokazala, da DS vpliva na bakterijsko razgradnjo CMC. Rast je bila najboljša na najmanj substituiranem CMC (DS = 0.7), prav tako tudi razgradnja, ki smo jo spremljali z reducirajočimi konci. Hidroliza CMC (DS = 1.2) odstopa od ostalih stopenj substituiranosti in je najmanjša. Razlog je verjetno v tem, da imajo raztopine CMC z DS > 1 bolj substituirane verige in so posledično manj dostopne za encimsko razgradnjo zaradi steričnih omejitev, ki jih povzročajo substituenta. Pri vseh treh tipih CMC viskoznost izrazito pade že dve uri po nacepiti gojišč z bakterijsko kulturo. Sklepamo, da celulolitični encimi takoj hidrolizirajo CMC derivate na najbolj dostopnih mestih, kar poveča število verig in zmanjša njihovo povprečno velikost. Na preostalih verigah se število nesubstituiranih (lažje dostopnih) regij zmanjša, kar upočasni nadaljnjo razgradnjo. Začetne vrednosti (pred nacepiti gojišč) so skladne z ugotovitvijo, da viskoznost raztopin CMC signifikantno pade, ko presežemo DS = 0.95 (Kulicke in sod., 1996), kar je posledica padca molske mase. Kljub temu, da CMC pripravijo iz iste celuloze, molska masa zaradi degradacijskih učinkov med reakcijo pada z naraščajočim DS (Clasen in Kulicke, 2001).

Biorazgradnja CMC (z DS 0.7, 0.9, 1.2) z bakterijsko kulturo *C. uda* je primerljiva tisti s celulazami, ki so jo opravili Lee in sod. (2006). Že po eni uri delovanja encimov so ugotovili izrazit padec v viskoznosti raztopin CMC, razgradnja je bila prav tako najboljša pri DS = 0.7, pri DS = 1.2 pa komaj opazna. Iz rezultatov izhaja, da je v primeru, ko je v povprečju na vsako anhidroglukozno enoto vezana vsaj ena karboksimetilna skupina (DS > 1), tak derivat praktično nerazgradljiv. Kot je ugotovil Wirick (1986), je razgradnja možna na tistih mestih v verigi CMC, kjer imamo tri ali več sosednih anhidroglukoznih enot, ki niso substituirane. Taka distribucija karboksimetilnih skupin je seveda bolj verjetna pri derivatih z nižjim DS, ki so zato tudi bolj razgradljivi.

Distribucijo vezanih skupin smo preverili s kvalitativnim ugotavljanjem deleža nesubstituiranih regij. Najbolj kompakten gel je nastal v primeru CMC z DS = 0.7, kar dokazuje, da ima ta polimer med proučevanimi CMC najvišji delež nesubstituiranih regij in je

zato najbolj razgradljiv. Nekoliko nižji delež nesubstituiranih regij ima CMC z DS = 0.9, zaradi česar je tudi razgradnja tega derivata nekoliko slabša, kot v primeru CMC z DS = 0.7. Najbolj tekoč gel je tvoril CMC z DS = 1.2, kar dokazuje, da je distribucija vezanih skupin v tem primeru najbolj homogena. Povzamemo lahko, da je hidroliza CMC in z njo povezana rast odvisna od deleža nesubstituiranih regij, sam delež pa je odvisen od DS; višji kot je DS, nižji je delež nesubstituiranih regij.

Razlike v porazdelitvi molekulskih mas med razgrajenimi in nerazgrajenimi CMC smo pokazali tudi s HPLC-SEC. Kromatogrami nerazgrajenih vzorcev imajo dva vrhova in v splošnem široko distribucijo, kar nakazuje, da material ni monodisperzen, ampak je sestavljen iz različno velikih verig. Elucijski čas razgrajenih vzorcev CMC je bil daljši, kar dokazuje razgradnjo derivatov in zmanjšanje povprečne velikosti verig. Odstopa razgradnja CMC z DS = 1.2, ki ima krajši čas elucije in širšo distribucijo, kar nakazuje, da je bila bakterijska razgradnja tega derivata delna in so se razgradile samo najdaljše verige.

5.2 VPLIV MOLSKE MASE KARBOKSIMETIL CELULOZE NA RAZGRADNJO

Vpliv molske mase na biorazgradnjo smo spremljali na dveh CMC različnih molskih mas (90 in 250 kDa) z DS 0.7. Ugotovili smo, da bakterija *C. uda* bolje raste na 250 kDa derivatu, medtem ko je koncentracija reducirajočih koncev višja na lažjem (za približno 1mM). Zanimivo je, da se dobljeni rezultati razlikujejo od navedenih encimskih testov v literaturi. Zasledimo namreč, da stopnja polimerizacije ne vpliva na hidrolizo CMC s celulazami (Reese in sod., 1950; Hankin in Anagnostakis, 1977).

Molska masa ključno vpliva na viskoznost raztopin (Reese in sod., 1950), to dejstvo so potrdili tudi naši rezultati. Viskoznost težjega derivata pade na začetno vrednost lažjega 7 ur po nacepiti z bakterijsko kulturo. Sklepamo lahko, da v tem času verjetno poteče cepitev 250 kDa težkih CMC do približne molske mase 90 kDa. Kljub temu, da se končne viskoznosti 250 in 90 kDa vzorca ne razlikujejo signifikantno, pa HPLC-SEC analiza nakazuje na različno porazdelitev končnih produktov hidrolize.

5.3 VPLIV TEMPERATURE NA RAZGRADNJO KARBOKSIMETIL CELULOZE

Optimalna temperatura za razgradnjo CMC z bakterijami rodu *Cellulomonas* je 40 °C, rast teh mezofilov pa je najboljša pri 30 °C (Thayer in sod., 1984). Vpliv temperature smo preverili za sev *C. uda* DSM 20108 pri 28 °C in 37 °C. Ugotovili smo, da sta tako razgradnja kot tudi hitrost rasti pri izbranih temperaturah podobni v eksponentni fazi rasti. Kažejo se sicer nekoliko višje koncentracije reducirajočih koncev pri 37 °C, vendar razlike večinoma niso signifikantne. Boljša razgradnja pri 37 °C bi bila pričakovana, saj je pri tej temperaturi celulazna aktivnost višja (glej prilogo A). V literaturi zasledimo, da je pri višji temperaturi (37 °C) encimska aktivnost boljša, rast pa slabša. Pri nižji temperaturi (28 °C) velja ravno obratno. Tega nismo mogli v celoti potrditi z našimi rezultati.

5.4 BIORAZGRADNJA RAZLIČNIH TIPOV HIDROKSJETIL CELULOZE

V industriji se poleg CMC uporabljajo tudi drugi celulozni derivati. Kot poročajo Reese in sod. (1950) je HEC odličen substrat za večino mikroorganizmov. Ključen zunajcelični encim, ki omogoča razgradnjo HEC, je β -1,4-endoglukanaza, ki naključno cepi notranje β -1,4-glikozidne vezi. Tovrstna razgradnja je bila opisana pri številnih mikroorganizmih, med drugim je značilna tudi za glivo *Aspergillus niger* (El Ahwany in Mohamed, 2008).

Razgradnjo različnih tipov HEC in njihovo reološko obnašanje v tekočem BHM gojišču smo spremljali pred in po inkubaciji s kulturo *C. uda*. Vsi proučevani tipi HEC so pred nacepivitvijo kazali tipično psevdoplastično obnašanje. Natrosol 250 HHR in Natrosol PLUS 330 PA sta po končani inkubaciji z bakterijsko kulturo izgubila psevdoplastične lastnosti, kar dokazuje njuno razgradnjo. To kaže, da v primeru nepopolne substituiranosti, tudi velikost substituenta ni ovira za razgradnjo derivata. Reogram Natrosola 250 H4BR, odvzetega po inkubaciji, se sicer razlikuje od nerazgrajenega vzorca, vendar ohranja psevdoplastične lastnosti. Pri Bermocollu EBM 5500 reoloških razlik med vzorcem odvzetim pred in po inkubaciji praktično ni. Ugotovili smo, da je Bermocoll EBM 5500 biološko bolj stabilen kot Natrosol 250 H4BR, saj mu poleg popolne substituiranosti dodatno zaščito omogočajo tudi večje substituenti. Potrdili smo torej, da je biološka stabilnost HEC odvisna predvsem od deleža nesubstituiranih regij v derivatu. Natrosol 250 H4BR in Bermocoll EBM 5500 po navajanjih proizvajalcev nimata nesubstituiranih regij in sta zato biološko bolj stabilna kot ostala dva tipa HEC.

Bakterijsko in encimsko razgradnjo različnih tipov HEC smo spremljali tudi z ugotavljanjem koncentracije reducirajočih koncev in z merjenjem viskoznosti gojišča po času. Celulazno mešanico smo pridobili iz izrabljenega gojišča, kjer smo kot edini vir ogljika uporabili CMC. Na ta način smo želeli preveriti, ali encimi, ki razgrajujejo CMC, obenem razgradijo tudi HEC. Tako pridobljeni encimi niso imeli vidnejšega učinka na proučevanih tipih HEC, saj se koncentracija reducirajočih koncev po enotedenski inkubaciji ni bistveno povišala. Viskoznosti Natrosola 250 H4BR in Bermocolla EBM 5500 so se med eksperimentom celo povišale. Znano je, da se na derivate celuloze lahko adsorbirajo proteini in s tem vplivajo na reologijo raztopine (Lee in sod., 2006; Jones in sod., 1997). V encimski mešanici, ki smo jo dodali raztopinam HEC, so bili prisotni številni proteini in druge celične komponente. Ti so verjetno povzročili reorganizacijo derivatov in s tem povišanje viskoznosti. Glede na padec viskoznosti pri Natrosolu PLUS 330 PA in pri Natrosolu 250 HHR lahko sklepamo, da so celulaze delno razgradile omenjena derivata, vendar pa tega nismo zaznali z reducirajočimi konci.

Izbrani tipi HEC očitno niso bili dober substrat za bakterijo *C. uda*, kljub temu je bakterija sposobna razgraditi Natrosol 250 HHR do najvišje mere. Tako kot v nekaterih drugih raziskavah (Reese in sod., 1950; Hrmová in sod., 1991; El Ahwany in Mohamed, 2008), smo tudi mi razgradnjo HEC spremljali z uporabo DNS reagenta in ugotovili izrazito povišanje reducirajočih koncev le v primeru Natrosola 250 HHR. Z merjenjem viskoznosti smo ugotovili, da so bakterije delno razgradile tudi Natrosol PLUS 330 PA. Do padca v

viskoznosti pride tudi pri bakterijski razgradnji Natrosola 250 H4BR, vendar zaradi eksperimentalne napake rezultat ni signifikanten. V primeru Bermocolla EBM 5500 rezultati reducirajočih koncev in viskoznosti ne kažejo, da je prišlo do razgradnje.

Pri ugotavljanju razgradnje z reducirajočimi konci in z meritvami viskoznosti smo v nekaterih primerih paralelkam izmerili precej različne vrednosti, kar se odraža v standardnem odklonu. Razlog je v naravi proučevanih vzorcev, saj gre za izjemno viskozne raztopine, zaradi česar je bilo delo z njimi oteženo in manj natančno.

Rezultati encimske in bakterijske razgradnje Natrosola 250 HHR nakazujejo, da je bakterija *C. uda* sposobna sintetizirati različne tipe celulaz. Za razliko od nas, so Reese in sod. (1950) ugotovili, da so celulaze mikroorganizmov *Myrothecium verrucaria*, *Aspergillus flavus* in *Actinomyces* sp., gojenih na CMC, sposobne razgraditi tudi HEC, ne morejo pa npr. razgraditi metil celuloze, ki ima podoben DS kot HEC. Slednje dokazuje, da sta sinteza in funkcionalnost celulaz odvisni od tipa substrata.

5.5 SKLEPI

Iz dobljenih rezultatov razgradnje derivatov celuloze z bakterijo *C. uda* lahko trdimo, da:

- stopnja substituiranosti vpliva na razgradnjo CMC, pri najnižji stopnji je razgradnja najboljša,
- je pri večji molski masi CMC rast *C. uda* boljša, vendar dobimo manj reducirajočih koncev,
- je hitrost rasti *C. uda* na CMC in sprememba viskoznosti pri 28 °C in 37 °C primerljiva, koncentracija reducirajočih koncev pa je v povprečju nekoliko nižja pri 28 °C,
- je razgradnja HEC odvisna od deleža nesubstituiranih regij,
- so encimi, ki hidrolizirajo CMC, manj učinkoviti pri razgradnji HEC in da je bakterija *C. uda* sposobna sinteze različnih tipov celulaz,
- biorazgradnja derivatov celuloze spremeni tokovno obnašanje raztopin iz psevdoplastičnega v Newtonsko.

6 POVZETEK

Karboksimetil in hidroksietil celuloza sta vodotopna etra celuloze. Njuna prisotnost v vodni raztopini poviša viskoznost in spremeni lastnosti raztopine; nastane ne-Newtonska tekočina z značilnim psevdoplastičnim obnašanjem. Te lastnosti izkoriščajo v številnih industrijskih aplikacijah in produktih, kjer derivata opravljata tudi vlogo vezivnega sredstva, zgoščevalca, emulgatorja ali stabilizatorja (Clasen in Kulicke, 2001). Razgradnja derivatov povzroči izgubo značilnih reoloških lastnosti, zaradi česar postane proizvod neuporaben. Ker sta oba derivata celuloze biorazgradljiva (Reese in sod., 1950), nastane velika ekonomska škoda ob morebitni kontaminaciji produktov s celulolitičnimi mikroorganizmi. Nekatere bakterije in glive proizvajajo celulolitične encime, ki hidrolizirajo celulozni material (Dashtban in sod., 2010). Encimska hidroliza celuloznih derivatov je odvisna od lastnosti, števila in distribucije vezanih substituent (Reese in sod., 1950; Wirick, 1968; Glasser in sod., 1994). S spreminjanjem strukturnih parametrov vplivamo na biorazgradnjo derivatov. V diplomski nalogi smo zato ugotavljali vpliv stopnje substituiranosti in velikosti derivata ter narave samih substituent na razgradnjo.

Biorazgradnjo smo spremljali v tekočem BHM gojišču z izbranim derivatom celuloze, ki je predstavljal edini vir ogljika. Kot modelni organizem smo uporabili bakterijo *Cellulomonas uda*, saj je sposobna izrabljati derivate celuloze kot edini vir energije za rast. Razgradnjo derivatov smo spremljali z ugotavljanjem koncentracije reducirajočih koncev in merjenjem viskoznosti po času ter rezultate primerjali s hitrostjo rasti bakterijske kulture. Razlike med razgrajenimi in nerazgrajenimi vzorci CMC smo ugotavljali tudi s HPLC. Z reogrami smo prikazali vpliv biorazgradnje na tokovno obnašanje raztopin derivatov celuloze. Ugotovili smo, da stopnja substituiranosti (DS = 0.7, 0.9 in 1.2) ključno vpliva na razgradnjo CMC, pri najnižjem DS sta rast bakterij in razgradnja materiala najboljša, pri DS = 1.2 se razgradnja vidno upočasni. Tudi molska masa CMC ($M_w = 90$ kDa in $M_w = 250$ kDa) vpliva na razgradnjo. Bakterija *C. uda* bolje raste na težjem derivatu, na lažjem pa doseže višje koncentracije reducirajočih koncev. V raziskavo smo vključili tudi zunanji dejavnik, t.j. temperaturo. Ugotovili smo, da izbrani temperaturi (28 °C in 37 °C) ne vplivata znatno na biorazgradnjo CMC z bakterijo *C. uda*. Ob spremljanju biološke stabilnosti štirih komercialnih tipov HEC (Natrosol 250 H4BR, Natrosol 250 HHR, Natrosol PLUS 330 PA in Bermocoll EBM 5500) lahko zaključimo, da je najbolj stabilen tisti derivat, ki nima nesubstituiranih regij. Ugotovimo tudi, da celulaze, pridobljene iz izrabljenega gojišča s CMC, niso sposobne tako učinkovito hidrolizirati HEC kot CMC. Na drugi strani pa je živa bakterijska kultura povsem razgradila Natrosol 250 HHR. Slednje nakazuje, da je bakterija *C. uda* sposobna sintetizirati različne tipe celulaz.

7 VIRI

- Bär A., van Ommen B., Timonen M. 1995. Metabolic disposition in rats of regular and enzymatically depolymerized sodium carboxymethylcellulose. *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.
- 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, 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.
- 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.
- Dean W. L., Ferguson G. N. 1971. Bibulouse cellulosic fibers. United States Patent 3 589 364: 14 str.
- 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.
- El Ahwany A. M. D., Mohamed A. H. 2008. Enzymatic hydrolysis of pseudoplastic paint thickener (hydroxyethyl cellulose) by a local isolate of *Aspergillus niger*. *African Journal of Biotechnology*, 7, 20: 3765-3770.
- Eldib I. A. 1971. Carboxylated starches as detergent builders. United States Patent Office 3 629 121: 22 str.
- Glasser W. G., McCartney B. K., Samaranayake G. 1994. Cellulose derivates with low degree of substitution. 3. The biodegradability of cellulose esters using a simple enzyme assay. *Biotechnology Progress*, 10, 2: 214-219.

- 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.
- Hankin L., Anagnostakis S. L. 1977. Solid media containing carboxymethylcellulose to detect c_x cellulase activity of micro-organisms. *Journal of General Microbiology*, 98: 109-115.
- Hoefler A. C. 2011. Sodium carboxymethyl cellulose: Chemistry, functionality and applications. Wilmington, Food ingredients Group, Hercules Incorporated: 15 str. <http://class.fst.ohio-state.edu/fst621/Additive%20classes/cmctlk.pdf> (maj 2011)
- Hollabaugh C. B., Burt L. H., Peterson Walsh A. 1945. Carboxymethylcellulose: Uses and applications. *Industrial and Engineering Chemistry*, 37, 10: 943-947.
- Holt J. G., Krieg N., Sneath P., Staley J., Williams S. 1994. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 9th ed. Baltimore, Williams & Wilkins: 571-596.
- Hrmová M., Petráková E., Biely P. 1991. Induction of cellulase- and xylan-degrading enzyme systems in *Aspergillus terreus* by homo- and heterodisaccharides composed of glucose and xylose. *Journal of General Microbiology*, 137: 541-547.
- 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.
- 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.
- 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.
- La Rosa F. R., Giese E. C., Dekker R. F. H., Pelayo J. S., de Melo Barbosa A. 2008. Microbiological contamination of water-based paints from an industry in the state of Paraná, Brazil. *Ciências Exatas e da Terra, Londrina*, 29, 1: 85-92.
- Lee J. M., Heitmann J. A., Pawlak J. J. 2006. Rheology of carboxymethyl cellulose solutions treated with cellulases. *BioResources*, 2, 1: 20-33.
- 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.
- Miller G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31, 3: 426-428.
- Obidi O. F., Nwachukwu S. C., Aboaba O. O., Nwalor J. U. 2010. Estimation of shelf life for water-based paints using regression methods. *Journal of American Science*, 6, 4: 123-127.
- Pal K., Bantia 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.
- Rapp P., Wagner F. 1986. Production and properties of xylan-degrading enzymes from *Cellulomonas uda*. *Applied and Environmental Microbiology*, 51, 4: 746-752.
- 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.
- 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.
- 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.
- Sommers R. W. 1968. Densification of carboxymethyl cellulose. United States Patent Office 3 394 127: 10 str.
- 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.

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.

Tothill I. E., Seal K. J. 1993. Biodeterioration of waterborne paint cellulose thickeners, review. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 31: 241-254.

Wirick M. G. 1968. A study of the enzymic degradation of CMC and other cellulose ethers. *Journal of Polymer Science*, 6: 1965-1974.

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorju prof. dr. Davidu Stoparju za prijaznost in zanesljivost ter za vse strokovne nasvete in hiter pregled diplome. Hvala za vso podporo.

Posebna zahvala gre delovnemu mentorju Janezu Orehku za organizacijo eksperimentalnega dela in za pomoč pri pisanju diplome. Iskrena hvala za vse razlage, napotke in spodbudne besede.

Moja zahvala gre tudi recenzentki prof. dr. Romani Marinšek-Logar in vsem zaposlenim na Katedri za mikrobiologijo, Oddelka za živilstvo, ki so mi kakorkoli pomagali pri nastajanju diplome.

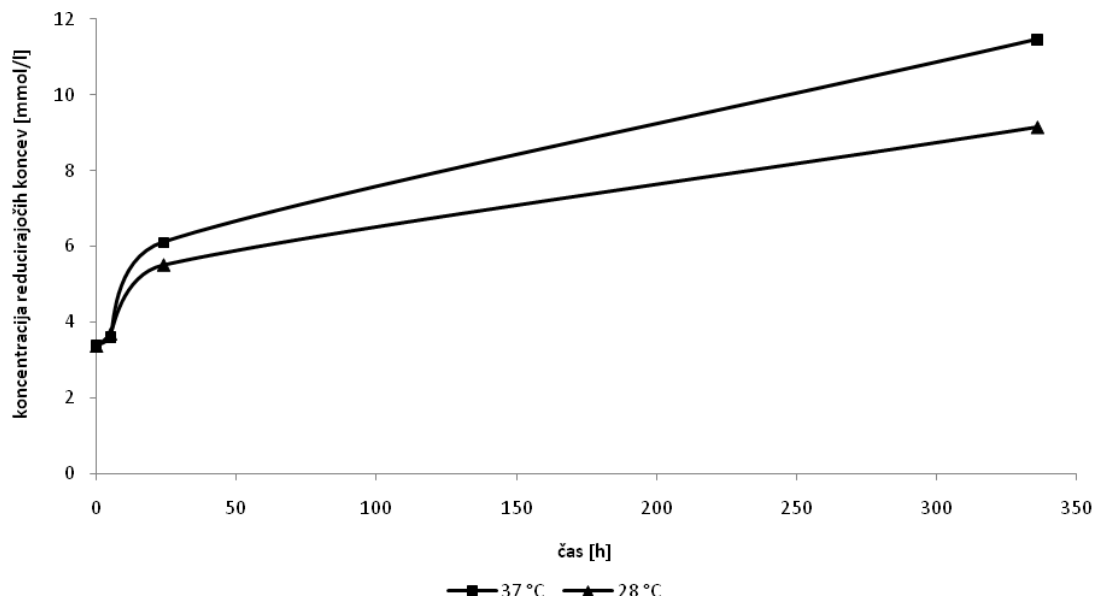
Največja zahvala gre mojim staršem in bratu, ki so me vedno podpirali in verjeli vame.

Nenazadnje se zahvaljujem tudi vsem prijateljicam/prijateljem, ki mi stojijo ob strani.

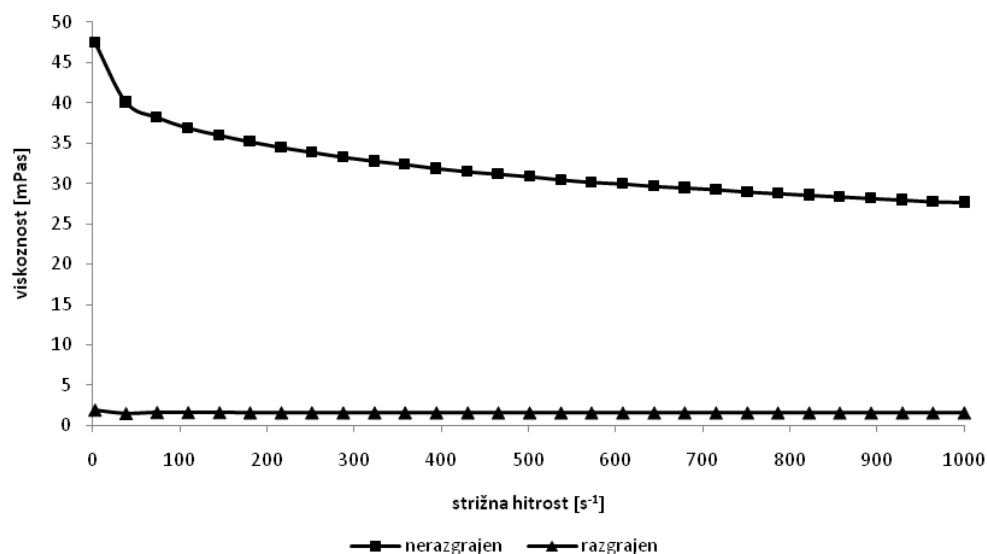
»Sreča je srečati prave ljudi, ki v tebi pustijo dobre sledi.«

(T. Pavček)

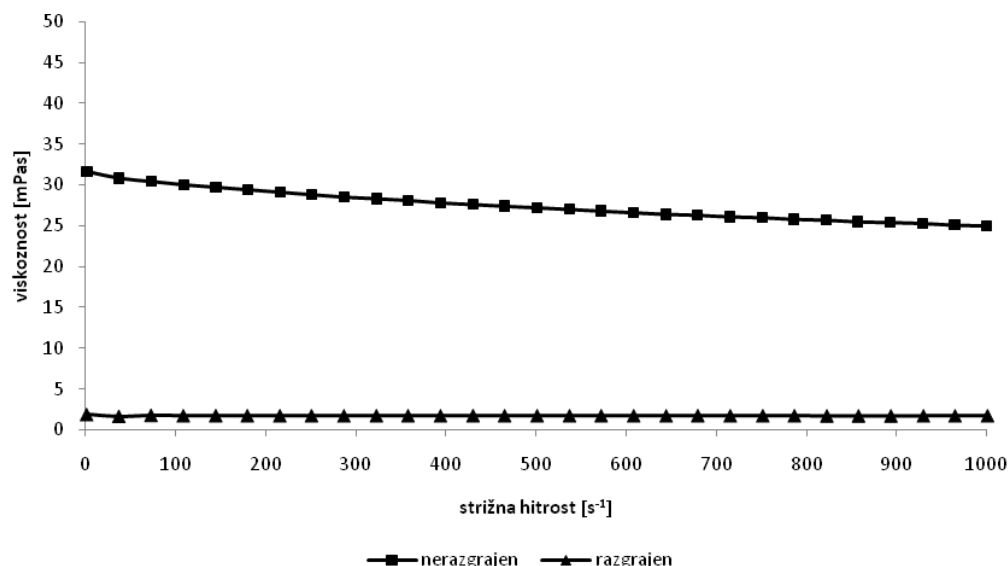
PRILOGE



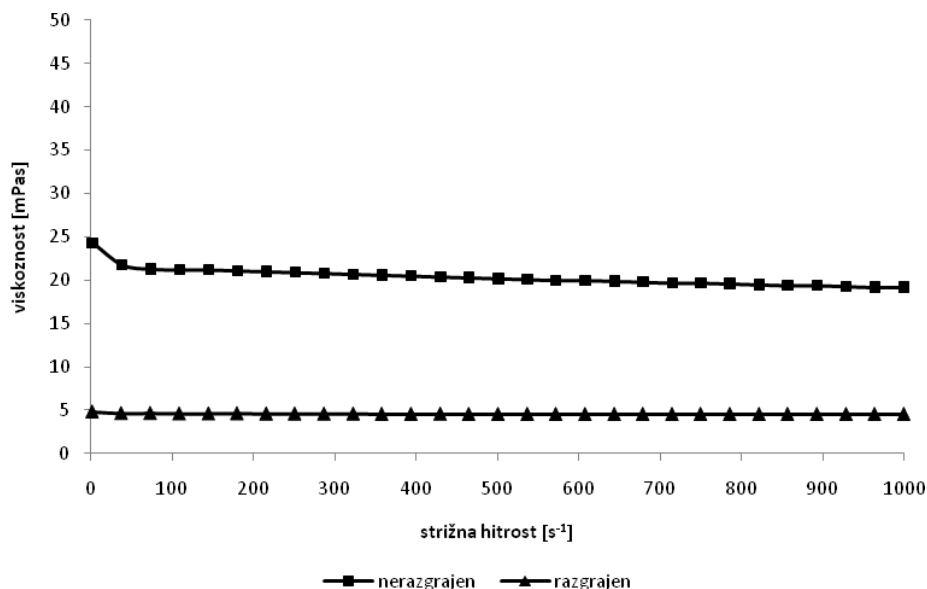
Priloga A: Vpliv temperature na encimsko razgradnjo karboksimetil celuloze (CMC). Razgradnja 3,5 % raztopine CMC ($M_w = 90$ kDa, $DS = 0.7$) z encimsko mešanico pri 28 °C in 37 °C. Prekonočno kulturo *Cellulomonas uda*, gojeno na trdnem PKE gojišču pri 28 °C, smo suspendirali v sterilni fiziološki raztopini. Z bakterijsko suspenzijo smo nacepili tekoče BHM gojišče z 1 % CMC ($M_w = 250$ kDa, $DS = 0.7$). Gojenje je potekalo aerobno pri 37 °C, s stresanjem pri 200 rpm. Po devetdnevni inkubaciji smo izrabljenemu gojišču s centrifugiranjem za 10 minut pri 13000 RCF odstranili celice in supernatant prefiltrirali preko 0,20 μ l filtra. 3,5 % sterilni raztopini CMC smo dodali pridobljeno encimsko mešanico, ki je predstavljala 1/3 celotne vsebine. Inkubacija je potekala brez stresanja pri 28 °C in 37 °C. Razgradnja pri 28 °C je označena s trikotniki, razgradnja pri 37 °C pa s kvadrati. Na abscisni osi je čas inkubacije v urah, na ordinatni osi je koncentracija reducirajočih koncev v mM.



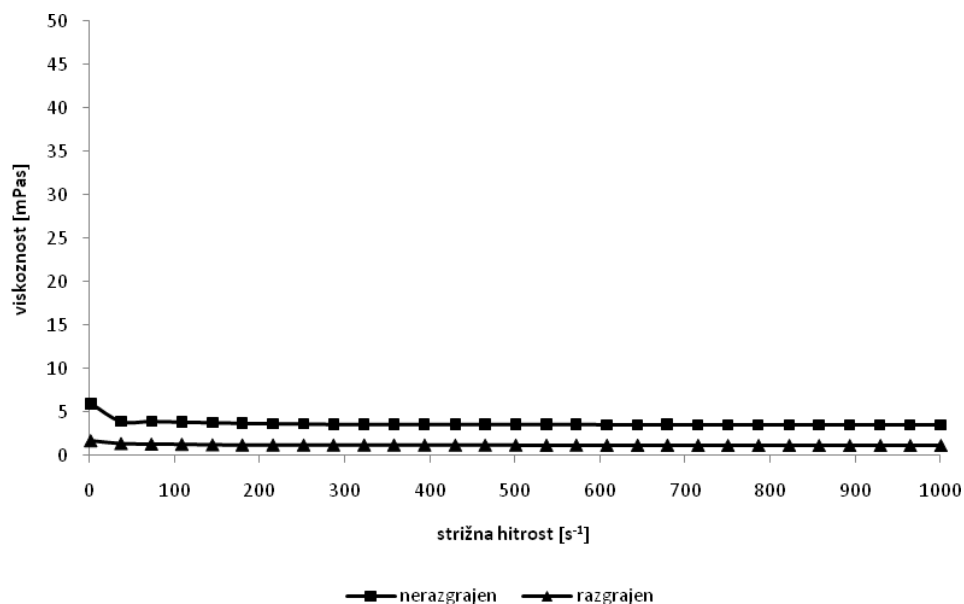
Priloga B1: Tokovno obnašanje raztopin z razgrajeno in nerazgrajeno karboksimetil celulozo (CMC) s stopnjo substituiranosti (DS) 0.7 in z $M_w = 250$ kDa. Kot nerazgrajen vzorec smo uporabili sterilno BHM gojišče z 1 % CMC, razgrajen vzorec je bil odvzet 9 dni po nacepiti gojišča z bakterijsko kulturo *Cellulomonas uda*. Inkubacija bakterijske kulture je potekala pri 37 °C, s stresanjem pri 200 rpm. S kvadratki je prikazano tokovno obnašanje raztopine z nerazgrajenim CMC, s trikotniki pa obnašanje razgrajenega derivata. Na abscisni osi je strižna hitrost v s^{-1} , na ordinatni osi je viskoznost, podana v mPas.



Priloga B2: Tokovno obnašanje raztopin z razgrajeno in nerazgrajeno karboksimetil celulozo (CMC) s stopnjo substituiranosti (DS) 0.9 in $M_w = 250$ kDa. Kot nerazgrajen vzorec smo uporabili sterilno BHM gojišče z 1 % CMC, razgrajen vzorec je bil odvzet 9 dni po nacepivki gojišča z bakterijsko kulturo *Cellulomonas uda*. Inkubacija bakterijske kulture je potekala pri 37 °C, s stresanjem pri 200 rpm. S kvadratki je prikazano tokovno obnašanje raztopine z nerazgrajenim CMC, s trikotniki pa obnašanje razgrajenega derivata. Na abscisni osi je strižna hitrost v s^{-1} , na ordinatni osi je viskoznost, podana v mPas.



Priloga B3: Tokovno obnašanje raztopin z razgrajeno in nerazgrajeno karboksimetil celulozo (CMC) s stopnjo substituiranosti (DS) 1.2 in z $M_w = 250$ kDa. Kot nerazgrajen vzorec smo uporabili sterilno BHM gojišče z 1 % CMC, razgrajen vzorec je bil odvzet 9 dni po nacepivki gojišča z bakterijsko kulturo *Cellulomonas uda*. Inkubacija bakterijske kulture je potekala pri 37 °C, s stresanjem pri 200 rpm. S kvadratki je prikazano tokovno obnašanje raztopine z nerazgrajenim CMC, s trikotniki pa obnašanje razgrajenega derivata. Na abscisni osi je strižna hitrost v s⁻¹, na ordinatni osi je viskoznost, podana v mPas.



Priloga B4: Tokovno obnašanje raztopin z razgrajeno in nerazgrajeno karboksimetil celulozo (CMC) s stopnjo substituiranosti (DS) 0.7 in z $M_w = 90$ kDa. Kot nerazgrajen vzorec smo uporabili sterilno BHM gojišče z 1 % CMC, razgrajen vzorec je bil odvzet 9 dni po nacepitvi gojišča z bakterijsko kulturo *Cellulomonas uda*. Inkubacija bakterijske kulture je potekala pri 37 °C, s stresanjem pri 200 rpm. S kvadratki je prikazano tokovno obnašanje raztopine z nerazgrajenim CMC, s trikotniki pa obnašanje razgrajenega derivata. Na abscisni osi je strižna hitrost v s^{-1} , na ordinatni osi je viskoznost, podana v mPas.

Priloga C: Hitrost rasti bakterije *Cellulomonas uda* na različnih tipih hidroksietil celuloze (HEC). Bakterijsko kulturo smo gojili v BHM gojišču z 0,7 % HEC pri 37 °C, s stresanjem pri 200 rpm. V preglednici so podane vrednosti optične gostote na začetku poskusa in po 7 dneh inkubacije. Podane so povprečne vrednosti in standardni odklon.

Hidroksietil celuloza	OD ₆₅₀	
	t = 0 dni	t =7 dni
Natrosol 250 H4BR	0,04 ± 0,00	0,05 ± 0,00
Natrosol 250 HHR	0,04 ± 0,00	0,09 ± 0,00
Natrosol PLUS 330 PA	0,06 ± 0,00	0,07 ± 0,00
Bermocoll EBM 5500	0,08 ± 0,00	0,06 ± 0,01