

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Tina STRMLJAN

**OPIS RAZGRADNJE KARBOKSIMETIL CELULOZE  
Z BAKTERIJAMI *Cellulomonas uda* IN *Bacillus subtilis***

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Tina STRMLJAN

**OPIS RAZGRADNJE KARBOKSIMETIL CELULOZE Z  
BAKTERIJAMI *Cellulomonas uda* IN *Bacillus subtilis***

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij

**THE DESCRIPTION OF DEGRADATION OF CARBOXYMETHYL  
CELLULOSE BY BACTERIA *Cellulomonas uda* AND *Bacillus subtilis***

GRADUATION THESIS  
University studies

Ljubljana, 2015

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija mikrobiologije na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Meritve viskoznosti so bile opravljene v JUB-u, meritve sipanja rentgenskih žarkov so bile opravljene na Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo na Katedri za fizikalno kemijo Univerze v Ljubljani. Vse ostale meritve so bile izvedene na Katedri za mikrobiologijo, na Oddelku za živilstvo Biotehniške fakultete v Ljubljani.

Za mentorja diplomskega dela je imenovan prof. dr. David Stopar, za somentorja asist. dr. Iztok Dogša in za recenzenta doc. dr. Tomaž Accetto.

Mentor: prof. dr. David Stopar  
Somentor: asist. dr. Iztok Dogša  
Recenzent: doc. dr. Tomaž Accetto

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  
Član: asist. dr. Iztok DOGŠA  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo  
Član: doc. dr. Tomaž ACCETTO  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Datum zagovora:

Podpisana izjavljam, da je naloga rezultat lastnega raziskovalnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravici shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Tina Strmljan

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn
- DK UDK 579.66+602.3:661.728.8(043)=163.6
- KG biorazgradnja/karboksimetil celuloza/CMC/celulolitični encimi/*Cellulomonas uda*/*Bacillus subtilis*/ koncentracija redukcijskih sladkorjev/viskoznost/SAXS
- AV STRMLJAN, Tina
- SA STOPAR, David (mentor)/DOGŠA, Iztok (somentor)/ACCETTO, Tomaž (recenzent)
- KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
- LI 2015
- IN OPIS RAZGRADNJE KARBOKSIMETIL CELULOZE Z BAKTERIJAMI  
*Cellulomonas uda* IN *Bacillus subtilis*
- TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
- OP X, 45 str., 1 pregl., 9 sl., 2 pril., 76 vir.
- IJ sl
- JI sl-en
- AI V diplomskem delu smo ugotovili kateri izmed izbranih mikroorganizmov mikrobiološke zbirke Katedre za mikrobiologijo Oddelka za živilstvo Biotehniške fakultete, so zmožni sinteze zunajceličnih celulaz. Celulaze so proizvajali vsi sevi *Bacillus subtilis* (NCIB 3610, 3610 wt, IS 75, JH 642), *Streptomyces coelicolor* DSM 40233, *Cellulomonas uda* DSM 20108, *Agromyces salentinus* DSM 16198, *Pseudomonas fluorescens* CCM 2789 in *Pseudomonas stutzeri*. Kot dobra proizvajalca celulaz smo prepoznali bakteriji *Cellulomonas uda* DSM 20108 in *Bacillus subtilis* NCIB 3610, zato smo jih uporabili za nadaljne raziskave razgradnje karboksimetil celuloze (CMC). Bakterije smo 470 ur inkubirali v gojišču BHM, kjer je edini vir ogljika 1 % CMC. Spektrofotometrično smo spremljali rast bakterijskih kultur, merili koncentracije redukcijskih sladkorjev in viskoznosti. Po končani inkubaciji smo izvedli analizo SAXS in primerjali strukturo CMC pred in po bakterijski inkubaciji. *C. uda* DSM 20108 maksimalno vrednost OD<sub>650nm</sub> doseže po 53 urah, kjer optična gostota znaša 0,39 a.u., bakterije *B. subtilis* NCIB 3610 potrebujejo za največjo doseženo vrednost OD<sub>650nm</sub> 0,14 a.u. kar 216 ur. Najvišja vrednost koncentracije redukcijskih sladkorjev tekom inkubacije s *C. uda* DSM 20108 je znašala 0,63 mg/mL z *B. subtilis* NCIB 3610 pa 0,36 mg/mL, pri čemer se bistven porast koncentracije redukcijskih sladkorjev tekom inkubacije s *C. uda* DSM 20108 zgodi do 29. ure, pri *B. subtilis* NCIB 3610 pa je največja vrednost dosežena po 288 urah. Viskoznost gojišča pade na raven vode po 6 urah pri *C. uda* DSM 20108, medtem ko se pri *B. subtilis* NCIB 3610 drastično spremeni viskoznost gojišča šele po 236 urah. Po bakterijski inkubaciji v gojišču BHM s CMC se zmanjša intenziteta sipalnih krivulj SAXS v sprednjem delu, kar kaže na spremembo strukture polimera na velikih prostorskih skalah. Oba mikroorganizma sta s celulaznimi encimi razgradila CMC, vendar je bila stopnja razgradnje značilno nižja pri *B. subtilis* NCIB 3610.

## KEY WORDS DOCUMENTATION

- DN Dn
- DC UDC 579.66+602.3:661.728.8(043)=163.6
- CX biodegradation/ carboxymethyl cellulose/CMC/cellulolytic enzymes/*Cellulomonas uda*/*Bacillus subtilis*/reducing sugar concentration/viscosity/SAXS
- AU STRMLJAN, Tina
- AA STOPAR, David (supervisor)/ DOGŠA, Iztok (co-advisor)/ ACCETTO, Tomaž (reviewer)
- PP SI-1000, Jamnikarjeva 101
- PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology
- PY 2015
- TI THE DESCRIPTION OF DEGRADATION OF CARBOXYMETHYL CELLULOSE BY BACTERIA *Cellulomonas uda* AND *Bacillus subtilis*
- DT Graduation Thesis (University studies)
- NO X, 45 p., 1 tab., 9 fig., 2 ann., 76 ref.
- LA sl
- AL sl/en
- AB In the thesis we have studied selected microorganisms from microbial collection at the Chair of Microbiology Department, Biotechnical Faculty, capable of synthesis of extracellular cellulases. Cellulases have been produced by all tested strains of *Bacillus subtilis* (NCIB 3610, 3610 wt, IS 75, JH 642), *Streptomyces coelicolor* DSM 40233, *Cellulomonas uda* DSM 20108, *Agromyces salentinus* DSM 16198, *Pseudomonas fluorescens* CCM 2789 and *Pseudomonas stutzeri*. Next, *Cellulomonas uda* DSM 20108 and *Bacillus subtilis* NCIB 3610 have been selected for further study of the biodegradation of carboxymethyl cellulose (CMC). Bacteria were incubated in BHM medium for 470 hours with 1 % CMC as the sole carbon source. Bacterial growth, concentration of reducing sugars, and viscosity changes have been measured. In addition SAXS analysis of CMC structure before and after bacterial incubation was done. Bacteria *C. uda* DSM 20108 reached maximum OD<sub>650nm</sub> value 0,39 a.u. after 53 hours while *B. subtilis* NCIB 3610 reached 0,14 a.u. in 216 hours. The concentration of reducing sugar increased during the first 29 hours by *C. uda* DSM 20108. Maximum value was 0,63 mg/mL. The change of concentration of reducing sugars by *B. subtilis* NCIB 3610 was slower, maximum value 0,36 mg/mL was reached after 288 hours of incubation. The viscosity of medium BHM inoculated by *C. uda* DSM 20108 decreased to the level of water after 6 hours while in the case of *B. subtilis* NCIB 3610 viscosity decreased only after 236 hours. The change of CMC structure was indicated by decreased scattering intensity in the front part of SAXS scattering curve, suggesting the change of polymer size at large spatial scales. Both microorganisms degraded the CMC using cellulolytic enzymes, however, the degradation dynamics was significantly slower in *B. subtilis* NCIB 3610.

## KAZALO VSEBINE

	str.
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA.....	iii
KEY WORDS DOCUMENTATION .....	iv
KAZALO VSEBINE.....	v
KAZALO PREGLEDNIC.....	vii
KAZALO SLIK.....	viii
KAZALO PRILOG .....	ix
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI .....	x
<b>1 UVOD.....</b>	<b>1</b>
1.1 OPREDELITEV PROBLEMA IN CILJI DIPLOMSKE NALOGE .....	1
1.2 DELOVNE HIPOTEZE .....	2
<b>2 PREGLED OBJAV .....</b>	<b>3</b>
2.1 STRUKTURA KARBOKSIMETIL CELULOZE.....	3
2.2 SINTEZA CMC .....	4
2.3 REOLOŠKE IN DRUGE FIZIKALNE LASTNOSTI RAZTOPIN CMC.....	5
2.4 UPORABA CMC V INDUSTRIJI.....	6
2.5 CELULOLITIČNI ENCIMI.....	7
2.6 CELULOLITIČNI MIKROORGANIZMI.....	10
<b>2.6.1 <i>Cellulomonas uda</i>.....</b>	<b>11</b>
<b>2.6.2 <i>Bacillus subtilis</i>.....</b>	<b>13</b>
2.7 PRINCIP UGOTAVLJANJA STRUKTURNIH SPREMEMB CMC Z OZKOKOTNIM RENTGENSKIM SIPANJEM SAXS.....	14
<b>3 MATERIALI IN METODE .....</b>	<b>16</b>
3.1 MATERIALI.....	16
<b>3.1.1 Kemikalije.....</b>	<b>16</b>
<b>3.1.2 Gojišča .....</b>	<b>16</b>
1.2.1.1 Gojišče agar CMC.....	16
1.2.1.2 Gojišče PKE.....	17
1.2.1.3 Prilagojeno gojišče po Bushnell Haasu (BHM).....	17

3.1.3	Jodovica.....	17
3.1.4	Reagent DNS.....	17
3.1.5	Bakterijski sevi .....	18
3.2	METODE .....	19
3.2.1	Test za zaznavanje celulaz.....	19
3.2.2	Izbira bakterijskega seva.....	19
3.2.3	Gojenje bakterijskih kultur.....	19
3.2.4	Spremljanje optičnih gostot bakterij.....	20
3.2.5	Priprava vzorcev za encimski test in merjenje viskoznosti .....	20
3.2.6	Spremljanje razgradnje CMC z metodo določevanja redukcijskih sladkorjev .....	20
3.2.7	Merjenje viskoznosti izrabljenih gojišč z rotacijskim viskozimetrom ....	21
3.2.8	Izračun povezanosti koncentracije redukcijskih sladkorjev in viskoznosti .....	21
3.2.9	Ugotavljanje strukture CMC s tehniko ozkokotnega sipanja rentgenskih žarkov (SAXS) .....	22
4	REZULTATI .....	23
4.1	ZAZNAVANJE ZUNAJCELIČNIH CELULAZ .....	23
4.2	RASTNI KRIVULJI.....	24
4.3	KONCENTRACIJA REDUKCIJSKIH SLADKORJEV .....	25
4.4	VISKOZNOST IZRABLJENEGA GOJIŠČA BHM.....	27
4.5	STRUKTURIRANOST CMC.....	28
4.5.1	Sipalni krivulji CMC pred in po inkubaciji z bakterijami <i>Cellulomonas uda</i> DSM 20108.....	28
4.5.2	Sipalni krivulji CMC pred in po inkubaciji z bakterijami <i>Bacillus subtilis</i> NCIB 3610.....	29
5	RAZPRAVA IN SKLEPI .....	30
5.1	RAZPRAVA .....	30
5.2	SKLEPI .....	34
6	POVZETEK.....	35
7	VIRI.....	37
	ZAHVALA	
	PRILOGE	

## KAZALO PREGLEDNIC

	str.
<b>Preglednica 1:</b> Pregled izbranih mikroorganizmov, testiranih s hitrim testom za zaznavanje celulaz.....	24



## KAZALO SLIK

	str.
<b>Slika 1:</b> Struktura karboksimetil celuloze (Biswal in Singh, 2004: 380).....	3
<b>Slika 2:</b> Shema razgradnje amorfnе in mikrokristalinične celuloze z nekompleksnimi celulaznimi sistemi (A) in kompleksnimi celulaznimi sistemi (B). (Lynd in sod., 2002; Ratanakhanokchai in sod., 2013).....	10
<b>Slika 3:</b> Shema meritve z metodo SAXS (povzeto po Dogša, 2003). ....	15
<b>Slika 4:</b> Primer pozitivnega in negativnega rezultata pri testu za zaznavanje celulaz: a) <i>Cellulomonas uda</i> DSM 20108 b) <i>Bacillus subtilis</i> NCIB 3610 c) <i>Chromobacterium violaceum</i> . Sliki a in b prikazujeta zbistritveno cono okoli kolonij, slika c predstavlja negativen rezultat, zbistritvene cone ni opaziti. ....	23
<b>Slika 5:</b> Rastna krivulja <i>C. uda</i> DSM 20108 in <i>B. subtilis</i> NCIB 3610 v gojišču BHM, kjer je edini vir ogljika CMC. Proučevali smo rast bakterij <i>C. uda</i> DSM 20108 (zelena barva) in <i>B. subtilis</i> NCIB 3610 (modra barva), ki smo jih gojili v tekočem gojišču BHM z 1 % CMC pri 37 °C in 200 rpm. Na abscisni osi je prikazan čas v urah, na ordinati pa optična gostota. Prikazana je povprečna vrednost in standardna napaka. ....	25
<b>Slika 6:</b> Spreminjanje koncentracije redukcijskih sladkorjev v gojišču BHM tekom rasti bakterij <i>C. uda</i> DSM 20108 in <i>B. subtilis</i> NCIB 3610. Proučevali smo spremembo koncentracije redukcijskih sladkorjev z bakterijami <i>C. uda</i> DSM 20108 (zelena barva) in <i>B. subtilis</i> NCIB 3610 (modra barva), sterilno BHM gojišče je označeno s sivo barvo. Bakterije smo gojili v gojišču BHM z 1 % CMC pri 37 °C in stresanju 200 rpm. Prikazana je povprečna vrednost in standardni odklon. ....	26
<b>Slika 7:</b> Prikaz spreminjanja viskoznosti tekočega gojišča BHM tekom inkubacije z bakterijami <i>C. uda</i> DSM 20108 (zelena) in <i>B. subtilis</i> NCIB 3610 (modra). Sterilno gojišče je označeno s sivo barvo. Bakterije so rasle pri 37 °C in stresanju 200 rpm. Prikazana je povprečna vrednost in standardni odklon. ....	27
<b>Slika 8:</b> Sipalni krivulji SAXS CMC pred inkubacijo (siva barva) in po 470-urni inkubaciji z bakterijo <i>C. uda</i> DSM 20108 (zelena barva). ....	28
<b>Slika 9:</b> Krivulji SAXS CMC pred inkubacijo (siva barva) in po 470-urni inkubaciji z <i>B. subtilis</i> NCIB 3610 (modra barva). ....	29

## KAZALO PRILOG

**Priloga A:** Število bakterij *Bacillus subtilis* NCIB 3610 tekom inkubacije v gojišču BHM z dodano 1 % CMC.

**Priloga B:** Rast bakterij *Bacillus subtilis* NCIB 3610 in *Cellulomonas uda* DSM 20108 v tekočem gojišču BHM, kjer je edini vir ogljika 1 % glukoza.

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

BHM	gojišče po Bushnell Haasu
CBM	ogljikohidratni modul
CCM	Czechoslovak Collection of Microorganisms
CMC	karboksimetil celuloza
DNS	3,5-dinitrosalicilna kislina
DS	stopnja substitucije
DSM	Deutsche Sammlung von Microorganismen
EPS	zunajcelične polimerne substance
HPLC	tekočinska kromatografija visoke učinkovitosti
MCA	monokloroocetna kislina
$M_w$	molska masa
NCIB	National Collection of Industrial Bacteria
$OD_{650}$	optična gostota pri 650 nm
PKE	pepton kvasni ekstrakt
PNPG	p-nitrofenol-beta-D-glukopiranozid
RCF	relativna centrifugalna sila
SAXS	sipanje rentgenskih žarkov pod majhnimi koti

## 1 UVOD

### 1.1 OPREDELITEV PROBLEMA IN CILJI DIPLOMSKE NALOGE

Karboksimetil celuloza ali krajše CMC je bel zrnat prašek brez vonja in okusa (Hollabaugh in sod., 1945). Gre za anionski polielektrolit, ki je pripravljen v reakciji celuloze z monokloroocetno kislino ob prisotnosti NaOH (Latif in sod., 2007). Je najbolj prodajan celulozni eter, saj ima širok spekter uporabe (Thielking in Schmidt, 2011). Hollabaugh in sod. (1945) so že leta 1945 poročali o uporabi CMC v tekstilni, papirni, farmacevtski, kozmetični, prehrambeni, keramičarski, usnjarski industriji ter industriji barv. Danes je njena uporaba množična in razširjena še na nekatera druga področja (Barba in sod., 2002). Iz poročila Transparency Market Research v katerem so zajeti podatki o porabi CMC lahko razberemo, da so različni uporabniki leta 2012 porabili 356200 ton CMC. Njena uporaba v industriji naj bi se med leti 2013-2019 še povečala. (Carboxymethyl cellulose market..., 2014).

Kot celulozni derivat je CMC podvržena razgradnji z različnimi mikroorganizmi, razgradnja celuloze namreč predstavlja enega največjih materialnih tokov v globalnem kroženju ogljika (Falkowski in sod., 2000). Biorazgradljivost je lastnost, ki je sicer dobra za okolje, vendar pa v industriji, ki uporablja CMC kot pomembno sestavino izdelkov, povzroča gospodarsko škodo zaradi zmanjšanja kakovosti izdelkov.

Za razgradnjo celuloze so potrebni celulazni encimi, ki cepijo  $\beta$ -1,4 glikozidne vezi v molekulah celuloze. Proizvajajo jih glive, bakterije, praživali, rastline in živali (Zhang X-Z. in Zhang Y-H.P., 2013). Kljub podatku, da so celulazne encime zmožne proizvajati nekatere vrste žuželk, mehkužcev in nematod, so glavni proizvajalci celulolitičnih encimov mikroorganizmi (Watanabe in Tokuda, 2000).

Celulaze imajo velik biotehnološki potencial, saj jih uporabljajo v tekstilstvu, pivovarstvu, vinarstvu, pri ravnanju z odpadki, pri izboljšavah krme za živali, papirništvu, agronomiji (Bhat, 2000). Aktualno je pridobivanje biogoriv s pomočjo celulaz (Zhang X-Z. in Zhang Y-H.P., 2013). Glede na njihovo vsestransko uporabnost je razgradnja CMC z encimi zelo

dobro raziskana, manj študij pa je bilo narejenih z mikroorganizmi, kjer je CMC edini vir ogljika.

V diplomskem delu smo proučevali zmožnost proizvodnje zunajceličnih celulaz nekaterih mikroorganizmov mikrobiološke zbirke Katedre za mikrobiologijo na Oddelku za živilstvo Biotehniške fakultete v Ljubljani. Kot dobra proizvajalca smo prepoznali *Cellulomonas uda* DSM 20108 in *Bacillus subtilis* NCIB 3610. Njuno rast smo spremljali v tekočem gojišču BHM, kjer je bila kot edini vir ogljika prisotna 1 % CMC. Spremljali smo tudi, kako se tekom inkubacije v omenjenem gojišču spreminjata koncentracija redukcijskih sladkorjev in viskoznost gojišča. S tehniko SAXS smo ugotovili strukturiranost nerazgrajene in mikrobiološko razgrajene CMC.

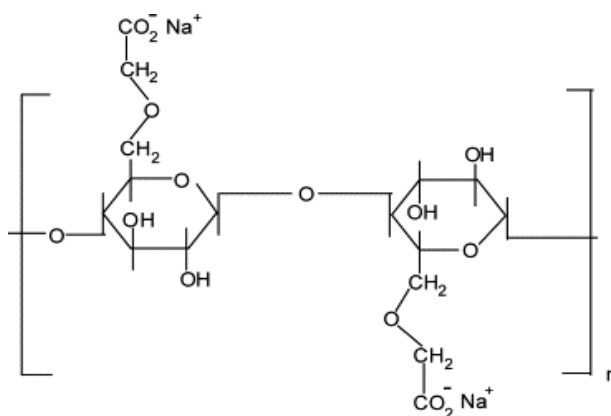
## 1.2 DELOVNE HIPOTEZE

- Bakterije *Cellulomonas uda* in *Bacillus subtilis* proizvajajo zunajcelične celulaze in lahko rastejo v tekočem gojišču BHM s CMC kot edinim virom ogljika.
- Pri razgradnji CMC z bakterijami *Cellulomonas uda* in *Bacillus subtilis* se viskoznost gojišča značilno zmanjša.
- Po inkubaciji z bakterijami *Cellulomonas uda* in *Bacillus subtilis* se struktura CMC spremeni.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 STRUKTURA KARBOKSIMETIL CELULOZE

Karboksimetil celuloza (dalje CMC) je derivat celuloze, ki ima na hidroksilnih skupinah glukoze vezane karboksimetilne skupine (Karlsson in sod., 2002). Po izgledu gre za bel, zrnat prašek brez vonja in okusa. Je topna v vodi in poveča viskoznost raztopin, zato se uporablja za zgoščevanje, suspendiranje ter stabiliziranje (Hollabaugh in sod., 1945). Prvič je CMC sintetiziral Jansen ob koncu prve svetovne vojne v Nemčiji. To je bil tudi prvi vodotopni ionski derivat celuloze. Za komercialno uporabo so jo začeli proizvajati v začetku dvajsetih let dvajsetega stoletja (Balsler in sod., 1986). CMC je danes najpomembnejši in najbolj razširjen celulozni eter, njena produkcija je zelo obsežna. Sintetizirana je v tako imenovanem "slurry" procesu (Heinze in Liebert, 2001).



Slika 1: Struktura karboksimetil celuloze (Biswal in Singh, 2004: 380).

Pomembna lastnost CMC je stopnja substituiranosti (DS). To je povprečno število hidroksilnih skupin na anhidridni glukozni enoti, ki so karboksimetilirane (Reese in sod., 1950). DS vpliva na topnost, lastnosti raztopine ter delovanje celulaznih encimov. Na CMC lahko delujejo le endoglukanaze (Latif in sod., 2007; Sieger in sod., 1995). Pomemben podatek je tudi porazdelitev substituent na anhidroglukoznih enotah (Horner in sod., 1999). Encimi v CMC namreč lahko cepijo le v področju, kjer so tri ali več sosednjih glukoz brez substitucij na hidroksilnih skupinah (Sieger in sod., 1995; Wirick, 1968). Na vsaki anhidridni glukozni enoti so lahko tri substituenti, tako da je največja možna stopnja substituiranosti 3 (Karlsson in sod., 2001). Ker je CMC le delno karboksimetilirana, jo

obravnavamo kot kopolimer iz osmih monomerov; nesubstituirana, monosubstituirana (2-, 3-, 6-), disubstituirana (2,3-, 2,6-, 3,6-) in trisubstituirana (2,3,6-) glukoza (Reuben, 1986).

## 2.2 SINTEZA CMC

Vodotopne polimere glede na sintezo delimo na naravne, sintetične ter semisintetične, kamor spada tudi CMC (Sieger in sod., 1995). Za sintezo CMC potrebujemo celulozo, ki je najobilnejši obnovljivi vir v biosferi. Celuloza je namreč glavna komponenta celične stene rastlin. Sestavljajo jo molekule glukoze, ki so med seboj povezane z  $\beta$ -1,4 glikozidnimi vezmi. Pomembna lastnost naravne celuloze je njena kristalinična struktura, ki je za polisaharide relativno neobičajna. Približno 30 posameznih celuloznih molekul sestavlja večje enote, ki jim pravimo elementarni fibrili oz. protofibrili, ti skupaj tvorijo mikrofibirile in slednji celulozna vlakna. Ne glede na orientacijo so verige med seboj povezane z vodikovimi vezmi (Lynd in sod., 2002). Voda do verig v kristalinični regiji ne more dostopati, zato ne pride do hidratacije in celuloza se v vodi ne topi. V postopku pridobivanja CMC je torej potrebno prekiniti omenjene vodikove vezi, kar storimo s suspendiranjem v alkalnem. Običajno proizvodnja CMC poteka v dveh korakih. V prvem koraku je celuloza ob prisotnosti inertnega topila (alkohola) obdelana z NaOH. Inertno topilo poskrbi, da NaOH lažje dostopa v celulozno strukturo. Tovrstnemu postopku pravimo mercerizacija in poteka pri sobni temperaturi. Temperaturni pogoji med mercerizacijo vplivajo na lastnosti in kvaliteto CMC. Sledi drugi korak, v katerem alkali celuloza reagira z monokloroocetno kislino, tako da nastane CMC. Istočasno NaOH reagira z monokloroocetno kislino, pri tem nastajata natrijev glikolat in NaCl v raztopljeni obliki. Potrebna je še nevtralizacija, čiščenje ter sušenje CMC, nato pa podajanje tehnične ocene in ocene čistosti produkta. Za industrijsko rabo je potrebna najmanj 98 % čistost, medtem ko je za uporabo v prehrani, farmaciji in izdelkih za osebno nego potrebna čistost vsaj 99,5 % (Latif in sod., 2007). V zgoraj opisanem postopku sinteze CMC s spremembo koncentracije in podaljševanja časa reakcije lahko vplivamo na spremembo celokupne DS, ne moremo pa vplivati na porazdelitev substituent na glukoznih enotah, zato je bilo v zadnjem času razvitih kar nekaj novih metod za sintezo CMC, kjer lahko vplivamo tudi na porazdelitev substituent (Heinze in Liebert, 2001).

### 2.3 REOLOŠKE IN DRUGE FIZIKALNE LASTNOSTI RAZTOPIN CMC

CMC je celulozni eter s širokim spektrom uporabe (Thielking in Schmidt, 2011). Večina aplikacij temelji na zanimivih reoloških lastnostih. Reologija proučuje mehanske lastnosti predvsem tekočin in poltrdnih snovi ter viskoelastičnih trdnih snovi. S poznavanjem reologije lahko sledimo različnim kemijskim reakcijam, reološka znanja pa nam dajo vpogled v strukturo različnih polimerov (Zupančič Valant, 2007).

V reologiji tekočine delimo na **newtonske**, pri katerih je viskoznost pri danem tlaku in temperaturi lastnost tekočine, ki je neodvisna od smeri, jakosti in časa delovanja striga, in **neneuronske** tekočine, pri katerih viskoznost pri danem tlaku in temperaturi ni konstantna (Zupančič Valant, 2007). Neneuronske tekočine dalje lahko razdelimo na časovno neodvisne, kamor uvrščamo **pseudoplastične**, **dilatantne** in **tekočine z mejo plastičnosti**, ter na časovno odvisne kamor spadajo **tiksotropne** ter **reopektične tekočine**. O pseudoplastičnih tekočinah govorimo, kadar z naraščujočo strižno hitrostjo viskoznost pada, o dilatantnih, kadar z naraščujočo strižno hitrostjo viskoznost narašča in o tekočinah z mejo plastičnosti, kadar se tekočina ob mirujočih pogojih obnaša kot trdna snov. Nekaterim tekočinam se viskoznost spreminja pri konstantni strižni hitrosti. To velja za tiksotropne tekočine, pri katerih viskoznost pri konstantni strižni hitrosti sčasoma pade, vendar se po prenehanju delovanja strižne hitrosti viskoznost povrne, in reopektične tekočine pri katerih viskoznost naraste pri konstantni strižni hitrosti (Žumer, 1999).

CMC je aditiv, ki ima močan vpliv na viskoznost, zato so reološke lastnosti dobro raziskane, čeprav raztopine CMC kažejo kompleksno reološko obnašanje. Ghannam in Esmail (1997) sta proučevala, kako se obnašajo raztopine CMC pri različnih koncentracijah (1 – 5 %). Odkrila sta, da 1 % raztopina CMC kaže značaj newtonske tekočine, z višanjem koncentracije pa se krepijo pseudoplastične, tiksotropne in viskoelastične lastnosti tekočin. Z višanjem koncentracije CMC v raztopini se niža indeks tokovnega obnašanja (Ghannan in Esmail, 1997). Na splošno je viskoznost polimernih raztopin odvisna od koncentracije polimera, interakcije med polimerom in topilom ter strukturnih značilnosti polimera, kot so: molekulska masa, oblika, fleksibilnost in molekularna konformacija (Browning, 1967). Najpomembnejša dejavnika, ki vplivata na reološke lastnosti CMC raztopin pa sta molekulska masa in koncentracija raztopine, DS



ima manjši vpliv (Kulicke in sod., 1996). Pri vseh raztopinah se z naraščajočo temperaturo viskoznost reverzibilno zniža (Sharma in sod., 2007). K spremembi (znižanju) viskoznosti raztopin CMC lahko pripomorejo tudi interakcije med celulaznimi encimi in CMC, ki spremenijo konfiguracijo in konformacijo substrata (Lee in sod, 2006). CMC je različno občutljiva za večvalentne soli. Z njimi tvori različne komplekse (Kulicke in sod, 1996). Prisotnost kovinskih soli ima sicer majhen vpliv na viskoznost raztopin CMC. Običajno se viskoznost 1 % raztopine CMC giblje med 5 in 2000 mPas, odvisno od obsega eterifikacije. Raztopine CMC so stabilne med pH 2 in pH 10. Pod pH 2 precipitirajo, nad pH 10 pa se viskoznost hitro zniža (Ghannam in Esmail, 1996). Zamrzovanje na vodne raztopine CMC nima vpliva (Hegedušić in sod., 2000).

#### 2.4 UPORABA CMC V INDUSTRIJI

Hollabaugh in sodelavci so že leta 1945 poročali o množični uporabi CMC v industriji, od takrat pa se je njena uporaba še povečala, predvsem pa razširila še na nekatera druga področja. V raziskavi Transparency Market Research navajajo, da so leta 2012 največ CMC porabili v prehrabeni in naftni industriji ter industriji, ki proizvaja izdelke za osebno nego. Velik delež CMC pa sta porabili tudi papirna industrija in industrija barv (Carboxymethyl cellulose market... , 2014).

CMC se torej množično uporablja v **prehrabeni industriji**, saj kot tipični hidrokolid nima neposrednega vpliva na okus in vonj prehrabnih izdelkov in je netoksična. Lahko deluje kot stabilizator, gostilo, vezivo in zadrževalec vode. Kot aditiv ima oznako E466. Prisotna je v industrijsko pripravljenih sladoledih, sorbetih, gostih sokovih, ribjih palčkah in mesnih omakah (Cash in Caputo, 2010). Uporablja se tudi v **vinarstvu** za preprečevanje kristalizacije kalijevega hidrogen tartrata (Greeff in sod., 2012). V naftni industriji CMC zviša viskoznost blata v vrtrinah (Dolz in sod., 2006). V **farmacevtski industriji** se CMC uporablja za povečevanje viskoznosti vodnih raztopin, ki so namenjene za suspendiranje praškov za topikalno, oralno ali parenteralno uporabo. Prav tako se uporablja kot vezivo v tabletah in stabilizator emulzij (Guo in sod., 1998). Prisotna je v gelih, ki se uporabljajo kot zaščitna sredstva med operacijami srca, prsnega koša in operacijami roženice (Barba in sod., 2002), kot adhezivni film jo dodajajo pri pripravi histoloških preparatov (Kawamoto, 2003). V **papirni industriji** CMC uporabljajo za boljše povezovanje papirnih vlaken med

seboj in povečevanje trdnosti papirja. (Blomsted in sod., 2007). V **tekstilni industriji** s CMC modificirajo vlakna in povečajo celokupni naboj. Zaradi povečanega števila karboksilnih skupin imajo obdelana vlakna boljše adsorpcijske sposobnosti za kationska površinska sredstva. CMC se adsorbira na površino in prepreči površinsko dostopnost za tekočine, kar pa omogoča boljše lastnosti vlaken. Poleg tega imajo vlakna, obdelana s CMC, boljše protimikrobne lastnosti (Fras Zemljič in sod., 2008). CMC je pomembna tudi v **nanotehnologiji**, je del mnogih nanokompozitov, npr. magnetnih nanokompozitov, ki služijo odstranjevanju toksičnih težkih kovin iz okolja (Vani in sod., 2013), uporabo pa beležimo tudi v **kmetijstvu** (Nie in sod., 2004 ) in mnogih drugih panogah.

## 2.5 CELULOLITIČNI ENCIMI

Za razgradnjo celuloze so potrebni encimi imenovani celulaze, ki hidrolizirajo  $\beta$ -1,4 vezi med dvema glukozama v verigi celuloze. Glede na encimsko aktivnost jih delimo na tri osnovne tipe, in sicer na: **endoglukanaze** ali 1,4- $\beta$ -D-glukan-4-glukanohidrolaze (EC 3.2.1.4), imenovane tudi endocelulaze, **eksoglukanze** oz. eksocelulaze, ki vključujejo 1,4- $\beta$ -D-glukan glukanohidrolaze oz. celodekstrinaze (EC 3.2.1.74) in 1,4- $\beta$ -D-glukan celobiohidrolaze oz. celobiohidrolaze (EC 3.2.1.91), ter  **$\beta$ -glukozidaze** ali  $\beta$ -glukozid glukohidrolaze (Lynd in sod., 2002).

Endoglukanaze, imenovane tudi CMCaze, delujejo na naključnih mestih amorfnе regije v celulozni verigi, topnih celuloznih substratih, kot je CMC, in celooligosaharidih. Produkti delovanja so: glukoza, topni celodekstrini in netopni fragmenti celuloze (Lynd in sod., 2002; Sadhu in Kanti Maiti, 2013). Večina celulaz je endoglukanaz. Njihova aktivna mesta so odprta. Potem, ko se vežejo na celulozo, nekajkrat cepijo verigo zatem disociirajo stran, tako hitro spremenijo viskoznost CMC raztopin (Wilson, 2011).

Eksocelulaze imajo tunelsko obliko aktivnega mesta, zato se vežejo le na enem koncu celulozne verige, kjer odcepijo molekulo celobioze od celuloze. Njihovo delovanje je procesivno. Ločimo dve vrsti eksocelulaz. Prvi tip deluje na reducirajočem koncu celuloze, medtem ko drugi tip deluje na nereducirajočem koncu. Eksoglukanaze delujejo tudi na mikrokristalinični celulozi.  **$\beta$ -glukozidaze** hidrolizirajo celodekstrine in celobiozo do **glukoze** ( Teeri, 1997; Lynd in sod., 2002; Wilson, 2011).

Zanimiva lastnost celulaznih sistemov je, da kažejo večjo skupno aktivnost, kot jo kaže vsota aktivnosti posameznih encimov, fenomenu pravimo sinergizem. Odkrite so bile štiri oblike sinergizma, in sicer: **endo-ekso** (sinergija med endoglukanazami in eksoglukanazami), **ekso-ekso** (sinergija med eksoglukanazami, ki delujejo na reducirajoče in nereducirajoče konce celulozne verige), **sinergija med eksoglukanazami in  $\beta$ -glukozidazami** ter sinergija med **katalitičnimi domenami in ogljikohidratnimi vezavnimi moduli, imenovanimi CBM**. Celulazni sistemi tako niso samo skupki encimov sestavljenih iz omenjenih treh tipov celulaz, ampak pri hidrolizi celuloze delujejo zelo koordinirano (Din in sod., 1994; Lynd in sod., 2002; Teeri, 1997).

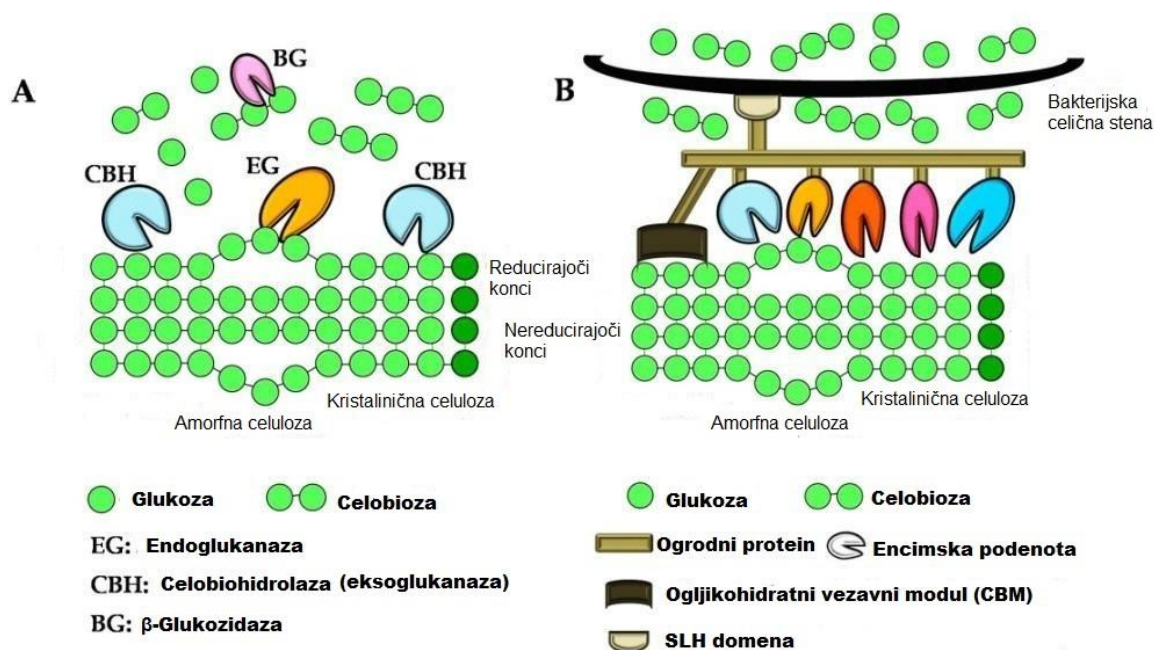
Za celulaze je značilna modularna struktura. V splošnem celulazni encim sestavljajo katalitični in ogljikohidratni vezavni moduli CBM (Carbohydrate-binding module). CBM poskrbi za vezavo encima na celulozo in tako približa katalitično domeno substratu (Lynd in sod., 2002). Poleg omenjenih modulov so prisotni tudi drugi moduli, katerih funkcija še ni znana in jih najdemo na N ali C terminalnem delu katalitičnega modula (Zhang X.Z. in Zhang Y.-H. P., 2013).

Vse celulaze spadajo med glikozid hidrolaze (EC 3.2.1.), ki so na podlagi podobnosti aminokislinskih sekvenc in kristalne strukture razvrščene v družine (Zhang X.Z. in Zhang Y.-H.P., 2013). Običajno namreč obstaja neposredna povezava med aminokislinsko sekvenco in zvijanjem proteina (Henrissat in sod., 1995). Družine in njihove lastnosti najdemo na spletni strani [www.cazy.org](http://www.cazy.org), kjer se baza odkritih encimov in družin stalno posodablja.

Sinteza 1,4- $\beta$ -glukanaz je pri večini bakterij regulirana z indukcijo in katabolno represijo, pri čemer celuloza, celobioza in soforoza inducirajo sintezo, glukoza in celobioza v večjih koncentracijah pa delujeta kot katabolna represorja formiranja 1,4- $\beta$ -glukanaz (Stoppok in sod., 1982).

Mikroorganizmi so za razgradnjo netopne celuloze razvili različne strategije, in sicer **diskretne nekompleksne celulazne sisteme** in **kompleksne celulazne sisteme**. V splošnem velja, da nekompleksne celulaze po večini proizvajajo aerobni mikroorganizmi, kompleksne celulazne sisteme pa nekatere anaerobne bakterije in glive, čeprav sistemi niso

popolnoma dihotomni. Celulolitične filamentozne glive in aktinomicetne bakterije s pomočjo hifnih izrastkov lahko prodirajo v celulozni substrat, ki je v celični steni rastlin povečini obdan s hemicelulozo in ligninom. Proizvodnja prostih celulaz z ali brez CBM zadostuje za učinkovito razgradnjo celuloze. Gre za nekompleksne celulazne sisteme. Določene anaerobne bakterije nimajo sposobnosti prodiranja v substrat, zato so bile najverjetneje primorane razviti alternativne mehanizme za razgradnjo celuloze in dostopanja do razgradnih produktov. To je predvidoma vodilo v razvoj kompleksnih celulaznih sistemov oz. t.i. celulosomov (Lynd in sod., 2002). Celulosome proizvajajo predvsem nekatere vrste rodov *Acetivibrio*, *Bacteroides*, *Butyrivibrio*, *Clostridium* in *Ruminococcus* (Doi in Kosugi, 2004). Celulosom je sestavljen iz dveh glavnih komponent: **neencimskih ogrodnih proteinov**, ki imajo kohezine, vezavna mesta za encime, in **celulosomalnih encimov**, ki se povezujejo s kohezini. Pri najpreprostejših celulosomih obstaja en sam ogrodni protein s številnimi kohezinskimi domenami in enim CBM (Doi, 2008). Celulosomi so veliki zunajcelični encimski kompleksi, ki lahko razgrajujejo celulozo, hemicelulozo in pektin. Mogoče so celo največji zunajcelični encimski kompleksi, ki jih najdemo v naravi. Policelulosomi imajo molsko maso 100 MDa ali več (Doi in sod., 2003). Celulosome, pritrjene na površino celic, lahko opazujemo z elektronskim mikroskopom. Videti so kot izbokline (Doi in Kosugi, 2004).



**Slika 2:** Shema razgradnje amorfne in mikrokristalinične celuloze z nekompleksnimi celulaznimi sistemi (A) in kompleksnimi celulaznimi sistemi (B). (Lynd in sod., 2002; Ratanakhanokchai in sod., 2013).

## 2.6 CELULOLITIČNI MIKROORGANIZMI

Celulolitični mikroorganizmi zasedajo širok spekter različnih habitatov. Nekateri so prostoživeči in rastlinske polisaharide pretvorijo v preproste sladkorje, ki jih nato asimilirajo, spet drugi so v tesnem stiku z živalmi, ki izrabljajo celulozo kot vir energije. Nekateri prebivajo v prebavnem traktu prežvekovalcev in drugih rastlinojedih živalih. Najdemo pa jih tudi v črevesju termitov in lesnih črvov. Ekosistemi, ki temeljijo na celulozi, vključujejo zelo različna okolja, kot so: tla, močvirja, barja, reke, jezera, morske sedimente, razpadajoče trave, listje, les, blato čistilnih naprav, silaže, kompost, blato in razpadajoči rastlinski material v vročih in vulkanskih, kisljih ter alkalnih vrelih.

Med celulolitične mikroorganizme spadajo praživali, glive in bakterije. Bakterije, ki razkrajajo celulozo, so aerobne, anaerobne, mezofilne, termofilne, in lahko naseljujejo zelo raznolika okolja, vključno okolja z ekstremnimi temperaturami, tlakom in pH. V naravi veliko celulolitičnih vrst tvori simbiotske odnose s sekundarnimi mikroorganizmi. Primarni mikroorganizmi razgradijo celulozo neposredno do celobioze in glukoze. Samo del teh produktov asimilirajo primarni mikroorganizmi, ostanek izrabijo satelitski mikroorganizmi. Odstranjevanje presežka sladkorjev spodbuja nadaljno razgradnjo

celuloze s primarnimi mikroorganizmi, saj celobioza inhibira celulaze (Bayer in sod., 2006; Ljungdahl in Eriksson, 1985).

Celulolitične bakterije obsegajo več različnih filogenetskih skupin. Fermentativni anaerobi so po večini Gram pozitivni (*Clostridium*, *Ruminococcus* in *Caldicellulosiruptor*) z nekaj Gram negativnimi izjemami, ki so filogenetsko sorodni Clostridijski skupini (*Butyrivibrio*, *Acetivibrio*) in *Fibrobacter*. Pri aerobnih Gram pozitivnih bakterijah so glavni predstavniki iz rodov *Cellulomonas* in *Thermobifida* in pri aerobnih polzečih bakterijah *Cytophaga* in *Sporocytophaga*. Ne gre prezreti dejstva, da je večina bakterij, ki se nahajajo v tleh, klasificiranih v rodove, pri katerih je dobro poznan sekundarni metabolizem, tvorba različnih stanj mirovanja (*Bacillus*, *Micromonospora*, *Thermobifida*) ter proizvodnja antibiotikov (*Bacillus*, *Micromonospora*) in ostalih metabolitov. Produkcija antibiotikov v celulolitičnih vrstah ni bila sistematično raziskana, vendar verjetno produkcija tovrstnih snovi zagotavlja dodatno selektivno prednost, ki kompenzira njihovo skromno rast na celulozi. Prav tako zmožnost tvorbe mirujočih stanj, ki so relativno odporna na stradanje, v naravi zagotavlja selektivne prednosti (Lynd in sod., 2002).

Mnogo mikroorganizmov lahko raste na topnih celuloznih derivatih ali amorfnih celulozi. Pravimo jim »psevdoceluloliti«, saj sintetizirajo le posamezne endoglukanaze ali  $\beta$ -glukozidaze, ki so jih preko horizontalnih prenosov pridobili od t.i. »pravih celulolitov«, ki sintetizirajo popoln nabor celulaznih encimov in omogočajo rast na mikrokristalinični celulozi, ki je prevladujoč tip celuloze v naravi (Sadhu in Kanti Maiti, 2013).

Zaradi dobrih rezultatov razgradnje CMC v encimskem testu, ki ga je opisal Kasana s sod. (2008), smo se odločili, da bomo v diplomski nalogi proučevali potek razgradnje CMC z bakterijama *Cellulomonas uda* DSM 20108, ki je »pravi celulolit« in *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* sev NCIB 3610 (*epsA-O*)::*tet*, ki je t.i. »psevdocelulolit«.

### **2.6.1 *Cellulomonas uda***

Bakterije rodu *Cellulomonas* (Cellulosa- celuloza, monas- enota) so Gram pozitivne aktinomicete, ki spadajo v red *Micrococcales*. Vsebujejo visok delež GC (72 %) (Chaudhary in sod., 1997). So tanke nepravilne palčke, ki se precej razlikujejo po dolžini in so lahko urejene v obilko črke V (Stackebrandt in sod., 2006). Odlikuje jih unikatna

zmožnost proizvodnje ksilanolitičnih, celulozitičnih in amilolitičnih encimov (Chaudhary in sod., 1997). Bakterije *Cellulomonas uda* DSM 20108, ki smo jih uporabili v diplomski nalogi, na trdnem gojišču PKE razvijejo okrogle, gladke, rumeno pigmentirane kolonije. Vse vrste rodu *Cellulomonas* so sposobne rasti v aerobnih in mikroaerobnih pogojih, *C. uda* pa raste tudi pri strogo anaerobnih pogojih. Glavni habitat so tla, vamp, blato in okolja, bogata s celulozo (Stackebrandt in sod., 2006). Vrste rodu *Cellulomonas* producirajo vsaj šest endoglukanaz in vsaj eno eksoglukanazo (Cex). Kadar so celice rasle na celulozi in celobiozi kot viru ogljika, so bili opaženi tudi celulosomom podobni izrastki (Lynd in sod., 2002). Kenyon in sod. (2005) poročajo, da znotraj rodu *Cellulomonas* obstajata dva različna načina razgradnje celuloze. Pri vrstah, ki so negibljive (kamor spada tudi *C. uda*), razgradnja celuloze ob visokem razmerju C:N poteka tako, da se celice preko eksopolimernih substanc, ki večinoma vsebujejo kurdlan ( $\beta$ -1-3-glukan) pritrdijo na celulozne delce, kjer tvorijo mikrokolonije. Površine mikrokolonij prekrivajo izbokline, ki so po velikosti in izgledu zelo podobne celulosomom. Pri gibljivih vrstah se celice ne pritrdjujejo na celulozni material, ampak ostajajo v bližini celuloze. Ko se tekom razgradnje celuloze sproščajo topni produkti, pa se sproži kemotaktični odziv.

Lo in sod. (2009) so iz riževih polj na južnem Tajvanu izolirali 9 celulozitičnih sevov, za katere so s pomočjo sekvenciranja 16S rRNA filogenetske analize ugotovili, da pripadajo rodu *Cellulomonas*, nekateri sevi pa so bili v 99,7 % gena identični *C. uda*. Za gojenje so uporabili gojišče BHM z dodatkom bodisi ksilana, riževe slame ali riževih luščin. Endoglukanaze so bile na vseh treh substratih večinoma zunajcelične, prav tako tudi eksoglukanaze in celobiazе. Analizo HPLC so raziskovalci uporabili za ugotavljanje nastalih redukcijskih sladkorjev in sekundarnih metabolitov. Ugotovili so, da po kultivaciji seva *C. uda* NS1, v gojišču BHM obogatenem z riževimi slamo ali riževimi luščinami zaznamo glukozo, celobiozo in ksilozo. Poleg tega pa tudi laktat, acetat, format in etanol. Če je bil v gojišče dodan zgolj ksilan so zaznali ksilozo in produkte fermentacije: laktat, acetat, format in etanol. Glukoza in celobioza sta produkt delovanja endoglukanaze, eksoglukanaze in celobiazе, medtem ko je ksiloza produkt delovanja ksilanaze. Različni viri ogljika vplivajo na različen nabor encimov in posledično na različne encimske produkte (Lo in sod., 2009).

Tudi Thayer in sod. (1984) so proučevali celulolitično aktivnost različnih sevov rodu *Cellulomonas*. Najboljšo celulolitično aktivnost so pri vseh sevih zabeležili med pH 6 in pH 7. Optimalna temperatura za depolimerizacijo CMC je bila 40 °C, za rast bakterij pa 30 °C. Celulolitična aktivnost na CMC je bila zmanjšana ob dodatku glukoze, vendar ne v tolikšnem obsegu kot po dodatku celobioze.

### 2.6.2 *Bacillus subtilis*

Rod *Bacillus* sestavljajo paličaste, sporulirajoče bakterije, ki jih uvrščamo v deblu *Firmicutes*. So zelo razširjene bakterije in jih največkrat najdemo v tleh. Vpletene so v kroženje ogljika in dušika. Po večini so nepatogene, zato se množično uporabljajo v biotehnologiji in industriji. Najbolje proučena vrsta je *Bacillus subtilis* (Rooney in sod., 2009). Kar nekaj raziskav kaže na to, da imajo bakterije rodu *Bacillus* nepopolni celulazni sistem in da je glavni celulazni encim endocelulaza oz. CMCaza (Wirth in sod., 2002).

V literaturi zasledimo kar nekaj celulolitičnih sevov bakterij *B. subtilis*. Au in sod. (1987) so izolirali CMCazo iz *Bacillus subtilis* AU-1. Pri razgradnji CMC so zaznavali glukozo in celobiozo. Celulazo oz. CMCazo so zaznali tudi pri bakteriji *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* A-53, ki so jo izolirali iz morske vode. Molekularna teža očiščene CMCaze je bila 56 kDa (ugotovljeno na podlagi mobilnosti s standardnimi umeritvenimi proteini). Izolirani encim je razgrajeval celobiozo, CMC, filter papir in ksilan, ni pa bila zabeležena razgradnja na celulozi, avicel in PNPG. Očiščen encim je imel najvišjo aktivnost na CMC, torej na topnem celuloznem substratu, ni razgrajeval kristalinične celuloze, pa tudi PNPG ne, ki je substrat za  $\beta$ -glukozidazo. Iz tega sklepamo, da je očiščen encim endoglukanaza (Kim in sod., 2009). Prav tako so CMCazo izolirali iz seva *Bacillus subtilis* YJ1. CMCaza je imela 32,5 kDa in je najboljšo aktivnost kazala na CMC, medtem ko na substratih, kot so avicel, bombažna vlakna, filter papir, ksilan in PNPG praktično ni bilo razgradnje (Yin in sod., 2010).

Au in sod. (1987) so raziskovali vpliv kovinskih ionov na aktivnost encima CMCaze. Ugotovili so, da  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Sn}^{2+}$ ,  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Hg}^{2+}$  in  $\text{Fe}^{2+}$  inaktivirajo encim, medtem ko  $\text{Co}^{2+}$  izboljša encimsko aktivnost. Predvidevali so, da so v aktivnem mestu encima vpletene reducirane tiolne skupine (Au in sod., 1987). Tudi Kim in sod. (2009) so proučevali, kaj



vpliva na aktivnost encima. Ugotovili so, da  $\text{Hg}^{2+}$  močno inhibira CMCazno aktivnost,  $\text{CoCl}_2$  jo inhibira le delno. EDTA, KCl in  $\text{NiCl}_2$  pa so v tej študiji izboljšale CMCazno aktivnost. Prav tako so tudi Yin in sod. (2010) proučevali vpliv kovinskih ionov na izolirano CMCazo in prišli do podobnih zaključkov kot zgoraj omenjeni sodelavci, da na CMCazo vplivajo kovinski ioni, in sicer:  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  ioni aktivirajo celulozo,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  in  $\text{Hg}^{2+}$  ioni, pa inaktivirajo.  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$  in  $\text{NH}_4^+$  na aktivnost ne vplivajo. Tovrstni fenomen so kasneje pojasnili s SH skupinami v aktivnem mestu encima.

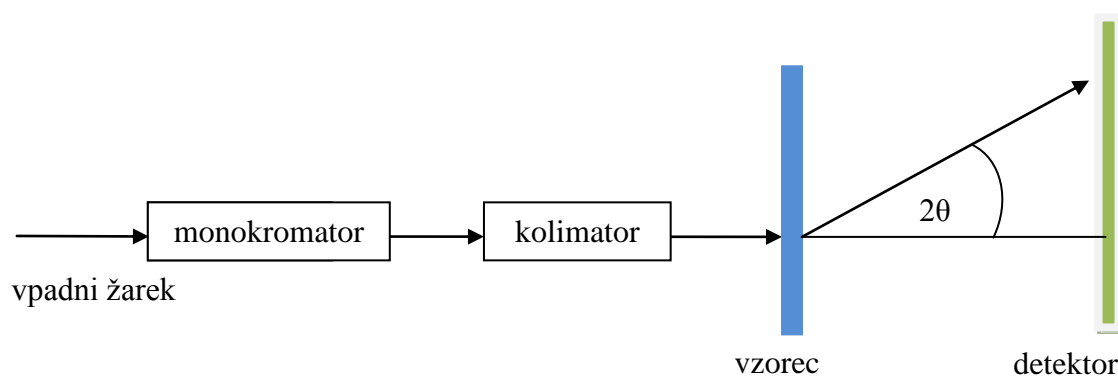
## 2.7 PRINCIP UGOTAVLJANJA STRUKTURNIH SPREMEMB CMC Z OZKOKOTNIM RENTGENSKIM SIPANJEM SAXS

SAXS (ang. **S**mall **A**nge **X** ray **S**cattering) je analitska metoda za ugotavljanje elektronske gostote in omogoča vpogled v strukturiranost biološkega materiala na nanometrski skali. Uporabljamo jo lahko za proučevanje trdnih ali tekočih materialov. Metoda je nedestruktivna in nezahtevna za pripravo vzorca. Uporablja se na različnih področjih, kot so proučevanje biološkega materiala, polimerov, kemikalij, nanokompozitov, kovin, mineralov, farmacevtskih substanc. Uporabna je za raziskovanje kot tudi za zagotavljanje kakovosti (Schnablegger in Singh, 2011). Metoda deluje na podlagi sipanja svetlobe. Rentgenski žarki prodrejo skozi vzorec. Vsi elektroni vzorca zanihajo, tako da postanejo vir sekundarnega valovanja, ki ima isto frekvenco kot vpadna svetloba. Sekundarni valovi med seboj interferirajo in kažejo različne interferenčne slike, ki so močno odvisne od prostorske porazdelitve t.i. »sipalnih centrov«. Sipanje koloidnih sistemov je običajno izrazito le pri majhnih kotih in od tod tudi splošno ime »ozkokotno« sipanje (Tomšič, 2004).

Meritve SAXS potekajo s pomočjo kamere Kratky, katere princip je sledeč. Žarki, ki izhajajo iz rentgenske cevi, potujejo skozi monokromator. Žarke enake valovne dolžine zbere kolimator v vzporeden snop, saj mora vpadni curek pasti na opazovano snov pod enakim vpadnim kotom. Rastopina preiskovanega vzorca, v našem primeru CMC, je v kapilari, ki je vpeta v kovinski nosilec. Vpadni žarki se sipajo na elektronih vzorca, pri tem prihaja do interference. Pri konstruktivni interferenci se intenziteta sipanega žarka poveča, pri destruktivni pa zmanjša. Z detektorji zaznamo intenziteto sipane svetlobe v odvisnosti

od kota sipanja  $2\theta$  (Roe, 2000). Največkrat je podana intenziteta sipanega žarka v odvisnosti od sipalnega vektorja,  $q$ , ki je povezan s kotom  $\theta$  in valovno dolžino svetlobe  $\lambda$ :

$$q = 4\pi \sin \theta / \lambda \quad \dots (1)$$



**Slika 3:** Shema meritve z metodo SAXS (povzeto po Dogša, 2003).

### 3 MATERIALI IN METODE

#### 3.1 MATERIALI

##### 3.1.1 Kemikalije

- Agar (Fluka, Španija)
- Amonijev nitrat  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,  $M_w = 80,04$  g/mol (Sigma-Aldrich, Nemčija)
- Destilirana voda
- 3,5-dinitrosalicilna kislina  $\text{C}_7\text{H}_4\text{N}_2\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ,  $M_w = 246,12$  g/mol (Sigma, Nemčija)
- D -(+)-glukoza, brezvodna  $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ ,  $M_w = 76,05$  g/mol (Kemika, Hrvaška)
- Jodovica
- K, Na- tartrat  $\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ,  $M_w = 282,23$  g/mol (Merck, Nemčija)
- Kalcijev klorid  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $M_w = 219,09$  g/mol (Sigma- Aldrich, ZDA)
- Kalijev hidrogen fosfat  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,  $M_w = 174,18$  g/mol (Kemika, Hrvaška)
- Kalijev dihidrogen fosfat  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $M_w = 136,09$  g/mol (Merck, Nemčija)
- Kalijev klorid  $\text{KCl}$   $M_w = 74,55$  g/mol (Merck, Nemčija)
- Karboksimetil celuloza  $M_w = 90$  kDa,  $DS = 0,7$  (Aldrich Chemistry, ZDA)
- Kvasni ekstrakt (Biolife, Italija)
- Magnezijev sulfat heptahidrat  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $M_w = 246,48$  g/mol (Merck, Nemčija)
- Natrijev hidroksid  $\text{NaOH}$ ,  $M_w = 40$  g/mol (Merck, Nemčija)
- Natrijev nitrat  $\text{NaNO}_3$
- Pepton
- Peptokompleks (Biolife, Italija)

##### 3.1.2 Gojišča

###### 1.2.1.1 Gojišče agar CMC

- 0,2 %  $\text{NaNO}_3$
- 0,1 %  $\text{K}_2\text{HPO}_4$
- 0,05 %  $\text{MgSO}_4$
- 0,05 %  $\text{KCl}$
- 0,2 % CMC
- 0,02 % pepton

- 1,7 % agar

#### 1.2.1.2 Gojišče PKE

- 3 g kvasnega ekstrakta
- 6 g peptokompleksa
- 15 g agarja
- Destilirana voda do 1000 mL

#### 1.2.1.3 Prilagojeno gojišče po Bushnell Haasu (BHM)

- 10 g CMC
- 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  $\text{NH}_4\text{NO}_3$
- 0,02 g  $\text{CaCl}_2$
- 1 L destilirana voda

Gojišče BHM v osnovi vsebuje tudi 0,05 g  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ . Ker železo močno agregira CMC, smo to komponento iz gojišča izpustili. To bi lahko vplivalo na nekoliko nižjo rast bakterij.

### 3.1.3 Jodovica

- 2 g joda  $\text{I}_2$
- 3 g kalijevega jodida KI
- 100 mL destilirane vode

Jodovica je raztopina joda in kalijevega jodida. Kalijev jodid raztopimo v manjši količini vode v 100 mL bučki. Ko se raztopi, postopno dodajamo jod in vodo. Vsakič premešamo. Ko dodamo ves jod, raztopino dopolnimo z destilirano vodo do 100 mL. Tako pripravljen reagent hranimo v temni steklenici

### 3.1.4 Reagent DNS

- 5 g 3,5-dinitrosalicilne kisline
- 100 mL 2M NaOH
- 150 g K, Na-tartrata
- Destilirana voda

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

### 3.1.5 Bakterijski sevi

- *Agrobacterium tumefaciens* N1
- *Agromyces salentinus* DSM 16198
- *Bacillus firmus* A2 80/73
- *Bacillus mycoides* A3 1/74
- *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* NCIB 3610 (3610 wt)
- *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* sev NCIB 3610 (*epsA-O*)::tet
- *Bacillus subtilis* IS 75
- *Bacillus subtilis* JH 642
- *Cellulomonas uda* DSM 20108
- *Chromobacterium violaceum*
- *Pseudomonas stutzeri*
- *Pseudomonas fluorescens* CCM 2789
- *Salmonella typhimurium* A8 32
- *Serratia marcescens*
- *Streptomyces coelicolor* DSM 40233
- *Xanthomonas campestris*

Bakterijski sevi, ki nimajo oznake knjižnic so izolati, ki so jih pridobili sodelavci Katedre za mikrobiologijo, Oddelka za živilstvo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani. V izogib težavam z zamenjavo podobnih mikroorganizmov, bomo bakterije *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* sev NCIB 3610 (*epsA-O*)::tet v nadaljevanju imenovali *Bacillus subtilis* NCIB 3610, medtem ko bomo sev brez mutacij *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* NCIB 3610, označevali zgolj z 3610 wt.

## 3.2 METODE

### 3.2.1 Test za zaznavanje celulaz

Iz mikrobiološke zbirke Katedre za mikrobiologijo na oddelku za živilstvo Biotehniške fakultete smo izbrali šestnajst bakterijskih sevov in s hitro ter enostavno metodo za zaznavanje mikrobnih celulaz (Kasana in sod., 2008) pregledali, kateri mikroorganizmi proizvajajo zunajcelične celulaze.

Bakterijske kulture, ki smo jih vzdrževali na trdnih gojiščih PKE pri temperaturi 4 °C, smo s cepilno zanko prenesli na sveže gojišče PKE. Nacepljena gojišča smo inkubirali 24 ur pri temperaturi 28 °C. Po končani inkubaciji smo bakterije s cepilno zanko prenesli v epice s fiziološko raztopino. 5 µL vorteksirane kulture smo nanegli na sredino trdnega gojišča CMC. Plošče smo nato inkubirali 48 ur pri 28 °C. Po končani inkubaciji smo plošče prelili z jodovico (KI) in po 5 minutah odčitali rezultate. Če je prišlo do proizvodnje zunajceličnih celulaz so se okoli kolonij pojavile cone zbistritve.

### 3.2.2 Izbira bakterijskega seva

Za nadaljnje raziskovanje razgradnje CMC smo uporabili bakterijo *Cellulomonas uda* DSM 20108 in bakterijski sev *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* NCIB 3610 (*epsA-O*)::*tet*, ki ga bomo v nadaljevanju tega diplomskega dela označevali zgolj z *Bacillus subtilis* NCIB 3610. Ker tovrstna bakterija zaradi okvare gena ne tvori EPS, smo v naši raziskavi lahko zaznavali le redukcijske sladkorje, nastale med razgradnjo CMC. Oba mikroorganizma sta pri testu za zaznavanje zunajceličnih celulaz izkazala potencialno veliko celulazno aktivnost (velik premer zbistritvene cone), zato smo se odločili, da bomo razgradnjo CMC v tekočem gojišču BHM podrobneje spremljali z omenjenima mikroorganizmoma.

### 3.2.3 Gojenje bakterijskih kultur

Bakteriji *C. uda* DSM 20108 in *B. subtilis* NCBI 3610 smo hranili na trdnih gojiščih PKE pri 4 °C. Ko smo želeli spremljati bakterijsko rast, smo jih ponovno s cepilno zanko precepili na trdno gojišče PKE. Gojili smo jih preko noči pri temperaturi 37 °C. Naslednji dan smo bakterijske kulture s pomočjo cepilne zanke precepili v 35 mL tekočega (prilagojenega) gojišča BHM. Gojišče smo pripravili v posebne erlenmajerice z rilčki, ki

olajšajo spektrofotometrično merjenje optične gostote bakterij. Tovrstne erlenmajerice imajo utore, ki povečajo mešanje. Bakterije smo gojili 24 ur pri 37 °C na stresalniku pri 200 rpm. Po enodnevni inkubaciji smo izmerili optično gostoto bakterij *C. uda* DSM 20108 in *B. subtilis* NCIB 3610. Vzeli smo 2 mL inokuluma posamezne bakterijske kulture in jo prenesli v nove erlenmajerice s 33 mL svežega gojišča BHM. Bakterijske kulture smo ponovno gojili aerobno pri 37 °C na stresalniku z 200 rpm.

### **3.2.4 Spremljanje optičnih gostot bakterij**

Tekom inkubacije v gojišču BHM smo spremljali hitrost rasti bakterijskih kultur *C. uda* DSM 20108 in *B. subtilis* NCIB 3610. Rast smo spremljali spektrofotometrično, in sicer z optičnim čitalcem Photometer MA 9510 Metrel pri valovni dolžini 650 nm. Zaradi izhlapevanja smo pred merjenjem absorbance izgubljeno tekočino nadomestili s sterilno destilirano H<sub>2</sub>O. Količino izhlapele vode smo izmerili s tehtanjem erlenmajeric pred vsakim ugotavljanjem optične gostote.

### **3.2.5 Priprava vzorcev za encimski test in merjenje viskoznosti**

Po spektrofotometričnem ugotavljanju optične gostote smo odvzeli 1300 µL gojišča in ga 10 minut centrifugirali pri 21932 RCF. Po centrifugiranju smo odstranili celice in izrabljeno gojišče razdelili v 2 epici po 600 µL. Eno epico izrabljenega gojišča smo shranili v zmrzovalni skrinji pri -80 °C za namen določanja viskoznosti. Drugo epico izrabljenega gojišča pa smo uporabili za encimski test oz. za ugotavljanje redukcijskih sladkorjev.

### **3.2.6 Spremljanje razgradnje CMC z metodo določevanja redukcijskih sladkorjev**

Za ugotavljanje razgradnje karboksimetil celuloze smo uporabili metodo določanja redukcijskih sladkorjev, ki jo je opisal Miller (1959). Mikroorganizmi s svojimi celulaznimi encimi krajšajo molekule CMC, pri čemer odcepljene molekule glukoze reagirajo z reagentom DNS. Z metodo zaznamo redukcijska mesta sladkornih komponent v našem vzorcu, ki z razgradnjo CMC naraščajo. Za zaznavanje redukcijskih sladkorjev smo uporabili reagent DNS. Za umeritveno krivuljo smo pripravili raztopine glukoze do koncentracije 0,1 w/v %. Pri ugotavljanju koncentracije sladkorjev moramo hkrati z

vzorcem vedno sproti pripraviti tudi umeritveno krivuljo, saj se naklon malo spreminja od testa do testa. Reakcija z reagentom DNS je potekala v steklenih epruvetah. 0,5 mL izrabljenega gojišča, po inkubaciji s *C. uda* DSM 20108 in *B. subtilis* NCIB 3610, smo dodali 0,5 mL DNS reagenta. Epruvete smo pokrili s kovinskimi zamaški, dobro premešali in jih kuhali 15 min pri 100 °C. Ohlajenim vzorčkom smo nato v mikrotitrski plošči izmerili absorbanco pri  $\lambda$  575 nm. Uporabili smo optični čitalec Multiscan spectrum Thermo electron corporation. S pomočjo umeritvene krivulje smo nato ugotovili koncentracijo redukcijskih sladkorjev.

### **3.2.7 Merjenje viskoznosti izrabljenih gojišč z rotacijskim viskozimetrom**

Viskoznost izrabljenega gojišča po inkubaciji bakterij *C. uda* DSM 20108 in *B. subtilis* NCIB 3610 smo merili na reometru v tovarni Jub. Vzorce, ki smo jih hranili v zmrzovalni skrinji pri -80 °C, smo odmrznili in nato meritve viskoznosti opravljali na sistemu ploščaplošča v reometru Anton Paar Physican MCR 301. Uporabili smo vreteno PP50 s premerom 49,975 mm. Razmik med dvema meritvenima ploščama je bil 0,25 mm. Temperatura, pri kateri so potekale meritve, je bila 20 °C.

### **3.2.8 Izračun povezanosti koncentracije redukcijskih sladkorjev in viskoznosti**

Za spremenljivki, koncentracijo redukcijskih sladkorjev in viskoznost smo izračunali Pearsonov koeficient korelacije, ki je mera za linearno povezanost med dvema spremenljivkama. Za statistično sklepanje smo uporabili t-statistiko.



### 3.2.9 Ugotavljanje strukture CMC s tehniko ozkokotnega sipanja rentgenskih žarkov (SAXS)

Po končani inkubaciji kultur v gojišču BHM smo z 10 minutnim centrifugiranjem pri 21932 RCF, odstranili celice. Vzorčke izrabljenega gojišča smo shranili v zamrzovalni skrinji pri  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Pred merjenjem s tehniko SAXS smo vzorčke odtajali in pustili, da se ogrejejo na sobno temperaturo. Na Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo, na Katedri za fizikalno kemijo, smo opravili eksperiment ozkokotnega sipanja rentgenskih žarkov, za kar smo uporabili kamero Kratky. Generator rentgenskih žarkov je bil opremljen z rentgensko cevjo z bakrovo anodo, ki izseva rentgensko svetlobo  $\text{CuK}_{\alpha}$  z valovno dolžino  $\lambda = 0,154\text{ nm}$  z močjo 1,4 kW (40 Kv, 35 mA). Temperatura, pri kateri je potekalo merjenje, je bila  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Za analizo intenzitete sipanja rentgenske svetlobe smo uporabljali naslednji dve enačbi (Roe, 2000):

$$\text{Braggov zakon: } \sin \theta = \lambda / (2d), \quad \dots (2)$$

kjer  $d$  pomeni razdaljo med dvema sipalcema v prostoru,

in enačbo, ki povezuje sipanje razredčene raztopine polimernih molekul, kjer ni interakcije med posameznimi verigami:

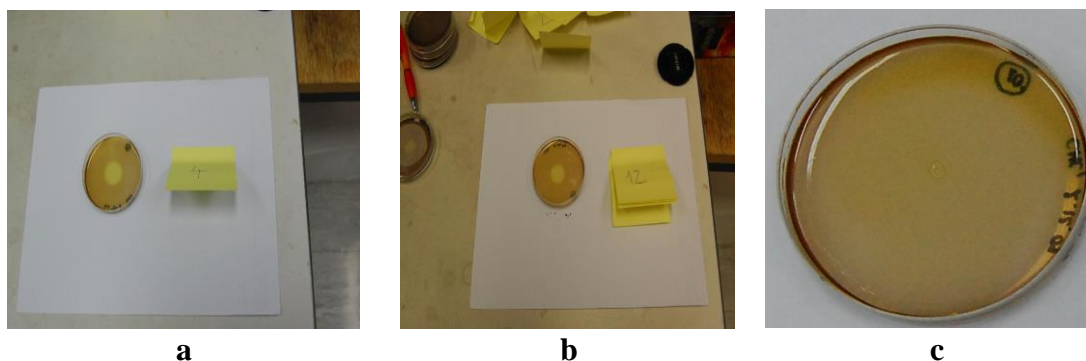
$$I(q) = V (\Delta\rho)^2 \varphi v 1 / (1 + 0,5 q^2 R_g^2), \quad \dots (3)$$

kjer je  $V$  opazovani volumen raztopine,  $\Delta\rho$  kontrast, ki je posledica razlike v elektronskih gostotah polimera in topila,  $\varphi$  je volumski delež polimera,  $v$  volumen posamezne molekule polimera. Člen  $1 / (1 + 0,5 q^2 R_g^2)$  opisuje sipanje polimera idealne oblike naključnega zvitja z velikostjo radiusa giracije  $R_g$ .

## 4 REZULTATI

### 4.1 ZAZNAVANJE ZUNAJCELIČNIH CELULAZ

Na ploščah na sliki 4 so vidne razlike med bakterijami, ki proizvajajo zunajcelične celulaze (sliki a in b) in tistimi bakterijami, ki jih ne (slika c). Jodovica s CMC tvori temno obarvan kompleks, z razgrajeno CMC pa ne. Okoli kolonij, ki proizvajajo zunajcelične celulaze in le te difundirajo v gojišče, pride do razgradnje substrata. Nastanejo dobro vidne zbistritvene cone. S testom za zaznavanje zunajceličnih celulaz smo testirali 16 bakterijskih vrst oz. sevov.



**Slika 4:** Primer pozitivnega in negativnega rezultata pri testu za zaznavanje celulaz: a) *Cellulomonas uda* DSM 20108 b) *Bacillus subtilis* NCIB 3610 c) *Chromobacterium violaceum*. Sliki a in b prikazujeta zbistritveno cono okoli kolonij, slika c predstavlja negativen rezultat, zbistritvene cone ni opaziti.

Izmed 16 bakterijskih sevov, ki smo jih preizkusili s hitrim testom za proizvodnjo celulaz po metodi, ki jo opisujejo Kasana in sod. (2008), smo dobili deset pozitivnih (prisotnost celulaz) in šest negativnih rezultatov (odsotnost celulaz). Mikroorganizmi, ki so naredili večji premer zbistritvene cone, so predvidoma dobri celulazni proizvajalci, medtem ko je pri nekaterih mikroorganizmih zbistritvena cona komaj opazna in jih v tem diplomskem delu uvrščamo med slabše proizvajalce celulaz.

Iz testa razberemo, da so dobri celulazni producenti vsi sevi *Bacillus subtilis* ( IS 75, JH 642, NCIB 3610, 3610 wt), *Streptomyces coelicolor* DSM 40233, *Cellulomonas uda* DSM 20108, *Agromyces salentinus* DSM 16198. Slabši celulazni producenti so: *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas fluorescens* CCM 2789 in *Xanthomonas campestris*. Pri bakterijah *Bacillus mycoides* A3 1/74, *Bacillus firmus* A2 80/73, *Agrobacterium tumefaciens* N1,

*Chromobacterium violaceum*, *Salmonella typhimurium* A8 32, *Serratia marcescens* cone razbarvanja ni bilo opaziti, zato sklepamo, da celulaznih encimov ne sintetizirajo. Dobri celulazni producenti so v preglednici 1 označeni z znakom ++, slabši celulazni producenti z znakom +. Bakterijam, ki celulaz ne proizvajajo smo pripisali -.

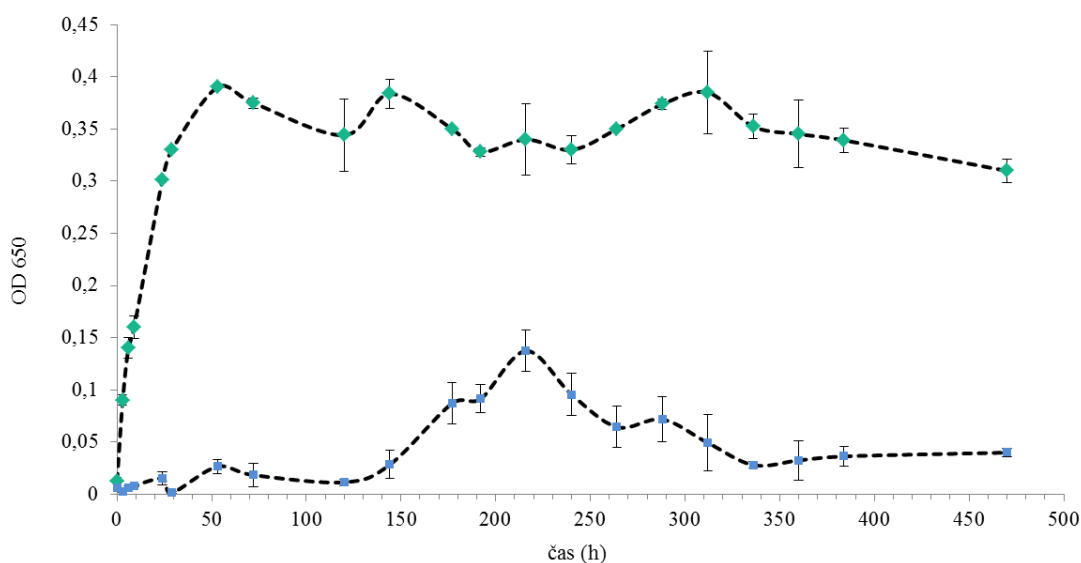
**Preglednica 2:** Pregled izbranih mikroorganizmov, testiranih s hitrim testom za zaznavanje celulaz.

MIKROORGANIZMI	BARVANJE PO GRAMU	CONA ZBISTRITVE
<i>Bacillus subtilis</i> 3610 wt	+	++
<i>Bacillus subtilis</i> NCIB 3610	+	++
<i>Bacillus subtilis</i> IS 75	+	++
<i>Bacillus subtilis</i> JH 642	+	++
<i>Streptomyces coelicolor</i> DSM 40233	+	++
<i>Cellulomonas uda</i> DSM 20108	+	++
<i>Agromyces salentinus</i> DSM 16198	+	++
<i>Xanthomonas campestris</i>	-	+
<i>Pseudomonas fluorescens</i> CCM 2789	-	+
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	-	+
<i>Bacillus mycoides</i> A3 1/74	+	-
<i>Bacillus firmus</i> A2 80/73	+	-
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> N1	-	-
<i>Chromobacterium violaceum</i>	-	-
<i>Salmonella typhimurium</i> A8 32	-	-
<i>Serratia marcescens</i>	-	-

## 4.2 RASTNI KRIVULJI

Izmed bakterij, ki so razgradile CMC, smo za nadaljnje delo uporabili *Cellulomonas uda* DSM 20108 in *Bacillus subtilis* NCIB 3610, ki predstavljata pravo in psevdocelulolitično bakterijo. Rast bakterijskih kultur *C. uda* DSM 20108 in *B. subtilis* NCIB 3610 je prikazana na sliki 5. V mikrobiologiji je rast definirana kot povečevanje števila bakterijskih celic (Madigen in Martinko, 2006), ki jo lahko v čisti kulturi ugotovimo s porastom optične gostote. Porast optične gostote OD<sub>650</sub> zabeležimo v obeh primerih, kar posredno kaže na rast obeh mikroorganizmov, vendar se rastni krivulji močno razlikujeta.

Bakterije *C. uda* DSM 20108 v gojišču BHM, kjer je edini vir ogljika CMC, rastejo hitreje in tudi optična gostota je višja kot pri bakterijah *B. subtilis* NCIB 3610. Maksimum rasti *C. uda* DSM 20108 dosežejo po 53 urah,  $OD_{650} \approx 0,39$ . Bakterije *B. subtilis* NCIB 3610 v gojišču BHM rastejo mnogo slabše in počasneje kot bakterije *C. uda* DSM 20108. Maksimum rasti dosežejo po 216 urah, in sicer je  $OD_{650} \approx 0,14$ . Tudi obliki rastnih krivulj se razlikujeta. Pri *C. uda* DSM 20108 praktično takoj beležimo eksponentno fazo rasti, ki ji sledi stacionarna faza. Pri bakterijah *B. subtilis* NCIB 3610 pa na začetku opazujemo fazo prilagajanja, po 120 urah sledi faza rasti do 216. ure, ko doseže maksimum, nato pa beležimo upad optične gostote. Iz rastne krivulje je moč razbrati, da *C. uda* DSM 20108 na CMC raste dobro, medtem ko rast na CMC za *B. subtilis* NCIB 3610 predstavlja večji izziv, kar se kaže v nižji vrednosti OD, dolgi fazi prilagajanja in netipični obliki rastne krivulje.

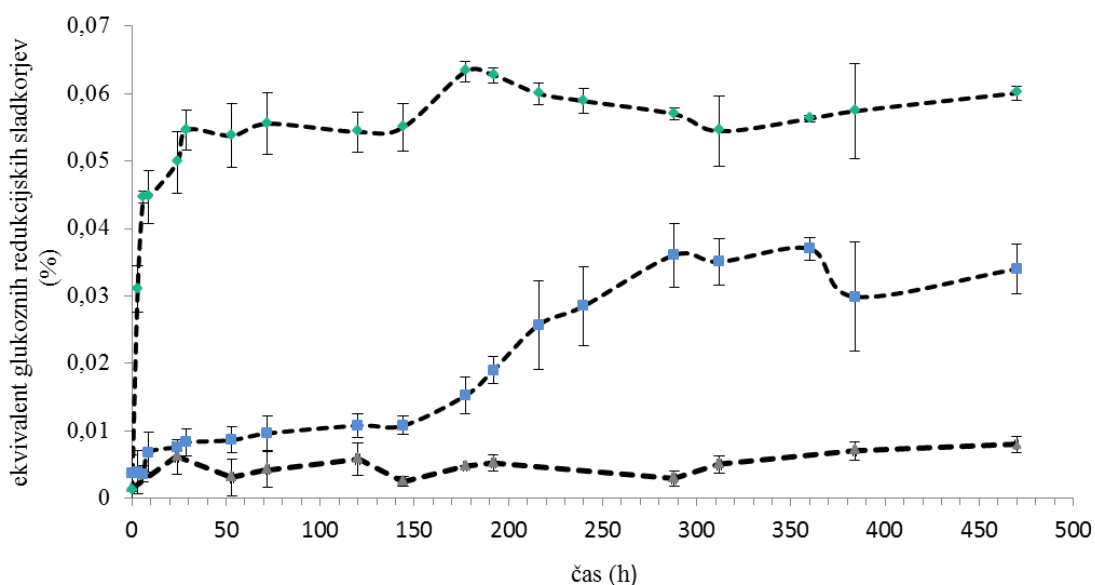


**Slika 5:** Rastna krivulja *C. uda* DSM 20108 in *B. subtilis* NCIB 3610 v gojišču BHM, kjer je edini vir ogljika CMC. Proučevali smo rast bakterij *C. uda* DSM 20108 (zelena barva) in *B. subtilis* NCIB 3610 (modra barva), ki smo jih gojili v tekočem gojišču BHM z 1 % CMC pri 37 °C in 200 rpm. Na abscisni osi je prikazan čas v urah, na ordinati pa optična gostota. Prikazana je povprečna vrednost in standardna napaka.

### 4.3 KONCENTRACIJA REDUKCIJSKIH SLADKORJEV

Spreminjanje koncentracije redukcijskih sladkorjev v izrabljenem gojišču BHM med rastjo *C. uda* DSM 20108 in *B. subtilis* NCIB 3610, s CMC kot edinim virom ogljika je prikazano na sliki 6. Po inkubaciji v tekočem gojišču BHM z bakterijami *C. uda* DSM

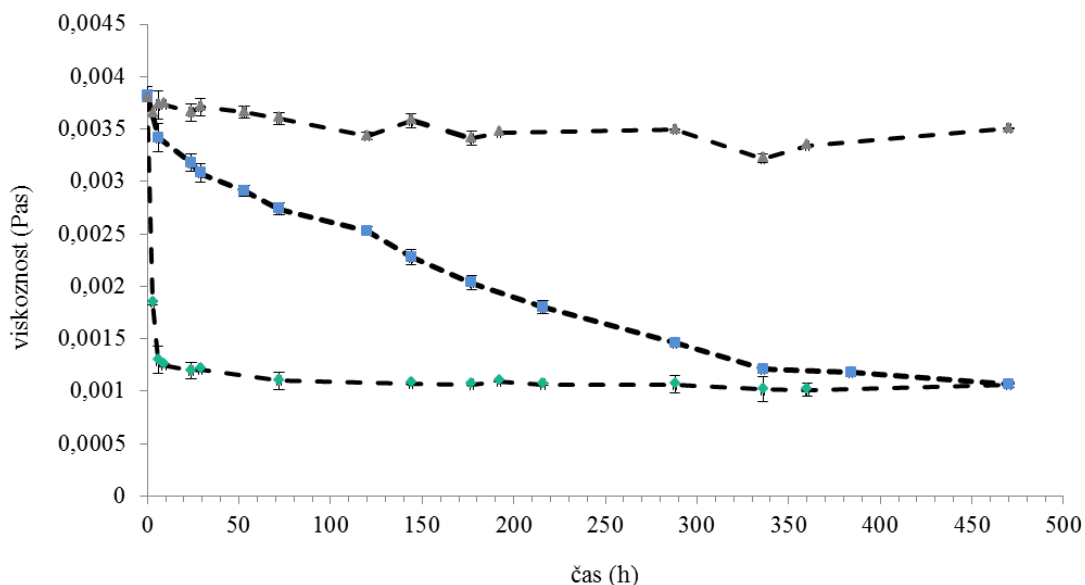
20108 in *B. subtilis* NCIB 3610 v obeh primerih opazimo naraščanje koncentracije redukcijskih sladkorjev, potek tega naraščanja pa je različen. Iz slike 6 je razvidno, da koncentracija redukcijskih sladkorjev hitreje narašča z bakterijami *C. uda* DSM 20108. Naraščanje redukcijskih sladkorjev je do 29. ure hitro, nato se umiri. Maksimalna koncentracija je dosežena po 177 urah, kjer je koncentracija reducirajočih sladkorjev 0,63 mg/mL, kar ustreza molarni koncentraciji 3,5 mM. Pri bakterijah *B. subtilis* NCIB 3610 je naraščanje glukoze do 144. ure počasno, sledi vzpon do 288. ure inkubacije, ko je dosežena maksimalna vrednost koncentracije, ki znaša 0,36 mg/mL oz. 2,0 mM. Koncentracija redukcijskih sladkorjev v gojišču BHM z dodano CMC brez mikroorganizmov je ostala tekom inkubacije enaka. To kaže, da je za razgradnjo CMC potreben mikroorganizem oziroma celulazni encimi.



**Slika 6:** Spreminjanje koncentracije redukcijskih sladkorjev v gojišču BHM tekom rasti bakterij *C. uda* DSM 20108 in *B. subtilis* NCIB 3610. Proučevali smo spremembo koncentracije redukcijskih sladkorjev z bakterijami *C. uda* DSM 20108 (zelena barva) in *B. subtilis* NCIB 3610 (modra barva), sterilno BHM gojišče je označeno s sivo barvo. Bakterije smo gojili v gojišču BHM z 1 % CMC pri 37 °C in stresanju 200 rpm. Prikazana je povprečna vrednost in standardni odklon.

#### 4.4 VISKOZNOST IZRABLJENEGA GOJIŠČA BHM

Z razgradnjo celuloze pride do spremembe viskoznosti gojišča. V obeh primerih po inkubaciji s *C. uda* DSM 20108 in *B. subtilis* NCIB 3610 viskoznost pade, kar je razvidno iz slike 7. Tudi v primeru viskoznosti se hitrost spreminjanja bistveno razlikuje. Pri bakterijah *C. uda* DSM 20108 viskoznost pade že po 3 urah, po 6 urah inkubacije pa se viskoznost ne spreminja več. Pri *B. subtilis* NCIB 3610 je znižanje viskoznosti postopno, na končno viskoznost, ki jo zasledimo pri *C. uda* DSM 20108, pride po 336 urah. Tako kot povečanje koncentracije redukcijskih sladkorjev je tudi padec viskoznosti indikator delovanja celulaz. Viskoznost sterilnega BHM se med inkubacijo minimalno spreminja. Upad viskoznosti je linearen in kaže na kemijsko zmanjšanje viskoznosti. Rezultati kažejo, da sta koncentracija redukcijskih sladkorjev in viskoznost povezani količini in negativno korelirata (za oba primera velja  $r^2 > 0,5$ ). Tako pri bakteriji *C. uda* DSM 20108 kot pri bakteriji *B. subtilis* NCIB 3610 lahko tovrstno povezanost potrdimo pri stopnji značilnosti 0,01. Viskoznost je v končni točki pri obeh bakterijah enaka in je podobna viskoznosti vodne raztopine.

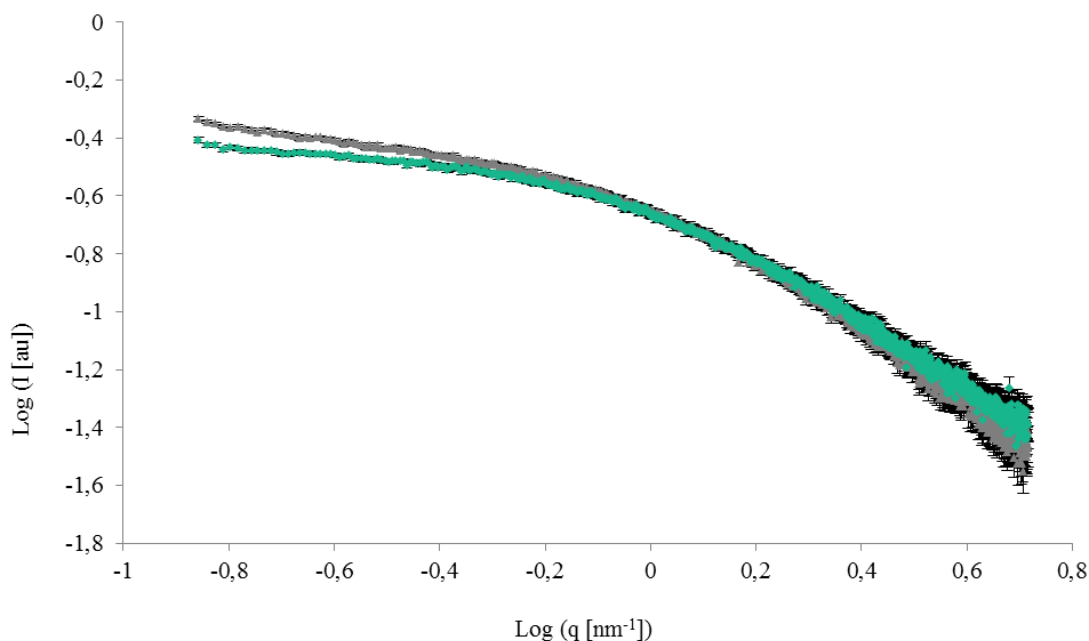


**Slika 7:** Prikaz spreminjanja viskoznosti tekočega gojišča BHM tekom inkubacije z bakterijami *C. uda* DSM 20108 (zeleno) in *B. subtilis* NCIB 3610 (modra). Sterilno gojišče je označeno s sivo barvo. Bakterije so rasle pri 37 °C in stresanju 200 rpm. Prikazana je povprečna vrednost in standardni odklon.

## 4.5 STRUKTURIRANOST CMC

### 4.5.1 Siplni krivulji CMC pred in po inkubaciji z bakterijami *Cellulomonas uda* DSM 20108

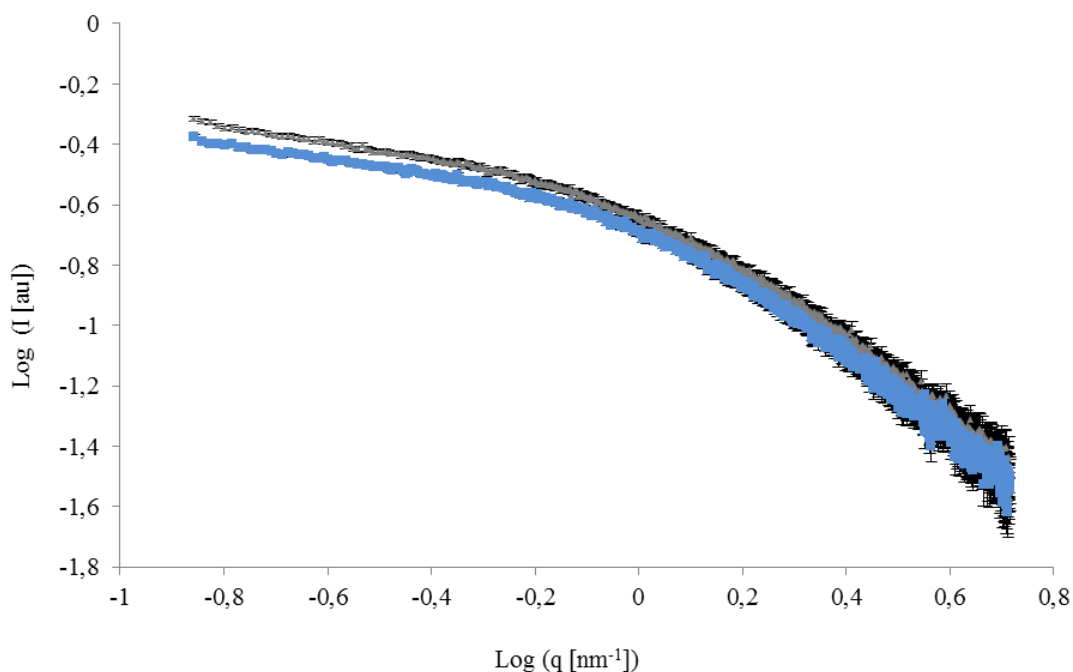
Na sliki 8 sta prikazani sipalni krivulji SAXS za CMC pred inkubacijo (siva barva) in po 470-urni inkubaciji z bakterijo *C. uda* DSM 20108 (zelena barva). Na majhnih prostorskih skalah ( $> 0,8 \text{ nm}^{-1}$ , kar ustreza Braggovim razdaljam, manjšim od 8 nm) se sipalni krivulji razgrajenega in nerazgrajenega CMC ne razlikujeta. Do spremembe strukture polisaharidnega skeleta CMC prihaja na večjih prostorskih skalah. Ob predpostavki, da se medmolekulske interakcije niso spremenile, ti rezultati kažejo na razgradnjo polimernih verig na krajše segmente.



**Slika 8:** Siplni krivulji SAXS CMC pred inkubacijo (siva barva) in po 470-urni inkubaciji z bakterijo *C. uda* DSM 20108 (zelena barva).

#### 4.5.2 Siplni krivulji CMC pred in po inkubaciji z bakterijami *Bacillus subtilis* NCIB 3610

Na sliki 9 sta prikazani sipalni krivulji CMC pred inkubacijo (siva barva) in po 470-urni inkubaciji z bakterijo *B. subtilis* NCIB 3610 (modra barva). Tako kot po inkubaciji s *C. uda* DSM 20108 je tudi po inkubaciji z *B. subtilis* NCIB 3610 razvidno, da se strukturne spremembe CMC skeleta dogajajo v sprednjem delu sipalne krivulje, kar pomeni razlike na velikih skalah. Razlika je manjša kot pri *C. uda* DSM 20108, kar kaže, da je proces razgradnje CMC manj intenziven.



**Slika 9:** Krivulji SAXS CMC pred inkubacijo (siva barva) in po 470-urni inkubaciji z *B. subtilis* NCIB 3610 (modra barva).



## 5 RAZPRAVA IN SKLEPI

### 5.1 RAZPRAVA

CMC je celulozni derivat, ki se v industriji uporablja kot vezivo, gostilo in stabilizator. Ima pomembno vlogo pri uravnavanju viskoznosti izdelkov, saj poveča viskoznost raztopin že pri majhnih koncentracijah. Kot celulozni derivat je biorazgradljiv, kar zmanjšuje njegovo uporabnost v industriji. V nalogi nas je zanimalo, kateri izmed izbranih mikroorganizmov mikrobiološke zbirke so zmožni rasti in proizvodnje zunajceličnih celulaznih encimov, ki so nujno potrebni za razgradnjo CMC.

Proučevali smo različne seve bakterij *Bacillus subtilis*, saj nas je zanimalo, ali bodo vsi sevi proizvajali celulaze. Earl in sod. (2007) so namreč dokazali, da znotraj obeh podvrst *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* in *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii*, ki so ju taksonomsko opredelili Nakamura in sodelavci (1999), obstaja precejšnja genska raznolikost. Razultati so bili pri vseh sevih *Bacillus subtilis*: NCIB 3610, 3610 wt, IS 75, JH 642 pozitivni. Proizvodnja celulaz pri bakterijah *B. subtilis* ni presenetljiva, saj gre za sporulirajoče Gram pozitivne bakterije, ki živijo predvsem v tleh (Harwood in sod., 2001), kjer je veliko različnih polimernih ogljikovih hidratov, ki izhajajo iz rastlin, živali in mikroorganizmov. *B. subtilis* je tako sposoben producirati encime za razgradnjo polisaharidov. Proizvaja  $\alpha$ -amilaze, pululanaze, endo- $\beta$ -1,4-mananaze, levanaze, glukan-1,4- $\alpha$ -maltohidrolaze, pektat liaze,  $\beta$ -1,4-endoglukanaze,  $\beta$ -1,3-1,4-endoglukanaze in endo-1,4- $\beta$ -ksilanaze, ki razgrajujejo polisaharide v krajše topne oblike (Zhang X-Z. in Zhang Y-H.P., 2010). Ni pa celulolitična aktivnost prisotna pri vseh bakterijah iz rodu *Bacillus*. Tako npr. *Bacillus mycooides* A3 1/74 in *Bacillus firmus* A2 80/73 nismo opazili cone hidrolize CMC. Za *Bacillus mycooides* ni nikakršnih poročil o celulolitični aktivnosti, medtem ko je pri nekaterih alkalofilnih sevih *Bacillus firmus* prisotna ksilanolitična aktivnost (Tseng in sod., 2002). Prav tako proizvodnja celulaz pri bakterijah *Streptomyces coelicolor* DSM 40233 ni presenetljiva, saj streptomicete najdemo v tleh. Odlikujejo jih številni metabolni in biotransformacijski procesi na lignocelulozah in hitinu. *Streptomyces coelicolor* A3(2), katerega genom so v celoti sekvencirali Bentley in sod. (2002), ima zapis za 8 celulaz, endoglukanaz. Test je pokazal pozitiven rezultat tudi pri *Cellulomonas uda* DSM 20108 in *Agromyces salentinus* DSM 16198, ki prav tako kot *Streptomyces coelicolor* spada med

aktinobakterije. Bakterije rodu *Cellulomonas* so ene izmed boljše proučenih celulolitičnih aerobnih bakterij in proizvajajo 6 endoglukanaz in vsaj eno eksoglukanazo (Chaudhary in sod., 1997). Stoppok in sod. (1982) so pri *C. uda* dokazali, da rastejo na različnih celuloznih substratih, tako mikrokristalinični celulozi kot CMC in producirajo endo-1,4- $\beta$ -glukanaze kot  $\beta$ -glukozidaze. Cono zbistritve smo opazili tudi pri gama proteobakterijah *Xanthomonas campestris*, *Pseudomonas fluorescens* CCM 2789 in *Pseudomonas stutzeri*, le da je bila cona razbarvanja v manjša kot pri že omenjenih Gram pozitivnih bakterijah. Iz literature je znano, da *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* izloča vsaj dve endoglukanazi (Schröter in sod., 2001), tudi *Pseudomonas fluorescens* var. *cellulosa* je znan celulolit (Yamane in sod., 1970). *Salmonella typhimurium* in *Serratia marascens*, ki tudi spadata med gama proteobakterije, sta dali negativen rezultat, prav tako tudi *Agrobacterium tumefaciens* N1 in *Chromobacterium violaceum*, ki spadata med alfa in beta proteobakterije. Pridobljeni rezultati so skladni s podatki iz literature.

Kinetiko razgradnje CMC smo proučevali z bakterijami *Cellulomonas uda*, ki spadajo med t.i. »prave celulolite« in so zmožne rasti na mikrokristalinični celulozi (Stoppok in sod., 1982), in bakterijami *Bacillus subtilis*, ki spadajo med t.i. »psevdocelulolite« in sintetizirajo posamezne celulazne encime, največkrat endoglukanaze in  $\beta$ -glukozidaze ter po večini rasti na mikrokristalinični celulozi niso zmožne. Zaradi različnega načina razgradnje celuloze je potek razgradnje CMC značilno različen. Bakterije *C. uda* DSM 20108 pričnejo rasti takoj, ne potrebujejo prilagoditvene faze. Bakterije *B. subtilis* NCIB 3610 potrebujejo dolgo fazo prilagoditve. Glede na rezultate merjenja optične gostote dosežejo maksimalno fazo rasti po devetih dneh, rast je kratka in ji takoj sledi padec optične gostote, kar nakazuje prehod v fazo odmiranja. Glede na obliko rastne krivulje in skromno rast bakterije *B. subtilis* NCIB 3610 v primerjavi s *C. uda* DSM 20108 sklepamo, da bakterije *B. subtilis* NCIB 3610 niso zmožne učinkovite izrabe CMC. Majhna rast je lahko posledica sinteze manj učinkovitih celulaznih encimov, saj se celulaze, npr. endoglukanaze, po učinkovitosti razgradnje CMC lahko razlikujejo, kar so pri glivnih endoglukanazah dokazali Karlsson in sodelavci (2002). Možen vzrok za slabo rast je lahko tudi nezmožnost prevzema razgradnih produktov CMC. Pomanjkanje ostalih hranil ni vzrok za slabo rast, saj so bakterije *B. subtilis* NCIB 3610 po dodatku glukoze v 24-ih urah zrasle do  $OD_{650nm} \sim 1,0$ . Po našem teoretičnem izračunu in rezultatih, ki jih je dobil Orehek

(2013) s pomočjo fenol-sulfurične metode za določanje celokupnih sladkorjev ter kromotropične metode za določanje karboksimetilnih skupin, so bakterije *B. subtilis* NCIB 3610 porabile manj kot 1 % prisotne CMC.

Bolj zanesljiv pokazatelj, da bakterije *Cellulomonas uda* DSM 20108 in *Bacillus subtilis* NCIB 3610 sintetizirajo in izločajo celulaze, je povečanje koncentracije redukcijskih sladkorjev pri obeh mikroorganizmih. Ob upoštevanju proizvajalčevega podatka za molsko maso CMC ( $M_r = 90000 \text{ g/mol}$ ) lahko izračunamo začetni ekvivalent glukozijskih redukcijskih koncev v gojišču z 1 % CMC, ki znaša 0,002 %. Povečanje na 0,03 % pri *B. subtilis* NCIB 3610 in 0,06 % pri *C. uda* DSM 20108 pomeni približno 15-kratno oz. celo 30-kratno cepitev osnovnih CMC verig. Razgradnjo CMC torej lahko vršita oba mikroorganizma, vendar se potek ter v manjši meri tudi intenziteta razgradnje med mikroorganizmoma znatno razlikuje.

Posledica razgradnje CMC je padec viskoznosti. Oba mikroorganizma lahko med rastjo popolnoma izničita psevdoplastične, tiksotropne in viskoelastične lastnosti CMC. Viskoznost izrazito hitro pade po začetku rasti *C. uda* DSM 20108. Tri ure po začetku rasti induciranege seva *C. uda* DSM 20108 je CMC s tehnološkega vidika neuporabna. To predstavlja za industrijo zelo resen problem, saj že manjša bremenitev s *C. uda* DSM 20108 pri ustreznih pogojih za rast lahko uniči izdelek. Padec viskoznosti je zelo hiter in je posledica naključne cepitve vezi, ki dolge verige, ki so predpogoj za psevdoplastično obnašanje raztopine, naredi krajše, kar onemogoča uspešen preplet polimernih verig. Po modelu Yamakawe (1974) pada intrinzična viskoznost polimera s kvadratnim korenem njegove molske mase. V naših primerih je viskoznost (po odštetem topilu) tako pri *C. uda* DSM 20108 kot tudi pri *B. subtilis* NCIB 3610 padla za približno 5-krat, kar kaže na zmanjšanje molske mase verig za približno 25-krat. Po končani inkubaciji je bila viskoznost primerljiva z viskoznostjo vode, kar pomeni, da CMC ni več opravljala vloge stabilizatorja, gostila, veziva in zadrževalca vode.

Glede na hitro rast, hiter padec viskoznosti in večje koncentracije redukcijskih sladkorjev, ki nastajajo pri inkubaciji *Cellulomonas uda* DSM 20108 v gojišču BHM, smo pričakovali, da bomo s tehniko SAXS opazili tudi večje spremembe v strukturi molekul CMC, vendar sta si sipalni krivulji CMC po končani inkubaciji s *C. uda* DSM 20108 in *Bacillus subtilis*

NCIB 3610 podobni. Oblika sipalne krivulje nam sporoča, na kateri velikostni skali se dogajajo strukturne spremembe. V obeh sipalnih krivuljah CMC po inkubaciji z bakterijami *C. uda* DSM 20108 in *B. subtilis* NCIB 3610 v prednjem delu krivulj opazimo znižanje naklona, kar nam kaže, da so se spremembe CMC polimera med inkubacijo vršile na velikih skalah, pri  $q < 0,8 \text{ nm}^{-1}$ , kar ustreza najmanj 10-20 monomerom glukoze. Če to primerjamo s povprečno molsko maso nerazgrajene CMC, ki je 90000 g/mol, kar je približno 400 monomerov, ugotovimo, da je SAXS nakazal zmanjšanje velikosti polimera zaradi razgradnje za največ 40-krat. Ta rezultat je popolnoma konsistenten z rezultatom, dobljenima z meritvami viskoznosti in redukcijskih koncev. Glede na to je sorazmerno majhna sprememba v intenziteti sipalne krivulje presenetljiva. V skladu z enačbo 3, ki povezuje intenziteto sipanja rentgenske svetlobe s koncentracijo in strukturo razredčene raztopine polimerov, bi namreč pričakovali, da bo razlika večja. Ker so bakterije porabile v najboljšem primeru samo 1 % CMC, se volumski delež polimera  $\phi$  po razgradnji ni mogel bistveno spremeniti. Pri majhnih  $q$  je prispevek sipanja zaradi oblike polimera majhen. Kar se je po razgradnji bistveno spremenilo, je dolžina polimera in s tem njegov volumen  $v$ . Zato bi pričakovali, da se bo intenziteta v sprednjem delu krivulje spremenila za 10 do 40-krat. Opazili smo približno 10-krat manjši odziv od pričakovanega. V enačbi (3) niso upoštevane interakcije med posameznimi molekulami, kar lahko znatno vpliva na sipanje in posledično na zmanjšanje razlike med krivuljama razgrajene in nerazgrajene CMC. Pojav bi lahko razložili s tem, da so po končani inkubaciji v raztopini prisotni navidezno večji polimeri. Molekula CMC je negativno nabita in se v vodi med seboj odbija, v gojišču BHM pa se odbojne interakcije zaradi soli zmanjšajo in posamezne verige polisaharida lahko pridejo bližje skupaj, kar lahko sklepamo iz različnih sipalnih krivulj CMC v vodi in gojišču BHM, kar je v diplomski nalogi pokazal Petek (2013). Posledično lahko cepljene molekule ostajajo blizu skupaj kar povečuje navidezni radius giracije molekul. Kljub temu, da bakterije *B. subtilis* NCIB 3610 rastejo zelo počasi in je za porast koncentracije redukcijskih sladkorjev in znižane vrednosti viskoznosti potrebno daljše časovno obdobje, po končani inkubaciji CMC spremenijo podobno kot bakterije *C.uda* DSM 20108 (podobna viskoznost, struktura). To je s stališča industrijske aplikacije pomembno, saj odsotnost znatne bakterijske rasti še ne pomeni, da CMC ne bo razgrajena oziroma da se njegove tehnološke lastnosti ne bodo spremenile.

## 5.2 SKLEPI

- Rast bakterij *Cellulomonas uda* DSM 20108 in *Bacillus subtilis* NCIB 3610 v gojišču BHM z dodano CMC se značilno razlikuje. Bakterije *Cellulomonas uda* DSM 20108 v gojišču BHM rastejo dobro. Rast bakterij *Bacillus subtilis* NCIB 3610 v gojišču BHM je skromna, kar kaže na slabo izrabo produktov razgradnje CMC.
- Tako bakterije *Cellulomonas uda* DSM 20108 kot bakterije *Bacillus subtilis* NCIB 3610 sintetizirajo zunajcelične celulazne encime, ki povzročijo porast koncentracije redukcijskih sladkorjev in izrazit padec viskoznosti gojišča.
- Struktura CMC se po inkubaciji v gojišču BHM z bakterijami *Cellulomonas uda* DSM 20108 in *Bacillus subtilis* NCIB 3610 spremeni na velikostnih skalah  $> 8$  nm.

## 6 POVZETEK

CMC je pomemben celulozni derivat, ki ga uporablja mnogo industrijskih panog predvsem za uravnavanje viskoznosti izdelkov. Je netoksičen bel prašek, ki nastane v reakciji alkali celuloze z monokloroocetno kislino. Kot celulozni derivat je podvržen razgradnji s celulaznimi encimi, ki jih proizvajajo različni mikroorganizmi, ki naseljujejo različne s celulozo bogate habitate, kar vključuje tudi okolja z ekstremnimi pogoji. Celulazne encime v grobem delimo glede na način delovanja na: endoglukanaze, eksoglukanaze in  $\beta$ -glukozidaze. Zmožnost razgradnje CMC je torej odvisna od celulaznih encimov, ki jih sintetizirajo celulolitični mikroorganizmi. Izmed izbranih bakterijskih sevov mikrobiološke zbirke Katedre za mikrobiologijo Oddelka za živilstvo Biotehniške fakultete so celulazne encime, ki smo jih preverjali s hitrim testom za zaznavanje celulaz, proizvajale naslednje bakterije: vsi sevi *Bacillus subtilis* (IS 75, JH 642, NCIB 3610, 3610 wt), *Streptomyces coelicolor* DSM 40233, *Cellulomonas uda* DSM 20108, *Agromyces salentinus* DSM 16198, kot slabši celulazni producenti so se izkazali: *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas fluorescens* CCM 2789 in *Xanthomonas campestris*.

Bakterije *Cellulomonas uda* DSM 20108 in *Bacillus subtilis* NCIB 3610 smo na podlagi hitrega testa prepoznali kot dobre proizvajalce celulaz, zato smo za nadaljnje raziskave uporabili omenjene bakterije. Gojili smo jih v tekočem gojišču BHM, kjer je bil edini vir ogljika 1 % CMC. Spektrofotometrično smo 470 ur spremljali rast, spremembe v koncentraciji redukcijskih sladkorjev in viskoznosti. Bakterije *C. uda* DSM 20108 so na CMC rasle dobro, hitro so spremenile viskoznost gojišča, zabeležili smo tudi hiter porast redukcijskih sladkorjev, kar je neposreden dokaz delovanja celulolitičnih encimov, predvsem endoglukanaz, saj eksoglukanaze na CMC ne delujejo. Potek razgradnje CMC z bakterijami *B. subtilis* NCIB 3610 je bil precej počasnejši, tudi netipična oblika rastne krivlje je indikator, da jim rast na CMC dela nemalo težav. Kljub temu pride do porasta redukcijskih sladkorjev in padca viskoznosti na raven vode, le da za to potrebujejo 14 dni, medtem ko bakterije *C. uda* DSM 20108 viskoznost gojišča v isti meri spremenijo v 6 urah. Z analizo SAXS smo spremljali strukturiranost CMC pred in po inkubaciji z bakterijami. Sibalni krivulji po inkubaciji CMC s *C. uda* DSM 20108 in *B. subtilis* NCIB 3610 sta podobni, po inkubaciji se kažejo spremembe na večjih skalah.

Potek razgradnje CMC s *C. uda* DSM 20108 in *B. subtilis* NCIB 3610 se razlikuje, kljub temu pa je končni rezultat razgradnje zelo podoben. Celulazni encimi, ki jih bakterije proizvajajo, močno spremenijo viskoznost raztopine CMC, kar je za industrijo pomemben podatek. Kljub neučinkoviti rasti na CMC bakterije *B. subtilis* NCIB 3610, lahko povzročajo neželene spremembe CMC raztopin, vendar počasneje kot bakterije *C. uda* DSM 20108.

## 7 VIRI

- Au K.S., Chan K.Y. 1987. Purification and properties of endo-1,4- $\beta$ -glucanase from *Bacillus subtilis*. *Journal of General Microbiology*, 133: 2155-2162
- Balsler K., Hoppe L., Eicher T., Wendel M., Astheimer A.-J. 1986. Cellulose ethers. V: Ullmann's encyclopedia of industrial chemistry. Vol. A5. 5<sup>th</sup> ed. Gerhartz W., Yamamoto Y.S., Champbell F.T., Pfefferkorn R, Rounsaville J.F. (eds.). Weinheim, Wiley VCH: 419-459
- Barba C., Mantane D., Rinaudo M., Farriol X. 2002. Synthesis and characterization of carboxymethylcelluloses (CMC) from non-wood fibres I. Accessibility of cellulose fibres and CMC synthesis. *Cellulose*, 9: 319-326
- Bayer E.A., Shoham Y., Lamed R. 2006. Cellulose-decomposing bacteria and their enzyme systems. *Prokaryotes*, 2: 578-617
- Bentley S.D., Chater K.F., Cedenio-Tarraga A.-M, Challis G.L., Thomson N.R., James K.D., Harris D.E., Quail M.A., Kieser H., Harper D., Bateman A., Brown S., Chandra G., Chen C.W., Collins M., Cronin A., Fraser A., Goble A., Hidalgo J., Hornsby T., Howarth S., Huang C.-H., Kieser T., Larke L., Murphy L., Oliver K., O'Neil S., Rabbinowitsch E., Rajandream M.-A., Rutherford K., Rutter S., Seeger K., Saunders D, Sharp S., Squares S., Taylor K., Warren T., Wietzorrek A., Woodward J., Barrell B.G., Parkhill J., Hopwood D.A. 2002. Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature*, 417: 141-147
- Bhat M.K. 2000. Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnology Advances*, 18, 5: 355-383
- Blomstedt M., Mitikka-Eklund M., Vuorinen T. 2007. Simplified modification of bleached softwood pulp with carboxymethyl cellulose. *Appita*, 60, 4: 309-314
- Browning B. L. 1967. Viscosity and molecular weight. V: Methods of wood chemistry. Browning B. L. (ed.). New York, Wiley Interscience Publishers: 519-557



- Burg T.P., Godin M., Kundsén S.M., Shen W., Carlson G., Foster J.S., Babcock K., Manalis S.R. 2007. Weighing of biomolecules, single cells and single nanoparticles in fluid. *Nature*, 446, 7139: 1066-1069
- Carboxymethyl cellulose market: global industry analysis, size, share, growth, trends and forecast, 2013-2019. 2014. Albany, Transparency Market Research: 83 str. <http://www.transparencymarketresearch.com/carboxymethyl-cellulose-industry.html> (16.2.2015)
- Cash M.J., Caputo S.J. 2010. Cellulose derivatives. V: Thickening and gelling agents. Imeson A. (ed.). West Sussex, Blackwell Publishing: 95-116
- Chaudhary P., Kumar N., Deobagkar D.N. 1997. The glucanases of *Cellulomonas*. *Biotechnology Advances*, 15: 315-331
- Din N., Damude H.G., Gilkes N.R., Miller R.C., Warren A., Kilburn D.G. 1994. C<sub>1</sub>-C<sub>X</sub> revisited: intramolecular synergism in cellulase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91: 11383-11387
- Doi R.H. 2008. Cellulases of mesophilic microorganisms. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1125: 267-279
- Doi R.H., Kosugi A. 2004. Cellulosomes: plant-cell-wall degrading enzyme complexes. *Nature Reviews, Microbiology*, 2: 541-551
- Doi R. H., Kosugi A., Murashima K., Tamaru Y., Han S.O. 2003. Cellulosomes from mesophilic bacteria. *Journal of Bacteriology*, 185: 5907-5914
- Dolz M., Jimenez J., Hernandez J.M., Deligido 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

- Dogša I. 2003. Ugotavljanje strukturne stabilnosti bakterijskih zunajceličnih polisaharidov s sipanjem X-žarkov pri majhnih kotih. Diplomsko delo. Ljubljana. Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije: 46 str.
- Earl A.M., Losick R., Kolter R. 2007. *Bacillus subtilis* genome diversity. *Journal of Bacteriology*, 187, 3: 1163-1170
- Falkowski P., Scholes R.J., Boyle E., Canadell J., Canfield D., Elser J., Gruber N., Hibbard K., Hogberg P, Linder S., Mackenzie F.T., Moore B., Pederson T., Rosenthal Y., Seitzinger S., Smetacek V., Steffen W. 2000. The global carbon cycle: a test of our knowledge as a system. *Science*, 290: 291-296
- Fras Zemljič L., Stenius P., Laine J., Stana-Kleinschek K. 2008. Topochemical modification of cotton fibres with carboxymethyl cellulose. *Cellulose*, 15, 2: 315-321
- Ghannam M.T., Esmail M.N. 1997. Rheological properties of carboxymethyl cellulose. *Journal of Applied Polymer Science*, 64, 2: 289-303
- Greeff A.E., Robillard B., Toit W.J. 2012. Short and long term efficiency of carboxymethylcellulose to prevent crystal formation in South African wine. *Food Additives & Contaminants*, 29, 9: 1374-1385
- Guo J.H., Skinner G.W., Harcum W.W., Barnum P.E. 1998. Pharmaceutical applications of naturally occurring water-soluble polymers. *Pharmaceutical Science & Technology Today*, 1, 6: 254-261
- Harwood C.R. 1992. *Bacillus subtilis* and its relatives: molecular biological and industrial workhorses. *Trends in Biotechnology*, 10, 7: 247-256
- Hegedušić V., Hercog Z., Rimac S. 2000. Rheological properties of carboxymethyl cellulose and whey solutions before and after freezing. *Food Technology and Biotechnology*, 38, 1: 19-26
- Heinze T., Liebert T. 2001. Unconventional methods in cellulose functionalization. *Progress in Polymer Science*, 26:1689-1762

- Henrissat B., Callebaut I., Fabrega S., Lehn P., Mornon J.P, Davies G. 1995. Conserved catalytic machinery and the prediction of a common fold for several families of glycosyl hydrolases. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 92: 7090-7094
- Hollabaugh C.B., Burt L.H., Peterson Walsh A. 1945. Carboxymethyl cellulose-uses and applications. *Industrial and Engineering Chemistry*, 37, 10: 943-947
- Horner S., Puls J., Saake B., Klohr E.-A., Thielking H. 1999. Enzyme-aided characterisation of carboxymethylcellulose. *Carbohydrate Polymers*, 40: 1-7
- Karlsson J., Momcilovic D., Wittgren B., Schüle 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 Cel45A core from *Trichoderma reesei*. *Biopolymers*, 63: 32-40
- Kasana R.C., Salwan R., Dhar H., Dutt S., Gulati A. 2008. A rapid and easy method for detection of microbial cellulases on agar plates using Gram's iodine. *Current Microbiology*, 57, 5: 503-507
- Kawamoto T. 2003. Use of new adhesive film for preparation of multi-purpose fresh frozen sections from hard tissues, whole animals, insects and plants. *Archives of Hystology and Cytology*, 66, 2: 123-143
- Kenyon W., Esch S.W, Buller C.S. 2004. The curdlan-type exopolysaccharide produced by *Cellulomonas flavigena* KU forms part of an extracellular glycocalyx involved in cellulose degradation. *Antonie van Leeuwenhoek*, 87:143-148
- Kim B.K., Lee B.H., Lee Y-J., Jin I.H., Chung C.H., Lee J.W. 2009. Purification and characterization of carboxymethylcellulase isolated from a marine bacterium, *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* A-53. *Enzyme and Microbial Technology*, 44: 411-416
- Kulicke W-M., Kull A.H., Kull W., Thielking H. 1996. Characterization of aqueous carboxymethylcellulose solutions in terms of their molecular structure and its influence on rheological behaviour. *Polymer*, 37: 2723-2731

- Latif A., Amar T., Noor S. 2007. Two-step synthesis and characterization of carboxymethylcellulose from rayon grade wood pulp and cotton linter. *Journal of the Chemical Society of Pakistan*, 29, 2: 143-150
- Ljungdahl L.G., Eriksson K.-E. 1985. Ecology of microbial cellulose degradation. *Advances in Microbial Ecology*, 8: 237-299
- Lee J.M., Heitman J.A., Pawlak J.J. 2006. Rheology of carboxymethyl cellulose solutions treated with cellulases. *BioResource*, 2, 1: 20-33
- Lo Y.C., Sartale G.D., Chen W.M., Bai M.D., Chang J.S. 2009. Isolation of cellulose-hydrolytic bacteria of cellulosic biohydrogen production. *Enzyme and Microbial Technology*, 44: 417-425
- Lynd L.R., Weimer P.J., van Zyl W.H., Petrorius I.S. 2002. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66, 3: 506-577
- Madigan M.T., Martinko J.M. 2006. *Brock biology of microorganisms*. 11<sup>th</sup> ed. Upper Saddle River, New Jersey, Pearson Prentice Hall: 992 str.
- Miller G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31, 3: 426-428
- Nakamura L.K., Roberts M.S., Cohan F.M. 1999. Relationship of *Bacillus subtilis* clades associated with strains 168 and W28: a proposal for *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* subsp. nov and *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* subsp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49: 1211-1215
- Nie H., Liu M., Zhan F., Guo M. 2004. Factors on the preparation of carboxymethylcellulose hydrogel and its degradation behaviour in soil. *Carbohydrate Polymers*, 58: 185-189

- Orehek J. 2013. Strukturni opis biorazgradnje gostil na celulozni osnovi. Doktorska disertacija. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Interdisciplinarni doktorski študij bioznanosti: 100 str.
- Petek K. 2013. Biorazgradljivost celuloznih derivatov. Magistrsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije. 40 str.
- 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
- Reuben J. 1986. Analysis of the <sup>13</sup>C-N.M.R. spectra of hydrolyzed and methanolysed 0-methylcelluloses: monomer compositions and models for their description. *Carbohydrate Research*, 157: 201-213
- Roe R. J. 2000. *Methods of X-ray and neutron scattering in polymer science*. New York, Oxford University Press: 331 str.
- Rooney A.P., Price N.P.J., Ehrardt C., Swezy J.L, Bannan J.D. 2009. Phylogeny and molecular taxonomy of *Bacillus subtilis* species complex and description *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum* subsp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59: 2429-2436
- Ratanakhanokchai K., Waeonukul R., Pason P., Tachaapaikoon C., Kyu K.L., Sakka K., Kosugi A., Mori Y. 2013. *Paenibacillus curdlanolyticus* strain B-6 multyenzime complex: a novel system for biomass utilization. V: *Biomass now-cultivation and utilization*. Matovic M.D. (ed). Rijeka, InTech: 369-394
- Sadhu S., Kanti Maiti T. 2013. Cellulase production by bacteria: a review. *British Microbiology Research Journal*, 3, 3: 235-258
- Schnablegger H., Singh Y. 2011. *The SAXS guide: getting acquainted with the principles*. Graz, Anton Paar GmbH: 91 str. Schröter K., Flaschel E., Pühler A., Becker A. 2001. *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* secretes the endoglucanases ENGXCA and

- ENGXCB: construction of an endoglucanase-deficient mutant for industrial xanthan production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 55: 727-733
- Sharma B.R., Dhuldhoya N.C., Merchant S.U., Merchant C.U. 2007. Hydrocolloids-efficient rheology control additives. e- magazine: *Science Tech Entrepreneur*, 2: 1-9
- Sieger C.H.N., Kroon A.G.M., Batelaan J.G., Ginkel C.G. 1995. Biodegradation of carboxymethylcellulose by *Agrobacterium* CM-1. *Carbohydrate Polymers*, 27:137-143
- Stackebrandt E., Schumann P., Prauser H. 2006. The family *Cellulomonadaceae*. *Prokaryotes*, 3: 983-1001
- 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
- Teeri T.T. 1997. Crystalline cellulose degradation: new insight into function of cellobiohydrolases. *Trends in Biotechnology*, 15: 160-167
- Tomšič M. 2004. Strukturne raziskave mikroemulzij z metodo ozkokotnega rentgenskega sipanja. Doktorska disertacija. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo: 170 str.
- Tseng M.J., Yap M.N., Ratanakhanokchi K., Kyu K.L. 2002. Purification and characterization of two cellulase free xylanases from an alkaliphilic *Bacillus firmus*. *Enzyme and Microbial Technology*, 30: 590-595
- 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 encyclopaedia 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

- Vani J.S., Madhusudhna Rao K., Siva Gangi Reddy N., Krishna Rao K.S.V. 2013. Synthesis and characterization of sodium carboxymethyl cellulose/poly(acrylamide) magnetic nanocomposite semi ipn's for removal of heavy metal ions. *World Journal of Nano Science & Technology*, 2,1: 33-41
- Watanabe H., Tokuda H. 2001. Animal cellulases. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 58: 1167-1178
- Wilson D.B. 2011. Microbial diversity of cellulose hydrolysis. *Current Opinion in Microbiology*, 14: 259-263
- Wirick M.G. 1968. A study of enzymic degradation of CMC and other cellulose ethers. *Journal of Polymer Science*, 6: 1965-1974
- Wirth S., Ulrich A. 2002. Cellulose-degrading potentials and phylogenetic classification of carboxymethyl-cellulose decomposing bacteria isolated from soil. *Systematic and Applied Microbiology*, 25: 584-591
- Yamakawa H., Fujii M. 1974. Intrinsic viscosity of wormlike chains. Determination of the shift factor. *Macromolecules*, 7: 128-135
- Yamane K., Suzuki K., Nisizawa K. 1970. Purification and properties of extracellular and cell-bound cellulase components of *Pseudomonas fluorescens* var. cellulosa. *Journal of Biochemistry*, 67, 1: 19-35
- Yin L.-J., Lin H.-H., Xiao Z.-R. 2010. Purification and characterization of cellulase from *Bacillus subtilis* YJ1. *Journal of Marine Science and Technology*, 18, 3: 466-471
- Zhang X.-Z., Zhang Y.-H. P. 2010. One step production of biocommodities from lignocellulosic biomass by recombinant cellulolytic *Bacillus subtilis*: opportunities and challenges. *Engineering in Life Science*, 10, 5: 1-9
- Zhang X.-Z., Zhang Y.-H. P. 2013. Cellulases: characteristics, sources, production and application. V: Bioprocessing, technologies and biorefinery for sustainable production

of fuels, chemicals and polymers. Yang S.-T., El-Enshasy H.A., Thongchul N. (eds.).  
New Jersey, John Wiley & Sons: 131-146

Zupančič Valant A. 2007. Uvod v reologijo. Ljubljana, Fakulteta za kemijo in kemijsko  
tehnologijo: 98 str.

Žumer M. 1999. Reologija. V: Reologija živil. 19. Bitenčevi živilski dnevi, Ljubljana, 10.  
in 11. junij 1999. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta,  
Oddelek za živilstvo: 1-1



## ZAHVALA

Zahvaljujem se izvrstnemu mentorju prof. dr. Davidu Stoparju, ki se je tekom moje odisejade izkazal kot Človek z veliko začetnico. Hvala za vse nasvete, predloge in izvrstne odgovore na zagonetna vprašanja. Predvsem hvala, ker nikoli niste obupali nad menoj.

Zahvaljujem se tudi somentorju asist. dr. Iztoku Dogši. Ni dovolj besed, da bi lahko izrazila hvaležnost za vso pomoč, trud in dragocen čas, ki mi je bil namenjen. Iztok, iskrena hvala.

Zahvala gre tudi doc. dr. Tomažu Accettu za hitro in strokovno recenziranje.

Hvala staršem.

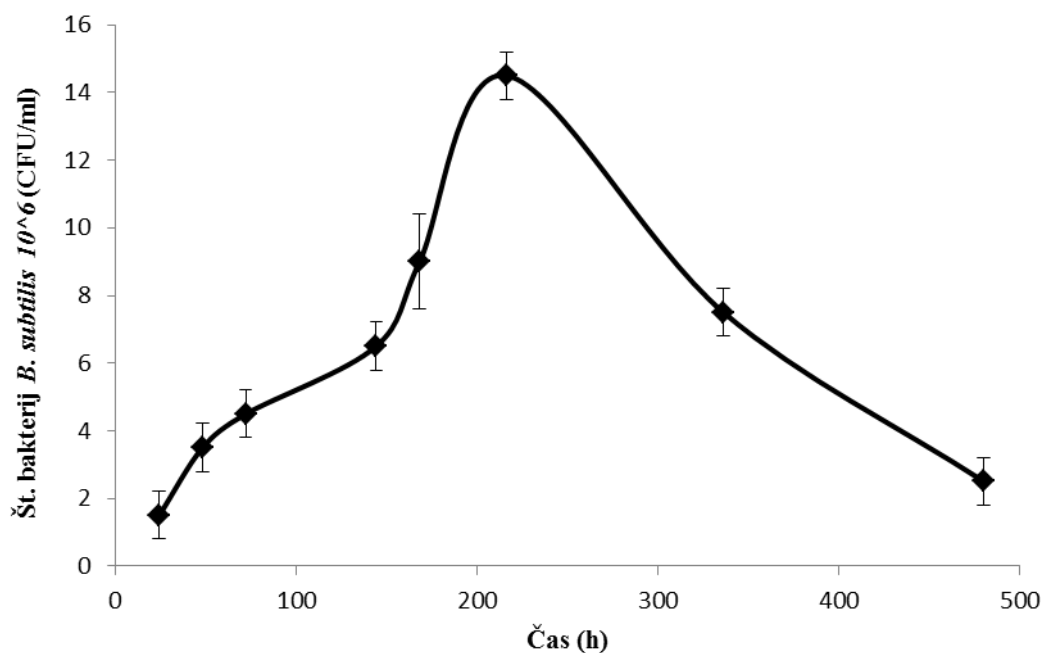
Hvala Branki, Tini ter vsem, ki ste mi pomagali na dolgi poti do cilja.

Posebno pa se zahvaljujem mojima najdražjima, Žigi in Boru. Hvala za vso podporo, vzpodbude in potrpežljiva leta čakanja.

Hvala Mr. Q, ki me tolažiš s kitajskim pregovorom: *»Ne boj se počasne rasti, boj se obstati na mestu«*.

## PRILOGE

**Priloga A:** Število bakterij *Bacillus subtilis* NCIB 3610 tekom inkubacije v gojišču BHM z dodano 1 % CMC.



Okvirni teoretični izračun

Okvirna ocena porabe CMC pri bakterijah *B. subtilis* v tekočem gojišču BHM z dodano 1 % CMC pri čemer predpostavljamo, da je 50 % mase celice sestavljeno iz ogljika.

$$N = n_{\text{MAX}} \cdot 0,5 \cdot A$$

N.....masa porabljenega CMC v celicah *B. subtilis*

$n_{\text{MAX}}$ .....največje število bakterij *B. subtilis* NCIB 3610 v BHM z 1 % CMC po času (CFU/mL)

A..... povprečna masa celice *B. subtilis*  $1,5 \cdot 10^{-13}$  g (Burg in sod., 2007)

$$N = 14,5 \cdot 10^6 \text{ CFU/mL} \cdot 0,5 \cdot 1,5 \cdot 10^{-13} \text{ g}$$

$$= 1,0875 \text{E-}06 \text{ g/mL}$$

Kar predstavlja 0,010875 % porabljenega CMC.

**Priloga B:** Rast bakterij *Bacillus subtilis* NCIB 3610 in *Cellulomonas uda* DSM 20108 v tekočem gojišču BHM, kjer je edini vir ogljika 1 % glukoza.

Bakterijski sev/ čas (h)	Optična gostota OD650 <sub>nm</sub> a.u.		
	0	14	24
<i>Bacillus subtilis</i> NCIB 3610	0,01±0,01	0,91±0,01	1,05±0,01
<i>Cellulomonas uda</i> DSM 20108	0,01±0,01	0,18±0,02	0,31±0,02