



Univerza v Mariboru

Fakulteta za naravoslovje
in matematiko

Kim FIJOK

**VPLIV RAZLIČNIH VIROV OGLJIKA NA
SESTAVO IN REOLOŠKE LASTNOSTI
ZUNAJCELIČNIH POLISAHARIDOV PRI
OCETNOKISLINSKIH BAKTERIJAH**

Magistrsko delo

Maribor, september, 2020



Univerza v Mariboru

Fakulteta za naravoslovje
in matematiko

Kim FIJOK

**VPLIV RAZLIČNIH VIROV OGLJIKA NA
SESTAVO IN REOLOŠKE LASTNOSTI
ZUNAJCELIČNIH POLISAHARIDOV PRI
OCETNOKISLINSKIH BAKTERIJAH**

Magistrsko delo

Maribor, september, 2020

VPLIV RAZLIČNIH VIROV OGLJIKA NA SESTAVO IN REOLOŠKE LASTNOSTI ZUNAJCELIČNIH POLISAHARIDOV PRI OCETNOKISLINSKIH BAKTERIJAH

Magistrsko delo

Študent: Kim FIJOK
Študijski program: Univerzitetni študijski program
Biologija in ekologija z naravovarstvom
Mentorica: red. prof. dr. Janja TRČEK
Somentor: doc. dr. Jure ŠKRABAN
Somentor: doc. dr. Iztok DOGŠA

Zahvala

Posebna zahvala mentorici red. prof. dr. Janji Trček za vso strokovno pomoč, usmerjanje in nasvete pri pisanju magistrske naloge. Ogromne zasluge gredo somentorju, doc. dr. Juretu Škrabanu za nasvete in vodenje pri laboratorijskem delu in asist. dr. Tadeji Vajdič za pomoč pri pisanju magistrske naloge.

Rada bi se zahvalila tudi Andreji Savič za pomoč pri izvajanju laboratorijskega dela ter moralno podporo.

Za pomoč pri izvajanju reoloških meritev na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani se posebej zahvaljujem red. prof. dr. Davidu Stoparju in somentorju doc. dr. Iztoku Dogši s Katedre za mikrobiologijo Oddelka za živilstvo. Hvala za strokovnost, strpnost, usmerjanje pri opravljanju meritev ter pomoč pri opredelitvi rezultatov.

Za zaupanje in spodbudo pri pisanju magistrske naloge se iskreno zahvaljujem materi in očetu ter svojemu fantu in njegovi družini.

Vpliv različnih virov ogljika na sestavo in reološke lastnosti zunajceličnih polisaharidov pri oacetnokislinskih bakterijah

Ključne besede: oacetnokislinske bakterije, biofilm, zunajcelični polisaharidi, acetan

UDK:

Povzetek

*V magistrski nalogi smo pri 83 sevih oacetnokislinskih bakterij (OKB) iz Zbirke mikroorganizmov Oddelka za biologijo FNM UM preiskali sposobnost za tvorbo zunajceličnih polisaharidov. 25 sevov je na gojišču RAE oblikovalo značilen biofilm. Štiri izbrane seve in še štiri referenčne seve smo vključili v nadaljnje analize. Z analizo PCR smo pri teh osmih sevih iskali specifične odseke ključnih genov za sintezo acetana (*aceA*), levana (*levA*) in celuloze (*bscA*). Pri enem sevu smo identificirali gen za sintezo acetana in levana, pri štirih gen za sintezo celuloze in acetana, pri dveh pa samo gen za sintezo celuloze. Pri enem izmed sevov nismo identificirali nobenega izmed treh iskanih genov, čeprav je sev v gojišču tvoril značilen biofilm. Po namnožitvi vsakega izmed teh sevov v dveh gojiščih, z različnima viroma ogljika, smo iz namnožene biomase izolirali vodotopne zunajcelične polisaharide. Očiščene polisaharide smo kislinsko hidrolizirali, jih ločili s tankoplastno kromatografijo ter identificirali po primerjavi s sladkornimi standardi. Zaradi drugačne monosaharidne sestave od že poznane acetana in sposobnosti sevov, da producirajo vodotopne polisaharide v velikih količinah, smo izbrali tri seve za preiskovanje viskoelastičnih lastnosti polisaharidov. Najbolj viskozen je bil zunajcelični polisaharid pridobljen iz seva *K. oboediens* AV380. Bistveno nižjo viskoznost sta imela zunajcelična polisaharida, pridobljena iz sevov *A. aceti* LMG 1504^T in *A. pomorum* LMG 18848^T. Polisaharid seva *K. oboediens* AV380 je oblikoval viskoelastično trdno snov, zdržal najširše območje reverzibilnih deformacij in najkasneje razpadel, zato menimo, da ima potencialno uporabno vrednost v biotehnološki industriji in je primeren kandidat za nadaljnje raziskave.*

Influence of Different Carbon Sources on Composition and Rheological Properties of Extracellular Polysaccharides in Acetic Acid Bacteria

Key words: Acetic Acid Bacteria, Biofilm, Extracellular Polysaccharides, Acetan

UDC:

Abstract

*In this master's thesis we analyzed the ability of 83 acetic acid bacteria (AAB) strains from the Culture Collection of Microorganisms of the Department of Biology, FNM UM, to form extracellular polysaccharides. 25 strains formed a characteristic biofilm on RAE medium. Four selected strains and four additional reference strains were included in further analyses. Using PCR analysis, we looked for specific PCR-products of key genes for the synthesis of acetan (aceA), levan (levA) and cellulose (bscA) in these eight strains. Under the applied growth conditions all 8 strains formed a biofilm of different thickness. The acetan and levan synthesis gene was identified in one strain, the cellulose and acetan synthesis gene in four, and only the cellulose synthesis gene in two. We did not identify any of the three genes in one of the strains, although the strain formed a characteristic biofilm on the medium. After cultivation of each of these strains in two media, containing different carbon sources, water-soluble extracellular polysaccharides were isolated from the harvested biomass. Purified polysaccharides were hydrolysed by acid at high temperature, separated by thin layer chromatography, and identified in comparison to sugar standards. Due to different monosaccharide composition from the already known acetan and the ability of the strains to produce water-soluble polysaccharides in large quantities, we selected three strains to investigate the viscoelastic properties of polysaccharides. The most viscous was the extracellular polysaccharide obtained from the strain *K. oboediens* AV380. Extracellular polysaccharides derived from strains of *A. aceti* LMG 1504^T and *A. pomorum* LMG 18848^T had significantly lower viscosities. The polysaccharide of the *K. oboediens* AV380 strain formed a viscoelastic solid, withstood the widest range of reversible deformations, and disintegrated at the latest. According to these characteristics, the polysaccharide of strain AV380 has potential useful values for biotechnological industry and is thus a suitable candidate for further research.*

UNIVERZA V MARIBORU

Fakulteta za naravoslovje in matematiko

**IZJAVA O AVTORSTVU IN ISTOVETNOSTI TISKANE IN ELEKTRONSKE OBLIKE ZAKLJUČNEGA
DELA**

Ime in priimek študentke: Kim FIJOK

Študijski program: Biologija in ekologija z naravovarstvom

Naslov zaključnega dela: Vpliv različnih virov ogljika na sestavo in reološke lastnosti zunajceličnih polisaharidov pri očetnokislinskih bakterijah

Mentor: red. prof. dr. Janja TRČEK

Somentor: doc. dr. Jure ŠKRABAN

Somentor: doc. dr. Iztok DOGŠA

Podpisana študentka Kim FIJOK

- izjavljam, da je zaključno delo rezultat mojega samostojnega dela, ki sem ga izdelala ob pomoči mentorice in somentorja;
- izjavljam, da sem pridobila vsa potrebna soglasja za uporabo podatkov in avtorskih del v zaključnem delu in jih v zaključnem delu jasno in ustrezno označila;
- na Univerzo v Mariboru neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravico shranitve avtorskega dela v elektronski obliki, pravico reproduciranja ter pravico ponuditi zaključno delo javnosti na svetovnem spletu preko DKUM; sem seznanjena, da bodo dela deponirana/objavljena v DKUM dostopna široki javnosti pod pogoji licence Creative Commons BY-NC-ND, kar vključuje tudi avtomatizirano indeksiranje preko spleta in obdelavo besedil za potrebe tekstovnega in podatkovnega rudarjenja in ekstrakcije znanja iz vsebin; uporabnikom se dovoli reproduciranje brez predelave avtorskega dela, distribuiranje, dajanje v najem in priobčitev javnosti samega izvirnega avtorskega dela, in sicer pod pogojem, da navedejo avtorja in da ne gre za komercialno uporabo;
- dovoljujem objavo svojih osebnih podatkov, ki so navedeni v zaključnem delu in tej izjavi, skupaj z objavo zaključnega dela;
- izjavljam, da je tiskana oblika zaključnega dela istovetna elektronski obliki zaključnega dela, ki sem jo oddala za objavo v DKUM.

Datum in kraj: Maribor, 22.09. 2020

Podpis študentke:

KAZALO VSEBINE

ZAHVALA	II
POVZETEK	III
ABSTRACT	IV
IZJAVA O AVTORSTVU IN ISTOVETNOSTI TISKANE IN ELEKTRONSKE OBLIKE ZAKLJUČNEGA DELA.....	V
KAZALO SLIK.....	VIII
KAZALO PREGLEDNIC	X
KAZALO GRAFOV	XI
UPORABLJENI SIMBOLI IN KRATICE	XII
1 UVOD	1
1.1 NAMEN DELA IN RAZISKOVALNE HIPOTEZE	3
2 PREGLED LITERATURE	4
2.1 ZUNAJCELIČNI POLISAHARIDI MIKROORGANIZMOV	4
2.1.1 <i>Reološke lastnosti polisaharidov</i>	<i>8</i>
2.1.2 <i>Zunajcelični polisaharidi oacetnokislinskih bakterij.....</i>	<i>9</i>
2.1.2.1 Celuloza	9
2.1.2.2 Levan	10
2.1.2.3 Acetan	11
2.1.3 <i>Vpliv vira ogljika na produkcijo polisaharida.....</i>	<i>12</i>
3 MATERIALI IN METODE	14
3.1 MATERIALI.....	14
3.1.1 <i>Bakterije</i>	<i>14</i>
3.1.2 <i>Rastna gojišča</i>	<i>15</i>
3.1.3 <i>Kemikalije za izolacijo DNA</i>	<i>15</i>
3.1.4 <i>Kemikalije za pomnoževanje DNA z metodo PCR</i>	<i>16</i>
3.1.5 <i>Kemikalije za elektroforezo v agaroznem gelu.....</i>	<i>16</i>
3.1.6 <i>Kemikalije za izolacijo zunajceličnih polisaharidov.....</i>	<i>17</i>
3.1.7 <i>Kemikalije za analizo sestave polisaharidov.....</i>	<i>17</i>
3.1.8 <i>Kemikalije za analizo reoloških lastnosti polisaharidov.....</i>	<i>18</i>
3.1.9 <i>Laboratorijska oprema in pribor.....</i>	<i>18</i>
3.2 METODE	19
3.2.1 <i>Gojenje oacetnokislinskih bakterij.....</i>	<i>19</i>
3.2.2 <i>Ocena tvorbe biofilma</i>	<i>19</i>
3.2.3 <i>Izolacija DNA</i>	<i>19</i>
3.2.4 <i>Verižna reakcija s polimerazo (PCR)</i>	<i>19</i>
3.2.5 <i>Gelska elektroforeza.....</i>	<i>21</i>
3.2.6 <i>Priprava biofilmov za izolacijo polisaharidov</i>	<i>21</i>

3.2.7	<i>Izolacija in čiščenje zunajceličnih polisaharidov</i>	21
3.2.8	<i>Hidroliza očiščenih polisaharidov</i>	23
3.2.9	<i>Analiza sestave polisaharidov s tankoplastno kromatografijo</i>	24
3.2.10	<i>Reološke analize zunajceličnih polisaharidov</i>	26
4	REZULTATI	28
4.1	IZBOR SEVOV, KI TVORIJO BIOFILM	28
4.2	DETEKCIJA GENOV ZA SINTEZO ACETANA, LEVANA IN CELULOZE	33
4.3	IZOLACIJA IN ČIŠČENJE ZUNAJCELIČNIH POLISAHARIDOV	34
4.4	HIDROLIZA OČIŠČENIH POLISAHARIDOV	37
4.5	ANALIZA SESTAVE OČIŠČENIH POLISAHARIDOV	37
4.6	REOLOŠKE LASTNOSTI IZBRANIH POLISAHARIDOV	42
5	RAZPRAVA	47
6	SKLEPI	53
7	POVZETEK	54
	VIRI IN LITERATURA	57

KAZALO SLIK

- Slika 3.1: Shema postopka izolacije in čiščenja zunajceličnih polisaharidov, modificirana po metodah Bales in sod. (2013) in Jančič (2019). 21
- Slika 3.2: Shematično prikaz poti potovanja posameznih sladkorjev po ločevanju s tankloplastno kromatografijo. Legenda: d₁, glukuronska kislina; d₂, manoza; d₃, glukoza; d₄, ramnoza; d₅, fruktoza; f, mobilna faza. Foto: Kim Fijok..... 24
- Slika 3.3: Rotacijski modularni reometer (Physica MCR 302, Anton Paar, Gradec, Avstrija). Foto: Kim Fijok..... 26
- Slika 4.1: Primer krhkega (levo, *A. pomorum* LMG 18848^T, gojen na glukozi), tankega (sredina, *K. rhaeticus* LMG 22126^T, gojen na saharozi) in debelega (desno, *Komagataeibacter* sp. AV436, gojen na glukozi) biofilma iz stacionarne faze rasti oacetnokislinskih bakterij. Foto: Kim Fijok..... 30
- Slika 4.2: Slike biofilmov po gojenju referenčnih sevov oacetnokislinskih bakterij na glukoznem (levo) in saharoznem (desno) gojišču RAE. Foto: Kim Fijok..... 31
- Slika 4.3: Slike biofilmov po gojenju sevov oacetnokislinskih bakterij, osamljenih iz industrijskih bioreaktorjev, na glukoznem (levo) in saharoznem (desno) gojišču RAE. Foto: Kim Fijok..... 32
- Slika 4.4: Ločevanje PCR-pomnožkov po namnoževanju specifičnega odseka gena za levan (proge 1, 2, 3, 4) in acetan (proge 5, 6, 7, 8) v preiskovanih sevih iz rodu *Komagataeibacter*. Legenda: VS, velikostni standard; 1, *K. oboediens* AV380; 2, *Komagataeibacter* sp. AV394; 3, *Komagataeibacter* sp. AV436; 4, *Komagataeibacter nataicola* LMG 1536^T – neg. kontrola; 5, *K. oboediens* AV380; 6, *Komagataeibacter* sp. AV394; 7, *Komagataeibacter* sp. AV436; 8, *K. swingsii* LMG 22125^T- poz. kontrola; 9, *K. hansenii* LMG 1527^T- neg. kontrola. Foto: Kim Fijok..... 34
- Slika 4.5: Primer vidne precipitacije zunajceličnih polisaharidov v stopnji 7 postopka izolacije in čiščenja zunajceličnih polisaharidov. Levo: *K. oboediens* AV380, gojen na saharozi; desno: *K. oboediens* AV380, gojen na glukozi. Foto: Kim Fijok. 35

- Slika 4.6: Primer velike količine očiščenega in izoliranega zunajceličnega polisaharida, ki ga tvori sev *A. acetii* LMG 1504^T, gojen na saharoznem gojišču RAE. Foto: Kim Fijok. 35
- Slika 4.7: Vijale s hidroliziranimi vzorci polisaharidov. Od leve proti desni: *A. estunensis* AV371, *K. oboediens* AV380, *Komagataeibacter* sp. AV436 in *K. pomaceti* T5K1^T. Vsi sevi so bili gojeni na glukoznem gojišču. Foto: Kim Fijok. 37
- Slika 4.8: Rezultat ločevanja sladkornih standardov s tankoplastno kromatografijo. Nanešeni so bili različni volumni hidroliziranih sladkornih standardov: 1, 1 µl; 2, 2 µl; 3, 3 µl. Foto: Kim Fijok. 38
- Slika 4.9: Rezultat ločevanja hidroliziranih zunajceličnih polisaharidov izbranih sevov oacetnokislinskih bakterij s tankoplastno kromatografijo. Vzorci na progah 1, 3, 5 in 7 so bili pridobljeni iz biofilma po namnoževanju na RAE gojišču z glukozo, vzorci na progah 2, 4, 6 in 8 po namnoževanju na gojišču RAE s saharozo. Legenda: 1 in 2, *A. acetii* LMG 1504^T; 3 in 4, *K. pomaceti* T5K1^T; 5 in 6, *A. pomorum* LMG 18848^T; 7 in 8, *K. rhaeticus* LMG 22126^T; 9, sladkorni standard (3 µl). Foto: Kim Fijok. 39
- Slika 4.10: Rezultat ločevanja hidroliziranih zunajceličnih polisaharidov izbranih sevov oacetnokislinskih bakterij s tankoplastno kromatografijo. Vzorci na progah 2, 4, 6 in 8 so bili pridobljeni iz biofilma po namnoževanju na RAE gojišču z glukozo, vzorci na progah 3, 5, 7 in 9 po namnoževanju na gojišču RAE s saharozo. Legenda: 1 in 10, sladkorni standard (3 µl); 2 in 3, *A. estunensis* AV371; 4 in 5, *K. oboediens* AV380; 6 in 7, *Komagataeibacter* sp. AV394; 8 in 9, *Komagataeibacter* sp. AV436. Foto: Kim Fijok. 40

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 2.1: Lastnosti in funkcionalne karakteristike najbolj znanih bakterijskih zunajceličnih polisaharidov.	5
Preglednica 3.1: Seznam uporabljenih sevov očetnokislinskih bakterij, izoliranih iz industrijskih procesov proizvodnje naravnega jabolčnega kisa slovenskega podjetja Apis-Vita.	14
Preglednica 3.2: Seznam uporabljenih referenčnih tipskih sevov očetnokislinskih bakterij iz mednarodnih zbirk mikroorganizmov.	15
Preglednica 3.3: Sestava uporabljenih rastnih poltrdih gojišč RAE.	15
Preglednica 3.4: Seznam uporabljenih začetnih oligonukleotidov za pomnoževanje specifičnih odsekov genov <i>lev</i> , <i>aceA</i> in <i>bcsA</i> v navedenih rodovih očetnokislinskih bakterij.	20
Preglednica 4.1: Seznam sevov očetnokislinskih bakterij, ki so tvorili biofilm v tekočem gojišču RAE z glukozo.	28
Preglednica 4.2: Opis biofilmov izbranih sevov očetnokislinskih bakterij, gojenih v tekočem gojišču RAE z glukozo ali saharozo.	29
Preglednica 4.3: Prisotnost genov za sintezo acetana, levana in celuloze pri izbranih sevih očetnokislinskih bakterij.	33
Preglednica 4.4: Pridobljena masa izoliranih zunajceličnih polisaharidov očetnokislinskih bakterij gojenih na glukoznih in saharoznih gojiščih.	36
Preglednica 4.5: Izračun retencijskih faktorjev monosaharidov sladkornega standarda iz 3. nanosa na sliki 4.8.	38
Preglednica 4.6: Monosaharidna sestava izbranih sevov očetnokislinskih bakterij gojenih na različnih virih sladkorja po ločevanju s tankoplastno kromatografijo (sliki 4.9 in 4.10). G, sev gojen na gojišču RAE z glukozo; S, sev gojen na gojišču RAE s saharozo; /, ni rezultata.	41

KAZALO GRAFOV

- Graf 4.1: Viskoznost zunajceličnih polisaharidov sevov *K. oboediens* AV380 (a), *A. aceti* LMG 1504^T (b) in *A. pomorum* LMG 18848^T (c), gojenih v prisotnosti glukoze (oznaka GL) ali saharoze (oznaka SAH). Meritev viskoznosti zunajceličnih polisaharidov je bila narejena v 1,5 % (w/v) raztopinah citratno-fosfatnega pufra (pH vrednost 2,4 ali 7).
..... 42
- Graf 4.2: Elastični (G') in viskozni (G'') modul v odvisnosti od amplitude strižne deformacije 1,5 % (w/v) raztopine zunajceličnih polisaharidov, raztopljenih v CF-pufru (pH 2,4), pridobljenih iz biomase na glukoznih gojiščih RAE. Krivulje: polisaharid seva *K. oboediens* AV380 (zelena), *A. aceti* LMG 1504^T (vijolična) in *A. pomorum* LMG 18848^T (oranžna). LVO (linearno viskoelastično območje) je definirano kot območje, v katerem ne pride do porušitve prostorske strukture polisaharidnega prepleta..... 45

Uporabljeni simboli in kratice

OKB – očetno kislinske bakterije

Da – dalton; enota za maso, s katero izražamo atomske in molekulske mase

LVO – linearno viskoelastično območje

G' – elastični modul; merilo elastičnega obnašanja sistema

G'' – viskozni modul; viskozni doprinos vzorca

Pa – paskal

BC – bakterijska celuloza

UV – ultravijolična svetloba

β -1,4 glukan – beta 1,4 glukan

UDP-glukoza – uridin difosfat glukoza

dH₂O – destilirana voda

MgCl₂ – magnezijev klorid

ddH₂O – bidestilirana voda

DNA – deoksiribonukleinska kislina

dNTP – deoksinukleotid

TAE – Tris-acetat-EDTA

EDTA – etilendiamintetraočetna kislina

NaOH – natrijev hidroksid

H₂SO₄ – žveplova kislina

Na₂HPO₄ – dinatrijev fosfat

kDa – kilodalton

PCR – verižna reakcija s polimerazo

Bp – bazni par

rpm – obrat na minuto

CF – citratno fosfatni pufer

s⁻¹ – inverzna sekunda

Pa·s – paskal sekunda

1 UVOD

Ocetnokislinske bakterije (OKB) so prepoznavne po sposobnosti oksidacije etanola v očetno kislino. Najbolj znan industrijski bioproces je pridelava kisa, kjer so najbolj aktivne vrste rodu *Acetobacter* in *Komagataeibacter* (Trček in sod., 2016; Štornik in sod., 2016). V statičnih razmerah pa OKB lahko v svojo okolico izločajo večje količine polisaharidov, ki predstavljajo del biofilma na površini tekočega gojitvenega medija. Matriks biofilma poleg zunajceličnih polisaharidov sestavljajo še odmrle celice, beljakovine in nukleinske kisline. Različni sevi OKB lahko v svojo okolico izločajo različne vrste zunajceličnih polisaharidov in z njimi okoli celic oblikujejo plast sluzi oz. biofilm, ki med drugim celice zaščiti pred zunanji stresnimi vplivi. Plavajoči biofilm omogoča OKB zadrževanje na površini in s tem stalen dotok kisika ter hitro rast (Trček, 2014; Perumpuli in sod., 2014; Flemming in Wingender, 2010).

Glede na kemijsko zgradbo mikrobne zunajcelične polisaharide razdelimo na homopolisaharide (npr. levan, dekstran, pululan), ki so sestavljeni iz ene vrste monosaharidov in na heteropolisaharide (npr. ksantan, acetan), ki vsebujejo več različnih vrst monosaharidov. Bakterijski zunajcelični polisaharidi imajo visoko molekularno maso, predvsem pa jih lahko zaradi možnosti gojenja bakterij v industrijskih bioreaktorjih pridobivamo v velikih količinah in konstantne kvalitete, kar jim daje prednost pred rastlinskimi polisaharidi (Ahmad in sod., 2015; Dağbağlı in Göksungur, 2017). Heteropolisaharidi imajo kompleksno in razvejano strukturo, ki že pri nizkih koncentracijah poveča viskoznost tekočih substratov, zaradi česar jih uporabljajo v živilski, kozmetični, medicinski in farmacevtski industriji. Ti polimeri omogočajo stabilizacijo, raztapljanje, kontrolo kristalizacije, inhibicijo sproščanja vode iz živil, enkapsulacijo in tvorbo filma ter so tako uporabni kot gostila, viskozifikatorji, lepila, absorbenti, maziva, sredstva za remediacijo tal, kozmetična sredstva, nosilci zdravil in suspenzijska sredstva. Te lastnosti polisaharidov pa se spremenijo že z majhnimi razlikami v njihovi strukturi. V zadnjih letih je bilo izoliranih in identificiranih več novih bakterijskih zunajceličnih polisaharidov, a je le peščica dosegla pomembno tržno vrednost, saj proizvodni stroški še vedno ostajajo visoki (Ates, 2015).

OKB spadajo v skupino varnih mikroorganizmov (angl. GRAS: Generally Recognized As Safe), zato so zanimive za industrijsko uporabo (Shi in sod., 2014). Poleg uporabe OKB za pridobivanje očetne kisline, so šele nedavno pričeli raziskovati zunajcelične polisaharide teh bakterij. Tvorba zunajceličnih polisaharidov je specifična za vsak sev, veliko vlogo igra vir ogljika, vrednost pH, temperatura in sestava gojišča (Valera in sod., 2015; Ryngajłto in sod., 2019). Med vodotopnimi heteropolisaharidi je najbolj raziskan acetan. Sinteza tega zunajceličnega heteropolisaharida OKB je povezana z velikim številom genov. Sprememba v izražanju samo enega izmed teh genov pa lahko povzroči spremembo v zgradbi polisaharida in njegovih viskoelastičnih lastnostih (Ryngajłto in sod., 2019). Sposobnost za sintezo polisaharidov iz skupine acetanov je zato smiselno preiskati pri večjem številu očetnokislinskih bakterij.

1.1 Namen dela in raziskovalne hipoteze

V nalogi smo si zastavili naslednje cilje:

- Očistiti zunajcelične polisaharide oacetnokislinskih bakterij iz izbranih sevov oacetnokislinskih bakterij, ki tvorijo biofilm.
- Določiti monomerno sestavo očiščenih zunajceličnih polisaharidov.
- Ugotoviti, če različni viri ogljika v gojišču za namnoževanje bakterij vplivajo na sestavo zunajceličnih polisaharidov pri izbranih sevih oacetnokislinskih bakterij.
- Preiskati reološke lastnosti očiščenih zunajceličnih polisaharidov izbranih sevov oacetnokislinskih bakterij.

Hipoteze magistrskega dela:

1. Med očiščenimi polisaharidi bodo tudi takšni, ki se bodo med seboj razlikovali v monomerni sestavi.
2. Med očiščenimi polisaharidi bodo tudi takšni, pri katerih bo monomerna sestava drugačna po namnoževanju enakega bakterijskega seva v gojiščih z različnimi viri ogljika.
3. Očiščeni zunajcelični polisaharidi se bodo med seboj razlikovali v viskoelastičnih lastnostih.
4. Reološke lastnosti očiščenih zunajceličnih polisaharidov se bodo v vsaj enem primeru razlikovale tudi glede na uporabljen vir ogljika za namnoževanje bakterijskega seva.

2 PREGLED LITERATURE

2.1 Zunajcelični polisaharidi mikroorganizmov

Mnogi mikroorganizmi, tako po Gramu negativne kot po Gramu pozitivne bakterije ter glive, tvorijo zunajcelične polisaharide. Ti po transportu iz celice lahko ostanejo s površino celice povezani ali pa tudi ne. Zunajcelični polisaharidi lahko okoli celice oblikujejo tudi kapsulo in jih zato imenujemo kapsularni polisaharidi; ti ostanejo s celico še vedno povezani s šibkimi ionskimi ali močnimi kovalentnimi vezmi (Ali in sod., 2011). Pri nekaterih mikroorganizmih imajo zunajcelični polisaharidi, ki predstavljajo del lipopolisaharidov, npr. pri bakteriji *Klebsiella pneumoniae*, funkcijo antigenskih determinant (Suresh Kumar in sod., 2007).

Zunajcelični polisaharidi so dolge verige polisaharidov, sestavljeni iz nerazvejanih ali razvejanih, ponavljajočih sladkornih enot in njihovih derivatov. Zunajcelični polisaharidi so običajno del adhezivnega matriksa biofilmov združbe bakterijskih celic. Poleg zunajceličnih polisaharidov, matriks sestavljajo še odmrle celice, beljakovine in nukleinske kisline (Perumpuli in sod., 2014; Flemming in Wingender, 2010). Tvorba zunajceličnih polisaharidov je običajno vzbujena v stresni situaciji, npr. ob pomanjkanju dušika ali kisika ter presežku vira ogljika v okolju, kjer se nahajajo mikroorganizmi, kar jim omogoča preživetje v takšnih razmerah (Poli in sod., 2010; Roca in sod., 2015).

Zunajcelične polisaharide na osnovi kemijske zgradbe delimo na homopolisaharide, ki so sestavljeni iz enega tipa monosaharidov in na heteropolisaharide, ki vsebujejo več različnih vrst sladkornih enot, ki se običajno ponavljajo v obliki disaharidov do heptasaharidov. Zunajcelični polisaharidi so večino sestavljeni iz glukoze, galaktoze in manoze, a pogosto najdemo tudi mikrobne zunajcelične polisaharide, v katere so vključeni fukoza, ramnoza, uronska kislina in amino sladkorji (Roca in sod., 2015). Bakterijski zunajcelični polisaharidi imajo visoko molekulsko maso in raznolike reološke lastnosti (Ahmad in sod., 2015). Odvisno od njihove kemijske sestave in fizikalnih lastnosti, se pogosto uporabljajo v komercialne namene v farmaciji, prehrambeni in papirni industriji, kot tudi v kozmetične namene (Saichana in sod., 2015).

Preglednica 2.1: Lastnosti in funkcionalne karakteristike najbolj znanih bakterijskih zunajceličnih polisaharidov.

Zunajcelični polisaharid in značilen mikrobnii producent	Monomerna sestava polisaharida in okvirna molekulska masa polisaharida [Da]	Lastnosti polisaharida	Uporaba polisaharida	Vir podatkov
Ksantan (<i>Xanthomonas</i> spp.)	Glukoza, manozna in glukuronska kislina $((2-50) \times 10^6)$	Visoka viskoznost, dobra obstojnost pri širokem razponu pH-vrednosti, temperature in konc. soli	V prehrambeni, farmacevtski, kozmetični industriji	Nwodo in sod., 2012
Pululan (<i>Aureobasidium pullulans</i>)	Glukoza $(10^4 - 4 \times 10^5)$	Zavira rast gliv, dobro zadržuje vlago, topen v vodi	Aditiv in konzervans za živila	Jindal in Khattar, 2018
Gelan (<i>Pseudomonas elodea</i>)	Glukoza, ramnoza in glukuronska kislina (5×10^5)	Ima lastnosti gela	V prehrabeni industriji kot želirno sredstvo	Sajna in sod., 2015; Jindal in Khattar, 2018
Dekstran (<i>Leuconostoc mesenteroides</i>)	Glukoza (10^6-10^9)	Ima visoko stabilnost in oblikuje ne-Newtonske viskoelastične tekočine	Živila, farmacevtska industrija (preprečuje koagulacijo) in kromatografski medij	Nwodo in sod., 2012
Alginat (<i>Pseudomonas aeruginosa</i> in <i>Azotobacter vinelandii</i>)	Glukuronska kislina in manuronska kislina $((0,3-1,3) \times 10^6)$	Ima lastnosti gela	Hidrokoloid v hrani, uporaba v medicinske namene (kirurški obliži, upravljanje ran in	Nwodo in sod., 2012

			nadzorovano sproščanje zdravil)	
Kurdlan (<i>Rhizobium meliloti</i> in <i>Agrobacterium radiobacter</i>)	Glukoza ($5 \times 10^4 - 2 \times 10^6$)	Sposobnost tvorbe gelov, netopen v vodi, užiten, netoksičen	Živila, farmacevtska industrija, odstranjevanje težkih kovin in dodatek za beton	Nwodo in sod., 2012
Celuloza (<i>Acetobacter</i> spp.)	Glukoza ($\sim 10^6$)	Netopen v večini topil, ima visoko natezno trdnost	Živila (neprebavljive vlaknine), biomedicina (celjenje ran, umetne krvne žile), membrane v zvočnikih	Nwodo in sod., 2012

Komercialno najbolj pomemben in uporaben zunajcelični polisaharid je ksantan (angl.: xanthan), ki ga proizvaja po Gramu negativna bakterija *Xanthomonas campestris*. Ksantan se pogosto uporablja v živilski industriji, saj je učinkovito zgoščevalo. Viskoznost raztopine se močno poveča pri zelo nizkih koncentracijah, v vodni raztopini izkazuje psevdoplastično obnašanje, kar je uporabno v industrijskih procesih črpanja, mešanja, polnjenja in nalivanja. Je visoko stabilen v širokem temperaturnem območju in širokem razponu različnih pH-vrednosti, med predelavo in pakiranjem je obstojen tudi pri strižni deformaciji. Prav tako ksantan izboljša koloidno stabilnost raztopin, zaradi česar se znatno poveča rok uporabnosti (Petri, 2015). Ksantan najpogosteje uporabljajo v hrani kot želirno sredstvo (solatni prelevi, omake, sirni namazi, sladoled, pudingi in druge sladice) in stabilizator. Uporabljajo ga kot dodatek za peko brezglutenskih izdelkov, saj testu doda elastičnost. Uporablja se tudi v zobnih pastah (Petri, 2015; Jindal in Khattar, 2019).

Gliva *A. pullulans* proizvaja zunajcelični polisaharid imenovan pululan (angl.: pullulan). Ima sposobnost lepljenja in tvorjenja vlaken in tankih biorazgradljivih filmov, ki so prozorni in neprepustni za kisik. Uporablja se kot aditiv v nizkokaloričnih živilih in pijačah, namesto škroba. Pululan zavira rast gliv in ima odlično sposobnost zadrževanja vlage, zato se uporablja kot konzervans. Prav tako se uporablja kot vodotopna in biorazgradljiva embalaža za živilske izdelke (Cheng in sod., 2011; Jindal in Khattar, 2019).

Bakterija *Pseudomonas elodea* proizvaja zunajcelični polisaharid imenovan gelan (angl.: gellan). Uporablja se v prehrabni industriji kot sredstvo za želiranje, pri glazurah za torte, želejih, džemih in marmeladah (Giavasis in sod., 2000).

Dekstran je zunajcelični polisaharid, ki ga proizvajajo mlečnokislinske bakterije rodov *Leuconostoc*, *Lactobacillus* in *Streptococcus*, kadar je glavni vir ogljika v gojišču saharoza. Zaradi nizke molekulske mase, visoke čistosti in kakovosti se pogosto uporablja v medicinske namene (ima antikoagulativne sposobnosti) in v molekularni biologiji (pri izdelavi sefadeksa). V prehrabni industriji se uporablja kot zgoščevalec in za izboljšanje teksture prehrabnih izdelkov, ki vsebujejo rastlinske beljakovine, npr. za proizvodnjo veganskih nadomestkov za mlečne izdelke. Dekstran poveča sposobnost zadrževanja vode in viskoznost kvinojinega jogurta, kjer se tekstura približa komercialnim mlečnim jogurtom (Zannini in sod., 2018). Uporablja se kot stabilizator v zamrznjenih mlečnih izdelkih (sladoled) (Bhavani in Nisha, 2010).

Velan (angl.: wellan gum) je zunajcelični polisaharid, ki ga proizvaja po Gramu negativna bakterija *Sphingomonas* sp. ATCC 31555. Uporablja se kot utrjevalni beton na preobremenjenih odsekih in težje dostopnih mestih (Kaur in sod., 2014).

Kefiran je zunajcelični polisaharid, ki nastane pri fermentaciji kefirja, kjer sodeluje kompleksna mikroba simbiotična mešanica mlečnokislinskih bakterij (*Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* in *Streptococcus* spp.), očetnokislinskih bakterij (*Acetobacter*) in kvasovk (*Kluyveromyces*, *Saccharomyces* in *Torula*). Je vodotopen polisaharid, ki ima protibakterijsko in proti tumorsko delovanje. Prav tako ima sposobnost moduliranja imunskega sistema črevesja, saj ščiti epitelijske celice pred zunajceličnimi dejavniki bakterije *Bacillus cereus*. Uporablja se kot dodatek fermentiranim izdelkom, saj povečuje viskoznost kislomlečnim gelom (Piermaria in sod., 2008).

Kurdlan, ki ga proizvaja bakterija *Agrobacterium biohar* (Suflet in sod., 2015), se v živilski industriji uporablja zaradi močnih viskoelastičnih lastnosti, saj tvori močan gel, je brez okusa, barve in vonja, ima odlično sposobnost zadrževanja vode, zato z njim spreminjajo teksturo izdelkov ter ga uporablja kot nadomestilo za maščobo (Cai in Zhang, 2017).

Zunajcelični polisaharidi se tako najpogosteje uporabljajo v prehranski industriji kot gostila, stabilizatorji, zgoščevalci, sredstva za želiranje in za zadrževanje vlage. Izolacija in čiščenje zunajceličnih polisaharidov sta potrebna, da dobimo izdelke, ki so primerni za prehrano ljudi in živali ali za uporabo v ostalih industrijskih panogah, naštetih zgoraj (Jindal in Khattar, 2019). Trenutno je uporaba mikrobnih zunajceličnih polisaharidov v velikih količinah najbolj omejujoča zaradi visokih proizvodnih stroškov (Roca in sod., 2015).

2.1.1 Reološke lastnosti polisaharidov

S pojmom reološke lastnosti opisujemo mehanske lastnosti tekočin, poltrdnih ter trdnih snovi, ki jih preučujemo po izpostavitvi snovi različnim strižnim silam (Zupančič-Valant, 2007). Pri polisaharidih se te lastnosti nanašajo na preiskovanje njihovih viskoelastičnih lastnosti, ki so pomembne za ugotavljanje njihovega uporabnega potenciala v živilski in drugih vrstah industrij. Zaradi raznolike monomerne sestave, vrste vezi, števila in dolžine stranskih verig ter širokega razpona molekulske mase imajo polisaharidi zelo različne viskoelastične lastnosti (Hundschell in Wagemans, 2019). Kadar raztopino polisaharida deformiramo, termodinamske sile v tekočini težijo k povrnitvi v prvotno stanje. Pri tem se notranja struktura lahko poruši ali pa tudi ne. Območje, v katerem ne pride do porušitve strukture sistema predstavlja linearno viskoelastično območje (LVO) (Mezger, 2006; Zupančič-Valant, 2007).

Viskoelastičnost je lastnost materiala, ki se na deformacijo odzove viskozno in elastično (Zupančič-Valant, 2007). Elastični modul, ki ga označimo s G' [Pa] je merilo elastičnega obnašanja sistema in opisuje njegovo upiranje preoblikovanju; poda nam informacijo o količini energije, ki jo sistem reverzibilno shrani in uporabi za vrnitev v prvotno stanje v območju LVO. Viskozni modul, ki ga označimo s G'' [Pa], pa meri viskozni doprinos vzorca in predstavlja tisto količino energije, ki jo sistem ireverzibilno odda okolici, zato je zanj izgubljena in je ne more uporabiti za kompenziranje deformacije. Večina biopolimerov izraža trdno (elastično), kakor tudi tekoče (viskozno) obnašanje (Stoodley in sod., 1999). Odvisno od molekulske strukture pa imajo polisaharidi v raztopini lahko lastnost gela, šibkega gela ali viskoelastične tekočine (Douglas, 2018).

2.1.2 Zunajcelični polisaharidi očetnokislinskih bakterij

Očetnokislinske bakterije (OKB) so po Gramu negativne bakterije, ki spadajo v skupino varnih mikroorganizmov (angl. GRAS: Generally Recognized As Safe), in so zato zanimive za industrijsko uporabo (Shi in sod., 2014). Znanе so po nepopolni oksidaciji ogljikovih hidratov, alkoholov in sladkornih alkoholov v ustrezne organske kisline, aldehide ali ketone, a tudi po sintezi različnih zunajceličnih polisaharidov (Taban in Saichana, 2017). V statičnih kulturah plavajo na površini tekočin, kjer v neposrednem stiku s kisikom proizvajajo biofilm (Valera in sod., 2015). To jim omogoča preživetje v stresnih razmerah rasti, kot je visoka koncentracija etanola in očetne kisline (Kanchanarach in sod., 2010). Nekateri sevi rodov *Acetobacter* in *Komagataeibacter* lahko sintetizirajo zunajcelične homopolisaharide, kot sta celuloza in levan, ali pa heteropolisaharid, kot je acetan (Dağbağlı in Göksungur, 2017).

2.1.2.1 Celuloza

Bakterijsko celulozo (BC) je prvi opisal Adrian J. Brown (1988). Ugotovil je, da ima enako kemijsko strukturo kot rastlinska celuloza, a za razliko od rastlinske celuloze ne vsebuje polimerov kot so hemiceluloza, lignin in pektin (Keshk, 2014). BC je v vodi netopen zunajcelični homopolisaharid, sestavljen iz glukoznih monomer, ki so med seboj povezane z β -1,4 glikozidno vezjo. Te linearne verige pa so med seboj povezane z vodikovimi vezmi, kar BC daje veliko visoko mehansko trdnost in sposobnost zadrževanja vode (Saibuatong in Phisalaphong, 2010; Castro in sod., 2011). BC varuje bakterijsko celico pred UV-sevanjem in sodeluje pri oblikovanju matriksa (Ryngajłto in sod., 2019).

Veliko vrst očetnokislinskih bakterij iz rodov *Gluconacetobacter*, *Komagataeibacter*, *Acetobacter* in *Gluconobacter* lahko sintetizira bakterijsko celulozo. Najbolje opisan producent BC je modelni organizem *K. xylinus* (Valera in sod., 2015). Sinteza bakterijske celuloze poteka med zunanjo in citoplazemsko membrano v treh korakih. V prvem koraku se glukoza polimerizira v β -1,4 glukan, od katerega je 10-15 verig organiziranih v paralelne strukture, ki oblikujejo 1,5 nm široke protofibrile. V drugi stopnji se nekaj protofibril formira v 3-4 nm široke nanofibrile. V tretjem koraku se nanofibrile združujejo v trakove (20-100 nm) in nato se celuloza izloči iz celice (Dağbağlı in Göksungur, 2017). Nanofibrile pri bakterijski celulozi tvorijo tridimenzionalno omrežje vlaken, medtem ko rastlinska celuloza tvori

dvodimenzionalno omrežje (Esa in sod., 2014). BC uporabljajo različni industrijski sektorji: v medicini se najpogosteje uporablja za pripravo bioaktivnih vsadkov, kot material za izdelavo prototipa krvnih žil, kot umetna koža za celjenje opeklin, kozmetična industrija jo uporablja za izdelavo različnih mask, v elektro-industriji se uporablja kot membranski pretvornik v slušalkah (patentno lastništvo podjetja Sony), pri kompleksnem čiščenju odpadne vode za pripravo BC-filtrov v stopnji mehanskega čiščenja, zelo razširjena pa je njena uporaba v prehranski industriji, npr. za pripravo biorazgradljive embalaže za sveže meso in klobase, kot stabilizator v hrani (surumi), za regulacijo reoloških lastnosti moke, kot ojačevalec teksture v smetani za stepanje, za ojačenje trdnosti lupin jajc, za podaljšanje obstoja vitamina C itd. (Esa in sod., 2014; Gorgieva in Trček, 2019).

BC se industrijsko pridobiva z oksidativno fermentacijo v statičnih razmerah ali pa v posodah s stresanjem. OKB jo proizvajajo v kemijsko definiranih kakor tudi v kompleksnih gojiščih (Esa in sod., 2014). Z namenom zmanjšanja stroškov produkcije bakterijske celuloze veliko raziskovalcev preučuje možnost uporabe kmetijsko-živilskih industrijskih odpadkov, bogatih s fruktozo, saharozo, dušikom in vitamini, kot alternativno naravno namnoževalno gojišče (Castro in sod., 2011).

2.1.2.2 Levan

OKB poleg BC lahko producirajo tudi homopolisaharid levan. Levan, ki se imenuje tudi mikrobní ekstracelularni fruktan, je sestavljen iz več kot 11 monosaharidnih enot fruktoze (Dağbağlı in Göksungur, 2017). Zaradi svoje kemijske strukture je topen v vodi in olju, netopen pa v številnih organskih spojinah kot so etanol, metanol, aceton, izopropanol, n-propanol, metiletiketon in toluen (Srikanth in sod., 2015). Ima nizko viskoznost, je dobro združljiv s solmi in površinsko aktivnimi snovmi, je toplotno stabilen (25–70 °C), tolerira kisle in alkalne substance, ima visoko sposobnost zadrževanja vode in odlično biokompatibilnost (Srikanth in sod., 2015; Dağbağlı in Göksungur, 2017). Čeprav ni bistven za nastanek biofilma, ima lahko strukturno in stabilizirajočo vlogo v njem. Dogša in sod. (2013) menijo, da v biofilmu služi kot prehranska rezerva. Dağbağlı in Göksungur (2017) ter Jakob in sod. (2012) so ugotovili, da mnoge OKB, med njimi *Gluconobacter cerinus*, *Gluconobacter gateurii*, *Kozakia baliensis*, *Neosasaia chiangmaiensis* ter več vrst iz rodu *Komagataeibacter* tvori levan v gojišču, kjer je

glavni vir ogljika sahara. Biosinteza levana poteka v petih fazah. Najprej se v celici sintetizira encim levansaharaza, ki se v drugi fazi akumulira v periplazemskem prostoru. Za tem sledi tretja faza, v kateri se encim s signalno peptidno potjo transportira v okolico. V četrti fazi se začne sinteza levana z aktivacijo encima levansaharaze, ki katalizira transfruktozilacijsko reakcijo substratov. V zadnji fazi se fruktozne podenote dodajo na levansko polisaharidno verigo in tako se zaključi sinteza levana (Srikanth in sod., 2015). Levan se zaradi posebnih viskoelastičnih lastnosti uporablja tudi v industrijske namene. V medicini ga uporabljajo kot nadomestek plazme, kot imunski modulator, za podaljševanje aktivnosti zdravil in kot protivnetna učinkovina (Srikanth in sod., 2015). Ima velik potencial kot funkcionalni biopolimer v živilih, krmi, kozmetiki, farmaciji in kemični industriji. Uporablja se lahko kot prebiotik in zgoščevalec hrane in krme učinkuje na zmanjševanje koncentracije holesterola. Levan z visoko molekulsko maso, ki ga proizvaja *Gluconobacter albidus*, izboljša trdoto drobtin in volumen brezglutenskega ajdovega kruha zaradi visokih viskoelastičnih lastnosti (Jakob in sod., 2013). V kozmetiki ga uporabljajo kot vezivno sredstvo, saj vlaži kožo in daje blagodejen učinek razdraženi koži (Jindal in Khattar, 2018).

2.1.2.3 Acetan

Acetan je v vodi topen zunajcelični heteropolisaharid, ki vsebuje glukozo, manozo, glukuronsko kislino in ramnozo v molarnem razmerju 4:1:1:1. Proizvajata ga *Gluconacetobacter entanii* in *K. xylinus* iz različnih virov ogljika, npr. sahara, glukoze, fruktoze in etanola (Dağbağlı in Göksungur, 2017). Velasco-Bedrán in López-Isunza (2007) sta pokazala, da *G. entanii* tvori največ acetana v gojišču s sahara. Ishida in sodelavci (2002) so dokazali, da prisotnost vodotopnih polisaharidov, kot je acetan, poveča viskoznost gojišča in izboljša disperzijo prostih celic. Pomanjkanje acetana zato zmanjša viskoznost gojišča in poveča kopičenje celic, kar pa posledično privede do zmanjšanja proizvodnje bakterijske celuloze (Ishida in sod., 2002). Biosinteza acetana poteka v več stopnjah in vključuje več genov. Sintezo acetana inicira izražanje gena *aceA*, katerega produkt transportira glukozni-1-fosfatni ostanek od UDP-glukoze do lipidnega prenašalca, zasidranega v notranji membrani. Sledi aktivacija genov *aceB* in *aceC*, ki kodirata sladkorne transferaze, zaradi česar se prične dodajanje acetilnih skupin. V zadnji fazi gena *aceD* in *aceE* sodelujeta pri premestitvi polisaharidnih enot iz citoplazme v periplazmo ter pri polimerizaciji in izločanju acetana iz

celice preko zunanje membrane v okolico (Griffin in sod., 1994; Griffin in sod., 1996a; Griffin in sod., 1996b; Edwards in sod., 1999; Ishida in sod., 2002). Acetan se uporablja kot viskozifikator in želirno sredstvo pri proizvodnji slaščic in kisa (Jindal in Khattar, 2018).

Kadar pride do spontane mutacije in preureditve genoma pri OKB, ki sicer sintetizirajo acetan, se lahko sinteza tega heteropolisaharida popolnoma ustavi ali pa se prične sinteza acetanu podobnih heteropolisaharidov (Ryngajłto in sod., 2019). Fang in Catchmark, (2014, 2015) ter Valepyn s sodelavci (2012) so dokazali, da kljub pomanjkanju večine genov *ace* pri različnih sevih *Komagataeibacter hansenii* in vseh genov pri *Komagataeibacter europaeus* LMG 18494, ti sevi sintetizirajo acetanu podobne heteropolisaharide s podobno monomerno sestavo. Jančič (2019) je v svoji magistrski nalogi ugotovila, da nekateri sevi OKB na mikrobiološkem gojišču RAE, kjer je vir ogljika glukoza, sintetizirajo acetan ali acetanu podobne polisaharide, kar pomeni, da glede na monomerno sestavo poleg manoze in ramnoze, vsebujejo še fruktozo, glukozo, glukuronsko kislino ali galaktozo. Raznolikost v monomerni sestavi se odraža tudi v viskoelastičnih lastnostih, ki so drugačne kot pri že opisanem acetanu (Jančič, 2019).

2.1.3 Vpliv vira ogljika na produkcijo polisaharida

Za pridobivanje mikrobnih zunajceličnih polisaharidov se uporabljajo gojišča z različnimi viri ogljika, od enostavnih monosaharidov do komercialno dostopnih mešanic ogljikovih hidratov. Med njimi so najpogostejši glukoza, fruktoza, manoz, maltoza, saharoza, laktoza, manitol, sorbitol, škrob, kot tudi sirotka, različni sladkorni koncentraciji (Neosorb™, Cerelose™) in alkali. Vrsta vira ogljika v gojišču lahko vpliva na produkcijsko kapaciteto seva za posamezni zunajcelični polisaharid, vrsto proizvedenega polisaharida in molekulsko maso polisaharida. Tako je Keshk (2014) pri sevu *K. xylinum* ugotovil, da je produktivnost za BC v primeru gojenja seva na gojišču z monosaharidi (glukoza) večja kot na gojišču z disaharidi (laktoza, saharoza). Bakterijska celuloza pridobljena na gojišču s saharozo je namreč le polovična v primerjavi s tisto, pridobljeno na gojišču z glukozo, vzrok pa je predvsem v nizki aktivnosti saharaze. Kornmann in sodelavci (2003) pa so gojili *K. xylinus* I-2281 na gojiščih z glukozo, fruktozo ali saharozo kot virom ogljika. Ob prisotnosti prvih dveh monosaharidov je bakterija sintetizirala acetanu podoben heteropolisaharid, v prisotnosti saharoze pa dodatno še levan. Conti in

sodelavci (1994) pa so dokazali, da alginat, proizveden z bakterijo *Pseudomonas* sp. doseže enkrat večjo molekulsko maso, kadar je v gojišču glukoza zamenjana s fruktozo. Poleg navedenih faktorjev, je tvorba zunajceličnih polisaharidov močno odvisna tudi od temperature namnoževanja bakterij in pH-vrednosti gojišča (Valera in sod., 2015; Ryngajłto in sod., 2019).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 Materiali

3.1.1 Bakterije

Ocetnokislinske bakterije, ki smo jih uporabili v nalogi, so iz Zbirke mikroorganizmov Oddelka za biologijo FNM UM. Zbirka vsebuje seve iz referenčnih mednarodnih zbirk mikroorganizmov in seve, pridobljene iz industrijskih procesov slovenskih proizvodnje kisa. Revitalizacijo sevov iz $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ smo izvedli na poltrdem gojišču RAE.

Preglednica 3.1: Seznam uporabljenih sevov ocetnokislinskih bakterij, izoliranih iz industrijskih procesov proizvodnje naravnega jabolčnega kisa slovenskega podjetja Apis-Vita.

Zaporedna številka/vrsta		Zaporedna številka/vrsta		Zaporedna številka/vrsta	
1	<i>Acetobacter pasteurianus</i> AV366	29	<i>Komagataeibacter</i> sp. AV394	57	AV422
2	AV367	30	AV395	58	AV423
3	<i>Komagataeibacter pomaceti</i> AV368	31	AV396	59	AV424
4	AV369	32	AV397	60	AV425
5	AV370	33	AV398	61	AV426
6	<i>Acetobacter estunensis</i> AV371	34	<i>Komagataeibacter</i> sp. AV399	62	AV427
7	AV372	35	<i>K. pomaceti</i> AV400	63	AV428
8	AV373	36	AV401	64	<i>G. entanii</i> AV429
9	AV374	37	AV402	65	<i>K. pomaceti</i> AV430
10	AV375	38	AV403	66	<i>K. pomaceti</i> AV431
11	AV376	39	AV404	67	AV432
12	AV377	40	AV405	68	<i>K. pomaceti</i> AV433
13	AV378	41	AV406	69	AV434
14	AV379	42	AV407	70	AV435
15	<i>Komagataeibacter oboediens</i> AV380	43	AV408	71	<i>Komagataeibacter</i> sp. AV436
16	<i>K. pomaceti</i> AV381	44	AV409	72	AV437
17	<i>Komagataeibacter</i> sp. AV382	45	AV410	73	AV438
18	AV383	46	AV411	74	AV439
19	AV384	47	AV412	75	AV440
20	AV385	48	AV413	76	AV441
21	AV386	49	AV414	77	AV442
22	<i>K. pomaceti</i> AV387	50	AV415	78	AV443
23	AV388	51	AV416	79	AV444
24	AV389	52	AV417	80	AV445
25	<i>A. estunensis</i> AV390	53	AV418	81	AV446
26	<i>A. estunensis</i> AV391	54	AV419	82	AV447
27	AV392	55	AV420	83	AV448
28	AV393	56	AV421		

Preglednica 3.2: Seznam uporabljenih referenčnih tipskih sevov očetnokislinskih bakterij iz mednarodnih zbirk mikroorganizmov.

Seznam rodov	Seznam vrst
<i>Acetobacter</i>	<i>Acetobacter aceti</i> LMG 1504 ^T <i>Acetobacter pomorum</i> LMG 18848 ^T
<i>Komagataeibacter</i>	<i>Komagataeibacter pomaceti</i> T5K1 ^T <i>Komagataeibacter rhaeticus</i> LMG 22126 ^T

3.1.2 Rastna gojišča

Za gojenje in izolacijo očetnokislinskih bakterij smo uporabili poltrda in tekoča gojišča RAE z različnima vira sladkorja.

Preglednica 3.3: Sestava uporabljenih rastnih poltrdih gojišč RAE.

GLUKOZNO GOJIŠČE RAE	SAHAROZNO GOJIŠČE RAE
4 % glukoze	4 % saharoze
1 % peptona	1 % peptona
1 % kvasnega ekstrakta	1 % kvasnega ekstrakta
0,137 % citronske kisline	0,137 % citronske kisline
0,338 % Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	0,338 % Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O
1 % etanola (96 %)	1 % etanola (96 %)
1 % očetne kisline	1 % očetne kisline
1,1 % agarja	1,1 % agarja

3.1.3 Kemikalije za izolacijo DNA

Za izolacijo DNA smo uporabili komercialen komplet GeneJET Genomic DNA Purification Kit (Thermo Scientific), proteinazo K (20 mg/ml), RNazo (10 mg/ml) in 50 % etanol.

3.1.4 Kemikalije za pomnoževanje DNA z metodo PCR

Za pripravo reakcijske mešanice za PCR smo uporabili naslednje založne raztopine:

- 2 mM dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP),
- 100 pmol/ μ l začetni oligonukleotid 1,
- 100 pmol/ μ l začetni oligonukleotid 2,
- 10-kratni *Taq*-pufer s KCl (Thermo Scientific),
- 25 mM MgCl₂ (Thermo Scientific),
- 2-krat destilirano H₂O,
- *Taq*-polimerazo (5 U/ μ l, Thermo Scientific),
- tarčno DNA.

Sestava reakcijske mešanice PCR [20 μ l]:

- 2 μ l dNTP,
- 1 μ l začetni oligonukleotid 1,
- 1 μ l začetni oligonukleotid 2,
- 2 μ l 10-kratni pufer *Taq* s KCl,
- 1,2 μ l MgCl₂,
- 11,7 μ l H₂O,
- 0,1 μ l *Taq*-polimeraza,
- 1 μ l tarčne DNA.

3.1.5 Kemikalije za elektroforezo v agaroznem gelu

Za pripravo in ločevanje DNA v agaroznem gelu smo uporabili:

- 1 % (w/v) agarozni gel,
- 50-kratni TAE pufer (242 g/l Tris, 57,1 ml/l očetna kislina, 100 ml/l 0,5 M etilendiamintetraočetna kislina (EDTA) (pH 8,0)),
- velikostni standard DNA (1kb Plus DNA Ladder, Thermo Scientific).
- 10-kratni pufer za nanos DNA (475 μ l glicerol, 475 μ l 2-kratni pufer TE (20 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, pH 8) in 50 μ l 20 % bromfenol modro),
- raztopino etidijevega bromida za barvanje gelov (1 μ g/ml),
- destilirano vodo za spiranje.

3.1.6 Kemikalije za izolacijo zunajceličnih polisaharidov

Za izolaciji polisaharidov smo uporabili:

- formaldehid (36,5 %) (Merck),
- 1 M NaOH (Sigma-Aldrich),
- trikloroocetno kislino (TCA) (Sigma-Aldrich),
- etanol (95 %) (Honeywell),
- destilirano vodo

3.1.7 Kemikalije za analizo sestave polisaharidov

Polisaharide smo hidrolizirali z 2 M trifluoroocetno kislino (TFA) (Sigma-Aldrich).

Sladkorni standard smo pripravili iz:

- 30 mg fruktoze (Roth),
- 90 mg glukuronske kisline (Sigma),
- 20 mg glukoze (Sigma-Aldrich),
- 20 mg galaktoze (Sigma-Aldrich),
- 20 mg ramnoze (Sigma-Aldrich),
- 20 mg manoze (Sigma).

Sladkorni standard smo hidrolizirali z 0,5 ml 2 M trifluoroocetne kisline (TFA) (Sigma-Aldrich).

Hidrolizirane vzorce in sladkorni standard smo analizirali s tankoplastno kromatografijo na plošči Silica gel 60 (Merck). Za mobilno fazo smo uporabili 2-propanol (Merck), očetno kislino (Sigma-Aldrich) in 0,75 % vodne raztopine borove kisline (Promega Corporation) v razmerju 40: 1: 5, do skupnega volumna 150 ml.

Reagent za obarvanje sladkorjev (100 ml) je vsebval:

- 0,17 g N-(1-naftil) etilendiamino dihidroklorida(Sigma-Aldrich),
- 97 ml metanola (Sigma-Aldrich),
- 3 ml H₂SO₄ (Sigma-Aldrich).

3.1.8 Kemikalije za analizo reoloških lastnosti polisaharidov

Za analizo viskoelastičnih lastnosti smo pripravili raztopini citratno-fosfatnega (CF) pufra s pH-vrednostjo 2,4 in 7. Pufra smo pripravili tako, da smo zmešali 0,2 M raztopino Na_2HPO_4 in 0,1 M raztopino citronske kisline v naslednjem razmerju:

- Za pufer pH 2,4: 6,2 ml Na_2HPO_4 in 93,8 ml citronske kisline,
- Za pufer pH 7: 82,35 ml Na_2HPO_4 in 17,65 ml citronske kisline.

3.1.9 Laboratorijska oprema in pribor

Laboratorijski pribor: čaše, stojala za epruvete in 50 ml centrifugirke, 2 ml centrifugirke, merilne valje, žličke, strgala, steklene palčke, nastavke za pipete, rokavice, bioreaktorji, erlenmajerice, steklenice, puhalke, epruvete, petrijevke, elastične gumice, papirnate brisačke, lepilni trak za avtoklaviranje, vrečke za avtoklaviranje, cepilne zanke, pincete, gorilniki, parafilm, dializne vrečke (12-14 kDa) (Sigma-Aldrich), steklene posode za gojenje biofilmov in kromatografska steklena komora.

Laboratorijski aparati: avtoklav (Kambič), centrifuga z hlajenjem (Beckman Coulter Microfuge 22R Centrifuge), avtomatske pipete, magnetna mešala, inkubator, digitalne tehtnice, hladilniki, zamrzovalniki, stresalnik, sistem za destilirano vodo (Millipore), PCR-aparat (TProfesional Basic, Biometra), napajalnik in banjice za elektroforezo (Biometra) in rotacijski modularni reometer (Anton Paar).

3.2 Metode

3.2.1 Gojenje očetnokislinskih bakterij

Revitalizacijo sevov shranjenih pri $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ smo izvedli na poltrdih glukoznih gojiščih RAE. Seve smo na poltrda gojišča RAE nacepili do posameznih kolonij. Plošče smo inkubirali v posodah, kjer smo ustvarili vlažno atmosfero. Nacepljene plošče smo inkubirali dva do tri dni pri $30\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.2.2 Ocena tvorbe biofilma

Iz poltrdih glukoznih gojišč RAE smo posamezne kolonije nacepili v epruvete s 5 ml tekočega gojišča RAE z glukozo. Po petih dneh inkubacije pri $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ smo vizualno ocenili prisotnost in debelino biofilma na površini tekočine. Pri sevih, ki so tvorili biofilm v gojišču RAE z glukozo, smo sposobnost tvorbe biofilma na enak način preverili tudi na gojišču RAE s saharozo.

3.2.3 Izolacija DNA

Izolacijo DNA smo izvedli po navodilih proizvajalca komercialnega kompleta GeneJET Genomic DNA Purification Kit (Thermo Scientific) za izolacijo DNA po Gramu negativnih bakterij. Izolirano DNA smo shranili pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.2.4 Verižna reakcija s polimerazo (PCR)

Za ugotavljanje prisotnosti genov za sintezo celuloze, levana in acetana smo z metodo PCR pomnožili specifične odseke značilnih genov za sintezo acetana, celuloze in levana (preglednica 3.4). Uporabili smo začetne oligonukleotide, opisane v delu Jančič (2019).

Verižno reakcijo s polimerazo za pomnoževanje odsekov genov *lev* in *aceA* smo izvedli pri naslednjih razmerah:

- začetna denaturacija: 1 minuta pri $95\text{ }^{\circ}\text{C}$,
- 30-kratni cikel pomnoževanja:
 - denaturacija: 30 sekund pri $95\text{ }^{\circ}\text{C}$,
 - prileganje začetnih oligonukleotidov: 30 sekund pri temperaturah, ki so navedene v preglednici 3.4,
 - polimerizacija: 30 sekund pri $72\text{ }^{\circ}\text{C}$,
- zaključno podaljševanje: 10 minut pri $72\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Verižno reakcijo s polimerazo za specifično pomnoževanje odsekov genov *bcsA* smo izvedli pri naslednjih razmerah:

- začetna denaturacija: 5 minut pri 95 °C,
- 35-kratni cikel pomnoževanja:
 - denaturacija: 30 sekund pri 95 °C,
 - gradientno prileganje posameznega para začetnih oligonukleotidov (55-65 °C): 30 sekund pri temperaturi prileganja (v vsakem ciklu se za 1 °C poveča temperatura),
 - polimerizacija: 30 sekund pri 72 °C,
 - zaključno podaljševanje: 5 minut pri 72 °C.

Preglednica 3.4: Seznam uporabljenih začetnih oligonukleotidov za pomnoževanje specifičnih odsekov genov *lev*, *aceA* in *bcsA* v navedenih rodovih osetnokislinskih bakterij.

Začetni oligonukleotidi	Rod	Gen	Temperatura prileganja	Velikost PCR-pomnožka (bp)	Vir
A_lev1_Fw: 5'-gccgcgtctattgcctctat-3' A_lev1_Rw: 5'-tgtagggaccgaaaagaccg-3'	<i>Acetobacter</i>	<i>lev</i>	55 °C	500 bp	Jančič, 2019
KAs_lev1_Fw: 5'-ggcat(a/c/g)a(a/c)gta(a/g)tgcg-3' KAs_lev1_Rw: 5'-gt(g/c)aa(c/t)ga(c/t)cagaccg-3'	<i>Komagataeibacter</i>	<i>lev</i>	46 °C	500 bp	Jančič, 2019
A_aceA_Fw1: 5'-gatgacgctctggccgaata-3' A_aceA_Rw1: 5'-cgcatgacgactgaagacct-3'	<i>Acetobacter</i>	<i>aceA</i>	55 °C	500 bp	Jančič, 2019
K_aceA_Fw: 5'-c(g/t)gatgt(g/c)tatgt(c/t)gtgc-3' K_aceA_Rw1: 5'-gat(a/g)tccagccagtcgac-3'	<i>Komagataeibacter</i>	<i>aceA</i>	49 °C	500 bp	Jančič, 2019
BcsA_Fw: 5'-ca(c/t)gc(a/c)aacgc(g/c)ggt-3' BcsA_Rw: 5'-cat(g/c)cc(a/g)cg(c/g/t)gccca-3'	<i>Acetobacter</i> , <i>Komagataeibacter</i>	<i>bcsA</i>	Gradientno prileganje: 55-65 °C	500 bp	Valera in sod., 2015

3.2.5 Gelska elektroforeza

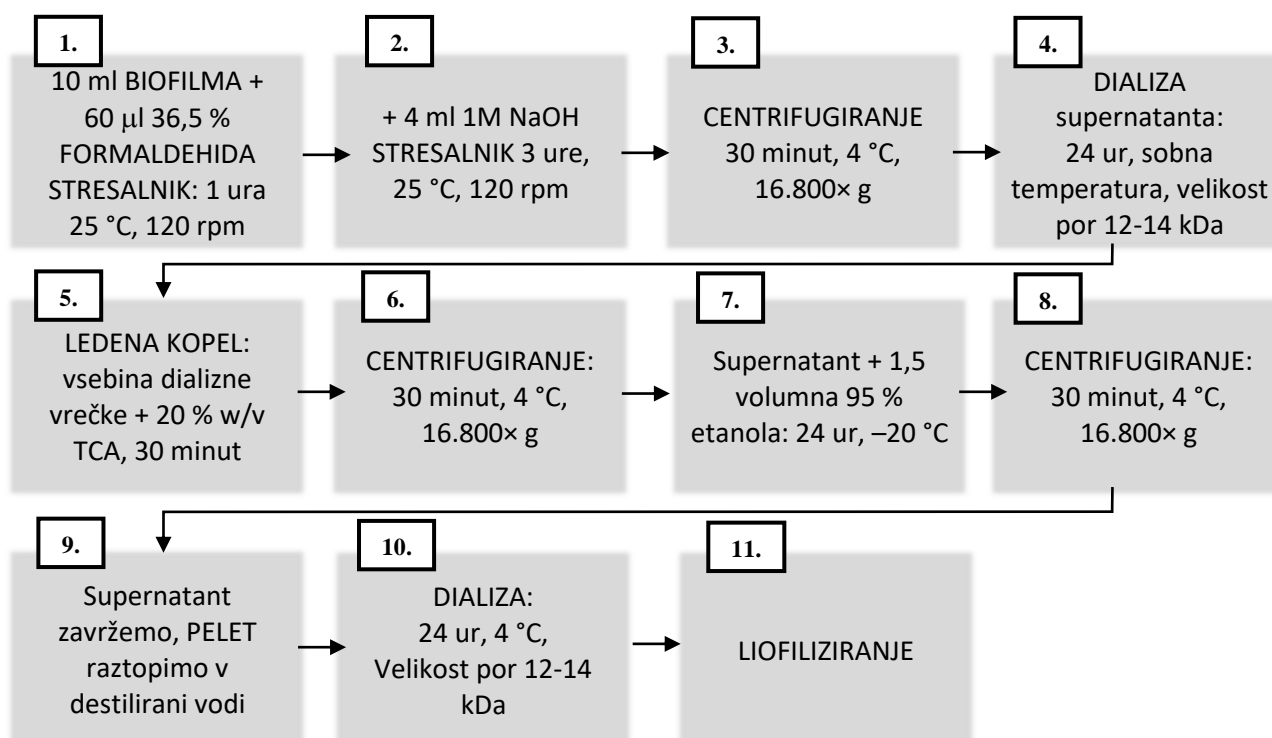
Z gelsko elektroforezo smo analizirali rezultat pomnoževanja izbranih genov v reakciji PCR. Uporabili smo 1 % agarozni gel v 1-kratnem TAE pufu. Elektroforeza je potekala v 1-kratnem TAE pufu pri napetosti 120 V približno 35 minut. Po elektroforezi smo gel obarvali z raztopino etidijevega bromida in nad UV svetlobo odčitali rezultate (preglednica 4.3).

3.2.6 Priprava biofilmov za izolacijo polisaharidov

Bakterijsko kolonijo smo nacepili iz poltrdega gojišča RAE v 100 ml tekočega gojišča RAE. S 100 ml namnoženega seva smo inokulirali vsako izmed štirih steklenih posod (sliki 4.2 in 4.3) s 300 ml tekočega gojišča RAE ter jih inkubirali pet dni pri 30 °C. Pridobljene biofilme smo shranili v plastične epruvete in jih do izolacije in čiščenja polisaharidov shranili pri –20 °C.

3.2.7 Izolacija in čiščenje zunajceličnih polisaharidov

Zunajcelične polisaharide smo očistili in izolirali s pomočjo modificirane metode povzete po metodah Bales in sod. (2013) in Jančič (2019) (slika 3.1).



Slika 3.1: Shema postopka izolacije in čiščenja zunajceličnih polisaharidov, modificirana po metodah Bales in sod. (2013) in Jančič (2019).

Izolacija in čiščenje zunajceličnih polisaharidov (slika 3.1):

1. Za izolacijo in čiščenje zunajceličnih polisaharidov smo uporabili 10 ml biofilma, kadar smo želeli preiskati njegovo monosaharidno sestavo s tankoplastno kromatografijo. Za reološke teste smo povečali količino biofilma in sorazmerno ostale kemikalije, in ponavljali izolacije dokler nismo dobili vsaj 600 mg posameznega očiščenega zunajceličnega polisaharida. Za fiksacijo celic in kapsularnih polisaharidov smo k izhodiščni biomasi, 10 ml, dodali 60 μ l 36,4 % formaldehid in stresali eno uro pri 120 vrtljajih/min in 25 °C.
2. Vzorcju smo dodali 4 ml 1 M NaOH in nadaljevali s stresanjem pri 25 °C in 120 vrtljajih/min še 3 ure. V tej stopnji so se vsi zunajcelični polisaharidi raztopili, z izjemo celuloze.
3. S centrifugiranjem vzorca (30 min, 4 °C, 16800 \times g) smo odstranili celice s pričvrščenimi kapsularnimi polisaharidi, preostale koščke biofilma in netopno celulozo.
4. Sledila je 24-urna dializa supernatanta v dializnih vrečkah (velikosti por: 12–14 kDa), inkubiranih v destilirani vodi pri sobni temperaturi. Tako smo odstranili še morebitno prisotne celice in raztopljene polisaharide z nizko molekulsko maso.
5. Po dializi smo izpraznili vsebino dializnih vrečk in izmerili volumen dializnega ostanka. Sledila je 30 minutna precipitacija beljakovin v ledeni kopeli s trikloroocetno kislino (TCA) (20 % w/v).
6. S centrifugiranjem vzorca (30 min, 4 °C, 16800 \times g) smo odstranili precipitirane beljakovine.
7. Supernatantu smo izmerili volumen in dodali 1,5-kratni volumen predhodno ohlajenega 95 % etanola. Vzorec smo inkubirali v steklenicah 24 ur pri –20 °C. Tako smo precipitirali zunajcelične polisaharide, morebiten ostanek polarnih lipidov pa je ostal raztopljen.
8. Po inkubaciji smo vzorec centrifugirali (30 min, 4 °C, 16800 \times g).
9. Supernatant smo zavrgli, pelet, ki je vseboval precipitirane zunajcelične polisaharide pa smo raztopili v destilirani vodi.
10. Sledila je ponovna 24-urna dializa vzorca v dializnih vrečkah (velikosti por: 12–14 kDa), inkubiranih v destilirani vodi pri 4 °C. S tem postopkom smo ponovno odstranili manjše molekule.
11. Dializni ostanek smo zamrznili pri –20 °C in po zamrznitvi vzorca nadaljevali z liofilizacijo (4 – 5 dni). Liofilizirane polisaharide smo shranili pri –20 °C.

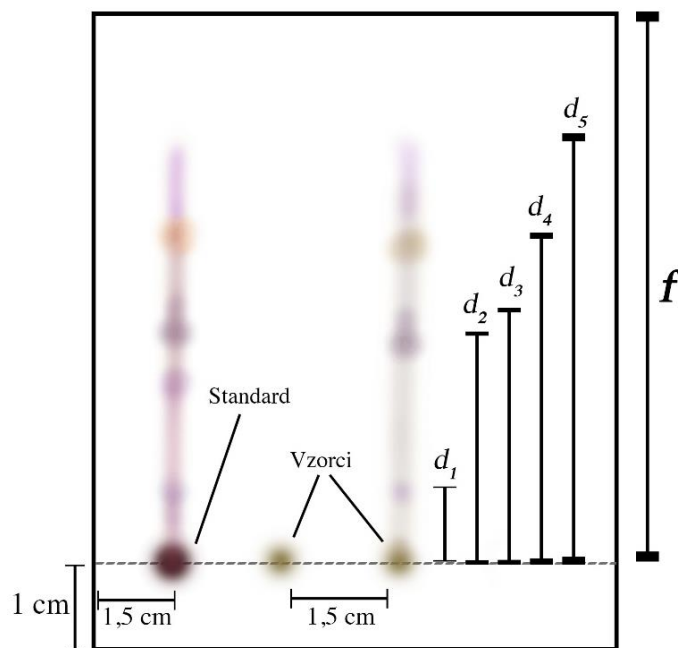
3.2.8 Hidroliza očiščenih polisaharidov

V steklene vijale smo natehtali približno 1 mg očiščenega zunajceličnega polisaharida, dodali 1 ml 2 M trifluoroocetne kisline (TFA) in vijalo zatesnili s segrevanjem nad ognjem. Hidroliza je potekala 2 uri pri 120 °C v peščeni kopeli. Po koncu hidrolize smo hidrolizate odpipetirali v plastične centrifugirke in jih posušili v termobloku pri 30 – 45 °C. Preostanek TFA smo odstranili z metanolom tako, da smo posušnim hidrolizatom trikrat zaporedoma dodali 0,5 ml metanola in vsakič počakali, da izhlapi. Nato smo vse vzorce raztopili v destilirani vodi v razmerju 1:4 (začetna masa natehtanega očiščenega zunajceličnega polisaharida pred hidrolizo (mg) : destilirana voda (μl)). Hidrolizirane vzorce smo shranili pri –20 °C do nadaljnjih analiz.

Sladkorni standard (glej točko 3.1.3.6) smo hidrolizirali z 0,5 ml 2 M trifluoroocetno kislino (2 uri pri 120 °C v peščeni kopeli). Po hidrolizi in čiščenju z metanolom smo vzorcu dodali 1 ml destilirane vode.

3.2.9 Analiza sestave polisaharidov s tankoplastno kromatografijo

Za analizo in ločevanje sladkorjev s tankoplastno kromatografijo na ploščah Silica Gel 60 smo pripravili mobilno fazo in reagent za obarvanje vzorcev. Kromatografsko komoro smo dan pred analizo nasičili z mobilno fazo, kar je vodilo v enakomerno porazdelitev vzorcev in sladkornega standarda.



Slika 3.2: Shematično prikaz poti potovanja posameznih sladkorjev po ločevanju s tankoplastno kromatografijo. Legenda: d_1 , glukuronska kislina; d_2 , manozna; d_3 , glukoza; d_4 , ramnoza; d_5 , fruktoza; f , mobilna faza. Foto: Kim Fijok.

Na ploščo Silica Gel 60 smo nanесли 2 μl hidroliziranega sladkornega standarda 1 cm od spodnjega roba in 1,5 cm od levega roba. Nato smo po 1 μl hidroliziranega vzorca nanašali v razmiku 1,5 cm (slika 3.2). Ploščo smo namestili na stojalo in jo zaprli v kromatografsko komoro tako, da se ni dotikala ali naslanjala stranic predhodno nasičene komore. Ploščo smo v komori pustili tako dolgo, dokler ni mobilna faza pripotovala do vrha. Nato smo ploščo posušili na zraku v digestoriju in jo zatem potopili v barvni reagent. Ko se je plošča ponovno posušila smo jo dali v pečico pri 120 °C do jasnega obarvanja vzorcev in sladkornega standarda. Nato smo odčitali rezultate in izračunali retencijske faktorje (R_f) z naslednjo formulo:

$$R_f = \frac{\text{pot posameznega sladkorja } (d_x)}{\text{pot mobilne faze } (f)}$$

Hidrolizirane vzorce smo pred nanosom na kromatografsko ploščo razredčili z vodo v naslednjem razmerju:

- 1,2 mg polisaharida seva *A. aceti* LMG 1504^T gojenega na glukozi in 4,8 µl destilirane H₂O,
- 1,2 mg polisaharida seva *A. aceti* LMG 1504^T gojenega na saharozi in 4,8 µl destilirane H₂O,
- 1,2 mg polisaharida seva *K. pomaceti* T5K1 gojenega na glukozi in 4,8 µl destilirane H₂O,
- 1,3 mg polisaharida seva *K. pomaceti* T5K1 gojenega na saharozi in 5,2 µl destilirane H₂O,
- 1,3 mg polisaharida seva *K. rhaeticus* LMG 22126^T gojenega na glukozi in 5,2 µl destilirane H₂O,
- 1,2 mg polisaharida seva *K. rhaeticus* LMG 22126^T gojenega na saharozi in 4,8 µl destilirane H₂O,
- 1,3 mg polisaharida seva *A. pomorum* LMG 18848^T gojenega na glukozi in 5,2 µl destilirane H₂O,
- 1,1 mg polisaharida seva *A. pomorum* LMG 18848^T gojenega na saharozi in 4,4 µl destilirane H₂O,
- 0,7 mg polisaharida seva *A. estunensis* AV371 gojenega na glukozi in 2,8 µl destilirane H₂O,
- 1,2 mg polisaharida seva *A. estunensis* AV371 gojenega na saharozi in 4,8 µl destilirane H₂O,
- 1,2 mg polisaharida seva *K. oboediens* AV380 gojenega na glukozi in 4,8 µl destilirane H₂O,
- 1,2 mg polisaharida seva *K. oboediens* AV380 gojenega na saharozi in 4,8 µl destilirane H₂O,
- 0,7 mg polisaharida seva *Komagataeibacter* sp. AV394 gojenega na glukozi in 2,8 µl destilirane H₂O,
- 0,1 mg polisaharida seva *Komagataeibacter* sp. AV394 gojenega na saharozi in 0,4 µl destilirane H₂O,
- 1,3 mg polisaharida seva *Komagataeibacter* sp. AV436 gojenega na glukozi in 5,2 µl destilirane H₂O,
- 1,2 mg polisaharida seva *Komagataeibacter* sp. AV436 gojenega na glukozi in 4,8 µl destilirane H₂O.

3.2.10 Reološke analize zunajceličnih polisaharidov

Reološke analize očiščenih zunajceličnih polisaharidov ocatnokislinskih bakterij smo izvajali na Biotehniški fakulteti v Ljubljani, na Katedri za mikrobiologijo, pod vodstvom prof. dr. Davida Stoparja in doc. dr. Iztoka Dogše. Za izvedbo meritev smo uporabili Rotacijski modularni reometer (Physica MCR 302, Anton Paar, Gradec, Avstrija) in merilni sistem CP50 (slika 3.3).



Slika 3.3: Rotacijski modularni reometer (Physica MCR 302, Anton Paar, Gradec, Avstrija).

Foto: Kim Fijok.

Za reološke analize smo izbrali tri seve: *K. oboediens* AV380, *A. aceti* LMG 1504^T in *A. pomorum* LMG 18848^T. Pred izvedbo analiz smo očiščene zunajcelične polisaharide zatehtali v 50 ml plastične epruvete s pokrovčki in jih redčili s pufrom CF (pH 7 in pH 2,4) do 1,5 % raztopine polisaharida. Razredčene vzorce smo premešali z vrtničnim mešalom, da smo dobili čim bolj homogeno raztopino. Štiri vzorce (*K. oboediens* AV380 gojen na glukozi, redčen s CF pufrom pH 7 in pH 2,4 ter *K. oboediens* AV380 gojen na saharozi, redčen s CF pufrom pH 7 in pH 2,4) smo za 3 ure dodatno segrevali pri 55 °C, da so se polisaharidi popolnoma raztopili. Nato smo jih pustili 2 uri na sobni temperaturi, da so dosegli enako temperaturo kot ostali testirani vzorci. Za eno meritev smo na reometer nanесли 585 μ l vzorca. Reološke metode smo izvajali z rotacijsko in z amplitudno metodo.

Viskoznost materiala smo analizirali z rotacijsko (oscilacijsko) metodo s stiskom vzorca med dve makroskopski plošči. Spodnja plošča je mirovala, zgornji smo pa postopoma zviševali strižno hitrost (enosmerno vrtenje plošče). Začetna strižna hitrost je bila 3 s^{-1} (inverznih sekund), nato pa smo jo logaritemsko povečevali, dokler ni dosegla 2000 s^{-1} . Prvo vrednost je reometer meril 60 sekund, čas naslednjih meritev pa je logaritemsko padal. Čas merjenja zadnje točke je bil 2 sekundi. Krivulja, ki smo jo pridobili, je predstavljala logaritem viskoznosti v odvisnosti od logaritma strižne hitrosti. Rezultate smo prikazali v obliki točkovnih krivulj (graf 4.1).

Za analizo elastičnosti polisaharidov smo vzorec prav tako stisnili med dve makroskopski plošči. Spodnja plošča je mirovala, zgornji pa smo pri konstantni frekvenci spreminjali velikost strižne deformacije (amplitudo). Imeli smo nastavljeno avtomatsko dolžino merjenja 21 točk. Krivulji, ki smo ju pridobili, sta bila logaritma elastičnega in viskozne modula v odvisnosti od logaritma velikosti strižne deformacije (amplitude) (graf 4.2).

4 REZULTATI

4.1 Izbor sevov, ki tvorijo biofilm

Od testiranih 83 sevov jih je 25 (preglednica 4.1) tvorilo biofilm na tekočem gojišču RAE z glukozo.

Preglednica 4.1: Seznam sevov ocatnokislinskih bakterij, ki so tvorili biofilm v tekočem gojišču RAE z glukozo.

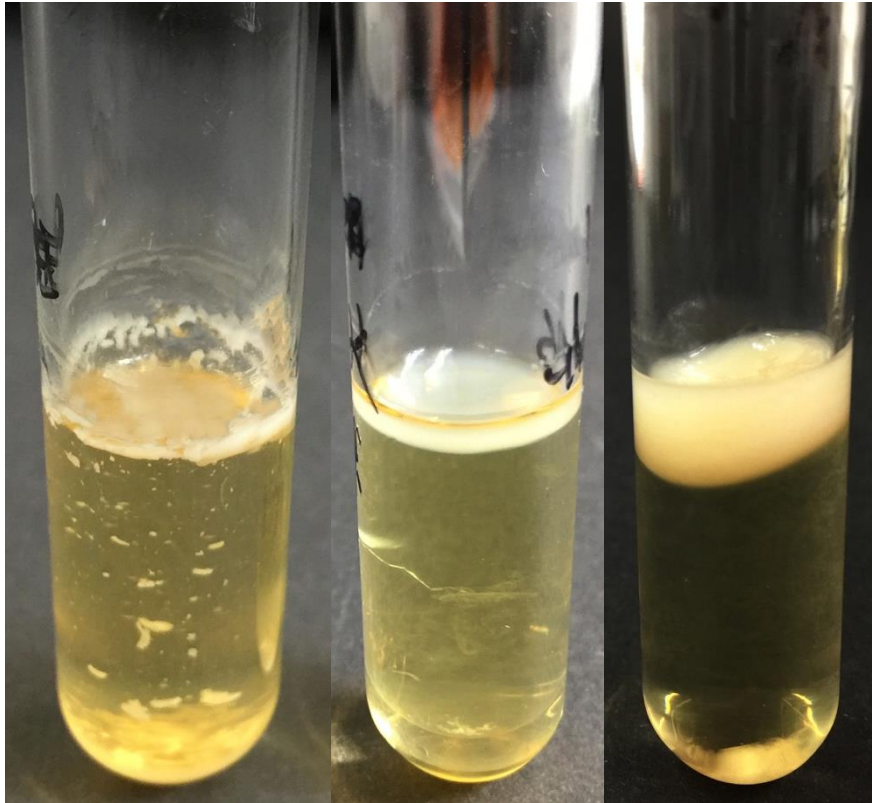
Oznaka seva
<i>A. pasteurianus</i> AV366
<i>K. pomaceti</i> AV368
<i>A. estunensis</i> AV371
<i>K. oboediens</i> AV380
<i>K. pomaceti</i> AV381
<i>Komagataeibacter</i> sp. AV382
<i>K. pomaceti</i> AV387
<i>A. estunensis</i> AV390
<i>A. estunensis</i> AV391
<i>Komagataeibacter</i> sp. AV394
AV396
<i>Komagataeibacter</i> sp. AV399
<i>K. pomaceti</i> AV400
AV410
AV414
AV417
<i>G. entanii</i> AV429
<i>K. pomaceti</i> AV430
<i>K. pomaceti</i> AV431
<i>K. pomaceti</i> AV433
AV435
<i>Komagataeibacter</i> sp. AV436
AV441
AV446
AV447

Za nadaljnje raziskave smo izbrali štiri seve, kateri so po enkratni izolaciji in čiščenju zunajceličnih polisaharidov iz 10 ml začetne biomase (biofilma) tvorili največ mg očiščenega zunajceličnega polisaharida. K temu smo dodali še štiri tipske seve (preglednica 3.2). Tem izbranim sevom smo ocenili še njihovo sposobnost za tvorbo biofilmov na saharoznih gojiščih RAE. Primerjava čvrstosti biofilma pridobljenega na glukoznem gojišču v primerjavi s tistim, nastalim na saharoznem gojišču je opisana v preglednici 4.2.

Preglednica 4.2: Opis biofilmov izbranih sevov ocetnokislinskih bakterij, gojenih v tekočem gojišču RAE z glukozo ali saharozo.

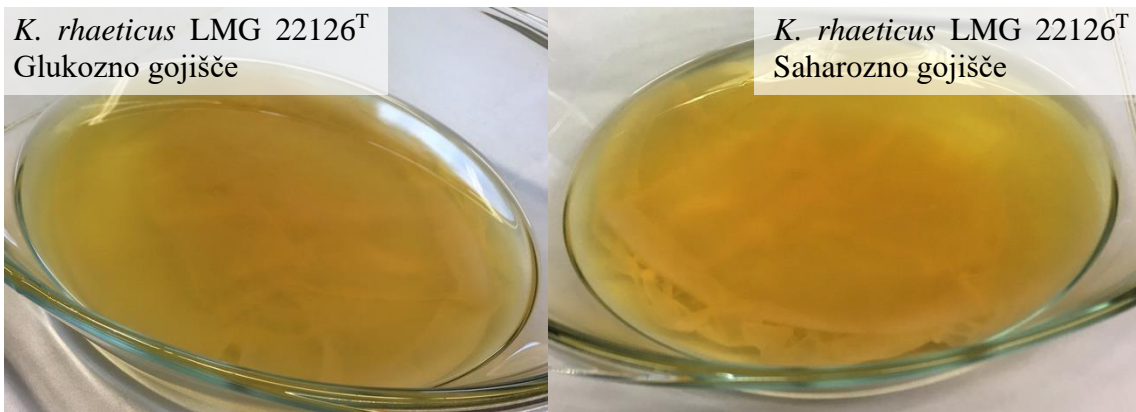
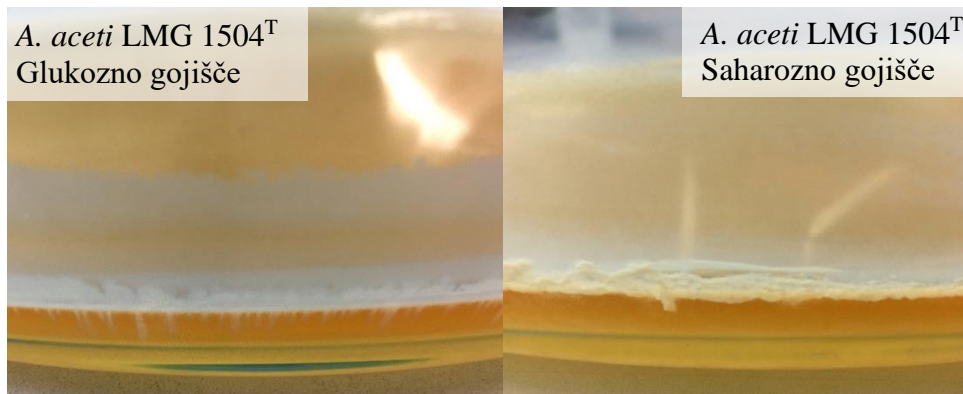
Oznaka seva	Vir sladkorja v gojišču RAE	Opis biofilma
<i>A. aceti</i> LMG 1504 ^T	Glukoza	Krhek
<i>A. aceti</i> LMG 1504 ^T	Saharoza	Krhek
<i>K. pomaceti</i> T5K1 ^T	Glukoza	Tanek
<i>K. pomaceti</i> T5K1 ^T	Saharoza	Tanek
<i>K. rhaeticus</i> LMG 22126 ^T	Glukoza	Tanek
<i>K. rhaeticus</i> LMG 22126 ^T	Saharoza	Tanek
<i>A. pomorum</i> LMG 18848 ^T	Glukoza	Krhek
<i>A. pomorum</i> LMG 18848 ^T	Saharoza	Krhek
<i>A. estunensis</i> AV371	Glukoza	Tanek
<i>A. estunensis</i> AV371	Saharoza	Tanek
<i>K. oboediens</i> AV380	Glukoza	Krhek
<i>K. oboediens</i> AV380	Saharoza	Krhek
<i>Komagataeibacter</i> sp. AV394	Glukoza	Debel
<i>Komagataeibacter</i> sp. AV394	Saharoza	Debel
<i>Komagataeibacter</i> sp. AV436	Glukoza	Debel
<i>Komagataeibacter</i> sp. AV436	Saharoza	Debel

Sevi zbrani v preglednici 4.2 so na obeh virih ogljika tvorili biofilm. Nekateri sevi so tvorili krhek biofilm, ki je ob manjšem stresanju razpadel, drugi sevi so tvorili tanek biofilm, ki ob stresanju ni razpadel, dva seva pa sta tvorila močan biofilm debeline približno 0,4 mm (slike 4.1, 4.2 in 4.3).



Slika 4.1: Primer krhkega (levo, *A. pomorum* LMG 18848^T, gojen na glukozi), tankega (sredina, *K. rhaeticus* LMG 22126^T, gojen na saharozi) in debelega (desno, *Komagataeibacter* sp. AV436, gojen na glukozi) biofilma iz stacionarne faze rasti očetnokislinskih bakterij. Foto:

Kim Fijok.



Slika 4.2: Slike biofilmov po gojenju referenčnih sevov očetnokislinskih bakterij na glukoznem (levo) in saharoznem (desno) gojišču RAE. Foto: Kim Fijok.

A. estunensis AV371
Glukozno gojišče



A. estunensis AV371
Saharozno gojišče



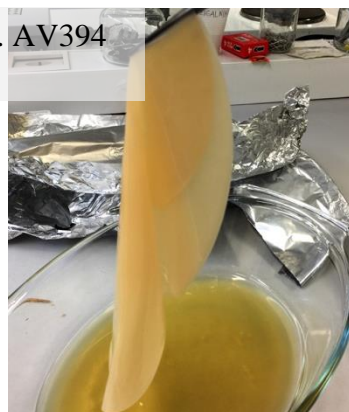
K. oboediens AV380
Glukozno gojišče



K. oboediens AV380
Saharozno gojišče



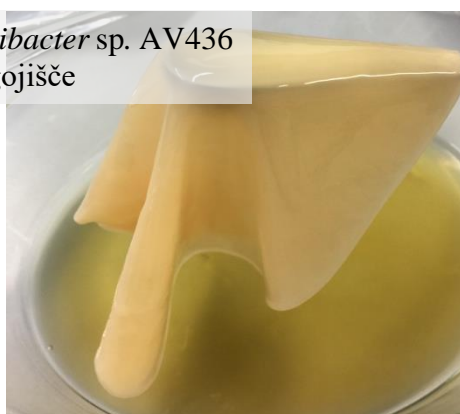
Komagataeibacter sp. AV394
Glukozno gojišče



Komagataeibacter sp. AV394
Saharozno gojišče



Komagataeibacter sp. AV436
Glukozno gojišče



Komagataeibacter sp. AV436
Saharozno gojišče



Slika 4.3: Slike biofilmov po gojenju sevov očetnokislinskih bakterij, osamljenih iz industrijskih bioreaktorjev, na glukoznem (levo) in saharoznem (desno) gojišču RAE. Foto:

Kim Fijok.

4.2 Detekcija genov za sintezo acetana, levana in celuloze

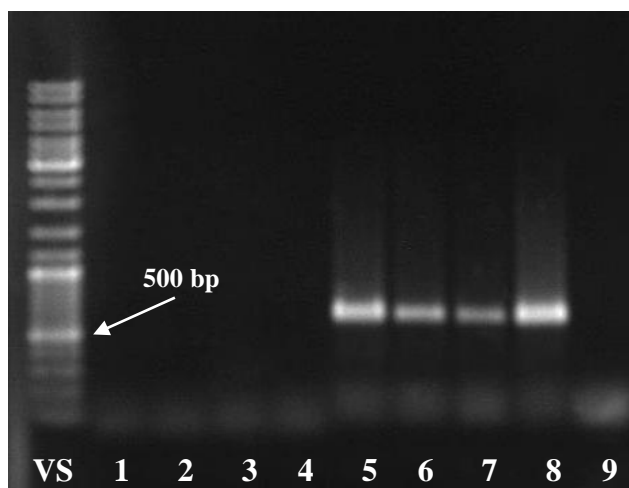
Pri izbranih sevih očetnokislinskih bakterij (preglednica 4.2) smo testirali prisotnost genov za sintezo treh znanih zunajceličnih polisaharidov: acetana, levana in celuloze (slika 4.4). Rezultati pomnoževanja genov z metodo PCR so zbrani v preglednici 4.3.

Preglednica 4.3: Prisotnost genov za sintezo acetana, levana in celuloze pri izbranih sevih očetnokislinskih bakterij.

Oznaka seva	Acetan (<i>aceA</i>)	Levan (<i>lev</i>)	Celuloza (<i>bscA</i>)
<i>A. aceti</i> LMG 1504 ^T	+	+	-
<i>K. rhaeticus</i> LMG 22126 ^T	+	-	+
<i>K. oboediens</i> AV380	+	-	+
<i>Komagataeibacter</i> sp. AV394	+	-	+
<i>Komagataeibacter</i> sp. AV436	+	-	+
<i>K. pomaceti</i> T5K1 ^T	-	-	+
<i>A. pomorum</i> LMG 18848 ^T	-	-	+
<i>A. estunensis</i> AV371	-	-	-

Preiskane seve v preglednici 4.3 smo razdelili v 4 kategorije glede na prisotnost genov za sintezo acetana in levana:

- Sevi, pri katerih sta prisotna gena za sintezo acetana in levana in je odsoten gen za sintezo celuloze,
- Sevi, pri katerih sta prisotna gena za sintezo acetana in celuloze in je odsoten gen za sintezo levana,
- Sevi, pri katerih nista prisotna gena za sintezo levana in acetana in je prisoten gen za sintezo celuloze,
- Sevi, pri katerih so odsotni vsi trije geni.



Slika 4.4: Ločevanje PCR-pomnožkov po namnoževanju specifičnega odseka gena za levansucrazo (proge 1, 2, 3, 4) in acetat (proge 5, 6, 7, 8) v preiskovanih sevih iz rodu *Komagataeibacter*. Legenda: VS, velikostni standard; 1, *K. oboediens* AV380; 2, *Komagataeibacter* sp. AV394; 3, *Komagataeibacter* sp. AV436; 4, *Komagataeibacter nataicola* LMG 1536^T – neg. kontrola; 5, *K. oboediens* AV380; 6, *Komagataeibacter* sp. AV394; 7, *Komagataeibacter* sp. AV436; 8, *K. swingsii* LMG 22125^T – poz. kontrola; 9, *K. hansenii* LMG 1527^T – neg. kontrola. Foto: Kim Fijok.

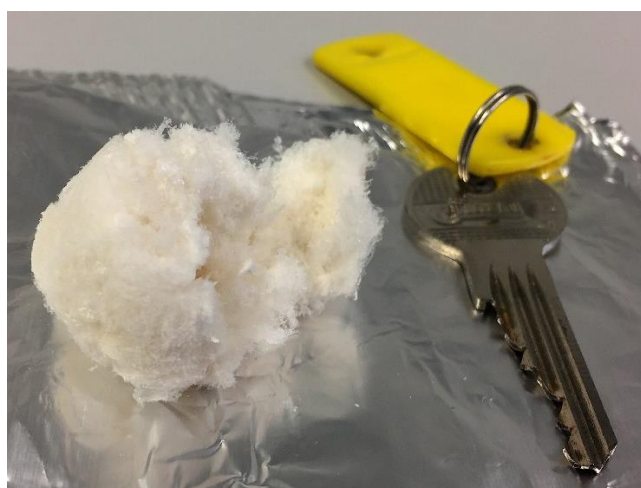
4.3 Izolacija in čiščenje zunajceličnih polisaharidov

Pri vseh sevih iz preglednice 4.1 in 4.2, gojenih na glukozi in saharozi, smo s postopkom izolacije in čiščenja polisaharidov dobili vodotopen polisaharid. Nekateri sevi so tvorili velike količine v vodi topnega polisaharida pri precej majhni količini začetne biomase (slika 4.6), medtem ko smo izolacijo drugih sevov morali izvesti večkrat, da smo dobili zadostne količine polisaharida za nadaljnje raziskave (preglednica 4.4).

Nekateri sevi so pri postopku izolacije in čiščenja zunajceličnih polisaharidov (faza precipitacije s 95 % etanolom, slika 3.1, 7. stopnja) tvorili vidne polisaharide v obliki tankih nitk (slika 4.5). Nitke smo opazili pri sevih *A. aceti* LMG 1504^T (gojen na glukozi in saharozi), *K. rhaeticus* LMG 22126^T (gojen na saharozi) in *K. oboediens* AV380 (gojen na glukozi in saharozi). Pri ostalih sevih nitk nismo opazili.



Slika 4.5: Primer vidne precipitacije zunajceličnih polisaharidov v stopnji 7 postopka izolacije in čiščenja zunajceličnih polisaharidov. Levo: *K. oboediens* AV380, gojen na saharozi; desno: *K. oboediens* AV380, gojen na glukozi. Foto: Kim Fijok.



Slika 4.6: Primer velike količine očiščenega in izoliranega zunajceličnega polisaharida, ki ga tvori sev *A. aceti* LMG 1504^T, gojen na saharoznem gojišču RAE. Foto: Kim Fijok.

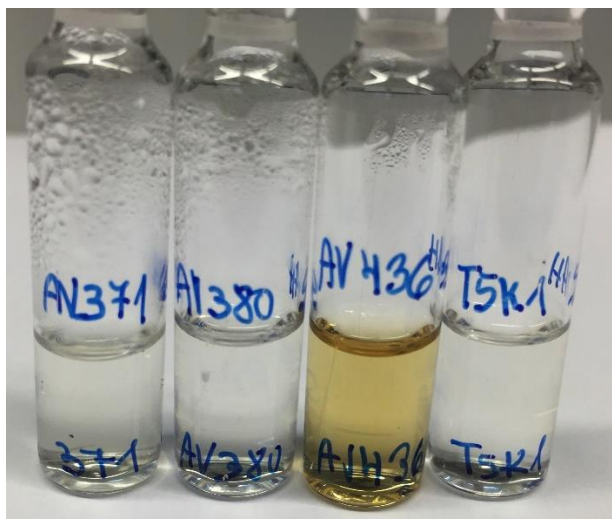
Preglednica 4.4: Pridobljena masa izoliranih zunajceličnih polisaharidov očetnokislinskih bakterij gojenih na glukoznih in saharoznih gojiščih.

Oznaka seva	Vir sladkorja v gojišču RAE	Masa izoliranih EPS*
<i>A. aceti</i> LMG 1504 ^T	Glukoza	99,3 mg*
<i>A. aceti</i> LMG 1504 ^T	Saharoza	293,2 mg*
<i>K. pomaceti</i> T5K1	Glukoza	1,3 mg
<i>K. pomaceti</i> T5K1	Saharoza	36,5 mg*
<i>K. rhaeticus</i> LMG 22126 ^T	Glukoza	2 mg*
<i>K. rhaeticus</i> LMG 22126 ^T	Saharoza	1,2 mg
<i>A. pomorum</i> LMG 18848 ^T	Glukoza	217,9 mg*
<i>A. pomorum</i> LMG 18848 ^T	Saharoza	80 mg*
<i>A. estunensis</i> AV371	Glukoza	1,4 mg
<i>A. estunensis</i> AV371	Saharoza	1,2 mg
<i>K. oboediens</i> AV380	Glukoza	132,3 mg*
<i>K. oboediens</i> AV380	Saharoza	200,5 mg*
<i>Komagataeibacter</i> sp. AV394	Glukoza	0,7 mg
<i>Komagataeibacter</i> sp. AV394	Saharoza	0,1 mg*
<i>Komagataeibacter</i> sp. AV436	Glukoza	1,3 mg
<i>Komagataeibacter</i> sp. AV436	Saharoza	1,2 mg

*Končna masa očiščenih zunajceličnih polisaharidov je seštevek več postopkov izolacij.

4.4 Hidroliza očiščenih polisaharidov

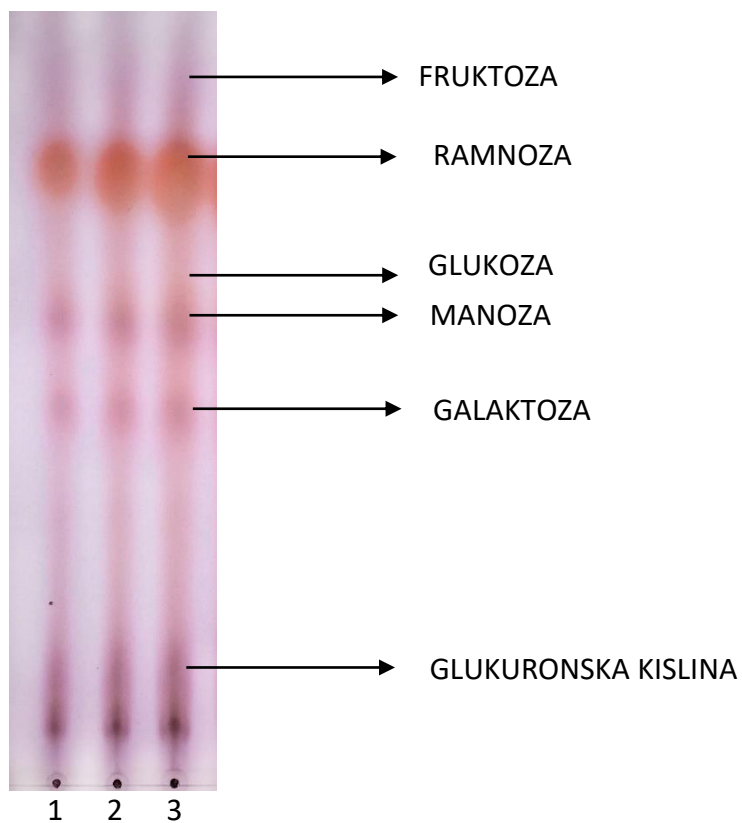
Po izolaciji in čiščenju polisaharidov smo vzorce popolnoma hidrolizirali do monosaharidov z 2 M trifluoroocetno kislino ob prisotnosti visoke temperature. Vzorce smo hidrolizirali v steklenih vijalah, katere smo predhodno zavarili in s tem preprečili izhlapevanje hidrolizata. Slika 4.7 prikazuje uspešno izvedeno hidrolizo.



Slika 4.7: Vijale s hidroliziranimi vzorci polisaharidov. Od leve proti desni: *A. estunensis* AV371, *K. oboediens* AV380, *Komagataeibacter* sp. AV436 in *K. pomaceti* T5K1^T. Vsi sevi so bili gojeni na glukoznem gojišču. Foto: Kim Fijok.

4.5 Analiza sestave očiščenih polisaharidov

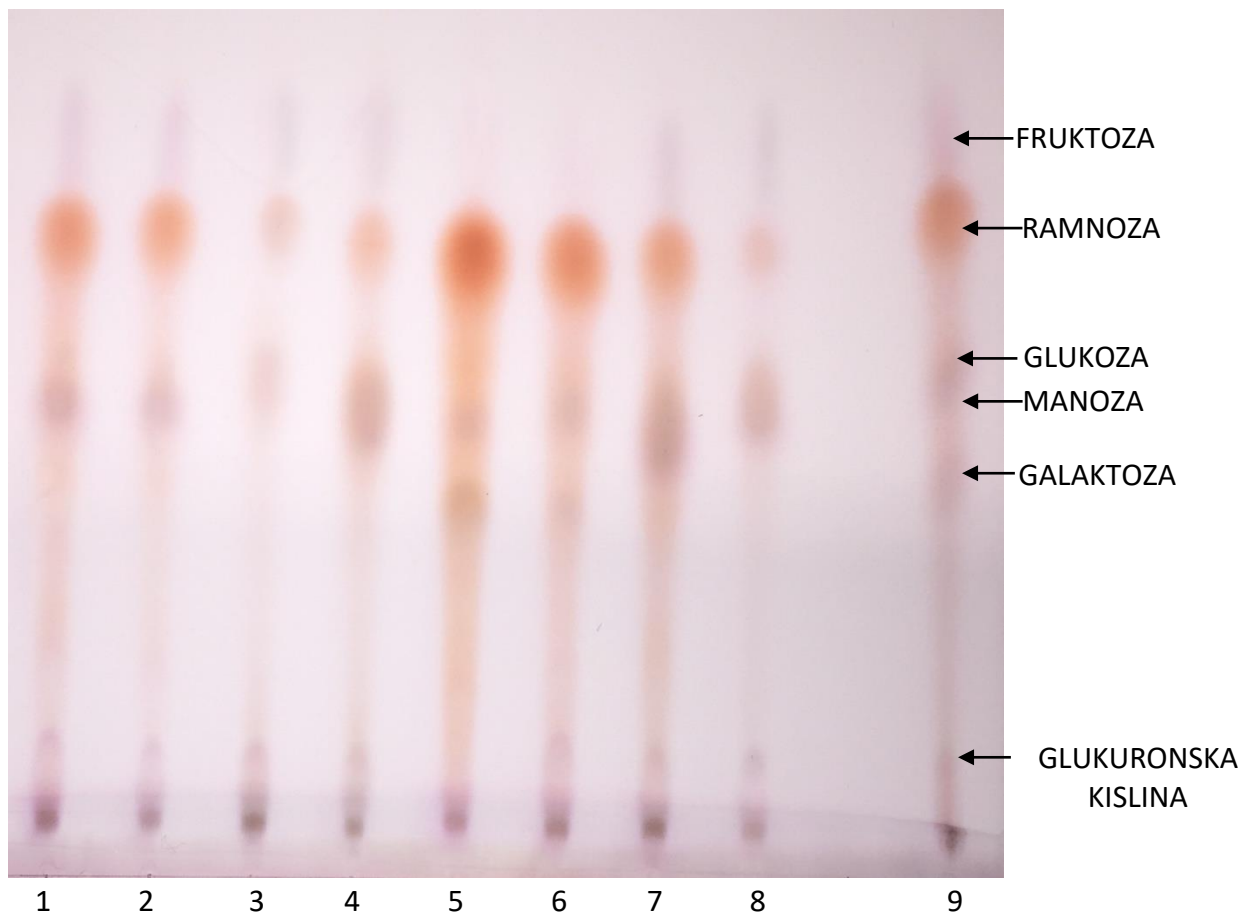
Hidrolizate smo nanесли na kromatografsko ploščo in jih ločevali s tankoplastno kromatografijo. Najprej smo postopek optimizirali tako, da smo določili primeren volumen/maso hidrolizata sladkornega standarda, pri katerem smo dobili najboljšo ločbo posameznih monomerov. Iz slike 4.8 vidimo, da smo najboljšo ločbo vseh monomerov, predvsem glukoze in manoze, dobili v primeru nanosa 3 μ l sladkornega standarda. Izračun retencijskih faktorjev smo naredili iz tega nanosa (preglednica 4.5). Po optimizaciji smo s tankoplastno kromatografijo analizirali sestavo hidrolizatov in pri izbranih vzorcih določili monomerno sestavo zunajceličnih polisaharidov (sliki 4.9 in 4.10, preglednica 4.6).



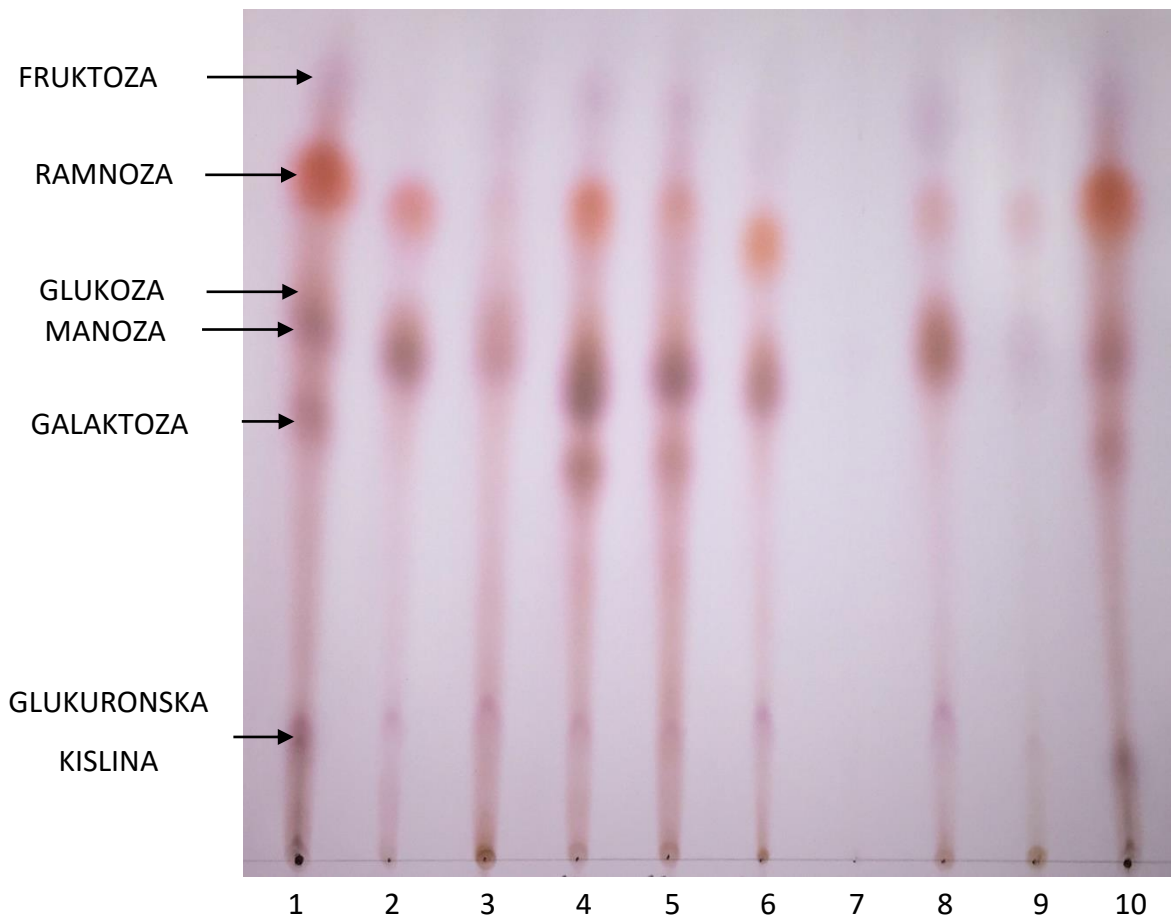
Slika 4.8: Rezultat ločevanja sladkornih standardov s tankoplastno kromatografijo. Nanešeni so bili različni volumni hidroliziranih sladkornih standardov: 1, 1 μ l; 2, 2 μ l; 3, 3 μ l. Foto: Kim Fijok.

Preglednica 4.5: Izračun retencijskih faktorjev monosaharidov sladkornega standarda iz 3. nanosa na sliki 4.8.

Monosaharid	Retencijski faktor (Rf)
Fruktoza	0,694
Ramnoza	0,608
Glukoza	0,495
Manoza	0,468
Galaktoza	0,396
Glukuronska kislina	0,113



Slika 4.9: Rezultat ločevanja hidroliziranih zunajceličnih polisaharidov izbranih sevov očetnokislinskih bakterij s tankoplastno kromatografijo. Vzorci na progah 1, 3, 5 in 7 so bili pridobljeni iz biofilma po namnoževanju na RAE gojišču z glukozo, vzorci na progah 2, 4, 6 in 8 po namnoževanju na gojišču RAE s saharozo. Legenda: 1 in 2, *A. aceti* LMG 1504^T; 3 in 4, *K. pomaceti* T5K1^T; 5 in 6, *A. pomorum* LMG 18848^T; 7 in 8, *K. rhaeticus* LMG 22126^T; 9, sladkorni standard (3 µl). Foto: Kim Fijok.



Slika 4.10: Rezultat ločevanja hidroliziranih zunajceličnih polisaharidov izbranih sevov očetnokislinskih bakterij s tankoplastno kromatografijo. Vzorci na progah 2, 4, 6 in 8 so bili pridobljeni iz biofilma po namnoževanju na RAE gojišču z glukozo, vzorci na progah 3, 5, 7 in 9 po namnoževanju na gojišču RAE s saharozo. Legenda: 1 in 10, sladkorni standard (3 μ l); 2 in 3, *A. estunensis* AV371; 4 in 5, *K. oboediens* AV380; 6 in 7, *Komagataeibacter* sp. AV394; 8 in 9, *Komagataeibacter* sp. AV436. Foto: Kim Fijok.

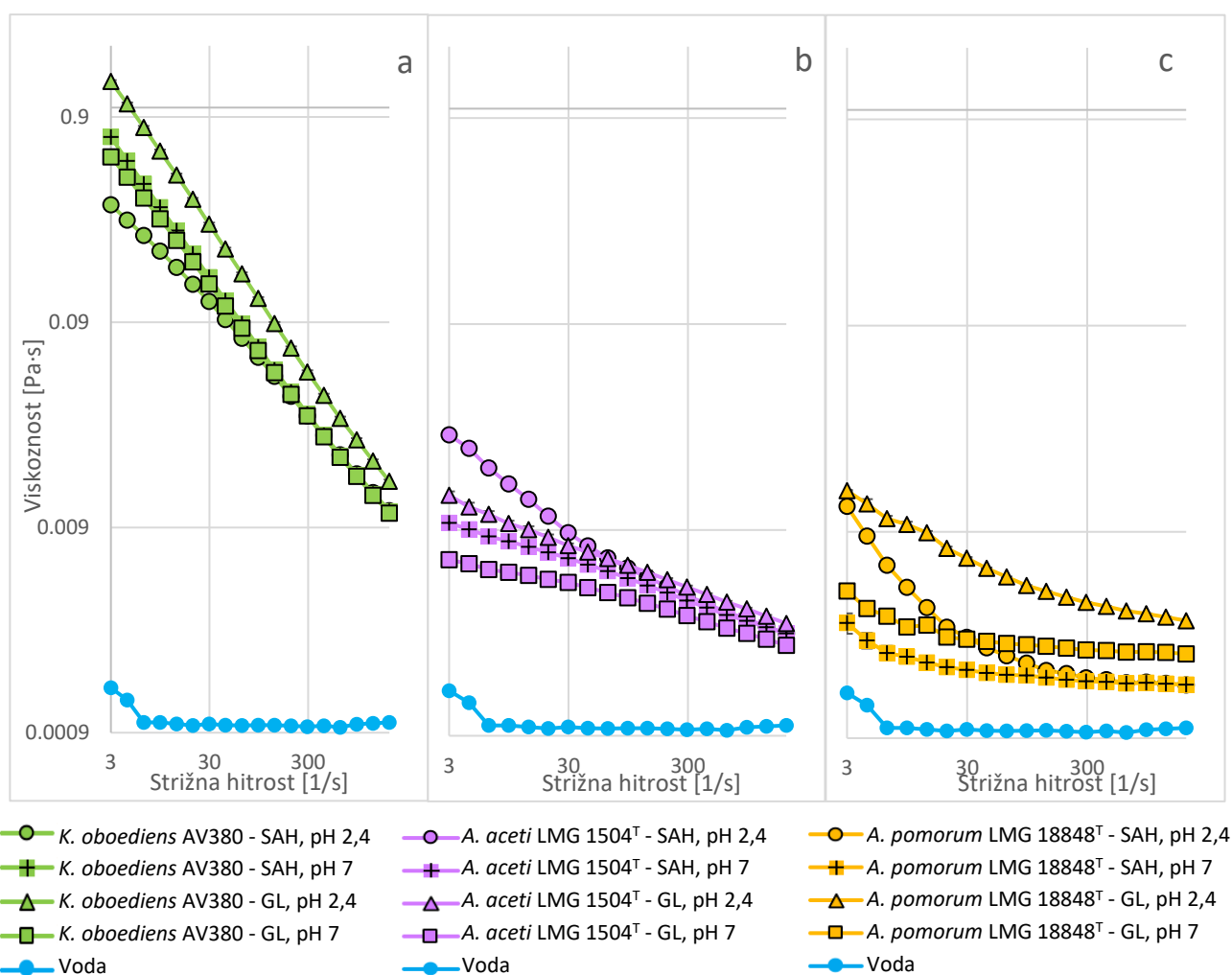
Preglednica 4.6: Monosaharidna sestava izbranih sevov očetnokislinskih bakterij gojenih na različnih virih sladkorja po ločevanju s tankoplastno kromatografijo (sliki 4.9 in 4.10). G, sev gojen na gojišču RAE z glukozo; S, sev gojen na gojišču RAE s saharozo; /, ni rezultata.

Oznaka seva	Fruktoza	Ramnoza	Glukoza	Manoza	Galaktoza	Glukuronska kislina
<i>A. acetii</i> LMG 1504 ^T – G	+	+	+	+	-	+
<i>A. acetii</i> LMG 1504 ^T – S	+	+	+	+	-	+
<i>K. pomaceti</i> T5K1 ^T – G	+	+	+	+	-	+
<i>K. pomaceti</i> T5K1 ^T – S	+	+	+	+	-	+
<i>A. pomorum</i> LMG 18848 ^T – G	-	+	-	+	+	-
<i>A. pomorum</i> LMG 18848 ^T – S	-	+	-	+	+	+
<i>K. rhaeticus</i> LMG 22126 ^T – G	+	+	+	+	-	+
<i>K. rhaeticus</i> LMG 22126 ^T – S	+	+	+	+	-	+
<i>A. estunensis</i> AV371 – G	-	+	+	+	-	+
<i>A. estunensis</i> AV371 – S	+	-	+	+	-	+
<i>K. oboediens</i> AV380 – G	+	+	+	+	+	+
<i>K. oboediens</i> AV380 – S	+	+	+	+	+	+
<i>Komagataeibacter</i> sp. AV394 – G	+	+	+	+	-	+
<i>Komagataeibacter</i> sp. AV394 – S	/	/	/	/	/	/
<i>Komagataeibacter</i> sp. AV436 – G	+	+	+	+	-	+
<i>Komagataeibacter</i> sp. AV436 – S	+	+	+	+	-	+

Komagataeibacter sp. AV394 (preglednica 4.6) na saharoznem gojišču tvori izjemno nizke količine zunajceličnega polisaharida. Kljub večim ponovitvam izolacije, nismo uspeli pridobiti zadostne količine polisaharida (samo 0,1 mg izoliranega polisaharida smo pridobili po večih ponovitvah izolacije) za uspešno izvedbo tankoplastne kromatografije. Roza obarvana polja v tabeli pri dveh sevih označujejo razliko v monomerni sestavi zunajceličnega polisaharida glede na različen vir ogljika v gojišču za namnoževanje sevov.

4.6 Reološke lastnosti izbranih polisaharidov

Po analizi monomerne sestave zunajceličnih polisaharidov s tankoplastno kromatografijo smo med sevi iz preglednice 4.6 izbrali za analizo reoloških lastnosti tiste seve, iz katerih smo iz 10 ml začetne biomase izolirali največ mg zunajceličnih polisaharidov. To so bili sevi: *K. oboediens* AV380, *A. aceti* LMG 1504^T in *A. pomorum* LMG 18848^T.



Graf 4.1: Viskoznost zunajceličnih polisaharidov sevov *K. oboediens* AV380 (a), *A. aceti* LMG 1504^T (b) in *A. pomorum* LMG 18848^T (c), gojenih v prisotnosti glukoze (oznaka GL) ali saharoze (oznaka SAH). Meritev viskoznosti zunajceličnih polisaharidov je bila narejena v 1,5 % (w/v) raztopinah citratno-fosfatnega pufru (pH vrednost 2,4 ali 7).

Iz grafa 4.1 je razvidno, da je na celotnem razponu merjenih strižnih hitrosti najbolj viskozen zunajcelični polisaharid pridobljen iz seva *K. oboediens* AV380. Bistveno nižjo viskoznost imata zunajcelična polisaharida, pridobljena iz seva *A. aceti* LMG 1504^T in *A. pomorum* LMG 18848^T. Ker vse tokovne krivulje z višanjem strižne hitrosti padajo, imamo opravka s strukturiranim materialom, ki izraža psevdoplastične lastnosti materiala. V polimernih sistemih je psevdoplastičnost pogosto posledica prepletenosti polimerov in z višanjem strižne hitrosti se prepletenost ruši.

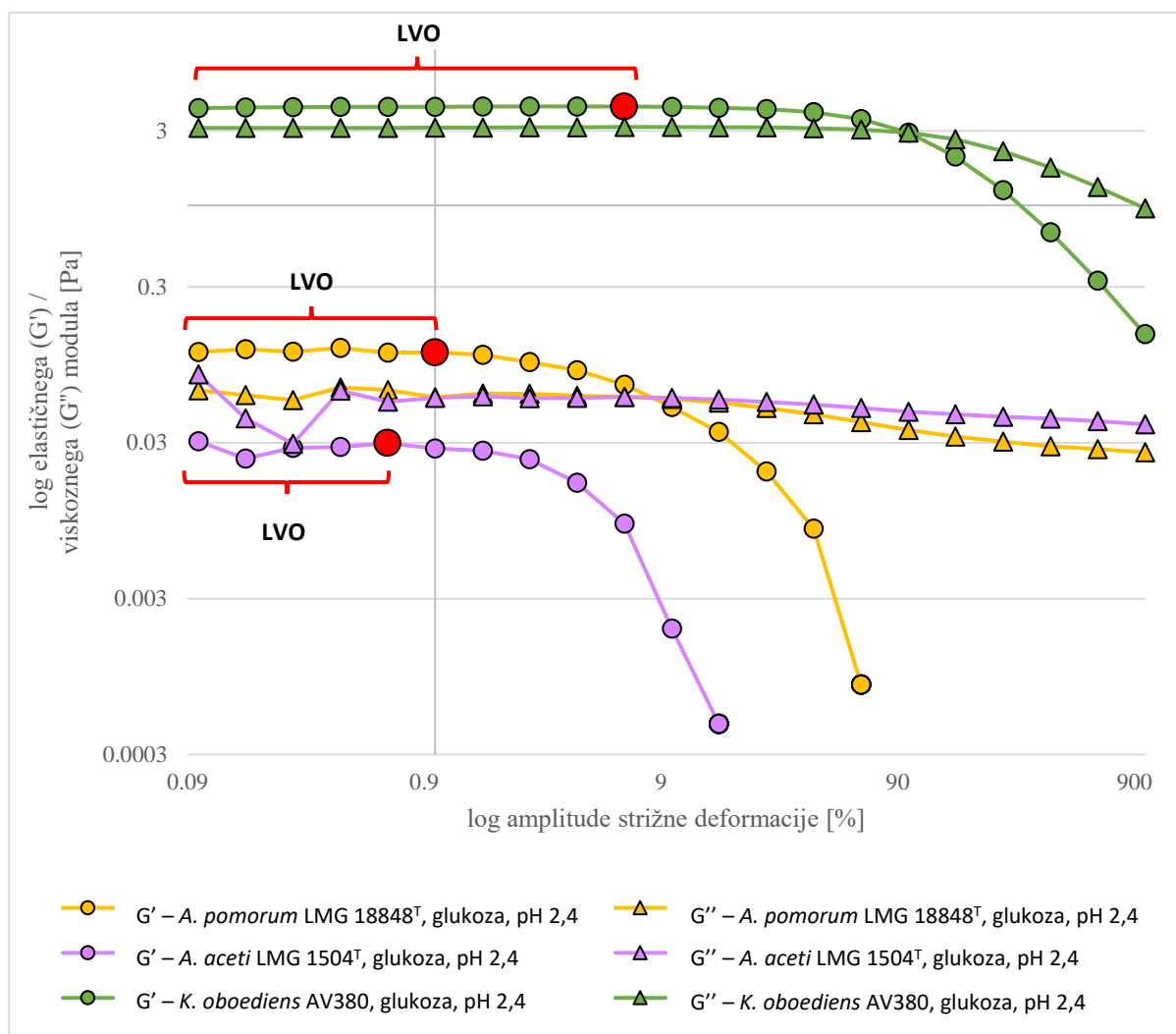
Z grafa 4.1a, kjer so prikazane viskoznosti zunajceličnih polisaharidov, pridobljenih iz seva *K. oboediens* AV380, lahko razberemo, da ima najvišjo viskoznost zunajcelični polisaharid, pridobljen iz glukoznega gojišča RAE, ki je bil tretiran s CF pufrom pH 2,4. Viskoznost ostalih treh vzorcev je pri nižjih strigih različna, vendar se s povečanjem strižne hitrosti ustali pri enakih vrednosti. To nakazuje, da kljub temu, da med polimeri obstajajo različno močne interakcije, je velikost in/ali togost polimera, ki ima večji vpliv prav v repu tokovne krivulje, podobna pri vseh vzorcih seva *K. oboediens* AV380. To se sklada z rezultati tankoplastne kromatografije, kjer smo ugotovili, da ta sev sintetizira enake monosaharide ne glede na vir sladkorja v gojišču. Konstantno višje vrednosti viskoznosti pri vseh merjenih strižnih hitrostih za polisaharid, ki je bil gojen na glukoznem gojišču in tretiran s CF pH 2,4, nakazujejo, da ima polimer višji delež nabitih sladkorjev, kot polisaharidi pridobljeni iz saharoznega gojišča. V CF pufu pri pH 2,4 so višje koncentracije protonov, ki nevtralizirajo odbojnost negativno nabitih sladkorjev, kar posledično lahko vodi do višje viskoznosti materiala.

Iz grafa 4.1b so razvidne bistveno nižje vrednosti viskoznosti vseh 4 tokovnih krivulj v primerjavi z grafom 4.1a, kar se sklada z drugačno primarno strukturo polisaharida (preglednica 4.6). Najvišjo viskoznost pri nizkih strigih opazimo pri polisaharidu gojenem na saharoznem gojišču, tretiranim s CF pufrom pH 2,4, pri visokih strigih pa pri polisaharidu, gojenem na glukoznem gojišču, tretiranim s CF pufrom pH 2,4 (enako kot pri grafu 4.1a). Pri sevu *A. aceti* LMG 1504^T lahko opazimo nekoliko višje viskoznosti kadar je gojen v saharoznem gojišču v primerjavi z gojenjem v glukoznem gojišču. Drugačno obnašanja tokovnih krivulj na glukoznem in saharoznem gojišču bi lahko pripisali dejstvu, da je sev *A. aceti* LMG 1504^T sposoben sintetizirati polisaharid s podobno monomerno sestavo, vendar drugačnim razmerjem sladkorjev, kadar je gojen na glukoznem in saharoznem gojišču.

Pri tokovnih krivuljah izmerjenih v CF s pH 2,4 lahko opazimo, da so te viskoznosti pri istem gojišču višje kot pri CF s pH 7, kar je v skladu s prisotnostjo titrabilne skupine, ki jo ima glukuronska kislina prisotna v polisaharidu *A. acetii* LMG 1504^T(preglednica 4.6).

Graf 4.1c predstavlja tokovne krivulje zunajceličnega polisaharida seva *A. pomorum* LMG 18848^T, ki dosega najnižje vrednosti viskoznosti izmed vseh treh sevov. Vpliv tipa gojišča je pri tem sevu najvišji, kar se sklada z rezultati tankoplastne kromatografije, kjer smo ugotovili, da ta sev sintetizira različne monosaharide glede na vir sladkorja v gojišču (preglednica 4.6). Višje vrednosti viskoznosti ima polisaharid, ki je gojen na glukoznem gojišču. Nižje vrednosti pH pri nizkih strigih spremenijo interakcije med polimeri pri polisaharidu pridobljenem na saharoznem gojišču, pri visokih strigih pa se obe tokovni krivulji ustalita v enaki točki, kar nakazuje, da gre za enak material. Drugačno obnašanje tokovnih krivulj ponovno opazimo, kjer je bila kot vir sladkorja uporabljena glukoza. Pri kislem pH je viskoznost vzorca znatno višja ne glede na strižno hitrost.

Po analizi viskoznosti zunajceličnih polisaharidov smo preiskali še elastičnost materiala, kjer smo pri enaki frekvenci spreminjali amplitudo strižne deformacije in pridobili krivulje prikazane na grafu 4.2.



Graf 4.2: Elastični (G') in viskozni (G'') modul v odvisnosti od amplitude strižne deformacije 1,5 % (w/v) raztopine zunajceličnih polisaharidov, raztopljenih v CF-puftru (pH 2,4), pridobljenih iz biomase na glukoznih gojiščih RAE. Krivulje: polisaharid seva *K. oboediens* AV380 (zelena), *A. aceti* LMG 1504^T (vijolična) in *A. pomorum* LMG 18848^T (oranžna). LVO (linearno viskoelastično območje) je definirano kot območje, v katerem ne pride do porušitve prostorske strukture polisaharidnega prepleta.

Iz grafa 4.2 lahko izberemo, da rezultati prikazujejo tri različne snovi. Zeleni krivulji predstavljata 1,5 % (w/v) raztopino zunajceličnega polisaharida v puftru CF (pH 2,4), ki ga tvori sev *K. oboediens* AV380, kadar je gojen na glukoznem gojišču RAE. Iz zelenih krivulj lahko razberemo, da je ta zunajcelični polisaharid viskoelastična trdna snov, ki ima v začetnem območju deformacije višje vrednosti elastičnega modula (G') kot pa viskoznega modula (G''). Rdečo označena točka predstavlja zadnjo vrednost linearnega viskoelastičnega območja. Do te točke so deformacije reverzibilne. Zunajcelični polisaharid seva *K. oboediens* AV380 ima

največje vrednosti LVO, kar nakazuje, da material prenese večje deformacije. Z višanjem strižne deformacije prihaja do ireverzibilnih strukturnih sprememb zunajceličnega polisaharida, kar vodi v razpad mreže zunajceličnega polisaharida. Do popolnega razpada strukture pride pri deformaciji, ko sta vrednosti za viskozni in elastični modul enaki (presečišča krivulj na grafu 4.2). Razlika med končno in začetno vrednostjo strižne deformacije, pri kateri se struktura začne rušiti, kaže na plastičnost oz. krhkost strukture (območje med presečiščem in rdečo točko na grafu 4.2). Glede na dobljene rezultate, je struktura zunajceličnega polisaharida seva *K. oboediens* najmočnejša od vseh treh testiranih sevov, saj se začne rušiti in potem dokončno razpade pri najvišjih amplitudah strižne deformacije (graf 4.2). Zraven tega so absolutne vrednosti obeh modulov pri tem sevu najvišje, kar pomeni, da je za strižno deformacijo potrebno največ energije.

Rumeni krivulji v grafu 4.2 predstavljata 1,5 % raztopino zunajceličnega polisaharida v pufru CF (pH 2,4), ki ga tvori sev *A. pomorum* LMG 18848^T, kadar je v rastnem gojišču prisotna glukoza. Iz krivulj lahko razberemo, da predstavljata zunajcelični polisaharid viskoelastično trdno snov, ki ima v začetnem območju deformacije višje vrednosti elastičnega modula (G') v primerjavi z viskoznim modulom (G''). Vendar je raztopina polisaharida, ki ga tvori *A. pomorum* LMG 18848^T, bistveno manj elastična in viskozna kot raztopina polisaharida, ki ga tvori sev *K. oboediens* AV380 (graf 4.2). Območje LVO, ki predstavlja območje reverzibilnih deformacij, je prav tako krajše, kot pri sevu *K. oboediens* AV380, kar nakazuje, da material razpade že pri relativno nizkih strižnih deformacijah.

Vijolični krivulji (graf 4.2) predstavljata 1,5 % raztopino zunajceličnega polisaharida v pufru CF (pH 2,4), ki ga tvori sev *A. aceti* LMG 1504^T, kadar je v rastnem gojišču kot vir sladkorja uporabljena glukoza. Iz vijoličnih krivulj je razvidno, da ima zunajcelični polisaharid slabo strukturno stabilnost, saj so logaritemske vrednosti viskoznega in elastičnega modula pri tem polisaharidu do 100-krat nižje kot pri polisaharidu pridobljenem iz seva *K. oboediens* AV380 (graf 4.2). Zaradi višjih vrednosti viskoznega modula (G''), ki prevladajo nad celotnim območjem strižne deformacije in manjših vrednostih elastičnega modula (G'), lahko snov uvrstimo med viskoelastične tekočine. Območje LVO je najkrajše od vseh testiranih sevov in nakazuje, da lahko material prenese zelo nizke vrednosti deformacije preden se njegova prostorska struktura poruši.

5 RAZPRAVA

V magistrskem delu smo raziskovali vpliv dveh različnih virov sladkorja na sestavo in reološke lastnosti zunajceličnih polisaharidov izbranih sevov OKB. Raziskovanje sestave in reoloških značilnosti bakterijskih zunajceličnih polisaharidov je zanimivo, saj lahko te polisaharide uporabljamo v medicini, farmacevtski, živilski in kozmetični industriji. Tudi sestava gojišča, predvsem vir ogljika, lahko vpliva na sestavo zunajceličnih polisaharidov. Brandt in sodelavci (2018) so pri gojenju seva *K. baliensis* NBRC 16680 na različnih virih sladkorja ugotovili sintezo polisaharidov s podobno monomerno sestavo, vendar so se polisaharidi med seboj razlikovali po reoloških in makromolekularnih lastnostih. Pri sevu *K. xylinus* I-2281 je Kornmann s sodelavci (2003) pokazal, da na glukoznem in fruktoznem gojišču le-ta sintetizira acetanu podoben polisaharid (glukonacetan), medtem ko na saharoznem gojišču ob glukonacetanu sintetizira še manjše količine levana.

Preiskani sevi v naši raziskavi (*A. aceti* LMG 1504^T, *K. pomaceti* T5K1, *A. pomorum* LMG 18848^T, *K. rhaeticus* LMG 22126^T, *A. estunensis* AV371, *K. oboediens* AV380, *Komagataeibacter* sp. AV394 in *Komagataeibacter* sp. AV436) so tvorili biofilm na glukoznem in saharoznem gojišču RAE. Iz pridobljenih biofilmov smo izolirali in očistili vodotopne zunajcelične polisaharide. Dva seva (*A. pomorum* LMG 18848^T in *A. estunensis* AV371) sta pri uporabljenih razmerah gojenja sintetizirala različni zunajcelični polisaharid na glukoznem in saharoznem gojišču RAE. Primerjava monomerne sestave je namreč pokazala, da je sev *A. pomorum* LMG 18848^T v gojišču RAE z glukozo tvoril zunajcelični polisaharid, ki ni vsebovali glukuronske kisline, v prisotnosti saharoze pa je isti sev sintetiziral polisaharid z glukuronsko kislino. V primeru seva *A. estunensis* AV371 so se zunajcelični polisaharidi pridobljeni v glukoznem in saharoznem gojišču RAE razlikovali v kar dveh monomerih (fruktozi in ramnozi).

Poleg vpliva na monomerno sestavo, lahko uporabljen vir ogljika v gojišču vpliva tudi na količino proizvedenih zunajceličnih polisaharidov. Do podobnih ugotovitev so prišli Degeest in sod. (2002) in Escalante in sod. (2002), ki poročajo, da je vir ogljika vplival na skupno količino proizvedenega polisaharida pri *Streptococcus thermophilis*. Kornmann in sodelavci (2003) so ugotovili, da na saharoznem gojišču sev *K. xylinus* I-2281 producira največ acetanu podobnega

zunajceličnega polisaharida, najmanj pa na gojiščih, kjer je glavni vir sladkorja glukoza. Pri naših sevih tega trenda nismo zaznali.

Raziskovali smo tudi raznolikost heteropolisaharidov. Acetanu podoben polisaharid smo našli samo pri sevu *A. estunensis* AV371, kadar je bil gojen na glukoznem gojišču. Na saharoznem gojišču pa je isti sev tvoril še neraziskan polisaharid, sestavljen iz monomernih enot fruktoze, glukoze, manoze in glukuronske kisline. Takšno sestavo monomernih enot smo opazili samo pri tem sevu. Zanimivo je tudi to, da z analizo PCR pri sevu *A. estunensis* AV371 nismo uspeli pomnožiti genov za sintezo acetana, levana in celuloze. Raziskave so pokazale, da je v ozadju fenotipske nestabilnosti pri očetnokislinskih bakterijah najpogosteje genetska nestabilnost, ki jo povzročajo spontane mutacije in preureditve genoma. Številna različna vstavitvena zaporedja (angl. insertion sequences (IS)) so našli v genomih predstavnikov rodu *Komagataeibacter*. Ta so povezana s prenehanjem sinteze acetana in/ali pričetkom sinteze acetanu podobnih polisaharidov (Ryngajłto in sod., 2019). Z mutacijo v genomu v predelu prileganja uporabljenih začetnih oligonukleotidov ali preureditvijo genoma bi lahko razložili dejstvo, da pri sevu *A. estunensis* AV371 nismo uspeli dobiti PCR-pomnožkov. Za natančnejšo analizo bi morali analizirati genomsko zaporedje tega seva. Vrste iz rodu *Komagataeibacter* nosijo skupek genov, ki so odgovorni za biosintezo acetana. Ti geni so sorodni dobro okarakterizirani skupini genov, ki kodirajo zapis za sintezo zunajceličnega polisaharida ksantana (*gum*) pri bakteriji *X. campestris* (Brandt in sod., 2016). Ne samo rod *Komagataeibacter*, tudi predstavniki rodov *Gluconacetobacter* (*Gluconacetobacter diazotrophicus*) in *Kozakia* (*K. baliensis*) vsebujejo podobne skupine genov, ki sodelujejo pri sintezi topnih zunajceličnih heteropolisaharidov (Brandt in sod., 2016). Ryngajłto in sodelavci (2019) so v genomu seva *K. xylinus* E25 odkrili skupino kar 17 različnih genov, ki sodelujejo pri sintezi acetana. Ti geni so popolnoma odsotni pri sevu *K. europaeus* LMG 18494, pri 3 sevih vrste *K. hansenii* pa je odsotna večina teh genov; med drugim tudi gen *aceA*, ki bi naj bil pomemben za prvi korak pri sintezi acetana (Valepyn in sod., 2012). Kljub pomanjkanju vseh ali večine teh genov, pa nekateri sevi teh dveh vrst sintetizirajo zunajcelične polisaharide s podobno sestavo, kot jo ima acetan (Fang in Catchmark, 2014, 2015; Valepyn in sod., 2012). To se ujema z našimi rezultati pri sevu *A. estunensis* AV371, kateri ne vsebuje gena *aceA*, vendar je prav tako sposoben tvorbe acetanu podobnega zunajceličnega polisaharida. Seva *K. pomaceti* T5K1 in *A. pomorum* LMG 18848^T prav tako ne vsebujeta gena *aceA*, vendar sta pri

uporabljenih razmerah namnoževanja sintetizirala v vodi topne polisaharide, ki po monomerni sestavi niso podobni acetanu. Pri sevu *A. acetii* LMG 1504^T smo z metodo PCR uspeli potrditi prisotnost genov *aceA* in *lev*. Zanimivo je to, da je sev proizvajal heteropolisaharid na gojišču z glukozo, kar je bilo pričakovano, in na gojišču s saharozo, kar nas je presenetilo. Encim levansaharaza (*lev*) je namreč odgovoren za biosintezo levana, kadar je v gojišču vir ogljika saharoza (Dağbağlı in Göksungur, 2017; Jakob in sod., 2012). Zato smo pričakovali, da bo v gojišču RAE s saharozo nastajal levan. A sev *A. acetii* LMG 1504^T pri uporabljenih razmerah namnoževanja levana ni sintetiziral. Za potrditev sinteze levana bi na kromatogramu (slika 4.9, sev 2) morali zaznati samo fruktozo. Zanimivo sestavo vodotopnih zunajceličnih polisaharidov smo opazili tudi pri sevu *K. oboediens* AV380. Na glukoznem, kakor tudi na saharoznem gojišču, je ta sev sintetiziral zunajcelični polisaharid, ki sestoji iz petih različnih monomernih enot (slika 4.10, preglednica 4.6). V literaturi nismo našli vira, ki bi navajal pri OKB zunajcelični polisaharid s tako številčno heterogeno monomerno sestavo.

V magistrski nalogi nas je poleg monomerne sestave polisaharidov zanimalo tudi, če obstajajo razlike v viskoelastičnosti med zunajceličnimi polisaharidi, pridobljenimi na glukoznem in saharoznem gojišču. Zaradi omejenih kapacitet za izolacijo zunajceličnih polisaharidov smo nadaljnje reološke meritve izvedli le pri treh sevih (*A. acetii* LMG 1504^T, *A. pomorum* LMG 18848^T in *K. oboediens* AV380), ki so na obeh gojiščih v uporabljenih razmerah namnoževanja sintetizirali največje količine zunajceličnih polisaharidov. Izbor sevov je temeljil tudi na monomerni sestavi vodotopnega zunajceličnega polisaharida: seva *A. acetii* LMG 1504^T in *K. oboediens* AV380 sta na obeh gojiščih tvorila polisaharid z enako monomerno sestavo, sev *A. pomorum* LMG 18848^T pa je na gojišču z glukozo sintetiziral zunajcelični polisaharid z drugačnimi monomeri kot na gojišču s saharozo (sliki 4.9 in 4.10, preglednica 4.6). Rastopine vseh testiranih zunajceličnih polisaharidov imajo različno monomerno sestavo glede na sev in izkazujejo psevdoplastičnost. Pri psevdoplastičnem obnašanju se polimeri z višanjem strižne hitrosti pričnejo orientirati v smeri toka in morebitni prepleti med njimi se začnejo razvozlavati. Razlike v krivuljah so lahko posledica razlik v razvejanosti polimerov, velikosti polimera, togosti ter interakciji med samimi polisaharidi (Benigar in sod., 2014), sintetiziranimi na glukoznem in saharoznem gojišču. Najvišjo viskoznost smo opazili pri raztopini zunajceličnih polisaharidov, ki jih je sintetiziral sev *K. oboediens* AV380 (graf 4.1a). Večinoma so bile pri posameznih sevih najbolj viskozne raztopine polisaharidov raztopljenih

v pufru CF s pH-vrednostjo 2,4, ki so jih izbrani sevi proizvajali, kadar smo jih gojili na glukoznem gojišču (graf 4.1a in 4.1c). Izjema je bil zunajcelični polisaharid, ki ga je proizvedel sev *A. acetii* LMG 1504^T, kjer smo pri nizki strižni hitrosti izmerili višjo viskoznost na gojišču s saharozo (graf 4.1). To bi lahko pomenilo, da sevi na glukoznem gojišču producirajo zunajcelične polisaharide z večjim deležem glukuronske kisline, kar daje polisaharidu negativen naboj. Z dodatkom CF pufra pH 2,4 pa lahko višja koncentracija protonov nevtralizira odbojnost negativno nabitih sladkorjev, kar pa posledično vodi do višje viskoznosti. Zanimivo je, da pri sevu *A. pomorum* LMG 18848^T, kadar je bil gojen na glukoznem gojišču, nismo zaznali glukuronske kisline v sestavi zunajceličnih polisaharidov, kljub temu pa je ta polisaharid imel večjo viskoznost od polisaharida pridobljenega na saharoznem gojišču, ki vsebuje glukuronsko kislino (slika 4.9, preglednica 4.6) in je bil hkrati občutljiv na pH. To nakazuje na prisotnost bodisi nabitih monosharidov, ki jih sicer s TLC v izolatu glukoznega gojišča nismo opazili (preglednica 4.6) ali pa na prisotnost nečistoč, kot so npr. DNA ali proteini. Za bolj natančno določitev monomerne sestave bi zato morali v prihodnosti uporabiti metodo HPLC in preveriti čistost vzorca z UV/Vis spektroskopijo.

Trenutno najbolj pogosto uporabljen zunajcelični polisaharid bakterijskega izvora je ksantan. Reinoso in sodelavci (2019) so proučili viskoelastične lastnosti tega polimera. Ugotovili so, da 1 % raztopina ksantana v destilirani vodi tvori izredno močno viskozno raztopino pri nizkih in visokih strigih, podobno kot 1,5 % raztopina polisaharida izoliranega iz seva *K. oboediens* AV380, ki smo jo preučevali v naši raziskavi. Najpomembnejše reološke lastnosti ksantana so visoka viskoznost pri nizkih in visokih strigih, izrazita psevdoplastičnost in dobra odpornost proti strižni deformaciji. Te lastnosti dajejo veliko prednost proizvajalcem živil, saj s povečanjem strižne hitrosti pride do zmanjšanja viskoznosti materiala, kar pa omogoča prehranskim izdelkom, da postanejo bolj mešljivi, enostavni za vlivanje, črpanje in obdelavo. Te psevdoplastične lastnosti ksantana so bolj izrazite kot pri drugih polisaharidih (guarjev gumi, rožičev gumi, in hidroksietil celuloza), kar pa lahko pripišemo njegovi edinstveni togi, paličasti konformaciji (Song in sod., 2006). Polisaharid seva *K. oboediens* AV380 ima najbolj strm naklon krivulj izmed vseh treh testiranih sevov. Naklon tokovne krivulje polisaharida v pufru CF pri pH 2,4, seva *K. oboediens* AV380, gojenega na glukozni, znaša na dvojnem logaritemskem grafu -0,70 in se najbolj približa naklonu 1 % raztopine ksantana, redčenega z destilirano vodo, ki znaša približno -0,85 (Reinoso in sod., 2019). Zato obstaja možnost, da polisaharid seva *K.*

oboediens AV380 zavzema podobno togo konformacijo in se tako z višanjem strižne deformacije rušijo podobne strukture kot pri ksantanu. Zaradi izrazite psevdoplastičnosti lahko predstavlja zunajcelični polisaharid seva *K. oboediens* AV380 potencialno gostilo in/ali stabilizator za industrijsko uporabo.

Poleg viskoznosti smo pri istih sevih testirali še elastičnost 1,5 % raztopine zunajceličnih polisaharidov, raztopljenih v pufru CF (pH 2,4). Elastičnost smo določili samo polisaharidom, ki so bili pridobljeni na gojišču z glukozo, saj so ti polisaharidi imeli višjo viskoznost. Zaradi omejenih kapacitet pri izolaciji smo se morali omejiti na manjše število meritev. Največje vrednosti elastičnega (G') in viskoznega modula (G''), kakor tudi linearno viskoelastično območje (LVO) smo ponovno opazili pri zunajceličnem polisaharidu seva *K. oboediens* AV380. Na grafu 4.2 lahko opazimo, da 1,5 % raztopina polisaharida seva *K. oboediens* AV380 in seva *A. pomorum* LMG 18848^T, pod danimi pogoji tvorita viskoelastično trdno snov, medtem ko 1,5 % raztopina polisaharida seva *A. acetii* LMG 1504^T tvori viskoelastično tekočino. Potencialno uporabna v industrijske namene bi lahko bila 1,5 % raztopina zunajceličnega polisaharida seva *K. oboediens* AV380. V primerjavi z 1 % raztopino ksantana v destilirani vodi, pa imata ksantan in naš polisaharid podobno območje reverzibilnih deformacij oz. LVO (graf 4.2) (Song in sod., 2006). Zunajcelični polisaharid seva *K. oboediens* AV380 izkazuje med testiranimi polisaharidi v naši raziskavi najširše območje reverzibilnih deformacij, kakor tudi najkasnejši razpad mreže polimera. Razpad mreže polimera opazimo šele pri 100 % vrednostih amplitude strižne deformacije. Enako so ugotovili za 1 % raztopino ksantana (Song in sod., 2006). Glede na absolutne vrednosti modulov pa za 1 % raztopino ksantana potrebujemo približno 10-krat več energije (Song in sod., 2006) v primerjavi s 1,5 % raztopino polisaharida seva *K. oboediens* AV380, da dosežemo enako deformacijo. Da bi ugotovili, če to predstavlja prednost ali slabost v industrijskih procesih, je potrebno izvesti več raziskav, ki so bolj specifične za potrebe industrijskega obrata in tarčnega izdelka (Song in sod., 2006; Reinoso in sod., 2019)

V tej raziskavi največje prednosti vidimo pri zunajceličnem polisaharidu, ki ga sintetizira *K. oboediens* AV380. Z namenom natančne opredelitve reoloških lastnosti polisaharida bi bilo v bodoče smiselno izvesti dodatne raziskave, kot so: HPLC (angl.: high-performance liquid chromatography, slov.: tekočinska kromatografija visoke ločljivosti) za natančnejšo

identifikacijo monomerne kompozicije polisaharida, metoda intrinzične viskoznosti, ki opisuje prostornino ene verige polimera, UV/Vis spektroskopijo za preverjanje čistosti vzorca, metodo FTIR (angl.: Fourier-transform infrared spectroscopy, slov.: infrardeča spektroskopija s Fourierovo transformacijo) za analizo kemijskih vezi med molekulami in metodo SLS (angl.: static light scattering, slov.: statično sipanje svetlobe) za določanje molekulske mase polimera. Za industrijsko uporabo je pomembno dobro razumevanje strukture zunajceličnega polisaharida, pogojev sinteze in interakcije polisaharida s potencialnimi produkti. Zato bi bilo v prihodnje smiselno raziskati odziv polisaharida na povišane temperature in različne vrednosti pH.

6 SKLEPI

Na osnovi rezultatov te raziskave smo prišli do naslednjih zaključkov:

1. 25 izmed 83 preiskanih sevov OKB, izoliranih v predhodnih raziskavah iz industrijskih procesov proizvodnje naravnega jabolčnega kisa slovenskega podjetja Apis-Vita, proizvaja biofilm na glukoznem gojišču RAE.
2. Štirje izbrani sevi iz industrijske proizvodnje kisa (*A. estunensis* AV371, *K. oboediens* AV380, *Komagataeibacter* sp. AV394 in *Komagataeibacter* sp. AV436) in štirje tipski sevi (*A. aceti* LMG 1504^T, *K. pomaceti* T5K1^T, *A. pomorum* LMG 18848^T, *K. rhaeticus* LMG 22126^T) tvorijo biofilm na glukoznem in na saharoznem gojišču RAE.
3. Med preiskanimi sevi OKB so tudi takšni, katerih monomerna sestava očiščenih zunajceličnih polisaharidov, preiskana s tankoplastno kromatografijo, se razlikuje, s čimer smo potrdili delovno hipotezo 1.
4. Med preiskanimi polisaharidi sta bila tudi takšna, pri katerih je vir sladkorja v gojišču za namnoževanje bakterij vplival na sestavo očiščenih zunajceličnih polisaharidov, s čimer smo potrdili delovno hipotezo 2.
5. Očiščeni zunajcelični polisaharidi izbranih sevov OKB so imeli različne reološke lastnosti. S tem smo potrdili delovno hipotezo 3.
6. Viskoznost zunajceličnih polisaharidov, gojenih na glukoznem gojišču, je bila drugačna od tistih, pridobljenih po namnoževanju bakterij na saharoznem gojišču, s čimer smo potrdili delovno hipotezo 4.

7 POVZETEK

V tej magistrski nalogi smo delno okarakterizirali kemijsko-fizikalne lastnosti zunajceličnih polisaharidov, pridobljenih iz 8 sevov ocatnokislinskih bakterij, gojenih na glukoznem in saharoznem gojišču RAE.

Začeli smo z revitalizacijo sevov OKB iz zbirke mikroorganizmov Oddelka za biologijo FNM UM in preverili, če tvorijo biofilm na glukoznem gojišču RAE po 5-tih dneh inkubacije pri 30 °C. Od 83 testiranih sevov pridobljenih iz industrijskih procesov proizvodnje naravnega jabolčnega kisa slovenskega podjetja Apis Vita jih je 25 produciralo značilen biofilm. Raziskavo smo nadaljevali s 4 sevi, ki so bili sposobni tvorbe vsaj 0,7 mg zunajceličnega polisaharida iz 10 ml začetne biomase, kar je bilo povezano z našimi omejitvami pri čiščenju polisaharida, zaradi majhnih volumnov v centrifugi s hlajenjem. K raziskavi smo nato dodali 4 referenčne tipse seve OKB iz mednarodnih zbirk mikroorganizmov, ki sintetizirajo večje količine zunajceličnih polisaharidov. Nato smo skupno 8 sevov inkubirali še na saharoznem gojišču RAE za 5 dni pri 30 °C ter ocenili tvorbo biofilma. Vseh 8 sevov je ne glede na vir ogljika v gojišču produciralo enako debel biofilm. Sledile so molekulske analize, pri katerih smo preverjali prisotnost najbolj značilnih genov za sintezo acetana, levana in celuloze. Pri enem sevu smo identificirali gen za sintezo acetana in levana, pri štirih gen za sintezo celuloze in acetana, pri dveh pa samo gen za sintezo celuloze. En sev, *A. estunensis* AV371, pa ni vseboval nobenega od treh genov, čeprav je v uporabljenih razmerah sintetiziral biofilm in v vodi topen zunajcelični polisaharid. Sledilo je pridobivanje biofilmov za izolacijo in čiščenje polisaharidov. Vsi sevi so, ne glede na prisotnost prej omenjenih genov in na vir sladkorja v gojišču, bili sposobni sintetizirati zunajcelične polisaharide v različnih količinah. Sev *Komagataeibacter* sp. AV394 je na saharoznem gojišču sintetiziral izredno majhne količine v vodi topnega zunajceličnega polisaharida, kljub več ponovitvam izolacije. Po pridobitvi očiščenih polisaharidov je sledila hidroliza za analizo monosaharidne sestave polisaharidov. Monomerno sestavo smo po hidrolizi preiskali s tankoplastno kromatografijo s primerjavo s sladkornimi standardi (fruktoza, ramnoza, glukoza, manoza, galaktoza, glukuronska kislina). Zunajcelični polisaharidi sevov *A. aceti* LMG 1504^T, *K. pomaceti* T5K1^T, *K. rhaeticus* LMG 22126^T in *Komagataeibacter* sp. AV436 so na glukoznem in saharoznem gojišču imeli enako

monomerno sestavo sladkorjev (prisotni vsi sladkorji razen galaktoze). Edini sev iz rodu *Komagataeibacter*, ki je sintetiziral heteropolisaharid, ki je vseboval tudi galaktozo, je bil *K. oboediens* AV380. Razlike v sestavi zunajceličnih polisaharidov po namnoževanju na različnih gojiščih smo opazili pri sevih *A. pomorum* LMG 18848^T in *A. estunensis* AV371. Zunajcelični polisaharid seva *A. pomorum* LMG 18848^T je na glukoznem gojišču sintetizira heteropolisaharid, sestavljen iz ramnoze, manoze in galaktoze, na saharoznem pa polisaharid, ki je poleg že navedenih monosaharidov vseboval še glukuronsko kislino. Zunajcelični polisaharid seva *A. estunensis* AV371 na glukoznem gojišču sintetizira acetanu podoben polisaharid, saj je monomerna analiza pokazala vsebnost ramnoze, glukoze, manoze in glukuronske kisline. Na saharoznem gojišču pa je tvoril polisaharid z drugačno monosaharidno sestavo.

Reološke analize smo zaradi zelo omejenih možnosti uporabe centrifuge s hlajenjem za izolacijo in čiščenje polisaharidov lahko izvedli le pri polisaharidih iz treh sevov (*A. aceti* LMG 1504^T, *A. pomorum* LMG 18848^T in *K. oboediens* AV380), saj so ti sevi pri uporabljenih razmerah sintetizirali največ zunajceličnih polisaharidov (od 1-10 mg). Opravili smo rotacijski test za merjenje viskoznosti in amplitudni test za merjenje elastičnosti, preiskali linearno viskoelastično območje ter ocenili vrsto materiala glede na njegove reološke lastnosti. Vsak polisaharid, pridobljen na glukoznem in saharoznem gojišču smo redčili s citratno-fosfatnim pufrom (vrednosti pH 2,4 in 7) do 1,5 % koncentracije. Vsi polisaharidi so pri danih razmerah kazali psevdoplastično obnašanje. Največjo viskoznost smo ugotovili pri sevu *K. oboediens* AV380, bistveno nižje vrednosti viskoznosti pa pri sevih *A. aceti* LMG 1504^T in *A. pomorum* LMG 18848^T. Večinoma smo opazili, da imajo njihovi polisaharidi največjo viskoznost, kadar so gojeni na glukoznem gojišču in tretirani s citratno-fosfatnim pufrom pri vrednosti pH 2,4. Zato smo s temi tremi vzorci nadaljevali test elastičnosti. Seva *A. pomorum* LMG 18848^T in *K. oboediens* AV380 sta pri danih razmerah tvorila viskoelastično trdno snov, sev *A. aceti* LMG 1504^T pa viskoelastično tekočino. Sev *K. oboediens* AV380 je imel največje viskoelastično območje, do razpada prostorske strukture polisaharidne mreže je prišlo šele pri večjih deformacijah. Največji potencial za morebitno uporabo polisaharida v industrijske namene tako vidimo pri sevu *K. oboediens* AV380. Za natančno karakterizacijo tega polisaharida pa so potrebne dodatne analize, kot so analiza monosaharidne sestave z metodo HPLC,

karakterizacija polisaharida z metodo FTIR in SLS, analiza intrinzične viskoznosti pri različnih temperaturah, pH-vrednostih in različnih koncentracijah.

VIRI IN LITERATURA

- Ahmad, N. H., Ahmed, J., Hashim, D. M., Manap, Y. A., Mustafa, S. (2015). Oscillatory and steady shear rheology of gellan/dextran blends. *Journal of food science and technology*, 52(5), 2902-2909.
- Ahmad, N. H., Mustafa, S., Che Man, Y. B. (2015). Microbial polysaccharides and their modification approaches: a review. *International journal of food properties*, 18(2), 332-347.
- Ali, I. A. I., Akakabe, Y., Moonmangmee, S., Deeraksa, A., Matsutani, M., Yakushi, T., Matsushita, K. (2011). Structural characterization of pellicle polysaccharides of *Acetobacter tropicalis* SKU1100 wild type and mutant strains. *Carbohydrate polymers*, 86(2), 1000-1006.
- Ates, O. (2015). Systems biology of microbial exopolysaccharides production. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 3, 200.
- Benigar, E., Dogsa, I., Stopar, D., Jamnik, A., Cigić, I. K., Tomšič, M. (2014). Structure and dynamics of a polysaccharide matrix: aqueous solutions of bacterial levan. *Langmuir*, 30(14), 4172-4182.
- Bhavani, A. L., Nisha, J. (2010). Dextran—the polysaccharide with versatile uses. *Int J Pharm Biol Sci*, 1(4), 569-573.
- Brandt, J. U., Jakob, F., Behr, J., Geissler, A. J., Vogel, R. F. (2016). Dissection of exopolysaccharide biosynthesis in *Kozakia baliensis*. *Microbial cell factories*, 15(1), 170.
- Brandt, J. U., Jakob, F., Wefers, D., Bunzel, M., Vogel, R. F. (2018). Characterization of an acetan-like heteropolysaccharide produced by *Kozakia baliensis* NBRC 16680. *International journal of biological macromolecules*, 106, 248-257.

- Cai, Z., Zhang, H. (2017). Recent progress on curdlan provided by functionalization strategies. *Food hydrocolloids*, 68, 128-135.
- Castro, C., Zuluaga, R., Putaux, J.L., Caro, G., Mondragon, I., Gañán, P. (2011). Structural Characterization of Bacterial Cellulose Produced by *Gluconacetobacter swingsii* sp. From Colombian Agroindustrial Wastes. *Carbohydrate Polymers*, 84(1), 96–102.
- Chen, P., Cho, S. Y., Jin, H. J., (2010). Modification and Applications of Bacterial Celluloses in Polymer Science. *Macromolecular Research* 18, 309–320.
- Cheng, K. C., Demirci, A., Catchmark, J. M. (2011). Pullulan: biosynthesis, production, and applications. *Applied microbiology and biotechnology*, 92(1), 29.
- Conti, E., Flaibani, A., O'Regan, M., Sutherland, I. W. (1994). Alginate from *Pseudomonas fluorescens* and *P. putida*: production and properties. *Microbiology*, 140(5), 1125-1132.
- Dağbağlı, S., Göksungur, Y. (2017). Exopolysaccharide production of acetic acid bacteria. In *Acetic Acid Bacteria* (pp. 120-141). CRC Press.
- Degeest, B., Mozzi, F., De Vuyst, L. (2002). Effect of medium composition and temperature and pH changes on exopolysaccharide yields and stability during *Streptococcus thermophilus* LY03 fermentations. *International journal of food microbiology*, 79(3), 161-174.
- Dogša, I., Brložnik, M., Stopar, D., Mandic-Mulec, I. (2013). Exopolymer diversity and the role of levan in *Bacillus subtilis* biofilms. *PLoS one*, 8(4), e62044.
- Douglas, J. (2018). Weak and strong gels and the emergence of the amorphous solid state. *Gels*, 4(1), 19.

- Edwards, K. J., Jay, A. J., Colquhoun, I. J., Morris, V. J., Gasson, M. J., Griffin, A. M. (1999). Generation of a novel polysaccharide by inactivation of the aceP gene from the acetan biosynthetic pathway in *Acetobacter xylinum*. *Microbiology*, *145*(6), 1499-1506.
- Esa, F., Tasirin, S. M., Rahman, N. A. (2014). Overview of bacterial cellulose production and application. *Agriculture and Agricultural Science Procedia*, *2*, 113-119.
- Escalante, A., Villegas, J., Wachter, C., García-Garibay, M., Farrés, A. (2002). Activity of the enzymes involved in the synthesis of exopolysaccharide precursors in an overproducing mutant ropy strain of *Streptococcus thermophilus*. *FEMS microbiology letters*, *209*(2), 289-293.
- Fang, L., Catchmark, J. M. (2014). Characterization of water-soluble exopolysaccharides from *Gluconacetobacter xylinus* and their impacts on bacterial cellulose crystallization and ribbon assembly. *Cellulose*, *21*(6), 3965-3978.
- Fang, L., Catchmark, J. M. (2015). Characterization of cellulose and other exopolysaccharides produced from *Gluconacetobacter* strains. *Carbohydrate polymers*, *115*, 663-669.
- Flemming, H. C., Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. *Nature reviews microbiology*, *8*(9), 623.
- Giavasis, I., Harvey, L. M., McNeil, B. (2000). Gellan gum. *Critical reviews in biotechnology*, *20*(3), 177-211.
- Gorgieva, S., Trček, J. (2019). Bacterial cellulose: Production, modification and perspectives in biomedical applications. *Nanomaterials*, *9*(10), 1352.
- Griffin, A. M., Morris, V. J., Gasson, M. J. (1994). Genetic analysis of the acetan biosynthetic pathway in *Acetobacter xylinum*. *International journal of biological macromolecules*, *16*(6), 287-289.

- Griffin, A. M., Morris, V. J., Gasson, M. J. (1996a). Genetic analysis of the acetan biosynthetic pathway in *Acetobacter xylinum*: nucleotide sequence analysis of the aceB aceC aceD and aceE genes. *DNA Sequence*, 6(5), 275-284.
- Griffin, A. M., Morris, V. J., Gasson, M. J. (1996b). Identification, cloning and sequencing the *aceA* gene involved in acetan biosynthesis in *Acetobacter xylinum*. *FEMS microbiology letters*, 137(1), 115-121.
- Hundscheil, C. S., Wagemans, A. M. (2019). Rheology of Common Uncharged Exopolysaccharides for Food Applications. *Current Opinion in Food Science*.
- Ishida, T., Sugano, Y., Nakai, T., SHODA, M. (2002). Effects of acetan on production of bacterial cellulose by *Acetobacter xylinum*. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 66(8), 1677-1681.
- Ishida, T., Sugano, Y., Shoda, M. (2002). Novel glycosyltransferase genes involved in the acetan biosynthesis of *Acetobacter xylinum*. *Biochemical and biophysical research communications*, 295(2), 230-235.
- Jakob, F., Pfaff, A., Novoa-Carballal, R., Rübsam, H., Becker, T., Vogel, R. F. (2013). Structural analysis of fructans produced by acetic acid bacteria reveals a relation to hydrocolloid function. *Carbohydrate polymers*, 92(2), 1234-1242.
- Jakob, F., Steger, S., Vogel, R. F. (2012). Influence of novel fructans produced by selected acetic acid bacteria on the volume and texture of wheat breads. *European Food Research and Technology*, 234(3), 493-499.
- Jančič, N. Sestava in viskoelastične lastnosti zunajceličnih polisaharidov pri izbranih sevih oacetnokislinskih bakterij. Mag. delo, Univerza v Mariboru, Fakulteta za naravoslovje in matematiko, Oddelek za biologijo, 2019. Pridobljeno s: <https://dk.um.si/Dokument.php?id=133690>

- Jindal, N., Khattar, J. S. (2018). Microbial polysaccharides in food industry. In *Biopolymers Joyeux for Food Design* (pp. 95-123). Academic Press.
- Joyeux, A., Lafon-Lafourcade, S., Riberau-Gayon, P. (1984). Evolution of acetic acid bacteria during fermentation and storage of wine. *Applied Environmental Microbiology*, 48(1), 153-156.
- Kanchanarach, W., Theeragool, G., Inoue, T., Yakushi, T., Adachi, O., Matsushita, K. (2010). Acetic acid fermentation of *Acetobacter pasteurianus*: relationship between acetic acid resistance and pellicle polysaccharide formation. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 1007022033-1007022033.
- Kaur, V., Bera, M. B., Panesar, P. S., Kumar, H., Kennedy, J. F. (2014). Welan gum: microbial production, characterization, and applications. *International journal of biological macromolecules*, 65, 454-461.
- Keshk, S. M. (2014). Bacterial cellulose production and its industrial applications. *Journal of Bioprocessing & Biotechniques*, 4(2), 1.
- Kornmann, H., Duboc, P., Marison, I., von Stockar, U. (2003). Influence of nutritional factors on the nature, yield, and composition of exopolysaccharides produced by *Gluconacetobacter xylinus* I-2281. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69(10), 6091-6098.
- Mezger, T. G. (2006). *The rheology handbook: for users of rotational and oscillatory rheometers*. Vincentz Network GmbH & Co KG.
- Nwodo, U. U., Green, E., Okoh, A. I. (2012). Bacterial exopolysaccharides: functionality and prospects. *International journal of molecular sciences*, 13(11), 14002-14015.
- Perumpuli, P. A. B. N., Watanabe, T., Toyama, H. (2014). Pellicle of thermotolerant *Acetobacter pasteurianus* strains: characterization of the polysaccharides and of the induction patterns. *Journal of bioscience and bioengineering*, 118(2), 134-138.

- Petri, D. F. (2015). Xanthan gum: A versatile biopolymer for biomedical and technological applications. *Journal of Applied Polymer Science*, 132(23).
- Piermaria, J. A., Mariano, L., Abraham, A. G. (2008). Gelling properties of kefiran, a food-grade polysaccharide obtained from kefir grain. *Food Hydrocolloids*, 22(8), 1520-1527.
- Poli, A., Anzelmo, G., Nicolaus, B. (2010). Bacterial exopolysaccharides from extreme marine habitats: production, characterization and biological activities. *Marine drugs*, 8(6), 1779-1802.
- Reinoso, D., Martin-Alfonso, M. J., Luckham, P. F., Martinez-Boza, F. J. (2019). Rheological characterisation of xanthan gum in brine solutions at high temperature. *Carbohydrate polymers*, 203, 103-109.
- Roca, C., Alves, V. D., Freitas, F., Reis, M. A. (2015). Exopolysaccharides enriched in rare sugars: bacterial sources, production, and applications. *Frontiers in microbiology*, 6, 288.
- Ryngajłto, M., Kubiak, K., Jędrzejczak-Krzepkowska, M., Jacek, P., Bielecki, S. (2019). Comparative genomics of the *Komagataeibacter* strains—Efficient bionanocellulose producers. *Microbiologyopen*, 8(5), e00731.
- Saibuatong, O. A., Phisalaphong, M., (2010). Novo Aloe Vera-Bacterial Cellulose Composite Film From Biosynthesis. *Carbohydrate Polymers*, 79(2), 455–460.
- Saichana, N., Matsushita, K., Adachi, O., Frebort, I., Frebortova, J. (2015). Acetic acid bacteria: A group of bacteria with versatile biotechnological applications. *Biotechnology Advances*, 33(6 Pt 2), 1260–1271.
- Sajna, K. V., Gottumukkala, L. D., Sukumaran, R. K., Pandey, A. (2015). White biotechnology in cosmetics. In *Industrial Biorefineries & White Biotechnology* (pp. 607-652). Elsevier.

- Shi, Z., Zhang, Y., Phillips, G. O., Yang, G. (2014). Utilization of bacterial cellulose in food. *Food hydrocolloids*, 35, 539-545.
- Song, K. W., Kuk, H. Y., Chang, G. S. (2006). Rheology of concentrated xanthan gum solutions: Oscillatory shear flow behavior. *Korea-Australia Rheology Journal*, 18(2), 67-81.
- Srikanth, R., Reddy, C. H. S., Siddartha, G., Ramaiah, M. J., Uppuluri, K. B. (2015). Review on production, characterization and applications of microbial levan. *Carbohydrate polymers*, 120, 102-114.
- Stoodley, P., Lewandowski, Z., Boyle, J. D., Lappin-Scott, H. M. (1999). Structural deformation of bacterial biofilms caused by short-term fluctuations in fluid shear: An in situ investigation of biofilm rheology. *Biotechnology and bioengineering*, 65(1), 83-92.
- Suflet, D. M., Popescu, I., Pelin, I. M., Nicolescu, A., Hitruc, G. (2015). Cationic curdlan: Synthesis, characterization and application of quaternary ammonium salts of curdlan. *Carbohydrate polymers*, 123, 396-405.
- Suresh Kumar, A., Mody, K., Jha, B. (2007). Bacterial exopolysaccharides—a perception. *Journal of basic microbiology*, 47(2), 103-117.
- Štornik, A., Skok, B., Trček, J. (2016). Comparison of cultivable acetic acid bacterial microbiota in organic and conventional apple cider vinegar. *Food technology and Biotechnology*, 54(1), 113-119.
- Taban, B. M., Saichana, N. (2017). Physiology and biochemistry of acetic acid bacteria. In I. Y. Sengun (Ed.), *Acetic acid bacteria: Fundamentals and food applications* (pp. 71–91). Boca Raton, FL: CRC Press.
- Trček, J. (2014). Ocetnokislinske bakterije imajo številne zanimive lastnosti. *Proteus*, 76(5), 199-202.

- Trček, J., Mahnič, A., Rupnik, M. (2016). Diversity of the microbiota involved in wine and organic apple cider submerged vinegar production as revealed by DHPLC analysis and next-generation sequencing. *International Journal of Food Microbiology*, 223, 57-62.
- Trček, J., Mira, N. P., Jarboe, L. R. (2015). Adaptation and tolerance of bacteria against acetic acid. *Applied microbiology and biotechnology*, 99(15), 6215-6229.
- Trček, J., Teuber, M. (2002). Genetic and restriction analysis of the 16S-23S rDNA internal transcribed spacer regions of the acetic acid bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 208(1), 69-75.
- Valepyn, E., Berezina, N., Paquot, M. (2012). Optimization of production and preliminary characterization of new exopolysaccharides from *Gluconacetobacter hansenii* LMG1524. *Advances in Microbiology*, 2(04), 488.
- Valera, M. J., Torija, M. J., Mas, A., Mateo, E. (2015). Cellulose production and cellulose synthase gene detection in acetic acid bacteria. *Applied microbiology and biotechnology*, 99(3), 1349-1361.
- Velasco-Bedrán, H., López-Isunza, F. (2007). The unified metabolism of *Gluconacetobacter entanii* in continuous and batch processes. *Process Biochemistry*, 42(8), 1180-1190.
- Zannini, E., Jeske, S., Lynch, K. M., Arendt, E. K. (2018). Development of novel quinoa-based yoghurt fermented with dextran producer *Weissella cibaria* MG1. *International journal of food microbiology*, 268, 19-26.
- Zupančič-Valant, A. (2007). *Uvod v reologijo*. Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Ljubljana.