

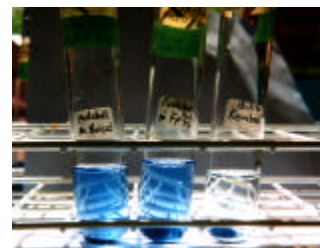
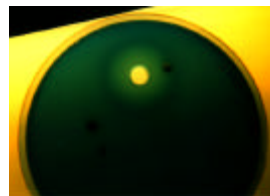
Indstilling af Adobe Acrobat Reader.



Tryk her, for at få vist et register, som kan bruges til at springe rundt i teksten med.

Tryk her, for at få vist en hel side ad gangen.

Du kan endvidere søge på alle ordene i teksten ved trykke på den lille kikkert i menubjælken, hvorefter der kan indtastes et søgeord.



A micrograph showing numerous rod-shaped bacteria, identified as Cytophaga hutchinsonii, scattered across a light-colored background. The bacteria are greenish-brown and vary in length and orientation. Some are single, while others are in small groups. The background has a speckled appearance with small, dark, circular spots.

**Cellulosedbrydende bakterier i jord
– Karakterisering af cellulaseaktivitet hos
*Cytophaga hutchinsonii***

Specialerapport

Annemette S. Sørensen

**Afdeling for Mikrobiel Økologi
Biologisk Institut
Aarhus Universitet
Marts 1999**

Tak til

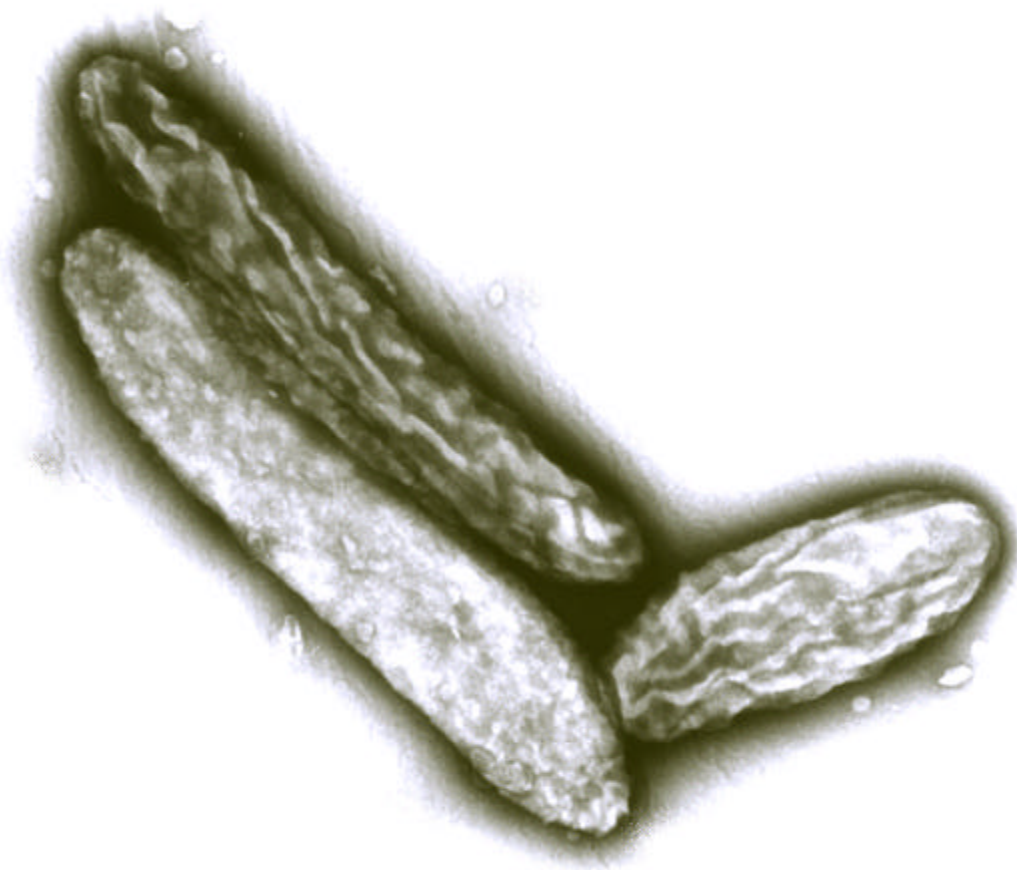
Jeg vil gerne takke alle, som har hjulpet mig i forbindelse med specialet.

Især tak til min vejleder Kjeld Ingvorsen for hans interesse i specialet og for at få mig til at fatte interesse for "kun" én bakterie!

En særlig tak til Tove Wiegers for hendes store hjælp med stort og småt i laboratoriet.

Også en stor tak til Michael Wainø, Jens T. Nielsen og specielt Annette N. Jensen for korrekturlæsning og brugbar kritik.

Sidst men ikke mindst, tak til Jan Bille for uvurderlig hjælp med alt vedrørende brug af computer.



Forside og denne side: *Cytophaga hutchinsonii*

Indholdsfortegnelse

Forord	1
Introduktion	2
Cellulose: struktur og mikrobiel nedbrydning	2
Cellulaser	4
Bakterier der danner cellulaser	8
Medier og substrater til detektion af cellulytiske bakterier	13
Introduktion	13
Vækst i et naturligt medie baseret på jordekstrakt tilsat indikatorsubstrater	14
Vækst på farvede og ufarvede substrater i defineret medie	19
Perspektivering	26
Optimering af vækstmedie for <i>Cytophaga hutchinsonii</i>	27
Enzymaktivitet.....	29
Introduktion	29
Exoglucanaseaktivitet	29
Filterpapirsaktivitet målt som reducerende sukre vha. Dinitrosalicylsyre-reagens (DNS-reagens).....	29
Filterpapirs- og Avicelase -aktivitet målt som reducerende sukre vha. Biquinolinreagens.....	34
Avicelaseaktivitet med RBB-Avicel.....	41
Perspektivering	46
Endoglucanaseaktivitet.....	47
CMCase aktivitet med RBB-CMC som substrat; forsøg med ændring af fældningsreagens.....	47
CMCase aktivitet i supernatant fra <i>Cytophaga hutchinsonii</i> , målt som reducerende sukre vha. Biquinolinreagens	49
Karakterisering af endoglucanaseaktivitet hos <i>Cytophaga hutchinsonii</i> vha. AZCL-HECellulose	55
Perspektivering	74
Resume	75
Litteraturliste.....	77
Appendix A: Tabeller	I
Appendix B: Medier og substrater	VII

Forord

Det oprindelige formål med specialet var "Tælling af cellulolytiske bakterier i landbrugsjord". Jeg ville på nogle udvalgte farvede og ufarvede cellulosesubstrater, hvor grundmediet var baseret på jordekstrakt, forsøge at isolere så mange forskellige typer af cellulolytiske bakterier som muligt.

Isolation af bakterier skulle foregå på agarplader med ét indbygget indikatorsubstrat, hvor med cellulolytisk aktivitet kunne detekteres direkte på pladerne. Basismediet i agarpladerne var jordekstrakt fra de jordprøver hvorfra der skulle udplades, ud fra den betragtning, at et medie som ligner det naturlige ville give det bedste indtryk af diversiteten.

Inden indsamling af diverse jordprøver blev sat i værk, ville jeg afprøve to almindelige, men fysiologisk meget forskellige aerobe cellulolytiske jordbakteriers evne til at vokse på substraterne. Den ene bakterie, *Cellulomonas uda*, er hurtigvoksende samt let at kultivere og den har extracellulære cellulaser. Den anden bakterie, *Cytophaga hutchinsonii*, vokser langsomt og er besværlig at kultivere; desuden anses den for ikke at være i besiddelse af extracellulære cellulaser. Det viste sig hurtigt, at *C. uda* voksede udmærket på de forskellige typer cellulosesubstrater og det var let at konstatere cellulolytisk aktivitet. *C. hutchinsonii* ville derimod overhovedet ikke gro på disse medier.

Mit oprindelige formål med at detektere flest mulige cellulolytiske bakterier fra jord blev herefter revideret til at undersøge hvorvidt jordekstrakt eller et defineret medie som basismedie i agarplader, med et indbygget indikatorsubstrat, kunne anvendes til at teste cellulolytisk aktivitet hos *Cellulomonas uda* og *Cytophaga hutchinsonii*. Ved at bruge et defineret basismedie (CY-agar) og tilsætte sukre (cellobiose eller glucose) sammen med et cellulosesubstrat lykkedes det at få vækst med *C. hutchinsonii* på agarplader.

Slægten *Cytophaga* er meget udbredt i naturen og er sandsynligvis en meget vigtig gruppe, der udgør store populationer. *Cytophaga*ernes evne til nedbrydning er varieret og ofte usædvanlig; herunder cellulosenedbrydning (Reichenbach, 1989). De kendte cellulolytiske stammer er beskrevet morfologisk og fysiologisk, hovedsageligt i ældre undersøgelser fra 40'erne, men der findes ikke mange rapporterede opgørelser over deres cellulolytiske formåen. *Cytophaga hutchinsonii* er beskrevet helt tilbage i 1929, men der er mig bekendt aldrig rapporteret studier vedr. de cellulolytiske enzymer hos denne bakterie.

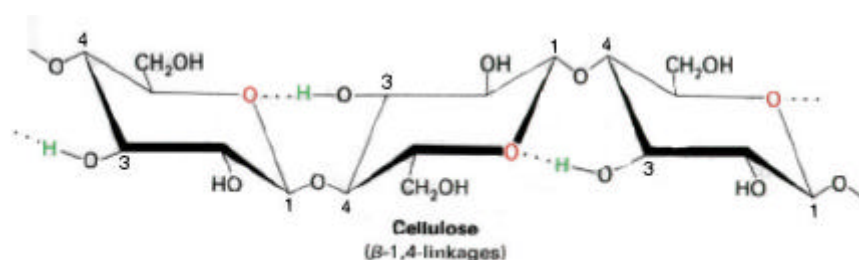
Hovedformålet med specialet blev herefter, at undersøge *Cytophaga hutchinsonii* nærmere med hensyn til cellulaseaktiviteter. Jeg afprøvede forskellige metoder til måling af exo- og endo-cellulaseaktiviteter, hvortil der blev anvendt forskellige cellulosesubstrater og der blev gjort forsøg på at optimere hydrolyseaktiviteterne.

Introduktion

Cellulose er kvantitativt den vigtigst forekommende organiske forbindelse idet den udgør over halvdelen af alt organisk kulstof i biosfæren. Man anslår, at 10^{15} kg cellulose syntetiseres og nedbrydes hvert år på jorden (Stryer, 1988). Den største del af cellulosen findes i cellevægge hos planter, hvor ca. halvdelen af biomassen er cellulose (Ljungdahl and Eriksson, 1985; Richmond, 1991). Cellulose forekommer også i begrænset omfang blandt svampe, bakterier, invertebrater og protister (Richmond, 1991). Andre vigtige komponenter i plantebiomassen er hemicellulose og lignin (hos højere planter og bregner). Hemicellulose er en heteropolymer, som danner brintbindinger med cellulose og lignin (Brock et al., 1994). Lignin er en aromatisk polymer, der forstærker cellevæggen og danner et stift træagtigt væv til modvirkning af tyngdekraften. Lignin er meget modstandsdygtig overfor biologisk nedbrydning.

Cellulose: struktur og mikrobiel nedbrydning

Cellulose er en lineær homopolymer af glucose bundet sammen med β -1,4-glucosidbindinger (Stryer, 1988). Kæder over 6-7 monomerer er uopløselige og kædelængden kan bestå af 100-14.000 enheder (Béguin and Aubert, 1994; Warren, 1996). Betakonfigurationen betyder, at glucoseenhederne er drejet 180 grader i forhold til hinanden og får cellulose til at danne lange lige kæder (Stryer, 1988; Béguin and Aubert, 1994). Ringiltatomet i en glucoseenhed er hydrogenbundet med 3-OH-gruppen i den næste (figur 1). I plantecellevægge er cellulosekæderne parallelt orienterede i forhold til hinanden og holdes hovedsageligt sammen af adskillige intra- og inter-molekylære hydrogenbindinger, som danner stive og uopløselige mikrofibriller (Béguin and Aubert, 1994; Warren, 1996).

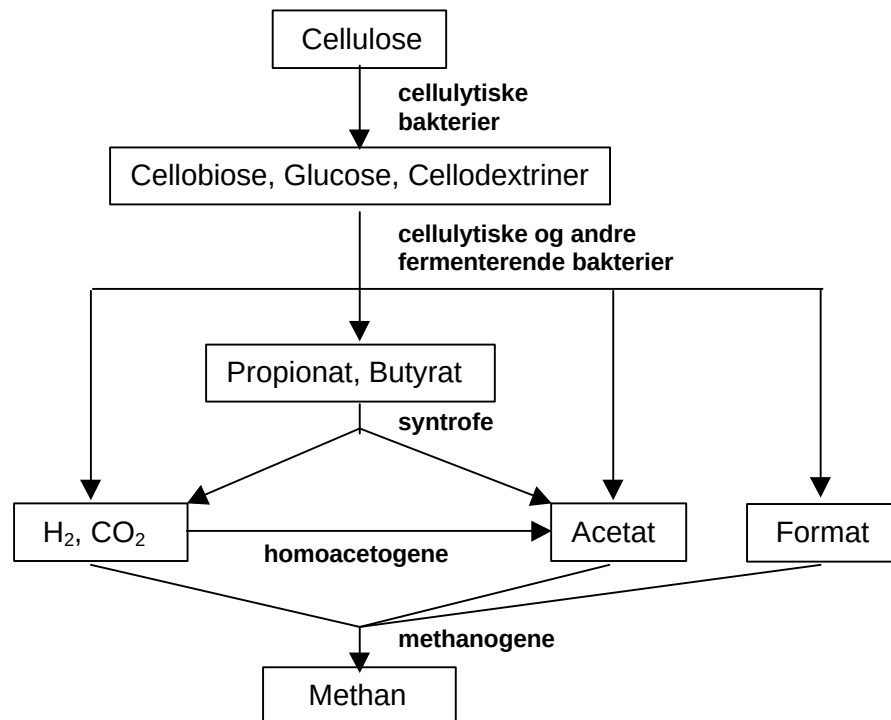


Figur 1: Skematisk diagram af cellulose med angivelse af hydrogenbindinger mellem glucoseenheder i samme cellulosekæde. Hydrogenbindinger dannes også mellem cellulosefibriller på tværs af kæderne (Stryer, 1988).

Strukturen af naturlig (nativ) cellulose er meget kompleks og der findes flere forskellige former for krystallinsk gitterstruktur (Tomme et al., 1995). I forbindelse med studier af enzymatisk hydrolyse af cellulose opererer man dog kun med begreberne krystallinsk og ikke krystallinsk, amorft cellulose, hvilket også er tilstrækkeligt i denne rapport. Krystallinsk cellulose har en bestemt form og struktur, som kan skelnes, hvorimod amorf cellulose er irregulært i form og uden adskilt struktur. Graden af krystallinitet kan variere fra 0% i amorf, syrebehandlet "swelled" cellulose til næsten 100% i cellulose fra grønalgen *Valonia macrophysa*. Bomuldscellulose er ca. 70% krystallinsk og de fleste kommercielle cellulose produkter varierer mellem 30-70% (Béguin and Aubert, 1994).

Nedbrydning af cellulose foregår næsten udelukkende ved mikrobiologiske processer. Undersøgelser af den mikrobielle aktivitet i jord, og dermed også cellulosenedbrydning, har vist, at 50-90% af aktiviteten udgøres af svampe. Imidlertid har man kun ringe kendskab til bakteriernes betydning for nedbrydningsaktiviteterne i jord, da hovedparten af jordbakterierne ligger i dvale, og ikke kan kultiveres med kendte metoder (Kjølner and Struwe, 1989).

I det naturlige miljø oxiderer aerobe mikroorganismer hovedparten af cellulose til CO_2 , mens 5-10% af den samlede cellulosenedbrydning sker anaerobt (Ljungdahl and Eriksson, 1985; Leschine, 1995). I modsætning til aerob nedbrydning af cellulose til CO_2 og H_2O , kræver en fuldstændig anaerob nedbrydning af cellulose til CH_4 og CO_2 , et samspil mellem blandede populationer. Figur 2 viser, hvordan samspillet mellem forskellige bakterietyper omdanner cellulose til CH_4 og CO_2 i det anoxiske miljø. I det marine miljø udkonkurrerer sulfat-reducerende bakterier ofte de metanogene bakterier mht. H_2 , da sulfatreducerende bakterier har en højere affinitet overfor H_2 , hvorved sulfid bliver et hovedprodukt af cellulose nedbrydning (Brock et al., 1994; Leschine, 1995).



Figur 2: Anaerob nedbrydning af cellulose i samspil mellem forskellige bakteriesamfund i jord og ferskvandssedimenter. Ethanol, lactat og succinat produceres også af fermenterende bakterier, men akkumuleres sjældent. Slutprodukterne fra fermentation kan variere i miljøer hvor nitrat, Mn(IV), Fe(III) eller sulfat er tilstede. Figuren er efter Leschine (1995).

Cellulaser

Cellulytiske mikroorganismer findes i alle slags miljøer, hvor cellulose akkumuleres. De optræder normalt i blandede populationer af cellulytiske og ikke-cellulytiske arter, hvor de ofte interagerer synergistisk. Kun få mikroorganismer danner et komplet enzymesæt, der gør dem i stand til at nedbryde naturlig cellulose effektivt, hvorimod mange mikroorganismer besidder ukomplette cellulasesystemer (Béguin and Aubert, 1994).

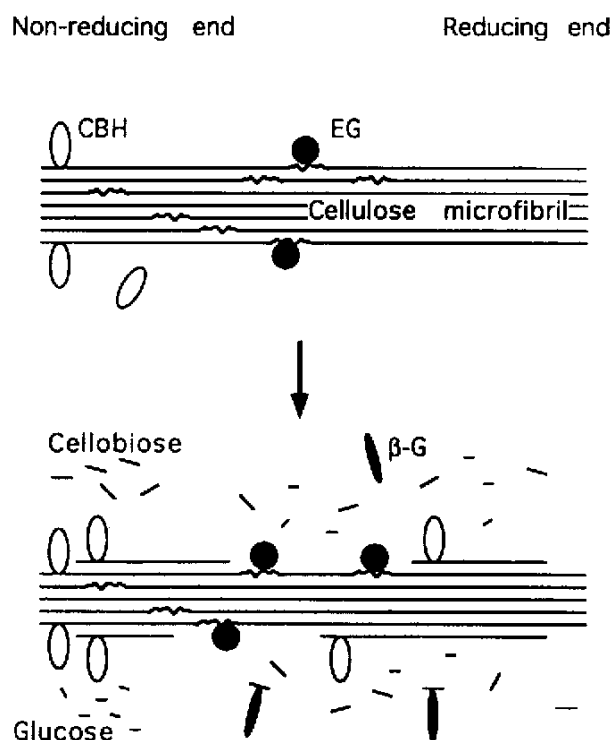
Cellulaser er en fælles betegnelse for enzymer, som er i stand til at hydrolysere β -1,4-glucosidbindinger. Man kan groft set inddele cellulaserne i tre typer: Endoglucanaser (endocellulaser) hydrolyserer β -1,4-glucosidbindinger på tilfældige steder i cellulosen og danner derved reducerende og ikke-reducerende ender. Exoglucanaser (exocellulaser eller cellobiohydrolaser) producerer cellobiose ved at hydrolysere fra den ikke-reducerende ende af cellulosefibriller. β -glucosidaser hydrolyserer cellobiose og celooligosaccharider til glucose (Wood and Garcia-Campayo, 1990; Coughlan and Mayer, 1992). Tabel 1 viser, hvilke substrater som hydrolyseres af cellulaserne.

Tabel 1: Cellulasers aktivitet på forskellige substrater

Substrat \ Enzym	Cellobiohydrolase	Endoglucanase	β -Glucosidase
Krystallinsk cellulose (f.eks. Filterpapir, Avicel, Bomuld, Solka floc)	langsom	ingen aktivitet	ingen aktivitet
Amorf "swollen" cellulose (f.eks. syrebehandlet bomuld)	meget aktiv	meget aktiv	ingen aktivitet
Carboxymethylcellulose	ingen aktivitet	meget aktiv	ingen aktivitet
Cello-oligosaccharider	aktiv	aktiv	aktiv
Cellobiose	ingen aktivitet	ingen aktivitet	aktiv

Tabellen er modificeret efter Wood and Garcia-Campayo (1990)

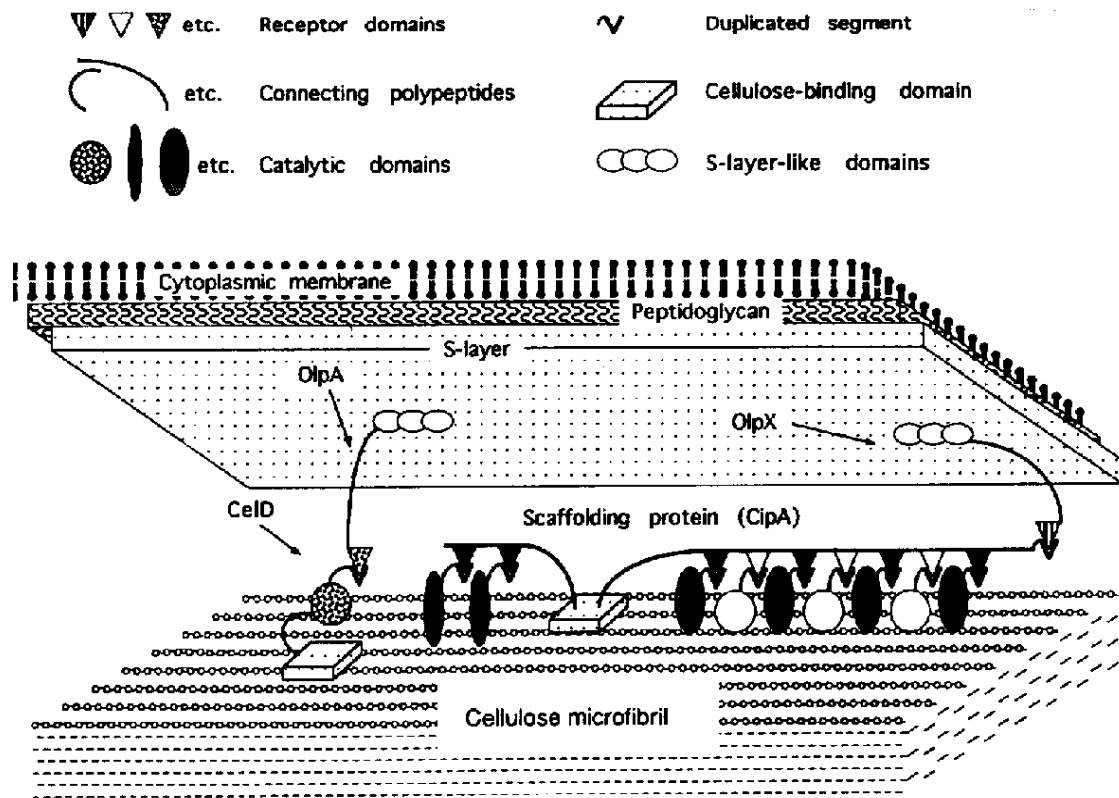
Cellulase systemerne kan inddeles i to forskellige kategorier: ikke-komplekse (ikke-aggregerende), som er karakteristiske hos aerobe bakterier og komplekse (aggregerende), der er almindelige for anaerobe bakterier (Gilbert and Hazlewood, 1993; Tomme et al., 1995). I de ikke-komplekse cellulasesystemer "optræder" endoglucanaser og cellobiohydrolaser synergistisk i hydrolysen af cellulose (figur 3). Endoglucanaserne hydrolyserer de amorfe dele af cellulosen, herved opstår der ikke-reducerende ender hvorfra cellobiohydrolaserne kan hydrolysere cellulose til cellobiose. Cellobiohydrolaserne kan hydrolysere sig ind på de mere krystallinske områder i cellulosen. Cellobiohydrolasernes aktivitet giver endoglucanaserne nye muligheder for at hydrolysere amorfe områder, der før var utilgængelige (figur 3). β -glucosidaserne fjerner cellobiosen, der ved akkumulering hæmmer exoglucanaseaktiviteten (Gilbert and Hazlewood, 1993; Leschine, 1995; Tomme et al., 1995). Denne forklaringsmodel er oprindelig udviklet ud fra kendskab til svampeenzymer, men da man har fundet cellobiohydrolaser hos *Cellulomonas fimi* (CbhA) og *Thermomonospora fusca* (E3), der er analoge med en cellobiohydrolase fra svampen *Trichoderma reesei* (CBHII), antager man, at modellen også gælder for bakterier (Tomme et al., 1995).



Figur 3: Generel model over den synergistiske interaktion mellem endoglucanaser og cellobiohydrolaser. Endoglucanaserne (EG) angriber fortrinsvis de overfladiske områder på cellulosen, hvor den krystallinske struktur er i uorden. Cellobiohydrolaser (CBH) hydrolyserer fra den ikke-reducerende ende af cellulose microfibriller, men pga. endoglucanasernes aktivitet skabes der nye områder, hvorfra cellobiohydrolaserne kan hydrolysere. Cellobiohydrolaserne hjælper også endoglucanaserne med at få adgang til nye amorfe områder på cellulosen. β -glucosidasernes (β -G) hydrolyse af cellobiose mindsker produktinhibering af endoglucanaser og cellobiohydrolaser. Modellen er udviklet ud fra hydrolyseadfærden hos svampen *Trichoderma reesei* (Tomme et al., 1995) og er her vist i en modificeret version.

I det komplekse enzymesystem associerer cellulaserne sig i store multienzymkomplekser kaldet cellulosomer. Denne strategi benyttes af mange anaerobe bakterier. Cellulosomet hos *Clostridium thermocellum* er meget grundigt undersøgt. Cellulosomerne sidder som udvækster (polycellulosomer) på celleoverfladen og tjener til fasthæftelse på og hydrolyse af cellulose (figur 5) (Tomme et al., 1995; Bayer et al., 1996). Et enkelt cellulosom består af op til 50 forskellige polypeptid molekyler og har en molekylvægt på 2-3.5 MDa, mens et polycellulosom vejer mellem 50-80 MDa (Meyer et al., 1987). Hydrolysemekanismen er beskrevet ud fra elektronmikroskopiske studier af Meyer et al. (1987), hvor de beskriver hydrolysen af cellulosen som en simultan multiklipning vha. endoglucanaser på række langs en cellulosefibril. Modellen af Meyer et al. (1987) viser, at endoglucanaser alene hydrolyserer krystallinsk cellulose og med en høj effektivitet, hvilket er temmelig usædvanligt. Mekanismen er senere draget i tvivl, da man har fundet evidens for, at *C. thermocellum* cellulosomer indeholder cellobiohydrolase. Tilstedeværelse af exo- og endoglucanaser i cellulosomerne betyder måske, at der hydrolyseres med en mekanisme som i det ikke-komplekse system (Béguin and Aubert, 1994; Tomme et al., 1995).

Cellulosomet hos *C. thermocellum* består af 12 eller flere underenheder, der især er cellulaser og xylanaser. Et protein, "scaffolding protein" (CipA), fastholder enzymerne i cellulosomet og formidler binding af enzymerne til cellulose vha. et cellulose-bindende-domæne (CBD) (Tomme et al., 1995; Bayer et al., 1996). En model af hvordan nogle af komponenterne i cellulosomet er orienterede i forhold til et cellulosesubstrat er illustreret i figur 4 .



Figur 4: "Scaffolding protein" (CipA) med cellulosebindende domæne (CBD), der adsorberer til cellulose og med receptor domæner, der interagerer med dupliserede segmenter på forskellige β -1,4-glucanaser. CipA er fasthæftet til cellen vha. et hypotetisk protein OlpX. Den regelmæssige fordeling af enzymerne på cellulosesubstratet afspejler den simultane multiklipning som foreslået af Meyer et al. (1987). Et andet enzym, som CelD, kan være fasthæftet til cellen med et andet protein OlpA og adsorbere til cellulose via sit eget CBD (modificeret figur efter Tomme et al, 1995).

Bakterier der danner cellulaser

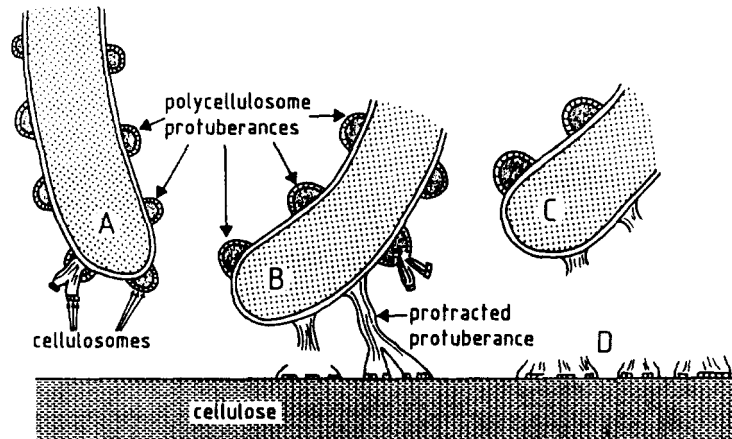
Anaerobe/fakultativt aerobe cellulolytiske bakterier

Få af de undersøgte bakterier har et komplet enzymesystem, som forårsager en betydelig nedbrydning af naturligt forekommende cellulose. Man benævner disse bakterier "ægte cellulolytiske bakterier" i modsætning til de fleste andre "pseudocellulolytiske bakterier", som har endoglucanaser og β -glucosidaser, men mangler exoglucanaser (Coughlan and Mayer, 1992).

Mange bakterier bruger celleassocierede enzymer i forbindelse med cellulosenedbrydning, hvilket besværer studiet af cellulaserne en del (Wood and Garcia-Campayo, 1990). De isolerede cellulaser fra bakterier er hovedsageligt endoglucanaser (tabel 2 og 3 i appendix a). Man har dog fundet extracellulære enzymer med aktivitet overfor krystallinsk cellulose blandt de anaerobe slægter *Clostridium*, *Acetivibrio*, *Ruminococcus* og *Fibrobacter* (Wood and Garcia-Campayo, 1990; Leschine, 1995) og blandt de aerobe slægter *Cellulomonas*, *Microbispora*, *Streptomyces* og *Thermomonospora* (Robson and Chambliss, 1989; Wood and Garcia-Campayo, 1990).

Blandt de anaerobe cellulolytiske bakterier er slægten *Clostridium* blandt de bedst undersøgte. Slægten *Clostridium* er anaerob, gram positiv og sporedannende. De fleste er mesofile og findes blandt andet i jord samt tarmkanalen hos mennesker og dyr (Robson and Chambliss, 1989). Figur 5 viser, hvordan *C. thermocellum* interagerer med cellulose. Bakterien producerer meget store mængder af extracellulære samt celleassocierede cellulaser og flere cellulaser er isoleret (tabel 2, appendix a); desuden anser man cellulaseaktiviteten for at være ekstrem høj (Bayer et al., 1996).

Man har dog fundet andre anaerobe bakterier, der også producerer cellulosomlignende strukturer, her iblandt *Acetivibrio cellulolyticus*, *Bacteroides cellulosolvens*, *Clostridium cellobioparum*, *Clostridium cellulovorans* og *Ruminococcus albus* (Leschine, 1995).



Figur 5: Model over interaktion mellem *Clostridium thermocellum* med cellulosomer på celleoverfladen og et cellulose substrat. (A) viser cellen lige før adhæsion til substratet. (B) viser kontakt med substratet, hvor nogle af cellulosom-fremspringene forlænges betydeligt, og der afsættes cellulosomer langs med substratet, der hydrolyseres. Efter nogen tid slipper cellen (C) substratet og efterlader cellefrie cellulosom-klynger på cellulosen (D), som antagelig fortsætter med at hydrolysere (Bayer et al., 1996).

Ved anaerob nedbrydning af cellulose antages interaktioner mellem bakterier at være vigtige. Co-kulturer af *Clostridium* med ikke-cellulytiske bakterier er observeret, hvor bakterierne lever mutualistisk. Her forsynes den ikke-cellulytiske bakterie med opløselige sukre, medens *Clostridium* får vitaminer eller vækstfaktorer. Den ikke-cellulytiske bakterie kan også medvirke til at danne fermenterbare opløselige sukre eller holde cellobiose koncentrationen lav, hvorved akkumulering af cellobiose ikke hæmmer den cellulytiske *Clostridium*s cellulasesystem (Leschine, 1995).

I andre tilfælde beskrives interaktionen mellem bakterierne som værende commensalistisk.

Aerobe/fakultativt anaerobe cellulytiske bakterier

De første beskrivelser over observation af aerob cellulosenedbrydning menes at være fra 1904 af C. van Iterson, Holland (Stanier, 1940). Tabel 3 (appendix a) viser en oversigt over aerobe og fakultativt anaerobe cellulytiske bakterier.

Cellulomonas slægten er blandt de mest undersøgte aerobe cellulosenedbrydende bakterier. De er ikkesporedannende og fakultativt anaerobe (Ljungdahl and Eriksson, 1985). Både exo- og endo-glucanaser er oprensedes fra *Cellulomonas* (tabel 3, appendix a). Alt efter bakteriekulturens alder og hvilken kulstofkilde der er brugt til vækst, kan cellulaserne være cellebundne, fasthæftede til substratet eller frie i mediet (Ljungdahl and Eriksson, 1985; Coughlan and Mayer, 1992).

Coughlan and Mayer (1992) foreslår, at cellulosenedbrydningen, hos *Cellulomonas* i kulturens tidlige faser, foregår vha. det "komplekse" enzymesystem, hvor cellulaserne er knyttet til celleoverfladen. I senere stadier under kultivering er cellulaserne ikke længere knyttet til cel-

leoverfladen, og enzymsystemet går over til den "ikke-komplekse" mekanisme, hvor enzymerne opererer synergistisk.

Cellulomonas uda er brugt som referencebakterie i nogle af mine undersøgelser. Den er undersøgt af bl.a. Nakamura and Kitamura (1983 og 1988), som har oprenset seks extracellulære cellulaser, hvoraf den ene er en cellobiohydrolase, der har størst aktivitet med Avicel som substrat.

Stoppok et al. (1982) fandt, at endoglucanaser fra *C. uda* hovedsageligt er extracellulære, mens en lille del er cellebundne. Desuden viste forsøgene, at lave cellobiosekoncentrationer inducerer endoglucanasedannelse, mens koncentrationer over 1 M hæmmer. Glucose hæmmer ikke endoglucanaseaktiviteten hos *C. uda*.

Amorf cellulose nedbrydes generelt hurtigere og mere komplet end krystallinsk cellulose. Ved hjælp af metoder til bestemmelse af krystallinitets index af cellulose har man fundet, at hydrolysen af amorf og krystallinsk cellulose hos *C. uda* sker samtidigt (Dermoun and Belaich, 1988). Cellulaserne hos *C. uda* bindes tæt til cellulosen, men exoglucanase adsorberes mere end endoglucanase (de Coninck-Chosson, 1988).

Slægten *Cytophaga* er bl.a. kendt for at have cellulytiske medlemmer. Reichenbach (1989 og 1992) har en beskrivelse af slægten. Winogradsky navngav slægten *Cytophaga* i 1929. Den består af encellede, glidende, gram-negative, aerobe eller fakultativ anaerobe, organotrofe, stavformede celler som varierer i form. Mange er pleomorfe. På agarplader er kolonierne ofte sværmende. I andre tilfælde er kolonierne kompakte. Kolonierne er ofte klart farvede i gult, orange eller rødt. Cellerne kan være omgivet af et mere eller mindre kompakt slimlag, som sandsynligvis har betydning for cellernes muligheder for bevægelse. G+C andelen i *Cytophaga* slægtens DNA er 30-45 mol%, hvor mange stammer ligger omkring 35.

Substratspektret er smalt for specialiserede cellulytiske cytophagaer som *C. hutchinsonii*, *C. rubra*, *C. rosea* og *C. marinoflava*. Iøvrigt mener Reichenbach, at kun stammer, der kan hydrolysere filterpapir bør betragtes som cellulosenedbrydere. Han omtaler organismene som *Cytophaga*-lignende-bakterier (CLB), fordi gruppen er meget heterogen og navnet *Cytophaga* har været brugt ukritisk. CLB nedbryder organiske makromolekyler som proteiner, cellulose, agar, chitin, pectin og stivelse. Bakterierne kan vokse på både organiske og uorganiske N-kilder. De udgør en meget vigtig gruppe, der har vid udbredelse og udgør store populationer i naturen. Som et eksempel på udbredelsen fandt Vardavakis (1989), vha. en pladefor tyndings metode, at *Cytophaga hutchinsonii* og *Cytophaga rubra* var de mest almindelige cellulytiske bakterier isoleret fra græsk skovjord. CLB findes i jord ved neutral pH, i rådende plantemateriale og gødning, specielt fra herbivorer, i rensningsanlæg (Güde, 1980), i ferskvand (ved flodbreder og ved søer), i estuarier, i oxisk bundsediment samt algemåtter i søer.

I det marine miljø forekommer CLB tæt ved stranden på levende eller dødt tang, i oxisk og anoxisk bundsediment og på forrådnende havdyr. Få stammer er patogene overfor mennesker, hvorimod fiskepatogene CLB er et økonomisk problem. Især er laksefisk i opdræt udsat for sygdomme.

Cellulytiske *Cytophaga* spp. skal være i tæt kontakt med cellulosefibre for at kunne hydrolysere disse, og produkterne absorberes øjeblikkeligt (Stanier, 1942; Veldkamp, 1965; Christensen, 1977; Reichenbach, 1989). Dog har et forsøg med cellulytiske bakterier på forskellige celluloseagarplader vist, at der var god vækst af *Cytophaga johnsonae* og en *Cytophaga* sp., selvom cellerne var adskilt fra cellulosesubstratet vha. en 3 mm agar-barriere (Kauri and Kushner, 1985). De cellulytiske *Cytophaga*er udnytter kun få kulstofkilder som cellulose, cellobiose samt glucose, og i naturen forekommer de ofte sammen med ikke-cellulytiske bakterier (Christensen, 1977). Det hævdes af Stanier (1942) og Schlegel and Schmidt (1986), at kolonier af *Cytophaga* spp. på cellulose agar plader aldrig er omgivet af klare hydrolysezoner, og at enzymerne derfor sidder intracellulært. Der er imidlertid eksempler på observationer af extracellulære enzymer hos *Cytophaga* spp. (Kauri and Kushner, 1985; Malek et al., 1988; Li and Gao, 1997). I ovennævnte forsøg af Kauri and Kushner (1985) må cellulaserne være uden for cellerne for at kunne hydrolysere substratet, men det kan ikke udelukkes, at nogle af disse enzymer stammer fra lyserede celler.

Li and Gao (1997), isolerede en fakultativ anaerob *Cytophaga* sp. LX-7 fra jord, som udskilte alle tre cellulase typer. Exoglucanaseaktiviteten kunne ikke detekteres i et almindeligt assay til måling af reducerende sukre (tabel 5, appendix a), men man kunne i stedet for måle frigivelse af total sukker (opløselig kulhydrat). Endo-glucanaseaktivitet blev målt vha. viskositetsændringer i CMC (tabel 5, appendix a).

Malek et al. (1988) fandt extracellulær CMCase- og Avicelase-aktivitet hos *Cytophaga* sp. (CLS-32), hvor cellulaseaktiviteterne blev målt som frigivelse af reducerende sukre. Dog er det tvivlsomt, om hydrolyseaktiviteterne var "ægte" extracellulære. Enzymopløsningerne blev først lavet efter 72 timers vækst, hvor mange celler måske allerede var lyserede pga. alder, og derfor kunne en del af cellulaseaktiviteterne også stamme fra celleassocierede enzymer.

Der er kun få eksempler på isolerede cellulaser fra *Cytophaga* og *Sporocytophaga* (tabel 3, appendix a). Chang and Thayer (1977) isolerede en periplasmatisk exoglucanase og en cytoplasmatisk membranbundet endoglucanase fra *Cytophaga* sp. (WTHC 2421), men de kunne ikke detektere extracellulær cellulaseaktivitet. Cellulaseaktiviteterne blev målt som frigivelse af reducerende sukre og viskositetsændringer i CMC. Molekylvægten af cellulaserne var henholdsvis 6.250 Da og 8.650 Da, hvilket er lavt sammenlignet med andre bakterielle cellulaser (tabel 3, appendix a).

Der mangler flere undersøgelser af cellulytiske *Cytophaga* spp., som kan karakterisere cellulaserne og belyse hvorvidt de er intra- og/eller extra-cellulære.

Cytophaga hutchinsonii anses for at være en ægte cellulytisk bakterie. Tabel 4 (appendix a) giver en oversigt over karakteristika for *C. hutchinsonii*. Desuden kan der i flydende kulturer af *C. hutchinsonii* dannes en slim, som består af en sur heteropolysaccharid med xylose, arabinose, mannose, glucose og glucoron syre (Reichenbach, 1992).

Medier og substrater til detektion af cellulytiske bakterier

Introduktion

Screening og assay over cellulytisk aktivitet

Ved at screene cellulytiske bakterier i minimal agar medie med indbygget krystallinsk eller opløseligt cellulose som eneste eller hoved kulstofkilde, får man både isoleret bakterier og testet for cellulytisk aktivitet i samme arbejdsgang. Bakterier med extracellulære eller overfladebundne cellulaser kan detekteres ved dannelse af klaringszoner omkring kolonierne. Men metoden kan ikke "fange" de bakterier, som udelukkende har intracellulære cellulaser. Cellulytiske *Cytophaga* spp. kolonier er f.eks. blevet anset for aldrig at være omgivet af klaringszoner på celluloseagar (Schlegel and Schmidt, 1986). Tabel 5, i appendix a, oplister nogle af de substrater, som kan bruges til screening af cellulytiske bakterier i agarmedie, og viser eksempler på hvilke enzymassays der kan anvendes til at undersøge de forskellige cellulaser nærmere.

Enzymernes indvirkning på nativ cellulose kan også vurderes ved, at studere ændringer i de fysisk-kemiske tilstande af det uopløselige substrat, ved krystallinitets index, polymeriseringsgrad, ændring i tilgængeligt overfladeareal eller dannelse af små partikler; hertil kommer elektronmikroskopi, der kan afsløre hvor cellulase adsorberer, erosionsmønstre og ændringer i fiber eller mikrofibril struktur (Béguin and Aubert, 1994).

I det følgende fremstilles et jordekstrakts-agarmedie samt forskellige indikatorsubstrater for direkte at kunne detektere cellulytisk aktivitet, hvilket er en fordel fremfor at skulle anvende replikaplader som ved traditionelle metoder med Congo rød-farvning af CMC. Desuden har man ikke problemer med at afgøre, hvornår pladerne har inkuberet længe nok. Når bakterier hydrolyserer de farvede substrater i agar, frigives farvede fragmenter som diffunderer væk fra hydrolyseområdet, og der dannes en klaringszone i forhold til det omgivende ikkehydrolyserede substrat. Substraterne, der anvendes i mine undersøgelser, er farvet med Remazol Brilliant Blue (RBB), som under stærkt alkaline forhold binder sig kovalent til hydroxylgrupper i cellulose.

Mange endo-cellulaseproducerende bakterier besidder ikke exo-cellulaser, mens det omvendte er tilfældet. For at "fange" begge typer bakterier fremstilles agarmedier, der påviser henholdsvis exo- og endo-glucanaseaktivitet. Substraterne der anvendes her til test af exoglucanaseaktivitet (eller aktivitet af et komplet enzym system) er filterpapir og RBB-Avicel (tabel 5, appendix a). Til test af endoglucanaseaktivitet bruges RBB-cellofan og RBB-CMC.

For at undersøge mediernes egnethed til også at detektere cellulolytisk aktivitet hos bakterier, der ikke udskiller cellulaser, afprøves medierne med to cellulolytiske, men fysiologisk meget forskellige bakterier: *Cellulomonas uda*, som udskiller cellulaser og *Cytophaga hutchinsonii*, der anses for ikke at udskille cellulaser.

Vækst i et naturligt medie baseret på jordekstrakt tilsat indikator-substrater

For at få en fornemmelse af omfanget af cellulolytisk aktivitet i jord laves et indledende forsøg, hvor der isoleres cellulosenedbrydere fra græsplænejord. Herefter laves forsøg med at dyrke *C. uda* og *C. hutchinsonii* på det samme basismedie.

Materialer og metoder

Forsøg med at isolere cellulosenedbrydere fra græsplænejord

Komponenter til fremstilling af agarplader

Jordekstrakt (basismedie) fra græsplænejord ved Århus Universitet

Substrater:

Avicel (SERVA; PH 105)

RBB-Avicel (Avicel farvet med Remazol Brilliant Blue R, Sigma; R-8001)

CMC (Sigma; C-5678)

OBR-HECellulose (Hydroxyethylcellulose farvet med Ostazin Brilliant Red, Sigma; O-6879)

Inokulum til isolationsforsøg

Pladerne inokuleres med græsplænejord, Århus Universitet, som følgende: 1g (tørvægt) jordprøve suspenderes i 95 ml Millipore vand og fortyndes til 10^{-4} , 10^{-5} og 10^{-6} via fortyndingsrække.

Agarplader fremstilles i 2 lag. Bundlaget består af "ren" jordekstrakt. Toplaget er jordekstrakt tilsat en af ovenstående substrater. Substraterne i toplaget er følgende: (koncentrationerne er angivet i procent, vægt/vol)

(A): 0.6% Avicel + 0.02% CMC

(B): 0.2-0.75% RBB-Avicel + 0.02% CMC

(C): 0.5% CMC, laves også som hele plader (modificeret efter Kluepfel, 1988)

(D): (0.12%) OBR-HECellulose (modificeret efter Farkas et al., 1985).

Fremstilling af jordekstrakt og farvet Avicel fremgår af appendix b.

Nogle af pladerne med CMC farves med Congo rødt for at teste hydrolyse. Der er anvendt en standardmetode efter Kluepfel (1988). Metoden er beskrevet i appendix b.

Forsøg med renkulturer

To renkulturer af bakterier blev indkøbt hos DSMZ, Braunschweig Tyskland; *Cellulomonas uda* DSM # 20108 og *Cytophaga hutchinsonii* DSM # 1761.

Substrater til agarplader med jordekstrakt

Filterpapir (Whatman #1)

RBB-Cellofan (ufarvet cellofan: 325p uncoated; British Cellophane Ltd.)

RBB-Avicel (Avicel, SERVA, pH 105)

RBB-CMC (CMC, Sigma; C-5678, farvet med Remazol Brilliant Blue R)

Agarplader med knust filterpapir og RBB-Avicel fremstilles i 2 lag som nævnt i ovenstående forsøg til isolering cellulosedbrydere fra græsplænejord. RBB-cellofan (1 x 2 cm) lægges ovenpå et-lags agar og CMC, farvet såvel som ufarvet, suspenderes i et-lags agar. Substraterne i de færdige agarplader er som følgende: (koncentrationerne er angivet i procent, vægt/vol)

(E): 0.2-0.5% knust filterpapir + 0.02% CMC

(F): 0.2-0.75% RBB-Avicel + 0.02% CMC

(G): RBB-cellofan (1 x 2 cm)

(H): 0.2-0.5% RBB-CMC

Fremstilling af knust filterpapir, RBB-cellofan og RBB-CMC fremgår af appendix b.

En uge gamle kulturer af *Cellulomonas uda* og *Cytophaga hutchinsonii* udstryges på agarplader, med undtagelse af plader med RBB-Cellofan, hvor 2 dråber kultur overføres til midt på cellofanen.

Resultater og diskussion

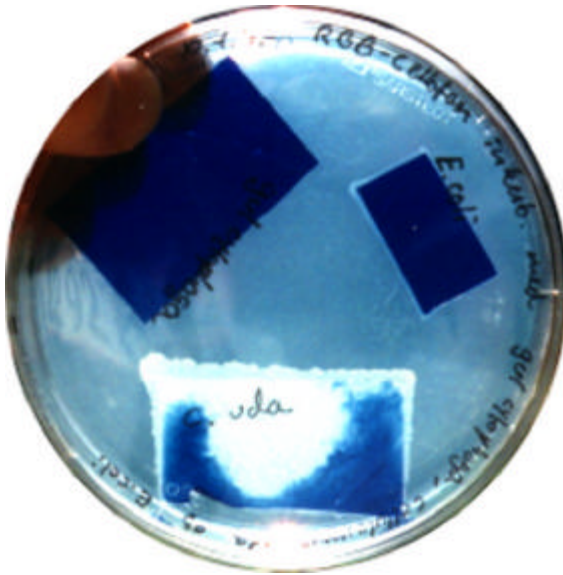
Indledende isolationsforsøg fra græsplænejord

Vækst ses på alle medier, men der ingen hydrolysezoner på substraterne (A) og (B). Det skyldes måske, at mikroorganismene ikke har exoglucanaser eller måske er RBB-Avicel-koncentrationen for lav til tydeligt at kunne afsløre hydrolysezoner.

Der ses tydelige hydrolysezoner omkring kolonierne på de plader med CMC (C), som farves med Congo rødt. Det er besværligt med denne metode til afsløring af cellulytiske mikroorganismer, da det forudsætter, at man laver replikplader, da mange mikroorganismer er følsomme overfor Congo rødt. Ved at anvende et farvet substrat ser man direkte, om kolonien er i besiddelse af cellulytiske enzymer. Kolonierne på OBR-HECellulose (D), viser tydelige hydrolysezoner, men pladerne bør fremstilles som et-lags, da farven diffunderer fra toplaget til bundlaget og indtrykket bliver mere uklart.

En koloni (en actinomycet) isoleret på OBR-HECellulose blev overført til en plade med knust filterpapir (Whatman #1) som toplag på jordekstrakt, der skulle afsløre om den havde exoglucanaseaktivitet. Efter 3 uger sås hydrolysezoner omkring en koloni, men den isolerede actinomycet blev dog ikke anvendt i flere forsøg pga. sporedannelse.

Forsøg med renkulturer



Billede 1: *C. uda*, *C. hutchinsonii* og *E. coli* podet på RBB-cellofan lagt ovenpå jordekstraktsmedie. Kun kulturen med *C. uda* har hydrolyseret cellofanen og farven er efterhånden trukket ud i jordekstraktsmediet. Billedet er taget efter 6 måneders inkubation.



Billede 2: *C. uda* podet på jordekstraktsmedie med ca. 0.2% (w/v) knust filterpapir i toplaget. Der ses tydelige hydrolysezoner efter ca. 2 ugers inkubation.



Billede 3: *C. uda* podet på 0.75% (w/v) RBB-Avicel + 0.02% (w/v) CMC som toplag på jordekstraktsmedie. Hydrolysezoner ses efter flere ugers inkubation.

Der ses hydrolysezoner og vækst på alle agarplader podet med *Cellulomonas uda* (tabel 6, side 20, øverste del og billeder 1-3). Hydrolysezonerne kan dog først erkendes efter lang tids inkubation, typisk flere uger, med undtagelse af RBB-CMC (foto ikke vist), hvor hydrolysezonerne ses indenfor en uge.

Cytophaga hutchinsonii vokser meget dårligt eller slet ikke og hydrolyserer ikke substraterne. Dog ses farveudtræk i agaren fra en plade med RBB-cellofan, så der kan være sket hydrolyse (foto ikke vist). Der mangler imidlertid en kontrolplade med uinkuberet RBB-cellofan til at bekræfte dette. Årsager til, at *C. hutchinsonii* ikke vokser på cellofan kan være inhiberende stoffer i cellofanen, at RBB er giftigt for cellerne eller, at cellerne ikke kan hæfte sig fast til cellofanoverfladen. Inhibering af vækst kan evt. være forårsaget af mangel på essentielle næringsstoffer i jordekstrakten, stoffer som ikke indgår i vækstkrav for *C. uda*. Den manglende vækst kan også skyldes, at *C. hutchinsonii* har svært ved at etablere kontakt med substraterne. Hvis mediet tilsættes let tilgængelige sukre som glucose eller cellobiose kan cellerne måske lettere komme i vækst på agarpladerne og de nødvendige cellulaser kan syntetiseres.

Konklusion

Bakterier som *Cellulomonas uda* kan detekteres med jordekstrakt og de valgte kulstofkilder. *Cytophaga hutchinsonii* kan derimod ikke opfanges med dette design pga. manglende vækst og klaringszoner.

Vækst på farvede og ufarvede substrater i defineret medie

Slægten *Cytophaga* er meget almindelig i naturen, men kendskabet til dens økologi og enzymer er begrænset. Det første forsøg med de to cellulolytiske bakterier i renkulturer leder frem til at undersøge *Cytophaga hutchinsonii* nærmere mht. vækst på celluloseagar medie. I det følgende er der anvendt et defineret basismedie fremfor jordekstrakt for at detektere cellulose hydrolyse med kulturer og supernatant fra *C. hutchinsonii* på celluloseagar medier. Der testes også for vækst i et flydende medie. Endelig laves der substrattest for *C. hutchinsonii*.

Materialer og metoder

Defineret medie

Agarmedie (CY-agar)

Flydende medie (MSM-medie)

Fremstilling af medierne fremgår af appendix b.

Agarplader fremstilles som følgende: (koncentrationerne er angivet i procent, vægt/vol)

(I): 0.2% knust filterpapir + 0.1% sterilfiltreret cellobiose (0.20 µm, Sartorius sterilfilter). Laves som 2-lags plader, hvor kun toplaget indeholder substrat.

(J): 0.2-0.5% RBB-CMC + 0.1% sterilfiltreret cellobiose. Laves som 1-lags plader

(K): 0.25% CMC + 0.1% sterilfiltreret cellobiose. Laves som 1-lags plader

Det flydende MSM-medie tilsættes følgende:

(L): 0.2% RBB-Avicel

(M): 0.2% RBB-cellofan

Til detektion af CMCase aktivitet i ufarvet CMC (K), anvendes Congo rødt på samme måde som i det indledende isolationsforsøg fra græsplænejord.

Sterilfiltreret kultursupernatant

2 ml udvokset kultur centrifugeres i Eppendorfrør ved 11.340 g i 15 minutter (Sigma 115; 13.000 rpm), hvorefter supernatanten filtreres gennem et 0.2 µm sterilfilter.

Supernatanten anvendes til en agar-diffusions test på en agarplade med RBB-CMC (J).

Substrattest

Der anvendes MSM-medie som ovenstående, 10 ml pr. rør (Pyrex glasrør) med vatpropper og folie omkring propperne. Substraterne tilsættes i en koncentration på 0.1% (w/v). Kontroller: (a) - substrat + inokulum. (b) + glucose + inokulum. Der måles pH og celletæthed (OD^{600}) straks efter podning. Rørene inkuberes aerobt i rysteinkubator ved 30 °C. Der måles igen efter en uge og sammenlignes med kontrollerne. Der suppleres med api 50 CH og api 20 NE -kits.

Resultater og diskussion

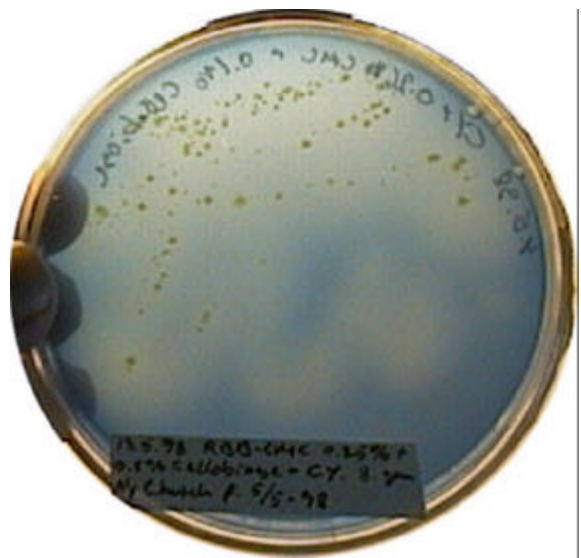
Tabel 6: Resultat af forsøg med medier til detektion af cellulytiske bakterier

Basismedie: jordekstrakt i agar	Vækst	Hydrolysezoner/farvefrigivelse
Filterpapir i toplag (2)	Cellulomonas uda: ja Cytophaga hutchinsonii: nej	hydrolysezoner ingen hydrolysezoner
RBB-Avicel i toplag (3)	C. uda: ja C. hutchinsonii: nej	hydrolysezoner ingen hydrolysezoner
RBB-Cellofan ovenpå toplag (1)	C. uda: ja C. hutchinsonii: nej	hydrolyse ingen hydrolyse, men farvefrigivelse. (NB! ingen kontrol)
RBB-CMC i hele pladen	C. uda: ja C. hutchinsonii: meget små kolonier efter lang tid	hydrolysezoner ingen hydrolysezoner
Basismedie: CY-medie eller MSM		
CY + Filterpapir + cellobiose i toplag (9)	C. hutchinsonii: ja	hydrolysezoner
CY + RBB-CMC + cellobiose i hel plade (4,5,6 og 7)	C. uda: ja C. hutchinsonii: ja	hydrolysezoner fra begge, ses også inden synlig vækst. Desuden hydrolyse ved inkubation med supernatant (sterilfiltreret)
CY + CMC + cellobiose i hel plade (8)	C. hutchinsonii: ja	hydrolysezoner ses efter farvning med Congo rødt
MSM + RBB-Cellofan, flydende medie (10,11 og 12)	C. uda: ja C. hutchinsonii: ja	farvefrigivelse fra begge
MSM + RBB-Avicel, flydende medie (10,11 og 12)	C. uda: ja C. hutchinsonii: ja	farvefrigivelse fra begge

Tallene i parentes angiver billede nr.



Billede 4: *C. hutchinsonii* podet på CY-medie + 0.5% (w/v) RBB-CMC + 0.1% (w/v) cellobiose. Efter 5 dages inkubation ses tydelig hydrolyse af RBB-CMC, men der ses ingen kolonier af *C. hutchinsonii*.



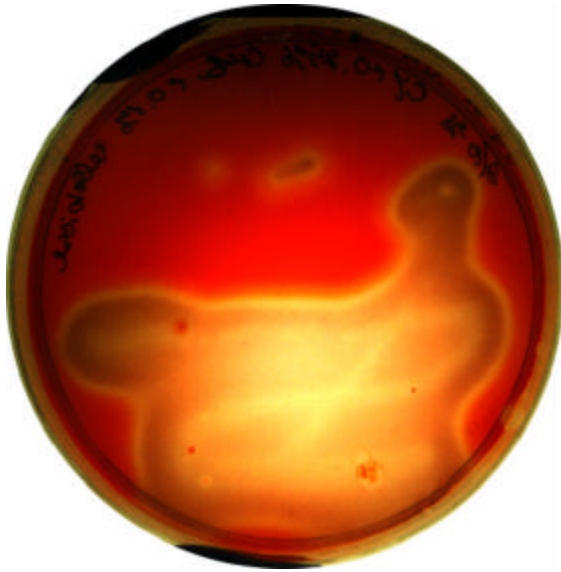
Billede 5: *C. hutchinsonii* podet på CY-medie + 0.25% (w/v) RBB-CMC + 0.1% (w/v) cellobiose. Efter 8 dages inkubation ses både tydelig hydrolyse af RBB-CMC og kolonier af *C. hutchinsonii*.



Billede 6: Sterilfiltreret supernatant fra *C. hutchinsonii* podet på CY-medie + 0.5% (w/v) RBB-CMC + 0.1% (w/v) cellobiose, hvor en brønd i pladen er tilsat 2 dråber. Efter 2 dages inkubation ses tydelig hydrolyse af substratet.



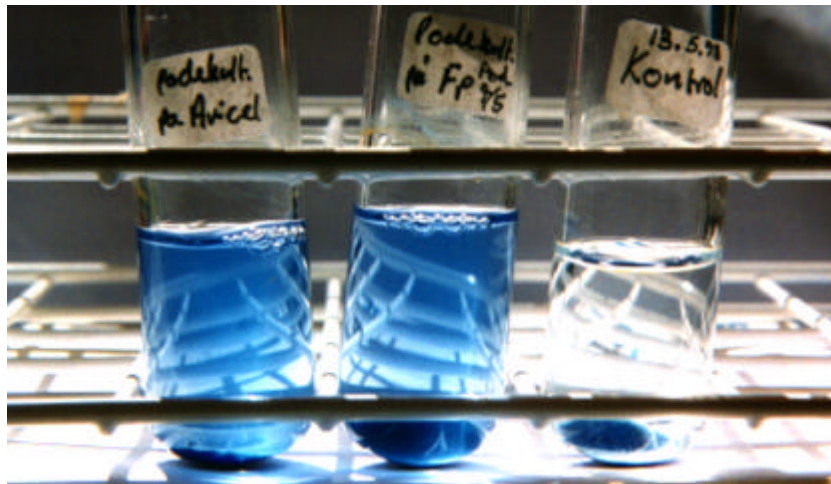
Billede 7: *C. uda* podet på CY-medie + 0.5% (w/v) RBB-CMC + 0.1% (w/v) cellobiose. Efter 5 dages inkubation ses kolonier og hydrolyse af substratet.



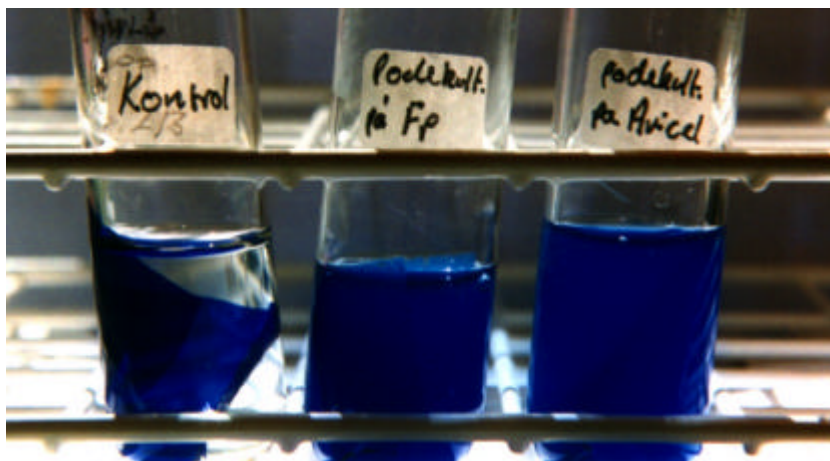
Billede 8: *C. hutchinsonii* podet på CY-medie + 0.25% (w/v) CMC + 0.1% (w/v) cellobiose. Efter ca. 7 dages inkubation ses kolonier og pladen farves med Congo rødt. Hydrolyse af CMC ses tydeligt hvor Congo rødt ikke binder.



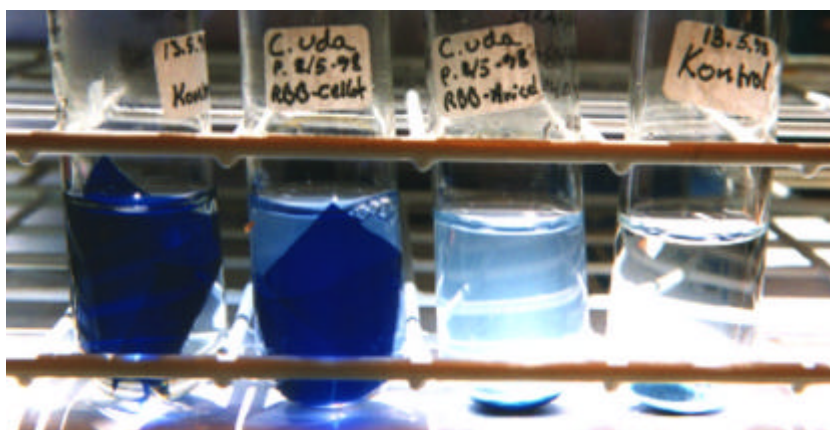
Billede 9: *C. hutchinsonii* podet på CY-medie med 0.2% (w/v) knust filterpapir + 0.1% (w/v) cellobiose i toplag. Efter ca. 1 uges inkubation ses kolonier, men hydrolysezoner ses først efter ca. 1 måneds inkubation.



Billede 10: To forskellige kulturer af *C. hutchinsonii* podet i MSM-medie + 0.2% (w/v) RBB-Avicel. Den ene podekultur er kultiveret på MSM-medie + Avicel og den anden er kultiveret på MSM-medie + filterpapir. Efter 5 dages inkubation ses tydelig farvefrigivelse sammenlignet med en kontrol.



Billede 11: To forskellige kulturer af *C. hutchinsonii* podet i MSM-medie + 0.2% (w/v) RBB-cellofan fra de samme podekulturer som nævnt under billede 10. Efter 5 dages inkubation ses tydelig farvefrigivelse sammenlignet med en kontrol.



Billede 12: *C. uda* podet i MSM-medie + henholdsvis 0.2% (w/v) RBB-cellofan og RBB-Avicel. Efter 5 dages inkubation ses tydelig farvefrigivelse på substraterne sammenlignet med kontrollerne. Rør 1 og 4 fra venstre er kontroller

Ved at ændre basismediet i agarpladerne, og tilsætte 0.1% (w/v) cellobiose sammen med cellulosesubstratet, lykkedes det at få *Cytophaga hutchinsonii* til at vokse på alle substrater og hydrolyse ses tydeligt (tabel 6, side 20, nederste del og billede 4-6 + 8-9). Der går dog meget lang tid førend hydrolyse kan ses på plader med filterpapir, måske fordi substratet synker lidt ned i agaren så cellerne har svært ved at få kontakt. Filterpapiret bliver måske ikke hydrolyseret før cellerne/kolonierne er så gamle, at de begynder at lysere og dermed lække cellulaser, som kan diffundere ned til substratet.

Billede 7 viser *Cellomonas uda* efter 5 dages vækst på RBB-CMC, hvor der ses hydrolyse af substratet.

Desværre fik jeg ikke afprøvet glucose- eller cellobiose- tilsætning til agarplader med jordekstrakt. Dette kunne vise om cellerne blot mangler et lettilgængeligt sukker for at komme i vækst, eller om jordekstrakten mangler essentielle næringsstoffer for *C. hutchinsonii*. Vækst i flydende MSM-medie viser, at *C. hutchinsonii* er i stand til at hydrolysere og vokse på RBB-Avicel og RBB-Cellofan, hvilket ikke kunne bekræftes på agarmedie (tabel 6, side 20 og billede 10-11). Billede 12 viser *C. uda* efter 5 dages vækst med henholdsvis RBB-cellofan og RBB-Avicel, hvor der ses tydelig hydrolyse af substraterne.

Klaringszoner omkring kolonier på agarplader med filterpapirsoverlag og farvefrigivelse fra RBB-Avicel tyder på, at *C. hutchinsonii* er i besiddelse af et komplet enzymesystem og/eller cellobiohydrolase (exoglucanase). Desuden viser klaringszonerne på farvet og ufarvet CMC, at bakterien har endoglucanaser. Det kan ikke udelukkes, at hydrolyse af filterpapiret og RBB-Avicel skyldes let nedbrydeligt amorf cellulose, som er en del af krystallinsk cellulose. Derfor er det vigtigt at efterprøve cellulaseaktiviteten med andre metoder (Coughlan and Mayer, 1988). Hydrolysezonerne omkring kolonierne og hydrolyse efter inkubation med supernatant på RBB-CMC plade tyder på, at *C. hutchinsonii* har extracellulære cellulaser. Dette står i modsætning til Stanier (1942), Veldkamp (1965) og Schlegel and Schmidt (1986), der finder, at *Cytophaga* spp. aldrig er omgivet af hydrolysezoner på cellulose-agar. Aktiviteten i supernatanten kan dog stamme fra lyserede celler, da supernatanten er taget fra en kultur i stationærfase og CMCase aktiviteten er i så fald celleassocieret. "Ægte" extracellulær aktivitet kan konstateres ved, at isolere supernatanten fra kulturen medens denne er i eksponentiel vækstfase, hvor der er en lille andel af lyserede celler.

Det skal nævnes, at væksten på agarplader med CMC skyldes cellobiose. Jeg har ikke været i stand til at få vækst med *C. hutchinsonii* på CMC, til trods for, at Reichenbach (1989) beskriver *C. hutchinsonii* som værende i stand til at vokse på CMC. Alligevel hydrolyseres CMC, men åbenbart ikke til produkter cellerne kan udnytte. Sandsynligvis bliver der dannet oligosaccharider, men enzymerne er ikke i stand til at hydrolysere dem yderligere til glucose. Substrattest med *C. hutchinsonii* viser, at bakterien heller ikke vokser med Hydroxyethyl-cellulose som substrat (tabel 4, appendix a), mens farvet HECellulose (AZCL-HECellulose) hydrolyseres fint. En forklaring kan være, at de substituerede carboxymethyl grupper i CMC og hydroxyethyl grupper i HECellulose inhiberer enzymerne (Barry McCleary, pers. kommunikation).

Farvet xylan (AZCL-Xylan) hydrolyseres også, men vækst på xylan og xylose forekommer ikke og hydrolysen sker langsommere end med AZCL-HEcellulose. Xylan udgør den største komponent i hemicellulose, der er bundet sammen af 1,4- β -D-xylopyranosyl enheder og hydrolyseres af xylanaser (Okada and Shinmyo, 1988). Evnen til at hydrolysere xylan, uden der

opnås vækst på hverken xylan eller nedbrydningsprodukterne xylose og xylobiose ses også hos den anaerobe cellulolytiske bakterie *Clostridium thermocellum* (Bayer et al., 1996).

Det virker formålsløst med denne tilsyneladende overflødige hydrolyse af β -1,4-glucosid-bindinger. Med mindre cellerne udnytter det i deres naturlige miljø f.eks i samspil med andre mikroorganismer, i konsortier, hvor de tilsammen udnytter substraterne bedre, end de er i stand til hver for sig. Evnen til at hydrolysere xylan kan også skyldes, at cellerne i deres naturlige omgivelser i nogle tilfælde må kunne hydrolysere xylan for at få adgang til cellulose.

Substrattestene viser, i overensstemmelse med Christensen (1977), at *C. hutchinsonii* har et smalt substratspektrum. Den vokser kun på cellulose (filterpapir, Avicel, α -Cellulose og cellofan), cellobiose og glucose (tabel 4, appendix a). Güde (1980), undersøgte forekomsten af *Cytophaga* spp. i rensningsanlæg og fandt, at den cellulolytiske gruppe var endnu mere specialiseret end *C. hutchinsonii*, idet kun få af dem kunne vokse på glucose eller cellobiose.

Konklusion

CY-medie i agarplader + cellobiose tilsat knust filterpapir, RBB-CMC eller ufarvet CMC kan anvendes til at detektere cellulolytiske bakterietyper som *Cytophaga hutchinsonii*.

Det farvede RBB-CMC substrat i agarplader kan bruges til at teste for cellulaseaktivitet selv om *C. hutchinsonii* ikke vokser på CMC.

Supernatant fra *C. hutchinsonii* har endocellulaseaktivitet, men en del af aktiviteten stammer fra lyserede celler og er således ikke udtryk for en "ægte" extracellulær aktivitet.

Defineret flydende medie (MSM) tilsat RBB-Cellofan eller RBB-Avicel kan anvendes til at teste for cellulaseaktivitet.

CMCellulose og HECcellulose hydrolyseres delvist af enzymerne hos *C. hutchinsonii*, men de substituerede grupper på substraterne inhiberer sandsynligvis nogle af enzymerne, så der ikke kan dannes metaboliserbare produkter.

Perspektivering

Metoder til direkte tællinger af bakterier i jord, ved f.eks. fluorescens mikroskopi, viser 30-1000 gange højere tal end man kan finde ved traditionelle tællinger på agarmedier (Kjøller and Struwe, 1989). Screening af cellulytiske bakterier i jord, med anvendelse af konventionelle mikrobiologiske metode har sine begrænsninger. Bakterierne vokser bl.a under forskellige betingelser og dermed skal medier og substrater kunne dække så mange forhold som muligt, hvilket er uopnåeligt. Dertil kommer, at en meget stor del af bakterierne fra jord ligger i dvale og ikke kan dyrkes med kendte metoder (Kjøller and Struwe, 1989). Det vil f.eks være et problem at detektere de cellulytiske bakterier på celluloseagar, hvis de ikke har extracellulære enzymer eller enzymer associeret med cellevæggen. Endvidere kan det være et problem, hvis nogle af de cellulytiske bakterier er afhængige af andre ikke-cellulytiske bakterier og lever i co-kulturer, som det er observeret hos f.eks *Clostridium* spp. (Leshine, 1995). Jordekstrakt bliver ofte anvendt som basismedie til isolation af bakterier, sammen med et eller flere væksts substrater. Men for at isolere cellulytiske typer såsom *Cytophaga hutchinsonii* vil det sandsynligvis være nødvendigt at supplere mediet med lave koncentrationer af sukker. Eventuelt kan det også være nødvendigt med tilsætning af sporstoffer og mineraler. Farvet filterpapir som toplag på et agar-basismedie er måske en mulighed for at lave et tyndere lag og dermed øge følsomheden og se hydrolyse på et tidligere tidspunkt. Man bør inkludere så mange forskellige cellulosesubstrater som muligt (overkommeligt) i en screening for at få en ide om diversiteten af de cellulytiske bakterier.

I fremtiden bliver det måske muligt at "fange" ikke-kulturbare cellulytiske bakterier ved at kombinere traditionelle mikrobiologiske metoder med nyere molekylærbiologiske metoder, hvor man for eksempel bruger cellulasegener som molekylære markører.

Evnen til kun delvist at hydrolysere visse substrater findes hos nogle bakterier. Det kunne være interessant med en nærmere undersøgelse af hvor udbredt det er, og hvorfor nogle bakterier har denne evne. Man kunne forestille sig, at evnen specielt findes hos de bakterier som lever i co-kulturer med andre bakterier.

Optimering af vækstmedie for *Cytophaga hutchinsonii*

En bakterie som *C. hutchinsonii* vokser ikke på et hvilket som helst medie eller substrat og den vokser ikke tæt af en aerob bakterie at være. På agarplader er den besværlig at få i vækst, det er kun lykkedes på CY-medie (appendix b), når der er tilsat cellobiose eller glucose og pladerne skal podes kraftigt. Agar indeholder komponenter, der kan virke inhiberende overfor cellulytiske bakterier, hvorimod agarose ikke gør (Li et al., 1996b). Mine forsøg med agaroseplader har dog ikke vist bedre vækst. De krystallinske cellulosesubstrater i pladerne giver de største problemer med at komme i vækst, sandsynligvis fordi substratet synker ned i agaren så cellerne har svært ved at få kontakt.

Det har ikke været muligt at lave en fortyndingsrække, hvor der er opnået vækst fra de højeste fortyndinger, hvilket ellers er en effektiv metode til at undgå kontaminanter. Cellulose-nedbrydende *Cytophaga* er kendt for ikke at danne kolonier udfra enkelte celler, men i stedet udfra celle -klaser eller -klynger, desuden producerer cellulosenedbryderne ofte så meget slim, at det er vanskeligt at suspendere cellerne i et flydende medie (Reichenbach, 1992). *C. hutchinsonii* kan dog dyrkes i flydende medie. Udgangspunktet som vækstmedie har været CY-medie, men pga. problemer med kontaminering blev cellerne overført til et minimal-medie, mineralsaltsmedie (MS, appendix b). Efterhånden viste det sig, at cellerne havde mere og mere besvær med at komme i vækst og de udvoksede kulturer var meget tynde. Mediet manglede sandsynligvis komponenter til at kunne vedligeholde en kultur i mange generationer. Kulturen blev således ved gentagne celleoverførsler langsomt drænet for essentielle stoffer. En modifikation af mineralsaltsmediet blev taget i brug (MSM), hvor kvælstofkilden blev suppleret med ammonium ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), som optages lettere end NO_3^- hos mange mikroorganismer, fordi det kræver mindre energi. Der blev tilsat sporstoffer (TMS-3) og fosfatmængden blev øget. Fosfaten blev autoklaveret separat inden tilsætning, for at mindske udfældninger.

Der kunne måles en umiddelbar virkning af de supplerende komponenter idet celletætheden, målt som OD^{600} , blev højere.

Kulturer tilsat forskelligt indhold af jern og mangan blev testet mht. OD^{600} og HECelulaseaktivitet desuden blev der testet mht. MOPS, 8 g/l (buffer, appendix b).

Øgede koncentrationer af både jern og mangan i mediet (100 mg/l) gav lav aktivitet. Ekstra mangan i mediet havde ingen øget effekt på aktiviteten. I stedet gav det problemer med udfældninger, hvilket forstyrrede aflæsning af absorbansen. Ekstra jern i mediet medførte de samme problemer som mangan ved aflæsning af OD^{600} , og der sås en lavere aktivitet sammenlignet med mediet indeholdende en normal jernkoncentration.

Tilsætning af MOPS til mediet stabiliserede pH, men det havde ingen øget virkning på cellulaseaktiviteten ved de normalt anvendte glucose- og cellobiose-koncentrationer (0.2% w/v). Ved 0.6% glucose tilsat mediet er der en tydelig effekt af MOPS, her er der en pH forskel på 2 og som en konsekvens af dette er aktiviteten ca. 7 gange højere hos kulturvæsken tilsat MOPS sammenlignet med kulturvæsken uden MOPS.

I de fleste af forsøgene med cellulaseaktivitet er kulturene med *C. hutchinsonii* kultiveret på MSM-medie med filterpapir eller glucose som substrat. I nogle af enzymaktivitets-forsøgene er der undtagelsesvist benyttet kulturer kultiveret på MS-medie. Det fremgår af det enkelte forsøg, hvilket vækstmedie den anvendte kulturvæske er dyrket på.

Enzymaktivitet

Introduktion

I denne del af specialet afprøves forskellige assay til måling af enzymaktivitetsrater hos *Cytophaga hutchinsonii* (tabel 5, appendix a). Der måles på exo- og endoglucanaseaktivitet. Princippet i de valgte metoder er, at de måler hydrolyse af substratet fotometrisk, enten direkte ved frigivelse af farvede hydrolyseprodukter eller indirekte ved frigivelse af reducerende sukker, som vha. reagenser danner farvede komplekser.

Exoglucanaseaktivitet eller aktivitet af et komplet cellulasesystem forsøges målt dels som frigivelse af reducerende sukker vha. to metoder (tilsætning af DNS- eller Biquinolin-reagens) og dels som hydrolyse af et farvet substrat (RBB-Avicel). Endoglucanaseaktivitet måles vha. tre metoder, hvor de to metoder måler direkte på frigivelse af farvede fragmenter fra RBB-CMC og AZCL-HECellulose, mens den tredje måler frigivelse af reducerende sukker. Frigivelsen af farvede substrater fra krystallinsk cellulose er proportionalt med mængden af cellulose som gøres opløseligt, men ikke nødvendigvis med dannelse af reducerende sukker eller glucose (Leisola and Linko, 1976). Ved måling af reducerende sukker afhænger resultatet af β -glucosidase aktiviteten og hvilket assay som benyttes (Leisola and Linko, 1976; Schwald et al., 1988; Wood and Bhat, 1988).

Alle forsøg med måling af enzymaktivitet, undtagen en, er lavet som tidsserier med minimum tre prøveudtagninger.

Exoglucanaseaktivitet

Filterpapirsaktivitet målt som reducerende sukker vha. Dinitrosalicylsyre-reagens (DNS-reagens)

Den kemiske proces som foregår, ved tilsætning af DNS-reagens til reducerende sukker, er en oxidation af aldehydgrupperne på de reducerende sukker til carboxylgrupper medens 3,5-dinitrosalicylsyre reduceres til 3-amino-5-nitrosalicylsyre (Miller, 1959). Der er imidlertid ikke fuld overensstemmelse mellem mængden af dannet aminonitrosalicylsyre og sukker, og de forskellige sukker giver forskel i farveudvikling. Disse uoverensstemmelser skyldes muligvis,

at der samtidig sker en sidereaktion, hvor sukker nedbrydes pga. de basiske forhold i reaktionsblandingen (Miller, 1959).

En kulturvæske fra *Cytophaga hutchinsonii* kultiveret i MS-medie (appendix b), + 0.2% (w/v) α -Cellulose + 0.02% (w/v) glucose bruges til Filterpapirsassay. Nogle af rørene forbehandles med henholdsvis 70% (v/v) ethanol, 1% (v/v) Rodalon eller chloroform for at teste om enzymaktiviteten øges når cellerne er døde og således ikke er i stand til at optage hydrolyseprodukter. Desuden tilsættes nogle rør enten 0.1% (w/v) Triton X-100 for at frigøre membranassocierede enzymer og evt. øge cellulaseaktiviteten, eller 0.05% (w/v) SDS for at teste om cellulaseaktiviteten påvirkes herved.

Standarder af glucose tilsættes henholdsvis 1% (v/v) Rodalon, 0.2% (w/v) Triton X-100 og Rodalon + Triton for at teste interferens med DNS-reagenset. Desuden måles cellobiose standarder.

Materialer og metoder

DNS opløsning (modificeret efter Miller et al., 1960)

Kaliumnatriumtartrat	200 g
3,5-Dinitrosalicylsyre	10 g
Krystallinsk fenol	2 g
NaOH	2% (w/v)

Opløses i 500 ml NaOH og fortyndes til 1 liter med Millipore vand. Opbevares mørkt ved 4 °C.

Til fremstilling af standardkurve fortyndes 50 mM Glucose stamopløsning i Millipore vand til koncentrationer på 0.125 -10.0 mM glucose.

Fremgangsmåde til filterpapirsassay (filterpapirassay, modificeret efter Mandels et al., 1976)

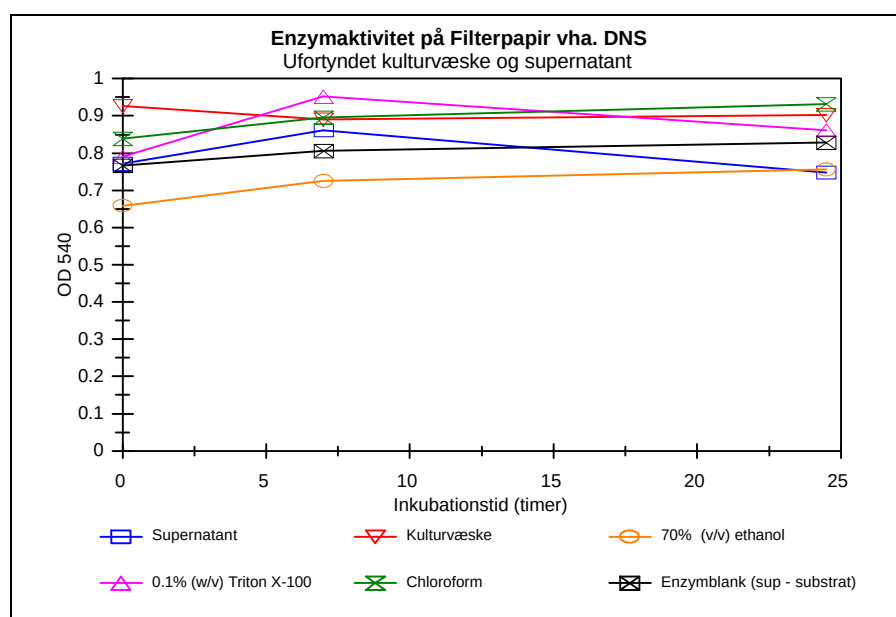
Små stykker filterpapir ca. 0.5 x 3 cm (Whatman # 1) lægges i Eppendorfrør. Der tilsættes 2 ml enzymopløsning (kulturvæske og/eller supernatant) og prøverne inkuberes i thermomixer ved 30 °C. Efter henholdsvis 0, 7 og 25 timers inkubationstid udtages 300 μ l, som herefter centrifugeres ved 11.340 g (Sigma 113; 13.000 rpm) i 15 minutter. 200 μ l af prøvens supernatant udpipeteres til Eppendorfrør. Der tilsættes 400 μ l DNS. Prøverne koges i vandbad i 15 minutter og afkøles derefter i isvand. Der tilsættes 1 ml Millipore vand til prøverne og ab-

sorbtionen ved 540 nm aflæses på spektrofotometer (Milton Roy; Spectronic 601) med Mil-lipore vand som reference.

Absorbansen af prøverne fratrækkes en ezymblank (200 µl supernatant + 400 µl DNS).

Glucosestandarder: 200 µl glucosestandard tilsættes 400 µl DNS og behandles på samme måde som prøverne.

Resultater og diskussion



Figur 6: Produktionen af reducerende sukre (udtrykt som OD^{540}) med filterpapir som substrat. Kulturen med *C. hutchinsonii* er 6 uger gammel og er dyrket på MS-medie + 0.2% Peptone + 0.2% α -cellulose, 70% (v/v) Ethanol, 0.1% (w/v) Triton og Chloroform inkuberes med cellerne 30 min. før tilsætning af Filterpapir. NB enzymblank er ikke fratrasket prøverne. Prøverne er lavet i duplikat.

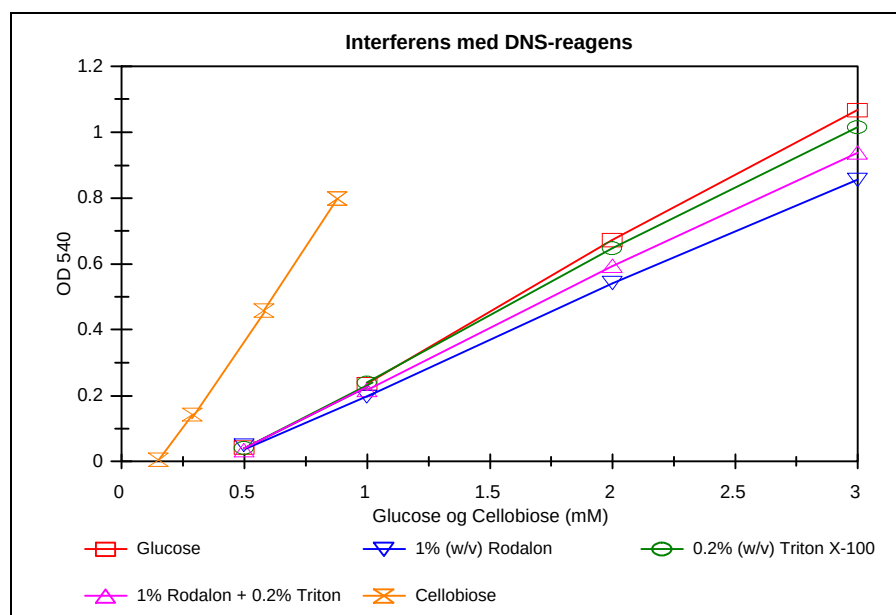
Produktionen af reducerende sukre, udtrykt som absorbans (OD^{540}), er meget lav indenfor de første 7 timer af assayet hvorefter der ikke sker mere (figur 6). Der ses en meget høj enzym-blankværdi sammenlignet med prøverne, hvilket viser, at der enten er en høj glucose-baggrundsværdi i prøverne eller der er interferens mellem DNS-reagenset og vækstmediet. En senere test af α -Cellulose med og uden forudgående cellekontakt har vist, at α -Cellulose kun interfererer med DNS-reagenset når cellulosen har været i kontakt med cellerne. Tilsætning af ethanol og chloroform har tilsyneladende ingen virkning på hydrolyseaktiviteten, med mindre virkningen forsvinder i interferensen (figur 6). Tilsætning af SDS og Rodalon viser ikke stabile værdier og er derfor ikke medtaget.

I et filterpapirsassay med en anden kultur, kultiveret under de samme betingelser (5 uger gammel), målttes også en høj baggrundsværdi og der var ingen farveudvikling af betydning i løbet af 22 timer.

Et tredje filterpapirsassay, med en 11 dage gammel kultur dyrket på filterpapir, viste slet ingen respons i løbet af 22 timer.

Måleområdet for metoden ligger mellem 0.1 - 3.0 mg glucose (Wood and Bhat, 1988) og er måske ikke tilstrækkelig følsom i dette tilfælde.

I lighed med mine forsøg fandt Li and Gao (1997) ingen signifikant produktion af reducerende sukre hos supernatant fra *Cytophaga* sp. LX-7 og foreslår, at cellobiose-oxiderende enzymer forårsager enten en oxidation af cellobiose til cellobionsyre eller en oxidation af de reducerende ender på hydrolyseprodukterne. Berg et al. (1972) lavede forsøg med *Cellvibrio fulvus* og mener, at bakterierne optager sukkeret øjeblikkeligt og derfor vil niveauerne af frie sukre være lave.



Figur 7: Glucose og cellobiose standarder, samt glucosstandarder tilsat Rodalon og Triton X-100

Effekten af Triton X-100- og Rodalon- tilsætning på glucosstandardkurven ses af figur 7. I prøverne med Rodalon sker der udfældninger ved DNS tilsætning og de centrifugeres derfor ved 11.340 g i 5 minutter før aflæsning af absorbans. Triton X-100 har kun en mindre indflydelse på standardkurven, hvor Rodalon giver den største afvigelse.

Cellobiose har en stor indflydelse på farveudviklingen, hvor værdierne er ca. 2.6 gange højere end glucose. Andre finder, at absorbtionsværdierne for cellobiose ligger 1.5 gange højere

end glucose for ens molære koncentrationer (Breuil and Saddler, 1985; Wood and Bhat, 1988). Metoden er følsom overfor inkubationsbetingelserne. Breuil and Saddler (1985) fandt, at måleværdierne afhang af hydrolyseprodukternes polymeriseringsgrad og der var ikke proportionalitet mellem det faktiske antal af reducerende hemiacetal grupper og de målte værdier. DNS metoden måler heller ikke tilfredsstillende værdier hvis β -glucosidase aktiviteten er lav (Schwald et al., 1988; Chan et al. 1989).

Der findes imidlertid en anden metode til måling af reducerende sukre, Nelson/Somogyi, som ikke påvirkes af polymeriseringsgraden af substratet og hydrolyseprodukterne (Breuil and Saddler, 1985).

Konklusion

Enzymaktivitet målt som reducerende sukre vha. DNS reagens på ufortyndet kulturvæske eller supernatant fra *Cytophaga hutchinsonii* giver utilfredsstillende resultater pga. interferens eller manglende respons. Måske er metoden ikke tilstrækkelig følsom.

Der opstår let interferens med metoden. α -Cellulose, der har haft kontakt med cellerne, interfererer med DNS-reagenset.

Ethanol og Chloroform ser ikke ud til at påvirke enzymaktiviteten.

Triton X-100 (0.2% w/v) påvirker ikke glucosestandarden nævneværdig, men Rodalon (1% v/v) interfererer med DNS-reagenset.

Cellobiose påvirker farveudviklingen i assayet meget sammenlignet med ens molære koncentrationer af glucose.

Filterpapirs- og Avicelase -aktivitet målt som reducerende sukre vha. Biquinolinreagens

Denne metode er ca. 100 gange mere følsom end DNS-metoden og måler i området 0.1 - 30 µg glucose (Sinner and Puls, 1978). Reducerende sukre reducerer et organisk kobber-komplex bestående af en bichinoninate/kobber-opløsning og danner et farvet produkt, der kan måles spektrofotometrisk ved 562 nm. Sinner and Puls (1978) testede 50 forskellige reducerende sukre, bl.a di- og oligosaccharider, aminosukre samt glucuronsyrer, der alle viste ens respons.

I det følgende testes metoden med kulturvæske og supernatant af *Cytophaga hutchinsonii* kultiveret på henholdsvis filterpapir og Avicel. For at optimere måling af aktiviteterne afprøves forskellige forbehandling med at fryse og frysetørre kulturvæske og supernatant for at teste om det påvirker aktiviteten. Desuden afprøves varmebehandling ved 70 °C samt chloroform- og azid-behandling, for at se om enzymerne stadig er aktive selvom cellerne dør. En standardkurve med glucose og cellobiose laves for at teste cellobiosens påvirkning af standarderne.

Materialer og metoder

Metoden er modificeret efter Sinner and Puls (1978)

Reagenser

4,4'-Dicarboxy-2,2'-biquinolin disodium Salt (Sigma; D-8284)

L-Asparginsyre

Na₂CO₃

CuSO₄

50 mM glucoseløsning

Substrat

Små stykker filterpapir 0.5 x 3 cm (Whatman # 1)

Fremgangsmåde til fremstilling af 100 ml færdig assayopløsning (opløsning AB)

Opløsning A: 0.13 g 4,4'-Dicarboxy-2,2'-biquinolin opløses i 85 ml Millipore vand. 6.22 g Na_2CO_3 tilsættes, og der fyldes op til 100 ml med Millipore vand.

Opløsning B: 0.64 g L-Asparginsyre og 0.87 g Na_2CO_3 opløses i 15 ml Millipore vand. 0.17 g CuSO_4 opløses i 5 ml Millipore vand. De to opløsninger blandes og der fyldes op med Millipore vand til 25 ml.

Opløsning AB: 24 ml opløsning A blandes med 1 ml opløsning B. Frisklavet reagens skal stå et døgn inden brug.

Glucosestandarder

(2-100 $\mu\text{g/ml}$), fortyndes i Millipore vand.

Fremgangsmåde til filterpapirsassay

500 μl enzymopløsning (kulturvæske eller supernatant) inkuberes med et stykke filterpapir i Eppendorfrør ved 30 °C i thermomixer. Der udtages 100 μl prøver jævnt fordelt over 0-250 minutter, som centrifugeres ved 11.340 g (Sigma 115; 13.000 rpm) i 15 minutter. 50 μl herfra udtages og stilles på køl indtil alle prøver er udtaget. Herefter blandes hver prøve med 1 ml reagens AB og inkuberes ved 80 °C i 25 minutter i et vandbad. Reaktionen stoppes i isvand. Absorbtionen måles ved 562 nm på spektrofotometer (Milton Roy; Spectronic 601) med Millipore vand som reference.

Blank: 50 μl medie + 1 ml opløsning AB.

Enzymblank: 500 μl medie samt et stykke filterpapir.

Kontrol: 500 μl kulturvæske eller supernatant, som inkuberes uden filterpapir.

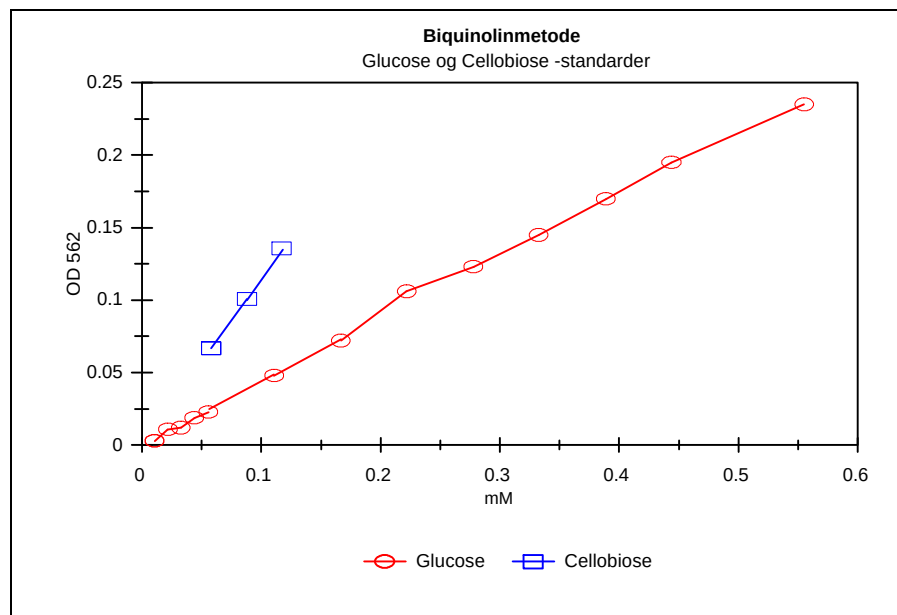
Enzymblank og kontrol behandles på samme måde som prøverne.

Glucosestandarderne, 50 μl fra hver, blandes med 1 ml reagens AB og behandles som de øvrige prøver.

Fremgangsmåde til måling af Avicelaseaktivitet

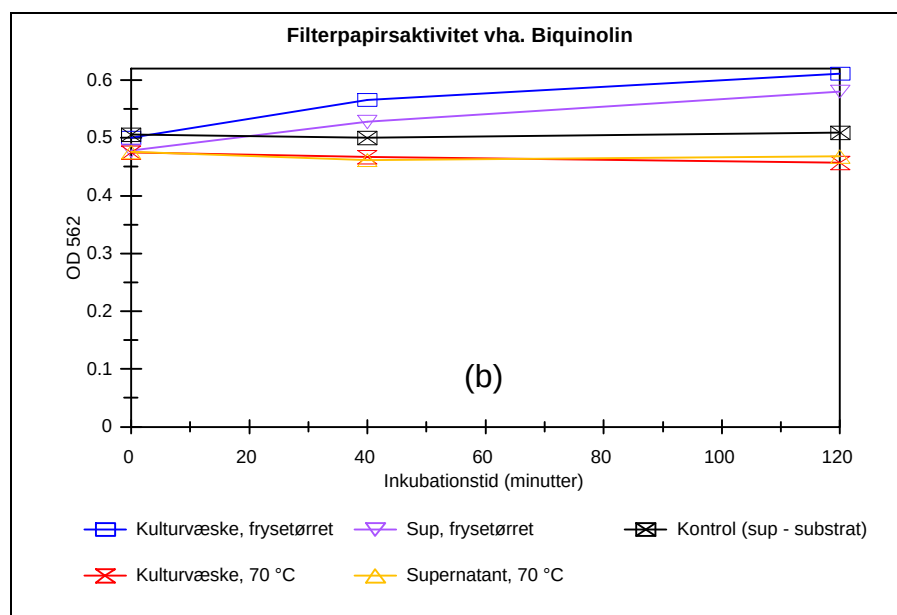
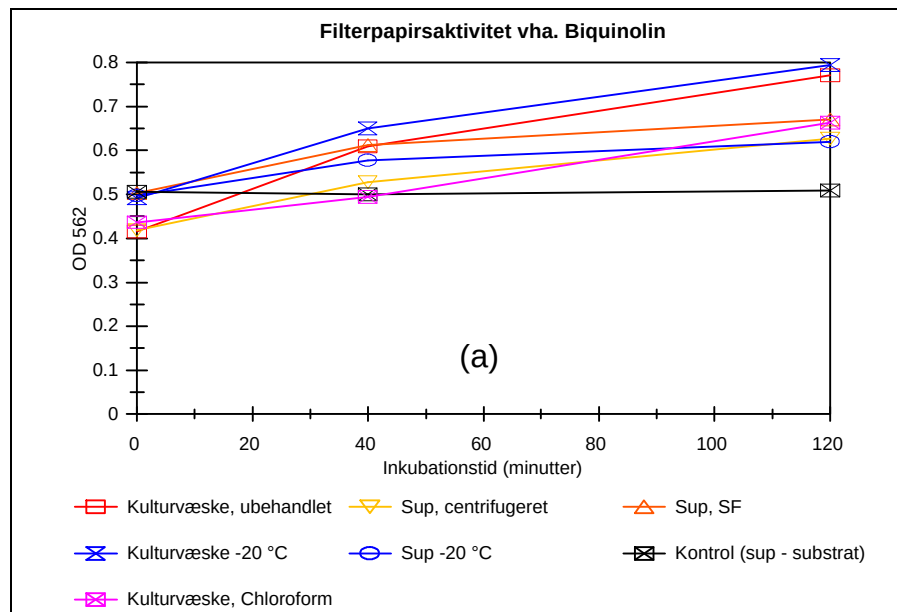
Enzymprøver (kulturvæske) og Avicel suspenderes i MSM-medie således, at enzymerne er fortyndet 4 gange og Avicel har en koncentration på 0.5% (w/v) i det færdige assay. Ellers samme fremgangsmåde som for filterpapirsassay.

Resultater og diskussion



Figur 8: Standardkurve med glucose og cellobiose tilsat Biquinolinreagens. Standarderne er fortyndet i Millipore vand.

En standardkurve over glucose- og cellobiose- standarder er vist i figur 8. Cellobiose påvirker farveudviklingen meget. For ens molære koncentrationer giver cellobiose en forøgelse på 2.7 gange glucose, hvilket er det samme som for standarder målt med DNS reagens.



Figur 9 (a) og (b): Filterpapirsaktivitet målt på en 12 dage gammel kultur, kultiveret på MS-medie + filterpapir. NB enzymblank er ikke fratrasket prøverne. For overskuelighedens skyld er aktiviteterne vist i to figurer.

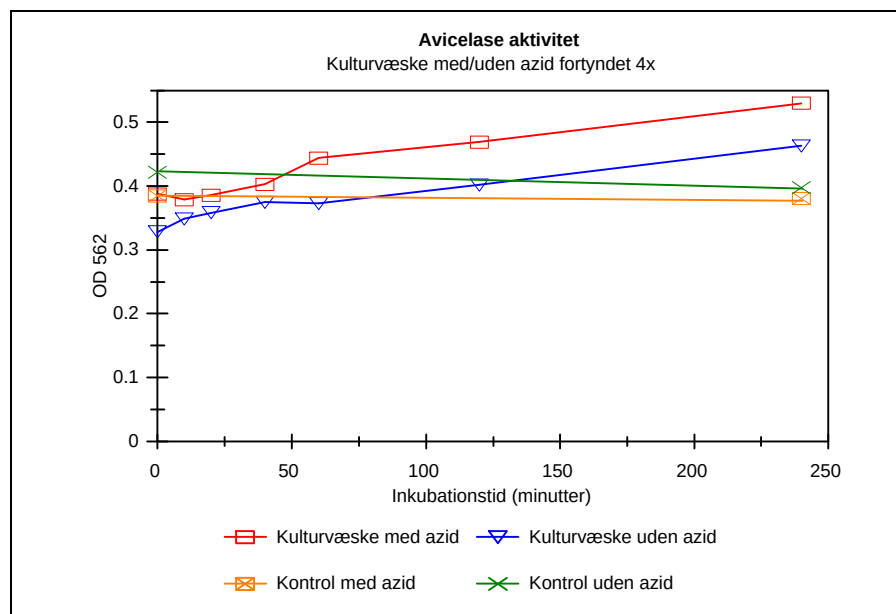
Resultatet af et forsøg med frysning, frysetørring, chloroformbehandling og varmebehandling af kulturvæske og supernatant er vist i figur 9 (a) og (b). Tilsyneladende giver frysning og frysetørring af kulturvæske og supernatant samt chloroformbehandling af kulturvæske ikke nogen øgning i filterpapirsaktiviteten, sammenlignet med de ubehandlede prøver, indenfor de 2 timer. Varmebehandlingen denaturerer cellulaserne, da værdierne ligger lavere end kontrolværdierne (figur 9 b).

Hydrolysen af filterpapir går langsomt og derfor burde forsøget have været udført over en længere tidsperiode end 2 timer. Supernatantaktiviteterne udgør 46% af kulturvæskernes aktiviteter indenfor 2 timer (beregnet som gennemsnittet af forholdet mellem frisk supernatant/kulturvæske og frosset supernatant/kulturvæske: $0.0015 \text{ minut}^{-1}/0.0028 \text{ minut}^{-1}$ og $0.009 \text{ minut}^{-1}/0.0024 \text{ minut}^{-1}$, figur 9 a).

I et tidligere forsøg med den samme kultur, 7 dage gammel, var supernatantens filterpapirsaktivitet 78% af kulturvæskens aktivitet indenfor de første 2 timer (data ikke vist). På disse grundlag ser det ud som om filterpapirsaktiviteten for en stor del er extracellulær, men det viser ikke, at exocellulaserne er extracellulære, da mange af enzymerne kan være lækgede fra lyserede celler pga. kulturens alder.

Både blankværdierne og kontrolværdierne i forsøget er meget høje, hvilket betyder at der er interferens mellem Biquinolinreagenset og mediet samt mellem Biquinolinreagenset og substraterne.

Der burde være lavet et vækstforløb hvor supernatant- og kulturvæske-aktiviteten løbende blev målt for at teste om cellerne lækker cellulaser i den stationære fase. Men et krystallinsk substrat vanskeliggør en ensartet høst af kulturvæsken, da cellerne både sidder på substratet og flyder rundt i mediet.



Figur 10: En uge gammel kultur dyrket på MSM-medie + filterpapir. Forbehandlet +/- azid natten over.

Forsøg med måling af Avicelaseaktivitet hos en 4 gange fortyndet kulturvæske med 0.5% (w/v) Avicel som substrat i assay er vist i figur 10. Der ses ikke er nogen afgørende forskel

på hydrolyseaktiviteten ved forbehandling med azid, og værdierne er meget lave (figur 10). Efter 1 times inkubationstid er hydrolyseraterne (OD^{562}/minut) ens.

Der blev også udført et forsøg med måling af hydrolyseaktiviteter fra 15 dage gamle kulturvæsker, hvor cellerne blev vasket og supernatanterne blev dialyseret for at fjerne de høje baggrundsværdier (data er ikke vist). Kulturene var dyrket på henholdsvis α -Cellulose, Avicel og filterpapir og assay blev udført med henholdsvis α -Cellulose, Avicel og filterpapir som substrat. Det viste sig, at vaskede celler ikke hydrolyserede substraterne, til gengæld var baggrundsværdierne i disse prøver på niveau med enzymblank-værdierne (MSM-medie + substrat). Da kulturene var 15 dage gamle, var der en stor andel af lyserede celler, og derfor sås der ingen aktivitet hos de vaskede celler. Supernatantprøverne havde en lav hydrolyseaktivitet, på trods af, at den var tilført cellulaser fra de lyserede celler.

Et andet forsøg med måling af Avicelaseaktivitet viste, at der ikke var proportionalitet mellem fortyndinger. Prøver med en 4 gange opkoncentrering af celler viste efter 2 timer værdier i samme størrelsesorden som ovennævnte forsøg (data ikke vist).

I et tredje forsøg med måling af filterpapirsaktivitet, hvor cellerne blev opkoncentreret henholdsvis 5 og 10 gange viste det sig, at 5 gange koncentrationen havde den største filterpapirsaktivitet (data ikke vist).

Glucosestandarder, fortyndet i Millipore vand, med 6 gange forskel i fortynding viste kun en forskel i absorbans på 2.8 (data ikke vist).

Med de foreliggende forsøg er der ikke noget, der tyder på en afgørende aktivitetsøgning når cellerne forbehandles med enten frysning, frysetørring, chloroform eller azid. De lave aktiviteter i disse forsøg skyldes tilsyneladende ikke, at cellerne optager hydrolyseprodukterne straks de er frigivet, da døde celler ikke stimulerer aktiviteten. Men pga. interferenserne kan optag af hydrolyseprodukter være skjult.

Konklusion

Hydrolyseaktiviteten af filterpapir, α -Cellulose og Avicel kan ikke måles tilfredsstillende vha. Biquinolinreagens pga. høje baggrundsværdier og manglende respons.

Forbehandling af cellerne med frysning, frysetørring, chloroform eller azid har ikke nogen afgørende effekt på Avicelaseaktiviteten.

De lave aktiviteter skyldes tilsyneladende ikke, at cellerne optager hydrolyseprodukterne.

Vask af cellerne fjerner den høje baggrundsværdi, men fjerner også aktiviteten.

Cellobiose påvirker farveudviklingen i assay meget sammenlignet med ens molære koncentrationer af glucose.

Avicelaseaktivitet med RBB-Avicel

Aktivitetmålinger med RBB-Avicel er i modsætning til måling af reducerende sukre upåvirket af ioner eller reducerende stoffer. Forholdet mellem cellooligosaccharider:cellobiose:glucose i assayet påvirker ikke resultatet, hvilket er ideelt i de tilfælde, hvor der ellers er produktinhibition (Wood and Bhat, 1988). Desuden er det bekvemt med farvede substrater i assay. Man skal ikke tilsætte reagenser efter inkubationen og man er ikke i tvivl, om der sker hydrolyse. Der er dog den ulempe, at frigivelsen af farvede substrater fra krystallinsk cellulose ikke nødvendigvis er proportional med dannelse af reducerende sukre eller glucose (Leisola and Linko, 1976), men der er proportionalitet med mængden af cellulose som gøres opløseligt. Ved måling af reducerende sukre afhænger resultatet af β -glucosidase aktiviteten og hvilket assay som bruges (Leisola and Linko, 1976; Schwald et al., 1988; Wood and Bhat, 1988). I de næste forsøg anvendes kulturvæsker med *Cytophaga hutchinsonii*.

Materialer og metoder

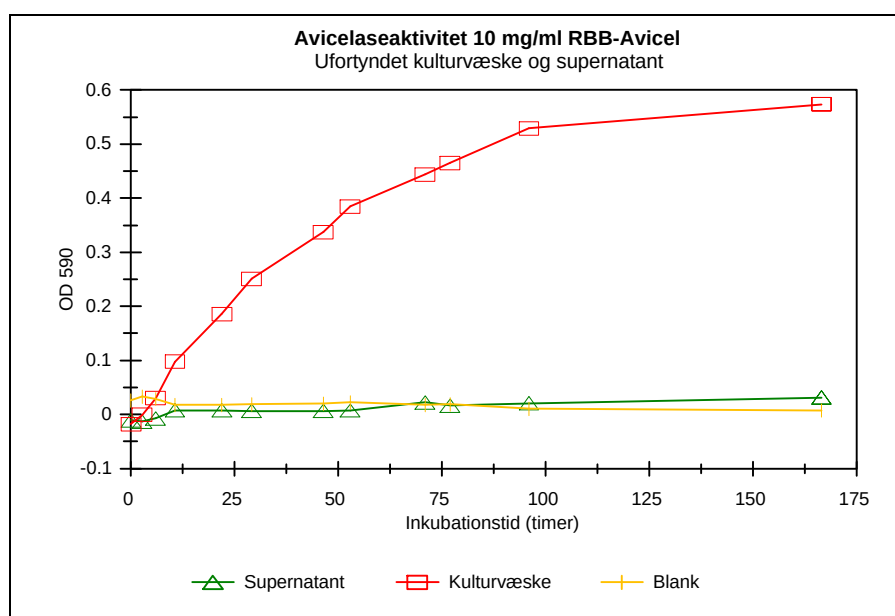
Fremgangsmåde til måling af RBB-Avicelase aktivitet

Der anvendes ufortyndet, sterilfiltreret supernatant og kulturvæsker fra *C. hutchinsonii*, alle dyrket på MSM-medie + filterpapir. Supernatanten fremstilles ved at centrifugere ved 11.340 g (Sigma 115; 13.000 rpm) i 15 minutter, hvorefter supernatanten filtreres gennem et 0.20 μ m filter (Sartorius). RBB-Avicel udvejes i Eppendorfrør og tilsættes ufortyndet supernatant eller kulturvæske til en koncentration på henholdsvis 1 og 10 mg/ml i Eppendorfrør. Rørene inkuberes i Eppendorf Thermomixer 5437 ved 30 °C. Ved aflæsning centrifugeres rørene ved 11.340 g i 5 minutter, hvorefter absorbansen ved OD⁵⁹⁰ aflæses på spektrofotometer (Milton Roy; Spectronic 601). Der måles mod en blank (MSM-medie + RBB-Avicel). Efter aflæsning hældes supernatanten tilbage i Eppendorfrøret og der inkuberes videre.

Hydrolyseaktiviteten forsøges øget ved at tilsætte 0.2% (w/v) Triton X-100 til en ufortyndet kulturvæske. Desuden testes om Avicelaserne er afhængige af levende celler for at kunne hydrolysere, ved at tilsætte 0.02% (v/v) Azid til en kulturvæske 18 timer før assay.

Resultater og diskussion

Indledningsvist er der lavet et forsøg med supernatant (ikke sterilfiltreret) fra både *Cytophaga hutchinsonii* og *Cellulomonas uda* samt lidt Cellozyme® (Novo Nordisk), hvor RBB-Avicel blev tilsat i en koncentration på 1 mg/ml (data ikke vist). Forsøget viste, at supernatant fra *C. hutchinsonii* ikke hydrolyserede RBB-Avicel, hvorimod supernatant fra *C. uda* og Cellozyme hydrolyserede RBB-Avicel men langsomt.

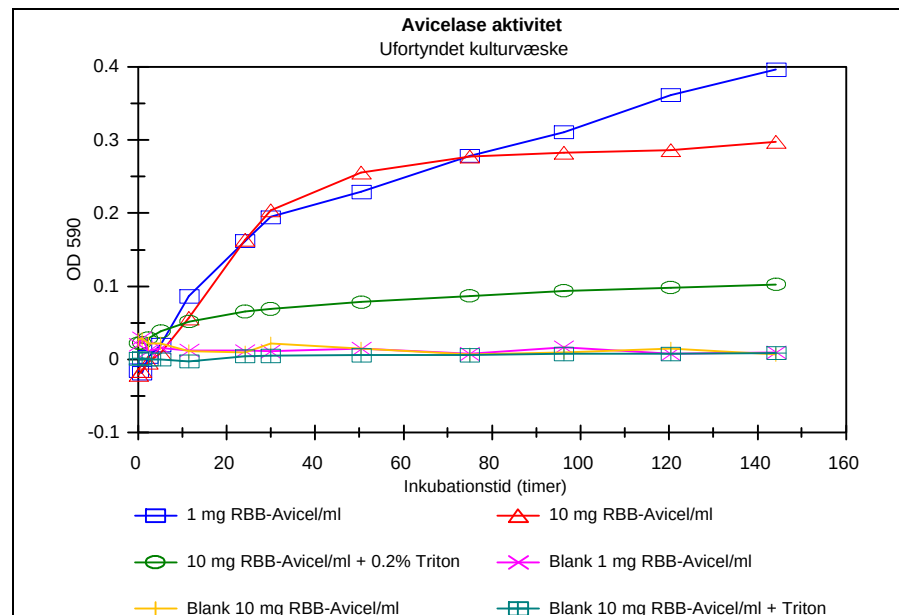


Figur 11: Avicelase aktivitet hos en 7 dage gammel kultur med *C. hutchinsonii*, dyrket på MSM-medie + filterpapir. Prøverne er lavet i triplikat.

Hydrolyseaktiviteten hos en 7 dage gammel kultur af *Cytophaga hutchinsonii* og dennes supernatant (sterilfiltreret) er vist i figur 11. Her ses det, at cellerne fra *C. hutchinsonii* har betydning for hydrolyse af RBB-Avicel. Sterilfiltreret supernatant har ingen aktivitet overfor RBB-Avicel og derfor må Avicelaseaktiviteten udelukkende være tilknyttet cellerne. Dertil kommer, at Avicelaserne, eller den hydrolytiske del af enzymerne, må være lokaliseret på celleoverfladen, da substratet ikke kan komme ind i cellerne. Kulturens alder betyder, at mange celler er lyserede og derfor må der også være Avicelaser i supernatanten, men de kan tilsyneladende ikke hydrolysere. Måske er Avicelaserne afhængige af cellerne for at kunne få kontakt med substratet, eller også denaturerer de samtidig med at cellerne lyserer. Dette står i modsætning til forsøgene med måling af filterpapirsaktivitet, hvor der tilsyneladende kunne måles en lav hydrolyseaktivitet i supernatanten (jvf. figur 9a, side 37). En forklaring herpå kan være, at filterpapir er lettere tilgængeligt for cellulaserne end Avicel, da filterpapirsaktiviteterne blev målt over 2 timer hvorimod Avicelaseaktiviteterne først kunne

registreres efter 2 timers inkubation. Endvidere har cellerne måske flere forskellige cellulasers til rådighed, som kan hydrolysere filterpapir, da supernatanten havde filterpapirsaktivitet, men ikke Avicelaseaktivitet.

En måde at få efterprøvet supernatantaktiviteten på filterpapir kunne være, at lave et assay med farvet filterpapir (RBB-filterpapir), hvilket muligvis er et mere følsomt assay til måling af exocellulaseaktivitet. Et sådant assay er udviklet af Poincelot and Day (1972).



Figur 12: Avicelase aktivitet hos en 6 dage gammel kultur dyrket på MSM + filterpapir. 0.2% (w/v) Triton er tilsat i assay. Prøverne er lavet i duplikat.

Tilsætning af 0.2% (w/v) Triton X-100 til assay hæmmer hydrolyseaktiviteten (figur 12). Triton X-100 er en non-ionisk detergent, som opløser plasmamembraner hos gram negative bakterier. Detergenten efterlader den ydre membran intakt og den forårsager normalt ikke protein denaturering og dermed tab af biologisk aktivitet (Schnaitman, 1981). Herved kunne man forestille sig, at nogle af de celleassocierede enzymer ville få lettere ved at komme i kontakt med substratet, men det ser imidlertid ud som om Triton inhiberer enzymerne eller måske forhindrer kontakt med substratet.

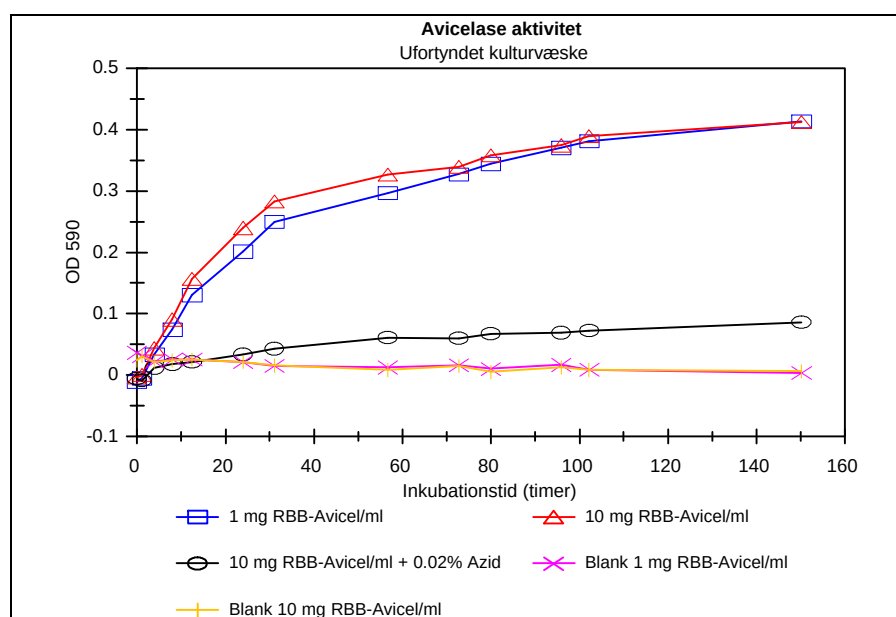
Behandling med azid viser, at Avicelaseaktiviteten afhænger af levende celler (figur 13). Azid blokerer elektrontransport fra cytokrom c til O_2 i elektrontransportkæden (Stryer, 1988). Måske sker der en produktinhibering af Avicelaserne når cellerne er døde og ikke længere optager hydrolyseprodukterne. Man kunne prøve at teste Avicelasernes følsomhed overfor cellobiose eller glucose, ved at tilsætte sukrene i forskellige koncentrationer til et assay.

I figur 11 nås en høj slut OD⁵⁹⁰ hos kulturvæsken sammenlignet med kulturvæskerne i figur 12 og 13, hvilket må betegnes som variationer mellem kulturvæskerne. Hydrolyseraterne indenfor 30 timer er af samme størrelsesorden i de tre forsøg, selvom kulturvæskerne er forskellige.

For en substratkoncentration på 1 mg/ml er raterne henholdsvis 0.007/time og 0.008/time, (figur 12 og 13). Med en substratkoncentration på 10 mg/ml er hydrolyseraterne i de tre forsøg, (figur 11,12 og 13), på henholdsvis 0.009, 0.008 og 0.010 (OD⁵⁹⁰/time). R² ligger mellem 0.98-0.99 for alle de beregnede rater. Der er tilsyneladende ikke substratbegrænsning ved en substrat-koncentration på 1 mg/ml, da en 10 gange højere substratkoncentration ikke resulterer i en 10 gange højere hydrolyserate.

Hydrolyseraten er højst indenfor de første 12 timer, hvorefter den gradvist aftager. Dette kan forklares ved, at enzymerne initielt hydrolyserer både amorft og krystallinsk Avicel. Avicel har en krystallinitet på omkring 47% (Wood, 1988). Hydrolyseraten falder efterhånden som substratet bliver mere krystallinsk, og enzymerne får vanskeligere ved at hydrolysere.

Farvet såvel som ufarvet Avicel bruges som substrat til at teste aktiviteten af et komplet enzymsystem og/eller test af exoglucanaseaktivitet. Da en del af substratet er amorft vil endoglucanaser sandsynligvis også kunne hydrolysere substratet. De initielle hydrolyserater kan derfor være et udtryk for både endo- og exo-glucanase aktivitet. Efterhånden som substratet hydrolyseres vil den krystallinske andel blive større og hydrolyseraten målt efter en vis inkubationstid er måske et bedre udtryk for exoglucanaseaktivitet. Med bakterietyper som *Cytophaga hutchinsonii* sker hydrolysen dog meget langsomt, selvom der anvendes ufortyndet kulturvæske.



Figur 13: Avicelase aktivitet hos en 5 dage gammel kultur, dyrket på MSM-medie + filterpapir. 0.02% (v/v) Azid er tilsat 18 timer før assay. Prøverne er lavet i duplikat.

Konklusion

Avicelaseaktiviteten hos *Cytophaga hutchinsonii* må være celleassocieret, da supernatant ikke kan hydrolysere RBB-Avicel. Enzymerne, eller enzymernes aktive sites, er sandsynligvis lokaliseret på celleoverfladen. Tilsætning af 0.2% (w/v) Triton X-100 til assay inhiberer Avicelaseaktiviteten og enzymerne er afhængige af levende celler, da behandling med azid hæmmer hydrolyseaktiviteten. Måske udsættes Avicelaserne for produktinhibering når cellerne er døde og ikke længere optager hydrolyseprodukterne.

Hydrolysen af RBB-Avicel er meget langsom med en bakterietype som *Cytophaga hutchinsonii*.

Perspektivering

Lave niveauer af sukre kan også detekteres ved at måle total sukker vha. en fenol-svovlsyre metode udviklet af Dubois et al. (1956). I en undersøgelse af Li and Gao (1997) kunne man ikke måle reducerende sukre i cellulosemedier hos *Cytophaga* sp., men det var muligt at måle lave niveauer af total sukker. Det kunne være interessant at se om måling af total sukker i stedet for reducerende sukre i assay med *C. hutchinsonii* giver tilfredsstillende resultater.

Man kunne også prøve med farvet filterpapir og farvet α -Cellulose på samme måde som med farvet Avicel for at se om det giver mere eller mindre følsomme assays. Et assay med farvefrigivelse fra farvet filterpapir, farvet med Remazol Brilliant Blue R, er tidligere beskrevet af Poincelot and Day (1972).

Exocellulaseaktiviteterne med *C. hutchinsonii* er meget lave i det hele taget og det kunne være interessant at optimere aktiviteterne så de også kan måles med andre metoder end farvefrigivelse; bestemmelse af sukre vha. HPLC er måske et alternativ til de testede metoder.

Man kunne også undersøge exocellulasernes egenskaber nærmere ved at lave en oprensning af enzymerne.

Endoglucanaseaktivitet

CMCase aktivitet med RBB-CMC som substrat; forsøg med ændring af fældningsreagens

Metoden er beskrevet i en artikel af Wirth and Wolf (1992), hvor den bl.a blev anvendt til at beskrive endocellulase aktiviteten hos enzymer ekstraheret fra jord. Princippet i denne metode er, at opløste RBB-CMC molekyler over en vis længde kan fældes med HCl. Kortere fragmenter af RBB-CMC, som er hydrolyseret fra substratet, forbliver i opløsning. RBB-CMC (Blue Substrates) er imidlertid konserveret med NaN_3 , der fordampes ved syretilsætning, hvilket rent praktisk kræver ekstra forholdsregler. I stedet for at fælde med HCl forsøges med en mættet NaCl-opløsning. Cellozyme®, der hovedsageligt er endocellulolytisk, bruges som testenzym.

Materialer og metoder

Reagenser

RBB-CMC (Blue Substrates, opløst i demineraliseret vand, 4 mg/ml) opløses i fosfatbuffer til 1.6 mg/ml

NaCl, mættet opløsning

HCl, 2M

Cellozyme® (Novo Nordisk)

Fosfatbuffer, 0.1M pH 6

Millipore vand

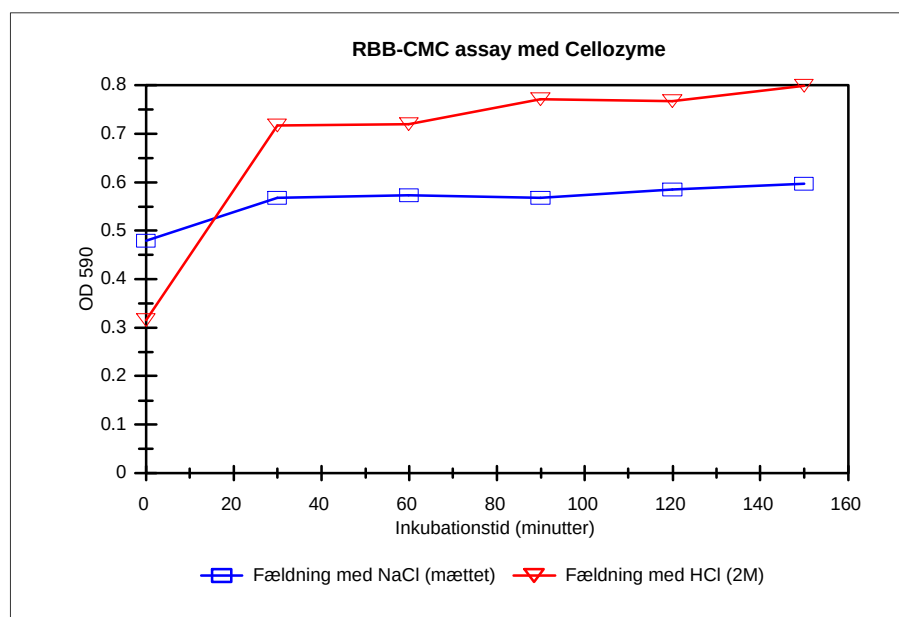
Fremgangsmåde

En smule Cellozyme opløses i 10 ml fosfatbuffer, der centrifugeres ved 11.340 g (Sigma 115; 13.000 rpm) i 5 minutter for at fjerne coatingrester. Herefter blandes 6 ml Cellozyme opløsning med 19 ml RBB-CMC således, at substratkoncentrationen er 1.2 mg/ml i assayet. Der inkuberes ved 45 °C i oliebad.

2 x 2 prøver á 0.6 ml udtages med 30 minutters interval. 0.15 ml HCl tilsættes to af prøverne og 0.6 ml NaCl tilsættes de to sidste prøver. Prøverne stilles på isbad i 10 minutter. Herefter centrifugeres prøverne ved 11.340 g i 3 minutter, hvorefter de henstår i yderligere 10 minut-

ter inden aflæsning af absorbtion ved 590 nm på spektrofotometer (Milton Roy; Spectronic 601). Der måles med Millipore vand som reference.

Resultater og diskussion



Figur 14: Fældning af ikke-hydrolyseret RBB-CMC med hhv. mættet NaCl-opløsning og 2M HCl. Absorbans måles på de hydrolyserede fragmenter. Substratkoncentrationen er 1.2 mg/ml.

Resultatet viser, at den største følsomhed opnås ved at anvende HCl til fældning af ikke-hydrolyseret RBB-CMC (figur 14). Sammenlignes de initiale aktiviteter, under de givne assaybetingelser, er fældning med HCl 4.5 gange mere følsom end fældning med NaCl ($0.0134/\text{minut} : 0.003/\text{minut}$). Begyndelsesværdien er meget høj med NaCl som substratfælder, hvilket tyder på interferens.

Enzymet er substratbegrænset, da kurven topper allerede efter den anden måling.

Konklusion

Endocellulaseaktivitet målt med RBB-CMC som substrat, hvor ikke-hydrolyseret substrat fældes med en mættet NaCl opløsning i stedet for 2 M HCl, viser ikke tilstrækkelig følsomhed og der er interferens med NaCl.

CMCase aktivitet i supernatant fra *Cytophaga hutchinsonii*, målt som reducerende sukre vha. Biquinolinreagens

Der hersker stadig stor uenighed om CMCase aktiviteten hos bakterier er extracellulær eller celleassocieret. Måling af extracellulær cellulaseaktivitet er forbundet med færre metodiske problemer end måling af celleassocieret aktivitet og det giver langt flere muligheder, at kunne studere enzymerne uden metabolisk interferens fra cellerne.

I det følgende undersøges endocellulaseaktivitet i supernatant fra *Cytophaga hutchinsonii* med CMC som substrat. Tidligere i rapporten er det vist, at supernatant fra *C. hutchinsonii* kan hydrolysere RBB-CMC ved en agar-diffusions test, (jvf. "Medier og substrater til isolering af cellulytiske bakterier" side 19). Da der blev anvendt supernatant fra en kulturvæske i stationærfasen, er der ikke tale om måling af "ægte" extracellulær CMCase aktivitet, fordi en del af aktiviteten sandsynligvis skyldes enzymer fra lusede celler.

Materialer og metoder

Metoden er den samme som er beskrevet i afsnittet om "Filterpapirs- og Avicelase-aktivitet målt som reducerende sukre vha. Biquinolinreagens" side 34.

Substratopløsning

1% (w/v) CMC opløst i MSM-medie. Reagenser er som beskrevet side 35 .

Glucosestandarder

En 50 mM glucosestamopløsning fortyndes til koncentrationer på 2-100 µg/ml i: Millipore vand (A) og MSM-medie + CMC (B), således at CMC-koncentrationen er 0.5% (w/v) som i CMCase assay.

Enzymopløsning (supernatant)

En udvokset kultur, kultiveret i 5 dage, centrifugeres ved 13.793 g (Biofuge fresco, Hereaus

Instruments; 13.000 rpm) ved 4 °C i 30 minutter, hvorefter supernatanten fjernes forsigtig og benyttes som enzymopløsning.

Fremgangsmåde til CMCase assay

500 µl enzymopløsning fortyndet 8 gange i MSM-medie inkuberes med 500 µl CMC-opløsning i Eppendorfrør ved 30 °C i thermomixer. Fra enzymopløsningen udtages med jævne mellemrum 100 µl prøver, der stilles ved 80 °C i 10 minutter for at inaktivere enzymet. Udtagne prøver stilles på køl indtil alle prøver er udtaget. 50 µl fra hver prøve udtages og blandes med 1 ml reagens AB og stilles i vandbad ved 80 °C i 25 minutter. Reaktionen stoppes i isvand. Absorbtionen måles ved 562 nm på spektrofotometer (Milton Roy; Spectronic 601) med en enzymblank som reference.

Enzymblank: 500 µl MSM-medie + 500 µl CMC-opløsning, der behandles på samme måde som prøverne.

Værdien til tiden nul fratrækkes de øvrige prøver, da t_0 -værdien er et udtryk for enzymopløsningens baggrundsværdi.

Glucosestandarderne: 50 µl fra hver glucosestandard, blandes med 1 ml reagens AB og behandles som de øvrige prøver.

Beregning af enzymaktivitet

Koncentrationen af glucoseækvivalenter (µg/ml) aflæses enten direkte på glucosestandardkurven eller beregnes ud fra hældningen af glucosestandardkurven og skæringspunktet med y-aksen (findes vha. lineær regression).

$$\text{Beregning af aktiviteten i milli units (mU/ml): } \frac{(\mu\text{g/ml}) * 1000 * \text{fortyndingsfaktor}}{180.16 * \text{minutter}}$$

1 U = µmol frigivet glucoseækvivalent /minut (Wood and Bhat, 1988)

Tæller: µg/ml = koncentrationen af glucose i prøven

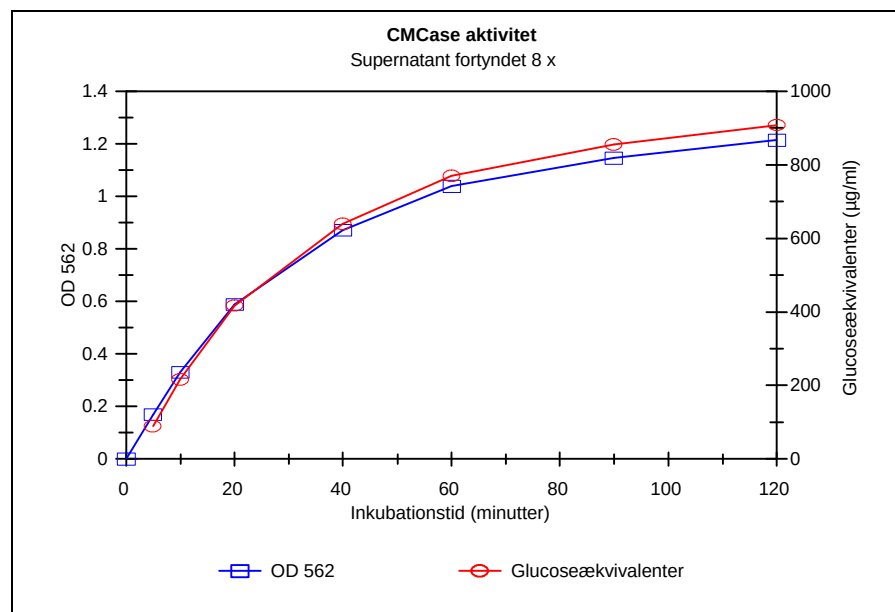
1000 = omregning fra units til mU

fortyndingsfaktor = enzymets fortynding i assay

Nævner: 180.16 = molekylvægten af glucose (g/mol)

minutter = inkubationstid

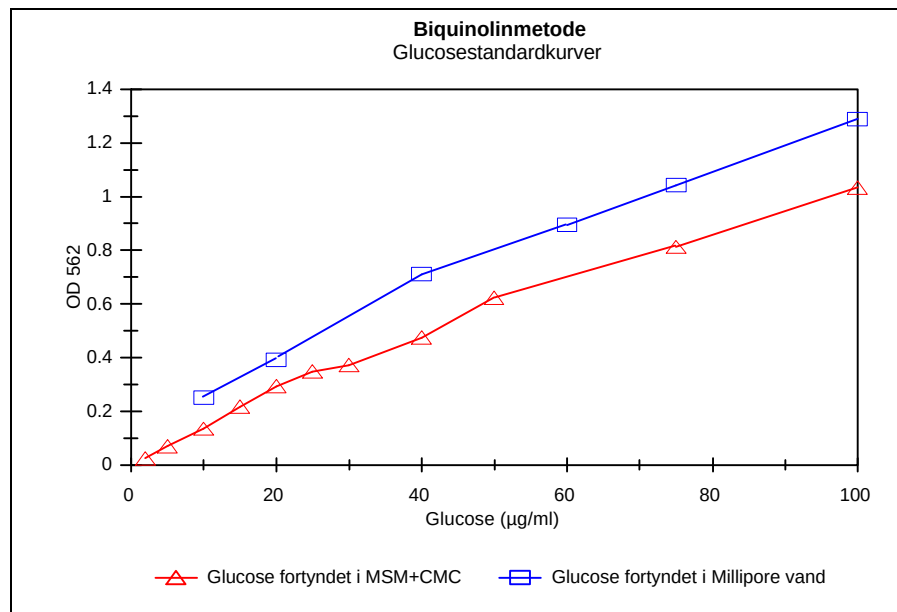
Resultater og diskussion



Figur 15: Supernatant (enzymopløsning) fra en 5 dage gammel kultur dyrket på MSM-medie + filterpapir, der viser hydrolyseaktiviteter (OD 562 og glucoseækvivalenter ($\mu\text{g/ml}$)).

CMCaseaktiviteten samt raten omregnet til glucoseækvivalenter ($\mu\text{g/ml}$) er størst indenfor de første 20 minutter af assay (figur 15). Den højeste enzymaktivitetsrate omregnet i units er 120 mU/ml. Efter ca. 20 minutter falder hydrolyseraten. En forklaring på affladning af kurverne kan være produktinhibering, men det er ikke sandsynligt, fordi der ikke dannes metaboliserbare hydrolyseprodukter som glucose eller cellobiose, idet cellerne ikke kan vokse på CMC som tidligere beskrevet (side 24). Enzymerne er sandsynligvis substratbegrænsede, hvilket kunne undersøges ved at lave assay med forskellige koncentrationer af CMC.

Da kulturen er 5 dage gammel ved høst af supernatanten, vil der være en vis andel af lyserede celler i kulturen, der har lækket CMCase og CMCaseaktiviteten afspejler således også den celleassocierede aktivitet.



Figur 16: Glucosestandard fortyndet i Millipore vand, målt med Millipore vand som reference (firkanter); og en glucosestandard fortyndet i MSM + CMC, målt med MSM + CMC som reference (trekanter). NB! Der er benyttet forskellig AB reagens, da standarderne er lavet i to forskellige forsøg.

Glucosestandardkurver med glucosestandarde fortyndet i henholdsvis Millipore vand og i MSM-medie + CMC, hvor der er korrigeret for interferensen fra MSM-medie og CMC, er vist i figur 16. Tidligere forsøg har vist, at både MSM-medie og CMC interfererer med reagens AB, men interferensen er konstant under hele assayet. Interferensen afspejles i glucosestandarderne, ved en lavere OD-værdi for den samme glucosekoncentration i standardprøverne, hvilket medfører et overestimat af glucosekoncentrationen i assayprøverne. Der er tillige en faktor mht. reagens AB, da glucose-standarde ikke blev målt med den samme opløsning af reagenset. I en tidligere måling af glucosestandarde fortyndet i Millipore vand, hvor der også blev benyttet en anden reagens AB, ses en forskel i hældningskoefficienterne på 4.5% ved at benytte forskellig AB reagens [0.0115 ($\text{OD}^{562}/\mu\text{g glucose/ml}$), $R^2=0.99$ og 0.0110 ($\text{OD}^{562}/\mu\text{g glucose/ml}$), $R^2=0.99$].

Der viser sig at være generelle problemer mht. at bestemme enzymaktivitet som udvikling i reducerende sukre:

Forskellige fortyndinger af enzymerne medfører forskellige standardkurve-respons, da der ikke er proportionalitet mellem fortyndinger af enzymerne og udvikling i absorbans. En 4 gange fortynding af supernatanten i MSM-medie resulterer i højere værdier end forventet sammenlignet med en 2 gange fortyndet supernatant. Det kan skyldes, at der er substratbegrænsning i den 2 gange -fortyndede supernatant og man derfor underestimerer målingerne. Ændringer af ion-koncentrationen eller -sammensætningen kan stimulere aktiviteten,

men ionkoncentrationen i assay burde ikke blive forstyrret af betydning, når der fortyndes i MSM-medie.

Anvendelse af forskellige kulturer som basis for enzymopløsninger giver også problemer, hvis man ønsker reproducerbare resultater. Selvom kulturene har ens vækstbetingelser og enzymerne høstes på det samme tidspunkt er det meget vanskeligt at få de samme hydrolyseaktiviteter, da længden af lagfasen varierer meget. Man kan ikke bruge celletætheden som mål for kulturens tilstand hos kulturer dyrket på uopløselige substrater, fordi cellerne både sidder på substratet og flyder rundt i mediet.

Hydrolyseaktiviteten afhænger også af, om der er mere eller mindre interferens med standardkurven. I ovennævnte forsøg tilsættes alle glucosestandarder den samme koncentration af CMC hvilket ikke tager forbehold for, at CMCkoncentrationen under assay falder med inkubationstiden.

En sidste faktor, som er vigtig i forbindelse med disse enzymaktivitetsmålinger, er stabiliteten og holdbarheden af reagenset. Reagens AB er stabilt i få uger, hvorimod opløsning A og B hver for sig er stabile i flere måneder. For at sikre sig, at reagenset ikke ændrer sig af betydning, kan man medtage nogle få standarder hver gang der laves et nyt assay, og hver gang reagenset er nyt laves en ny standardkurve.

Der er kun lavet få målinger af CMCaseaktiviteter hos *Cytophaga* spp. I en undersøgelse af extracellulær CMCaseaktivitet hos *Cytophaga* sp. (CLS-32), målt som reducerende sukre vha. Nelson/Somogyi metoden, er der rapporteret om aktiviteter på 12-30 U/ml efter 20 minutters inkubation, afhængig af vækstsubstratet (Malek et al., 1988). Begyndelses- substratkoncentrationen i assay var 0.6% CMC, men det fremgår ikke, hvilket CMCsubstrat der blev anvendt, og hvilken temperatur assayene blev udført ved, dog blev cellerne dyrket ved 37 °C. Desuden blev CMCaseaktiviteterne målt efter 72 timers vækst, hvilket kan betyde, at den målte aktivitet ikke kun er udtryk for den extracellulære aktivitet, men også viser den celleassocierede aktivitet. Umiddelbart er der en meget stor forskel i hydrolyseaktivitet, men det er vanskeligt helt at sammenligne resultaterne pga. forskellige assaybetingelser, hvor substratkoncentrationen og måske temperaturen og CMCsubstratet varierer, hvilket er af stor betydning (Mullings, 1985). Desuden måles aktiviteterne ved to forskellige metoder.

I en anden undersøgelse af celleassocieret CMCase aktivitet hos en *Cytophaga* sp. (WTHC 2421), målt som reducerende sukre vha. DNS reagens, blev der rapporteret en aktivitet på 87 mU/ml ved 30 °C efter 30 minutters inkubation (Chang and Thayer, 1977). Substratkoncentrationen i begyndelsen af assay var 0.5% CMC (Sigma). Her er assaybetingelserne mere sammenlignelige med mit forsøg, dog er enzymopløsningerne vidt forskellige og aktiviteterne måles med to forskellige metoder.

Konklusion

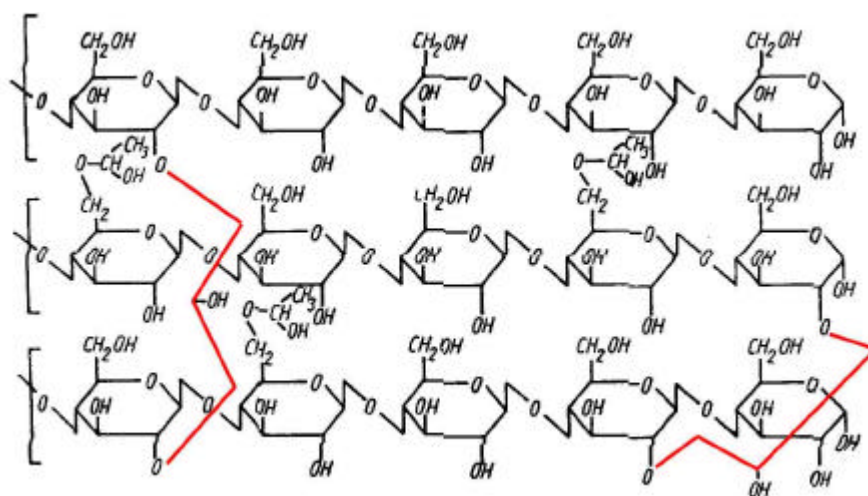
Supernatant fra *Cytophaga hutchinsonii* indeholder endocellulaser, der hydrolyserer CMC og hydrolyseprodukterne kan måles som reducerende sukre vha. Biquinolinreagens.

En del af CMCase aktiviteten er celleassocieret.

Hydrolyseaktiviteten er størst indenfor de første 20 minutter af assayet, men noget mindre end de aktiviteter, som er målt i andre undersøgelser.

Karakterisering af endoglucanaseaktivitet hos *Cytophaga hutchinsonii* vha. AZCL-HECellulose

Hydroxyethylcellulose er et opløseligt substrat, men krydsbindinger mellem enkeltkæder gør substratet uopløseligt (Zemek et al., 1981; Safarik and Safarikova, 1991). Et eksempel på krydsbinding af hydroxyethylcellulose er vist i figur 17. Farvet HECellulose (AZCL-HECellulose, Mega Zyme) har krydsbindinger for ca. hver 15. sukker enhed (B. McCleary, pers. kommunikation). Krydsbinding medfører en højere substitueringsgrad og mindsker cellulasernes affinitet for substratet, men ulempen herved opvejes ved den rent praktiske fordel i, at man undgår fældning af ikke-hydrolyseret substrat, som ved aktivitetsmålinger med opløseligt RBB-CMC (jvf. side 47). AZCL-HECellulose fra Mega Zyme har en hydroxyethyl-substitueringsgrad på 0.9, hvilket betyder, at 9 ud af 30 frie hydroxylgrupper indeholder en HE-gruppe. Farvemolekylet AZCL (Azorin-, Mega Zyme), er fordelt med én pr. 20 sukker enheder (B. McCleary, pers. kommunikation).



Figur 17: Et eksempel på strukturen af hydroxyethylcellulose krydsbundet vha. epichlorhydrin. Krydsbindingerne kan være mellem nabokæder eller mellem hver anden cellulosekæde (vist med rødt). Substitueringsgraden med hydroxyethyl er 0.2 i dette eksempel. Figuren er fra Zemek et al. (1981).

Med HECellulose som substrat måles hydrolyseaktiviteter udtrykt som frigivelse af farve (farvekoncentration) pr. tid (OD^{590}/minut).

I det følgende testes cellulaseaktivitet hos *C. hutchinsonii* ved forskellige temperatur- og pH-værdier tillige ved forskellige koncentrationer af NaCl, glucose og cellobiose. Cellulasestabiliteten testes ligeledes ved forskellige temperaturer. Cellulaseproduktion undersøges ved vækst af *C. hutchinsonii* på forskellige substrater samt ved vækst i tilstedeværelse af Triton

X-100 eller Tween 80. Endelig bestemmes cellulaseaktiviteten løbende under et vækstforløb. I de fleste forsøg sammenlignes supernatant- og kulturvæske-aktiviteterne.

Materialer og metoder

Inden et standard assay kunne anvendes, måtte proceduren optimeres mht. håndtering af substratet. Der blev lavet en samlet udvejning af AZCL-HECellulose i et scintillations vial fremfor udvejning til det enkelte Eppendorfrør. Glasset er inden tilsætning af substrat skyllet med 0.1% (w/v) Triton X-100 for at hindre adhæsion til overfladen. Pippettespidser afklippes og skylles i Triton før afpipetering til Eppendorfrør. Desuden homogeniseres substratsuspensionen, da AZCL-HECellulose svulmer op i suspension og disse "flager" er uhomogene.

AZCL-HEcellulase assay (standard assay)

HEcellulaseaktivitet måles på kulturvæsken og supernatanten. Supernatanten fås enten ved at centrifugere celsuspensionen ved 11.340 g (Sigma 115; 13.000 rpm) i 15 minutter, eller ved yderligere at filtrere gennem et 0.20 µm filter (Sartorius sterilfilter), for at fjerne eventuelle overskydende celler.

Substrat: AZCL-HECellulose (Mega Zyme; Batch AZCLCE 21102)

Buffer: 50 mM NaP ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$), pH 7.

Standard fremgangsmåde

Substratet suspenderes i 50 mM NaP (3.2 mg/ml) i en 20 ml scintillations vial, skyllet med 0.1% (w/v) Triton X-100 opløst i 50 mM NaP. Opløsningen homogeniseres herefter 2-3 minutter ved hastighed 4-5 i homogenisator (KINEMATICA; Polytron-Aggregate PT 1200). Eppendorfrør tilsættes 1.375 ml 50 mM NaP og 125 µl prøve (enzymopløsning). Umiddelbart før inkubationsstart tilsættes 0.5 ml substrat således, at prøven fortyndes 16 gange. Substratet holdes suspenderet vha en magnet og en magnetomrører medens der udtages 0.5 ml med Pipetman (Gilson), hvor spidsen er klippet af pipettespidser og resten er skyllet i Triton X-100. I det færdige assay er AZCL-HECellulose koncentrationen 0.8 mg/ml. Der inkuberes ved 30 °C i thermomixer (Eppendorf Thermomixer 5437). Enzymblank er 1.5 ml NaP buffer + 0.5 ml AZCL-HECellulose.

Der måles absorbtion på spektrofotometer (Milton Roy; Spectronic 601) ved 590 nm således: Prøverne tages ud af thermomixeren og centrifugeres ved 11.340 g i 5 minutter. Supernatanten pipeteres over i plastkuvetter. OD⁵⁹⁰ aflæses og supernatanten pipeteres tilbage i Eppendorfrørret og inkuberes videre. Absorbtion - enzymblank afbildes som funktion af tiden. Enzymaktivitetsraten beregnes ud fra den lineære del af kurven (normalt indenfor 2-3 timer) som OD⁵⁹⁰/minut.

Diverse undersøgelser

Vækstforløb med glucose som substrat

Fra en kultur i eksponentiel vækst (MSM + MOPS + 0.2% (w/v) glucose) overføres celler (4%, v/v) til MSM-medie (K₂HPO₄, 2g/l) + 0.2% (w/v) glucose i en Erlenmeyerkolbe og stilles i rysteinkubator ved 30 °C. Prøver udtages sterilt med passende interval, hvor celletæthed (OD⁶⁰⁰) og pH måles (Spektrofotometer, Milton Roy, Spectronic 601; pH meter 28, Radiometer Copenhagen). Desuden udtages prøver af kulturvæske og supernatant, der nedfryses i Eppendorfrør ved -20 °C. Supernatanten fås ved at centrifugere ved 11.340 g i 15 minutter, hvorefter supernatanten forsigtigt pipeteres fra.

AZCL-HECellulase assay udføres med de frosne prøver af kulturvæske og supernatant fortyndet 16 gange i 50 mM NaP, som beskrevet ovenfor.

Glucoseforbrug måles vha. DNS reagens, hvor prøverne fortyndes i Millipore vand afhængig af glucosekoncentrationen og en standardkurve fremstilles som tidligere beskrevet.

Behandlinger med detergent og ethanol

Forsøg A

Som et forsøg på at øge HEcellulaseaktiviteten tilsættes detergenterne Triton X-100 og Tween 80 (Sigma, P-1754) til kulturer i vækst på følgende måde: Fire kulturer dyrkes på samme medie i 25 ml Pyrex rør (MSM + 0.2% (w/v) glucose + MOPS). Til tre af kulturene tilsættes efter 2 dages vækst (OD⁶⁰⁰ ≈ 0.4) henholdsvis (1): 0.1% (w/v) Triton X-100, (2): 0.1% (w/v) Tween 80 og (3): både 0.1% Triton og 0.1% Tween. Den sidste kultur benyttes som kontrol. Kulturene henstår yderligere i 4 dage, hvorefter AZCL-HEcellulase standard assay udføres.

Forsøg B

I modsætning til forsøg A behandles cellulaserne først i forbindelse med assayet. Den samme kultur som i forsøg A anvendes, men kulturen er her 11 dage gammel ($OD^{600} = 0.350$, $pH = 6.75$) og der anvendes både frisk og frosset kulturvæske. Før assay tilsættes henholdsvis 15% (v/v) og 50% (v/v) ethanol til friske prøver, mens en ubehandlet kulturvæske fungerer som kontrol. Den frosne kulturvæske er nedfrosset ved $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ tilsat 0.1% (w/v) Triton X-100, kontrollen er frosset uden tilsætning af Triton. Også her udføres standard assay.

Temperaturoptimum

Forsøg udføres ved 10, 20, 23, 30, 40 og $50\text{ }^{\circ}\text{C}$. Supernatant og kulturvæske høstes fra en 3 dage gammel kultur, kultiveret på MSM + 0.2% (w/v) glucose + K_2HPO_4 (2 g/l). $OD^{600} = 0.250$, $pH = 7.0$. I assay fortyndes enzymerne 10 gange i 50 mM NaP, $pH\ 7$.

Procedure

AZCL-HECellulose (3.2 mg/ml i 50 mM NaP) forinkuberes i thermomixer til den rette temperatur inden tilsætning af enzym. Prøverne inkuberes i 20 minutter efter enzymtilsætning. En blank (substrat + NaP) medtages for hver temperatur. Herefter centrifugeres prøverne ved 13.793 g (Biofuge fresco, Hereaus Instruments; 13.000 rpm) ved $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ i 15 minutter. Absorbansen aflæses ved OD^{590} mod en enzymblank som før beskrevet. Den relative aktivitet afbildes som funktion af temperaturen.

Temperaturstabilitet

I dette og flere andre forsøg anvendes frosset kultur og supernatant taget fra samme batch dyrket på MSM medie + 0.2% (w/v) glucose + K_2HPO_4 (2g/l). Kulturen er høstet efter 2 dage, hvor $OD^{600} = 0.533$ og $pH = 6.7$. Supernatanten er høstet efter 3 dage, hvor $OD^{600} = 0.660$ og $pH = 6.7$. Kultur og supernatant (sterilfiltreret) nedfryses ved $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Forsøg udføres ved 20, 30, 40, 45 og $50\text{ }^{\circ}\text{C}$. Supernatanten og kulturvæsken fortyndes (i 50 mM NaP, $pH\ 7$), henholdsvis 4 og 10 gange, undtagen i forsøget ved $45\text{ }^{\circ}\text{C}$, hvor supernatant og kulturvæske fortyndes henholdsvis 5 og 8 gange.

Procedure

Enzymerne forinkuberes, i Eppendorfrør, ved de respektive temperaturer, men inkubationstiden varierer, (fra 20 minutter - 4 timer og 2 timer - 24 timer) alt efter hvilken temperatur som

testes. Forinkubationen af de forskellige prøver igangsættes således, at de alle er færdige på samme tidspunkt. Herefter tilsættes AZCL-HECellulose til Eppendorfrørene som tidligere beskrevet, ved 30 °C, hvor der aflæses absorbans efter 30, 60 og 90 minutter. Som en kontrol medtages prøver, der ikke har været forinkuberede, men derudover behandles de på samme måde som de øvrige prøver.

Enzymaktivitetsraten af de forinkuberede prøver afbildes i % af den maximale aktivitetsrate (aktiviteten af de ikke-forinkuberede prøver ved 30 °C) som funktion af inkubationstiden.

pH-optimum

Der anvendes samme kultur og supernatant som i temperaturstabilitetsforsøget.

I dette forsøg fortyndes enzymerne 10 gange i 40 mM Britton-Robinson buffer (Rauen, 1964). pH i bufferen indstilles fra 5 til 9. AZCL-HECellulose udvejes til hvert enkelt Eppendorfrør således, at substratkonzentrationen er 0.8 mg/ml i assay. For hver pH laves en blank (Britton-Robinson buffer + substrat). Efter enzymtilsætning inkuberes prøverne ved 30 °C i thermomixer og OD⁵⁹⁰ aflæses over et tidsinterval på 0-120 minutter.

Effekt af cellobiose-, glucose- og NaCl-tilsætninger

Der anvendes samme kultur og supernatant som i temperaturstabilitetsforsøget.

I disse forsøg fortyndes alle prøver 16 gange i 50 mM NaP, pH 7. Prøverne udsættes for varierende cellobiose-, glucose- og NaCl-konzentrationer i assay således:

Cellobiose forsøget: Cellobiosekoncentrationen i assayrørene varierer fra 0-4% (w/v). Blank med henholdsvis 0, 0.2 og 4% cellobiose fremstilles.

Glucose forsøget: Glucosekoncentrationen i assayrørene varierer fra 0-20% (w/v). Blank med henholdsvis 0, 0.3, 2, 5, 10, 15 og 20% glucose fremstilles.

NaCl forsøget: NaCl koncentrationen i assayrørene varierer fra 0-20% (w/v). Blank med henholdsvis 0, 5, 10 og 20% NaCl fremstilles.

Herudover behandles alle prøver som tidligere beskrevet for AZCL-HEcellulase assay.

Glucose-/pH-effekt

Fire kulturer podes med samme podekultur, hvor alle vokser på MSM-medie. To kulturer har 0.2% (w/v) glucose, hvoraf den ene yderligere er tilsat MOPS (8 g/l). De to andre kulturer dyrkes med 0.6% (w/v) glucose, hvoraf den ene er tilsat MOPS. Der udtages prøver til måling af celledensitet (OD⁶⁰⁰) og pH. Desuden nedfryses kulturvæske og supernatant. AZCL-HEcellulaseaktiviteten måles på de optøede prøver vha. standard assay.

HEcellulase-aktiviteten sammenlignet efter vækst på forskellige substrater

Seks Erlenmeyerkolber podes med samme podekultur. Kulstofkilderne tilsættes hver sin kolbe indeholdende MSM-medie + K_2HPO_4 (2 g/l). Kulstofkilderne cellobiose (Sigma), D-glucose (Merck), α -Cellulose (Sigma), Avicel (SERVA), filterpapir (Whatman # 1) eller HE-Cellulose (Merck) tilsættes til en koncentration på 0.2% (w/v). Der udtages kultur fra 3. til 7. vækstdag og der måles OD^{600} hvor dette er muligt samt pH. Kulturvæske nedfryses ved -20 °C. AZCL-HEcellulaseaktiviteten måles på de optøede prøver ved standard assay.

Resultater og diskussion

Indledende forsøg med AZCL-HECellulose som substrat til test af endoglucanaseaktivitet viser en høj hydrolyseaktivitet. Substratkonsentrationen er lav (0.8 mg/ml), da AZCL-HECellulose er ret kostbart, men ved en 16 gange fortynding af enzymerne er aktiviteten lineær inden for en periode af 3 timer. Afbrydelse af assayet ved hver måling påvirker ikke lineariteten af enzymaktiviteten. Spektrofotometret måler lineært med frigivet AZCL indtil $OD^{590} > 1.4$.

Skylning af glasset til opbevaring af substratsuspensionen, i 0.1% Triton X-100, bevirker en øgning i cellulaseaktiviteten sammenlignet med en direkte udvejning i Eppendorfrør. Der er aktivitetsvariationer mellem de enkelte assayreplikater på 5-20% ved direkte udvejning. Samlet udvejning og homogenisering af AZCL-HECellulose før assay giver en mindre variation imellem replikater. Således viste indledende forsøg med prøver i triplikater en variation på 10% i gennemsnit. Det er især homogeniseringen, som mindsker variationen og det kan forklares ved, at celluloseflagerne får et mere ensartet overfladeareal, hvormed enzymerne får adgang til et mere homogent substrat.

I forsøg uden replikater antages variationen at være 10% og forsøg med replikater fremgår af de enkelte figurer.

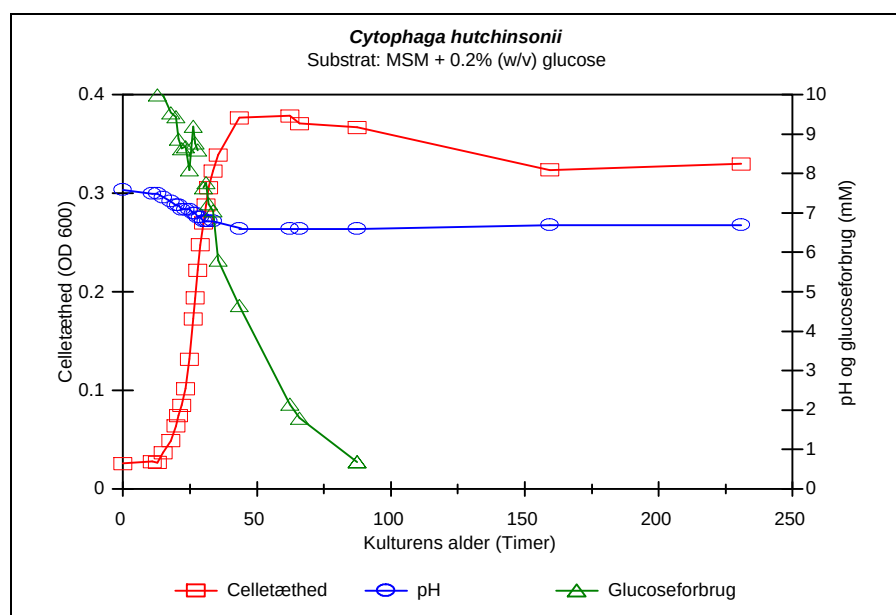
Alle forsøg, på nær et, udføres i tidsserier af mindst 70 minutters varighed.

Anvendelse af frosset fremfor frisk enzymmateriale betyder en stigning i HEcellulaseaktivitet. Forholdet mellem supernatant- og kulturvæske-aktiviteterne varierer mellem de enkelte kulturer, men er fundet til at variere mellem 33-53% hos både friske og frosne enzymprøver taget fra kulturer i stationærfasen. Prøver taget fra en kultur i den eksponentielle vækstfase viser, at supernatantandelen ligger under 30% af kulturvæskens hydrolyseaktivitet og i den statio-

nære fase udgør supernatantaktiviteten ca. 33% af kulturvæskeaktiviteten (vises i afsnit vedr. "Vækstforløb med glucose som substrat" side 62).

Hydrolyseaktiviteten målt med AZCL-HECellulose som substrat er konstitutiv. Forsøg med en kultur overført tredje gang med glucose som væksts substrat viser en Hecellulase aktivitet i samme størrelsesorden som de to foregående generationer (data ikke vist).

Vækstforløb med glucose som substrat



Figur 18: Vækstforsøg med *Cytophaga hutchinsonii* med måling af celletæthed og pH. Glucoseforbrug er målt på frosset supernatant vha. DNS-reagens.

Vækstforløbet af *Cytophaga hutchinsonii*, med udvikling i celletæthed, glucoseforbrug og pH er vist i figur 18. Det ses, at lagfasen varer omkring 15 timer, men det afhænger meget af podekulturens tilstand. Fordoblingstiden er 5 timer og kulturen når maximal celletæthed efter 43 timer. Stationærfasen indtræder efter ca. 50 timer, hvorefter glucosekoncentrationen falder fra ca. 5 mM til under 1 mM. Kulturen forbruger således kun halvdelen af den tilgængelige glucose inden væksten stagnerer. pH falder til gengæld en enhed i løbet af den eksponentielle vækstfase, hvorefter den er stabil.

Hydrolyseaktiviteten er proportional med væksten, som det ses af figur 19. Kulturvæskens Hecellulaseaktivitet er højst imellem 43-66 timers vækst. Aktiviteten i supernatanten er derimod både på sit højeste og stabil fra 43 timer og resten af målingerne. Kulturens stationær fase har ikke indflydelse på supernatantenzymene, men aktiviteten hos kulturvæsken mind-

skes efterhånden som cellerne lyserer, hvilket er tydeligt efter 90 timer. Måske bliver enzymerne, der er tilknyttet cellerne, udsat for proteaser når cellerne lyserer eller også kan enzymerne ikke fungere uden intakte celler. En test af cellulaseaktiviteten specifik tilknyttet cellerne kan udføres ved at fjerne supernatanten fra en kultur og eventuelt vaske med medie. Hydrolyseaktiviteten fra levende celler sammenlignet med aktiviteten fra lyserede eller azid-behandlede celler vil afsløre om de intracellulære HEcellulaser er afhængige af intakte celler. I samme test vil man få et mål for den intracellulære cellulaseaktivitet sammenlignet med kulturvæske- og supernatant-aktivitet.

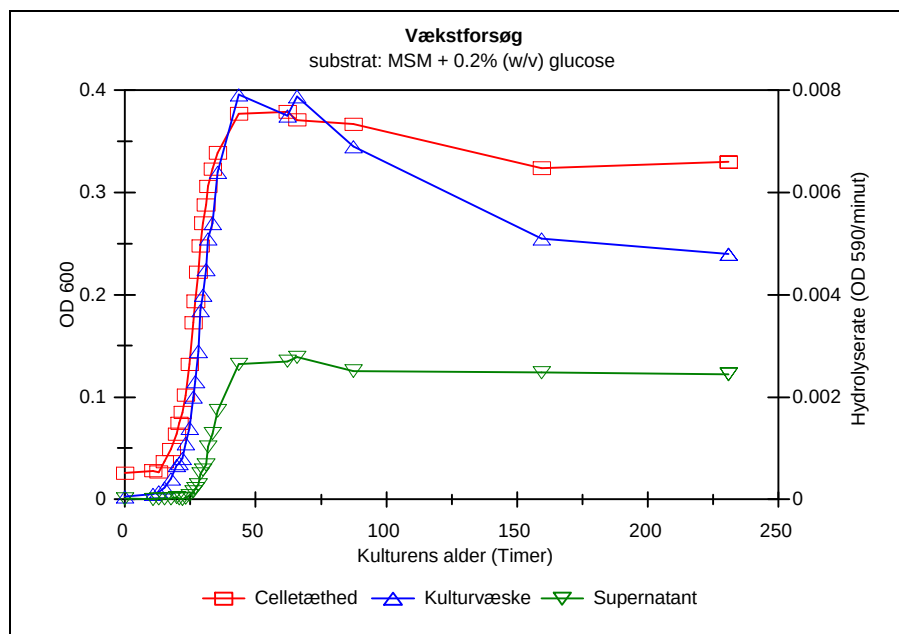
Supernatantaktiviteten er et udtryk for ekskretion af endocellulaser, hvilket ikke tidligere er rapporteret for denne bakterie. Tværtimod anføres det, at Cytophagaerne er ude af stand til at producere extracellulære cellulaser (Brock et al., 1994). Hvis cellerne ikke udskiller cellulaser burde det ikke være muligt at måle supernatantaktivitet i løbet af kulturens eksponentielle vækstfase, med mindre cellerne lyserer under centrifugering af kulturvæsken før nedfrysning og derved frigiver celleassocierede cellulaser til supernatanten.

En forklaring på, at supernatantaktiviteten er konstant efter 43 timer kan være, at tilførsel af cellulaser fra lyserede celler går lige op med nedbrydning af enzymerne pga. proteaseaktivitet.

Forsøg med *Cellvibrio fulvus* kultiveret på 0.5% glucose viser, at extracellulær CMCase aktivitet først kan detekteres efter at kulturen er kommet i stationærfasen (Berg et al., 1972).

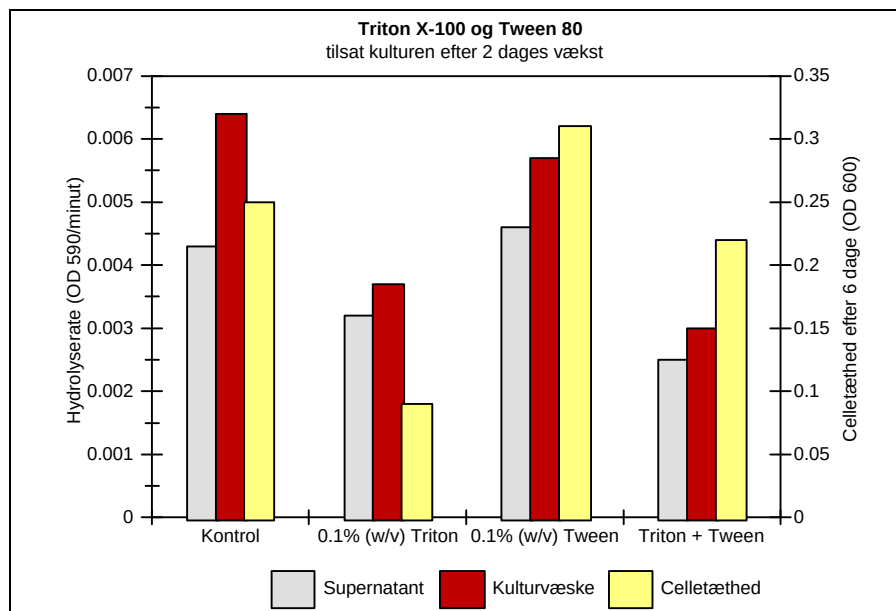
Den cellebundne CMCaseaktivitet mindskes samtidig med, at den cellefrie aktivitet øges efter stationærfasen er nået, hvilket ikke er et eksempel på ekskretion af endocellulaser, men et udtryk for, at kulturen frigiver cellebundne CMCase efterhånden som kulturen ældes (Berg et al., 1972).

Supernatantens andel af den totale HEcellulaseaktivitet udvikler sig fra 1-50% i løbet af vækstperioden (figur 19). Efter 28 timers vækst er supernatantens andel kun på 10% af kulturvæskens, men i den sidste del af den eksponentielle vækstfase, efter 43 timer, hvor kulturen stagnerer, er supernatantens andel på 33%. Supernatantens andel vokser herefter til 50% pga. at, aktiviteten hos kulturvæsken falder.



Figur 19: Celltæthed målt under vækstforsøget og Hecellulaseaktiviteter er målt som standard assay på frosne prøver af kulturvæske og supernatant. Hydrolyseaktiviteterne er beregnet ud fra tidsserier på 170-220 minutter.

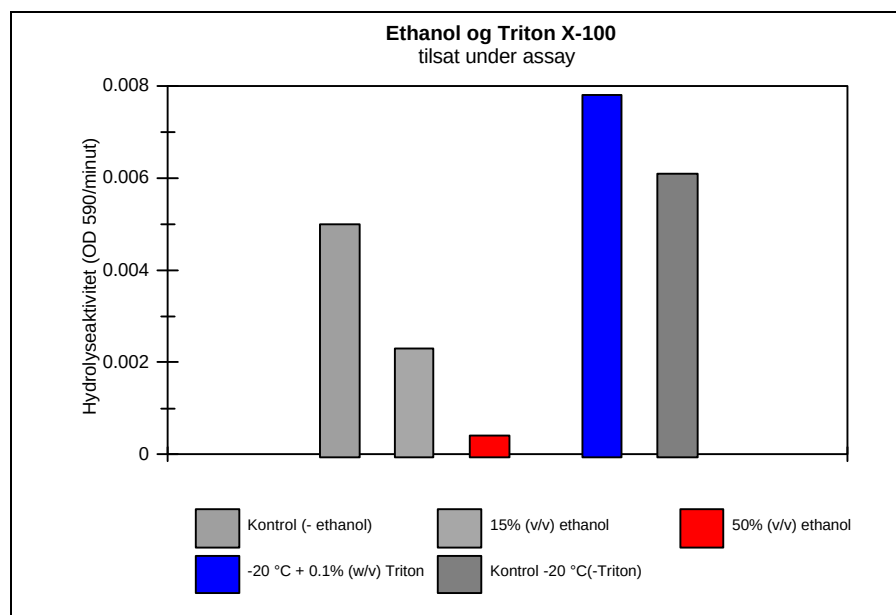
Behandlinger med detergent og ethanol



Figur 20: Forsøg A; tilsætning af detergenter til kulturer efter 2 dages vækst på MSM-medie + 0.2% (w/v) glucose + MOPS. Hecellulase standard assay er udført efter 6 dages vækst. Hydrolyseaktiviteterne er beregnet ud fra tidsserier på 70-160 minutter.

Forsøg A viser, at man ikke opnår en forøgelse i Hecellulase aktiviteten ved tilsætning af de to detergenter til kulturen under vækst (figur 20). Figuren viser også, at celltætheden efter 6 dage i de fire vækstrør varierer kraftigt fra 0.090 til 0.310 og er således langt under værdien

på ca. 0.4 efter 2 dages vækst. Assayet burde ideelt set have været udført efter 3 dage, hvor celletætheden stadig er høj og detergenterne sandsynligvis har nået at virke. Triton har en tydelig effekt på væksten af *Cytophaga hutchinsonii*, da celletætheden er meget lav efter 6 dage (figur 20). Tween har ikke den samme effekt på væksten som Triton, her er celletætheden højere end kontrollens, men hydrolyseaktiviteten hos kulturvæsken er lavere end kontrollens. Triton X-100 og Tween 80 er non-ioniske detergenter, der som tidligere nævnt opløser plasmamembraner, men normalt ikke forårsager protein denaturering og dermed tab af biologisk aktivitet. Detergenterne virker udelukkende på den celleassocierede cellulaseaktivitet, som mindskes. Sammenligner man forholdet mellem supernatantaktiviteterne og kulturvæskeaktiviteterne hos de fire kulturer viser det sig, at tilsætning af detergent medfører en øging af supernatantens andel af kulturvæskens aktivitet på ca. 17%. Dette tyder på, at celleassocierede cellulaser frigives til supernatanten ved tilsætning af detergent.

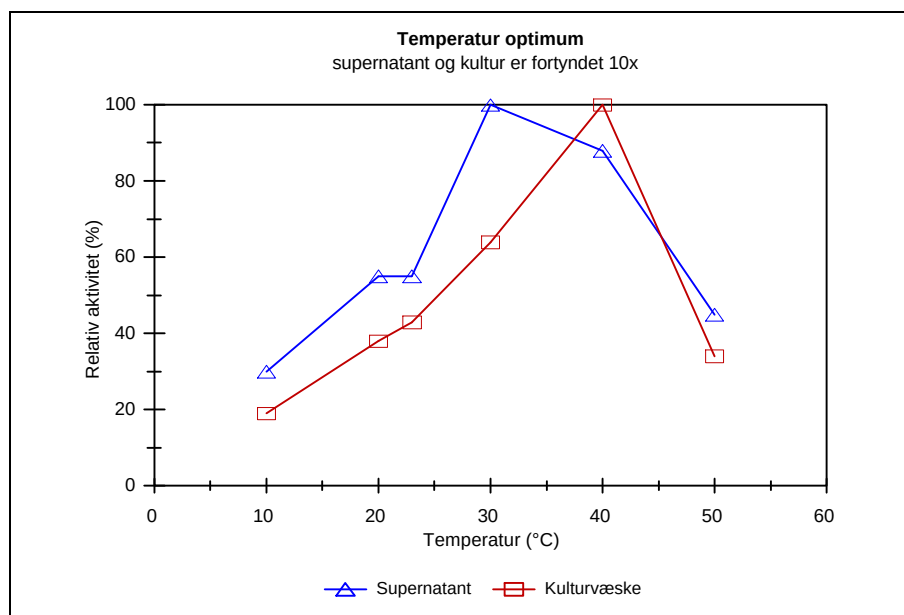


Figur 21: Forsøg B; tilsætning af ethanol og Triton X-100, under HECelulose standard assay. Der er anvendt den samme kultur som i figur 20, men kulturen er her 11 dg. gammel. Hydrolyseaktiviteterne er beregnet ud fra tidsserier på 170 minutter.

Forsøg B viser, at der tilsyneladende kan opnås en stimulering af cellulaseaktiviteten ved at tilsætte Triton X-100 umiddelbart før nedfrysning (figur 21). Der blev ikke lavet assay med supernatant tilsat Triton, hvilket kan be- eller afkræfte om den forøgede cellulaseaktivitet skyldes enzymerne tilknyttet cellerne. Forsøg med Tritontilsætning burde også udføres med en ung frisk kultur, hvor andelen af lyserede celler er lav, for at se om Triton har en stimulerende effekt på hydrolyseaktiviteten i denne del af vækstfasen.

Det ses endvidere, at ethanoltilsætning hæmmer cellulaseaktiviteten (figur 21).

Temperaturoptimum



Figur 22: En 3 dage gammel, kultur dyrket på MSM + 0.2% glucose. Prøverne forinkuberes til den rette temperatur inden tilsætning af enzym. Prøverne inkuberes i 20 min, efter enzymtilsætning. Den relative hydrolyserate er beregnet ud fra hydrolyseaktiviteten (OD^{590}/minut) efter 20 minutters inkubationstid. Kulturvæskeprøverne er lavet i triplikat.

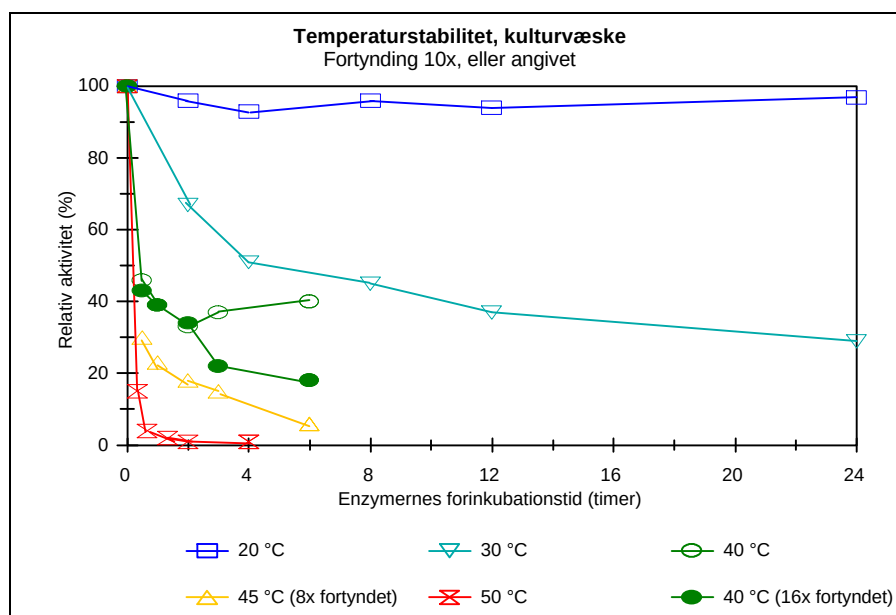
HEcellulaseaktiviteten er højst ved 40 °C for kulturvæsken og ved 30-40 °C for supernatanten, når en variation på 10% medregnes (figur 22). Det skal bemærkes, at kulturen var lidt "tynd" ($OD^{600} = 0.250$) til at fortynde supernatanten 10 gange i assay, hvor kun én måling lå højere end 0.1 (30 °C-testen). Desuden blev enzymaktiviteterne ikke stoppet ved at stille prøverne på is umiddelbart efter de 20 minutters inkubationstid. Alle prøver blev imidlertid behandlet ens inden aflæsning af absorbans, hvilket er det vigtigste i forhold til at vise de relative hydrolyseaktiviteter.

Der er målt temperaturoptimum på lichenaser fra tørret kultur ("dry preparations") af *Cytophaga globulosa* i forbindelse med hydrolyse af lav (Fåhræus, 1946-48). *C. globulosa* er i det store hele i overensstemmelse med *Sporocytophaga myxococcoides* og findes ikke beskrevet som selvstændig art hos forskellige kultursamlinger (DSMZ og ATCC) eller i Bergeys Manual (1989), dog er bakterien benævnt *Sporocytophaga globulosa* hos Stanier i 1940 (Christensen, 1977). Fåhræus fandt, at 36 °C var optimum efter 24 timers hydrolyse, men efter 4 timer var hydrolyseraterne ens ved 36 og 42 °C, hvilket stemmer overens med mine fund.

En anden *Cytophaga* sp., isoleret fra jord, udskiller amylase, som er rapporteret til at have temperaturoptimum ved 50 °C ved nedbrydning af opløst stivelse (Jeang et al., 1995). Desuden bevarer enzymet over 50% aktivitet, efter 1 times inkubation ved temperaturer mellem

30-60 °C. Supernatant cellulaserne fra *C. hutchinsonii* er meget mere temperaturfølsomme, hvor de kun har over 50% aktivitet, indenfor 20 minutter, ved temperaturer mellem 20-40 °C.

Temperaturstabilitet



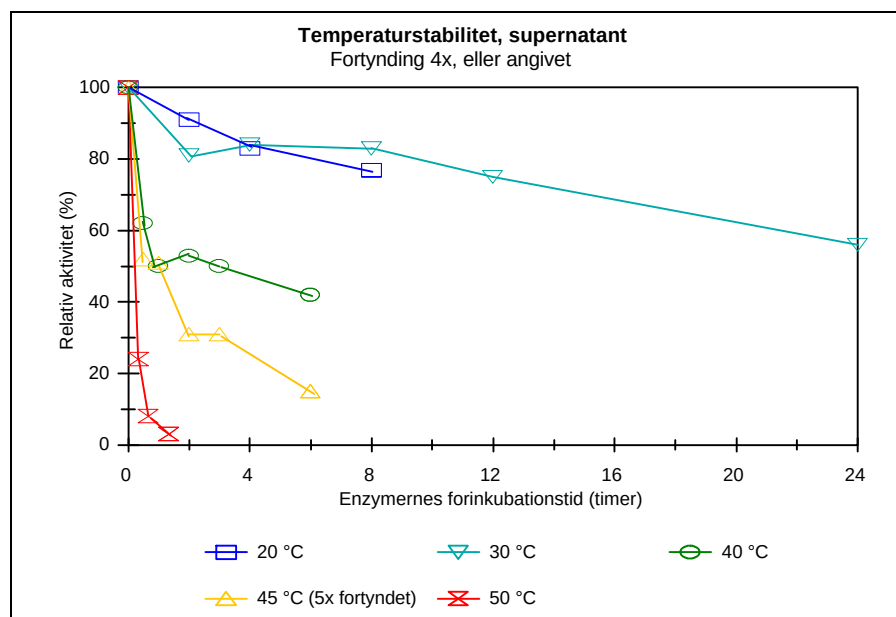
Figur 23: Frosset kultur dyrket i MSM-medie + 0.2% glucose og høstet efter 2 døgn. Kulturvæsken forinkuberes i de angivne tidsrum inden substrattilsætning. De relative aktiviteter er beregnet ud fra hydrolyseraten (OD^{590}/minut) i løbet af tidsserier på 90 minutters Hecellulase assay.

Temperaturstabiliteten for kulturvæsken og supernatanten er afbildet på figur 23 og 24. Hos kulturvæsken er Hecellulaseaktiviteten stabil ved 20 °C, men allerede ved 30 °C falder enzymaktiviteten brat til 50% efter 4 timer og yderligere til 30% efter et døgn (figur 23). I et andet temperaturstabilitetsforsøg, med 16 gange fortynding af to tilsvarende kulturer med *C. hutchinsonii*, ses tilsvarende fald i cellulaseaktiviteten indenfor 4 timer ved 30 °C (data ikke vist).

Ved 40 °C er der vist to kurver for kulturvæskens aktivitet, hvor kulturen er fortyndet henholdsvis 10 og 16 gange. Aktiviteterne divergerer efter 2 timers forinkubation, men det antages for mest sandsynligt, at aktiviteten falder til 18% fremfor at holde sig omkring 30-40%, efter 1-6 timer ved 40 °C. Dette begrundes ved, at cellerne ikke var i stand til at overleve ved 40 °C. Selvom Hecellulaserne i kulturvæsken har optimum ved 40 °C er det ikke ensbetydende med, at de er stabile ved denne temperatur, men i mange andre tilfælde er enzymer dog mere thermotolerante end cellerne. Forsøget ved 40 °C burde have været forlænget til 12-24 timer, for at teste om restaktiviteten holder sig stabilt omkring 20%.

Enzymerne destabiliseres yderligere ved 45 °C og ved 50 °C forsvinder aktiviteten helt, efter blot 4 timers inkubation.

Supernatantens HEcellulaser er tilsyneladende ikke stabile ved 20 °C (figur 24), men da der mangler to vigtige punkter efter 12 og 24 timers forinkubation, kan man ikke afgøre om enzymerne er stabile ved denne temperatur; evt. på et lidt lavere niveau end hos kulturvæsken. Ved 40, 45 og 50 °C ligger supernatantcellulasernes temperaturstabilitet på niveau med kulturvæskens, hvis man regner med en variation på 10%. Overraskende mister enzymerne i supernatanten ikke så meget aktivitet ved 30 °C som kulturvæskens enzymer, hvilket er uventet da extracellulære cellulaser, alt andet lige, er mere udsatte end cellulaser tilknyttet cellerne. I et tidligere forsøg, hvor prøverne blev forinkuberet i 1½ time ved 20, 30, 40 og 50 °C, viste de relative supernatantaktiviteter sig, at ligge markant under kulturvæskens aktiviteter ved alle fire temperaturer (data ikke vist). Assaybetingelserne er ens i de to forsøg bortset fra kulturvæsken, der var fra en 3 dage gammel "frisk" kultur og supernatant (ikke steriliseret).



Figur 24: Frosset supernatant fra samme kultur som i figur 23, men supernatanten er høstet efter 3 døgn. Supernatanten forinkuberes i de angivne tidsrum inden substrattilsætning. De relative aktiviteter er beregnet ud fra hydrolyseraten (OD^{590}/minut) i løbet af tidsserier på 90 minutters HEcellulase assay.

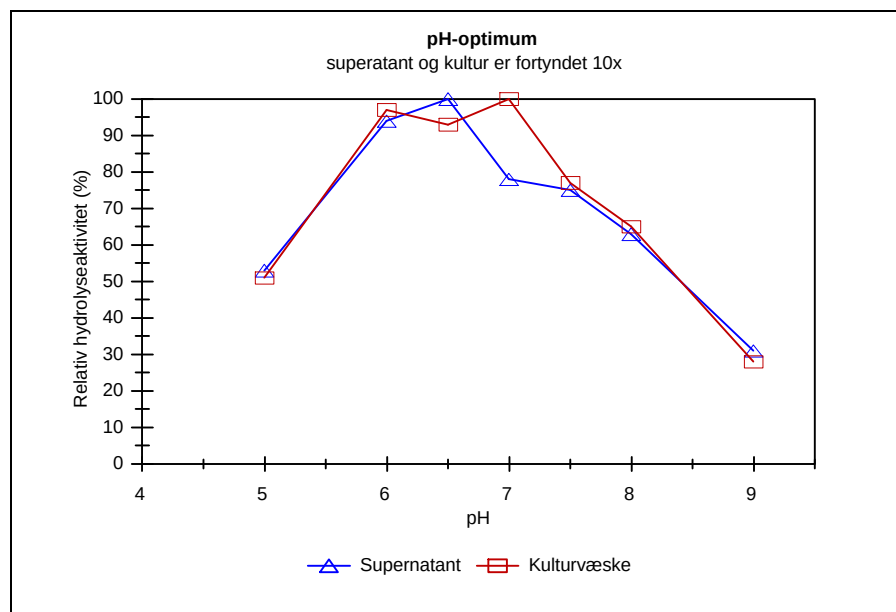
Der benyttes fire forskellige fortyndinger af enzymerne i forsøget, hvilket har indflydelse på de reelle hydrolyseaktiviteter (OD^{590}/minut), da der ikke er proportionalitet imellem fortyndingerne. Men i ovenstående forsøg er det den relative hydrolyserate, som er interessant og derfor har de forskellige fortyndinger ingen betydning for resultaterne.

Cellulaserne er ikke specielt temperaturstabile, hvilket også er fundet hos lichenaser fra en anden Cytophaga, *C. globulosa* (Fåhræus, 1946-48). Her blev der målt temperaturstabilitet

på tørret kultur suspenderet i buffer. Enzymerne var meget temperaturfølsomme ved forvarmning ved henholdsvis 50, 60 og 70 °C i 5 minutter, hvor lichenase aktiviteten faldt henholdsvis 50%, 40% og 6% i forhold til en ikke-forvarmet prøve.

Sami et al. (1988) målte temperaturstabilitet i supernatanten fra *Cellulomonas flavigena*, hvor enzymerne blev forinkuberet ved henholdsvis 10-90 °C i 30 minutter inden Avicelase- og CMCase-assay. Sammenlignet med HEcellulaseaktiviteterne fra *C. hutchinsonii*, er de relative supernatantaktiviteter nogenlunde ens ved 20-45 °C, men ved 50 °C har *C. flavigena* CMCaserne stadig omkring 30% aktivitet, hvor *C. hutchinsonii* kun har knap 10% tilbage. I et andet temperaturstabilitetsforsøg med *Cellulomonas uda*, hvor kultursupernatant blev forinkuberet ved 25-45 °C, i 24 timer, var CMCase aktiviteten stabil indtil 40 °C og faldt kun til 50% ved 45 °C (Nakamura and Kitamura, 1982). Dette viser en langt højere temperaturstabilitet end hos enzymerne fra *C. hutchinsonii*.

pH-optimum



Figur 25: Måling af pH-optimum er udført med den samme kultur og supernatant som i temperaturstabilitetsforsøget. Til HEcellulase assay er substratet udvejet til hvert enkelt rør. Den relative hydrolyseaktivitet er beregnet ud fra hydrolyseraten (OD^{590} /minut) i løbet af tidsserier på 90-120 minutter. Alle prøver er lavet i triplikat.

Den relative hydrolyseaktivitet af supernatanten og kulturvæsken for pH-værdier mellem 5 og 9 er vist i figur 25. Den optimale pH-værdi under de givne inkubationsbetingelser ligger mellem pH 6-7. HEcellulaserne er pH tolerante, da cellulaserne har en hydrolyseaktivitet på over 50% fra pH 5 til 8 og ved pH 9 er aktiviteten stadig på 30%.

For *Cytophaga globulosa*, hvor cellulaserne stammede fra tørret kultur og hvor cellofan var substrat, lå pH-optimum omkring 7 (Fåhræus, 1946-48). pH blev kun testet i området 5.4-7.4, hvor der var over 50% aktivitet.

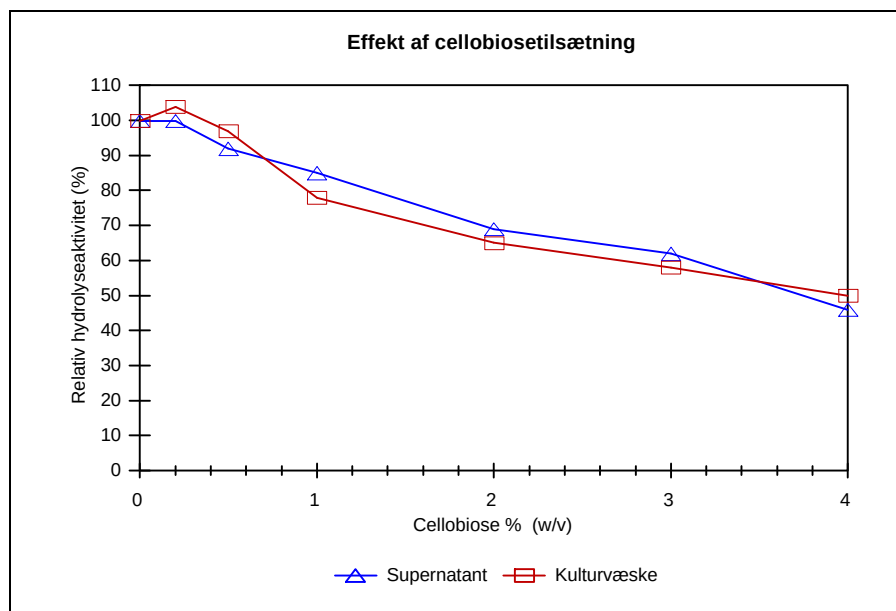
For en *Cytophaga* sp. undersøgt mht. amylaser lå pH-optimum mellem 4.5-6.5 og der var over 50% aktivitet fra pH 4-7.75 (Jeang et al., 1995).

Effekt af cellobiose-, glucose- og NaCl-tilsætninger

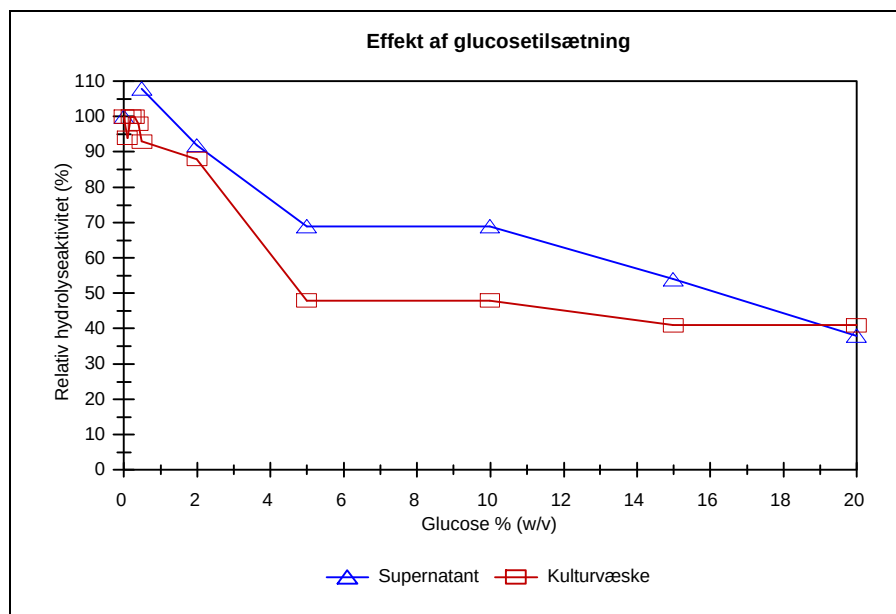
De relative supernatant- og kulturvæske-aktiviteter efter tilsætning af henholdsvis cellobiose og glucose på er vist i figur 26 og 27. Cellulaseaktiviteterne hæmmes mere eller mindre ved tilsætning af disse sukre. Enzymerne er mere følsomme overfor cellobiose end glucose. Ved 2% (w/v) cellobiose- og glucose-tilsætning er hydrolyseaktiviteterne henholdsvis 70 og 90% og ved 4% tilsætning er raterne på henholdsvis 50 og 60-75% af prøverne uden tilsætning af sukre.

En *Cytophaga* sp. udsat for 0.01% cellobiose og glucose i assay viste ens respons for de to sukre, nemlig en nedgang i CMCaseaktivitet på 6% (Chang and Thayer, 1977).

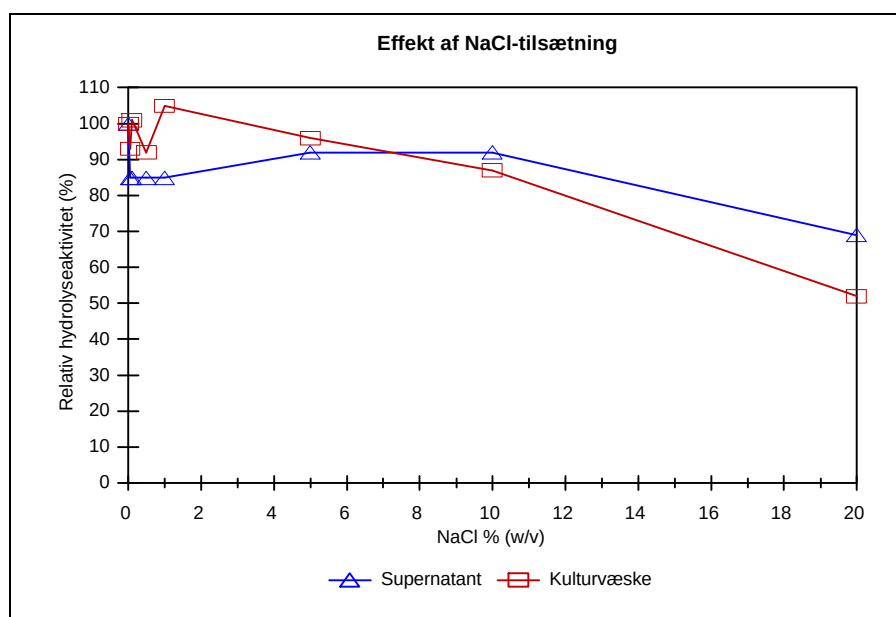
Stoppok et al. (1982), lavede et forsøg med *Cellulomonas uda*, med vaskede celler, udsat for cellobiose- og glucose-tilsætninger i assay på op til 50 mM. Der var ingen respons på glucose-tilsætningerne, men 50 mM cellobiose (1.7%) reducerede CMCaseaktiviteten med 50%, hvor *Cytophaga hutchinsonii* kun mister 30% aktivitet ved denne cellobiosekoncentration.



Figur 26: Der er anvendt samme kultur og supernatant som i temperaturstabilitetsforsøget. Der anvendes HECelulase standard assay og der laves tidsserier over 120-180 minutter.



Figur 27: Der anvendes samme kultur og supernatant som i temperaturstabilitetsforsøget. Der anvendes HEcellulase standard assay og der laves tidsserier over 120-180 minutter.



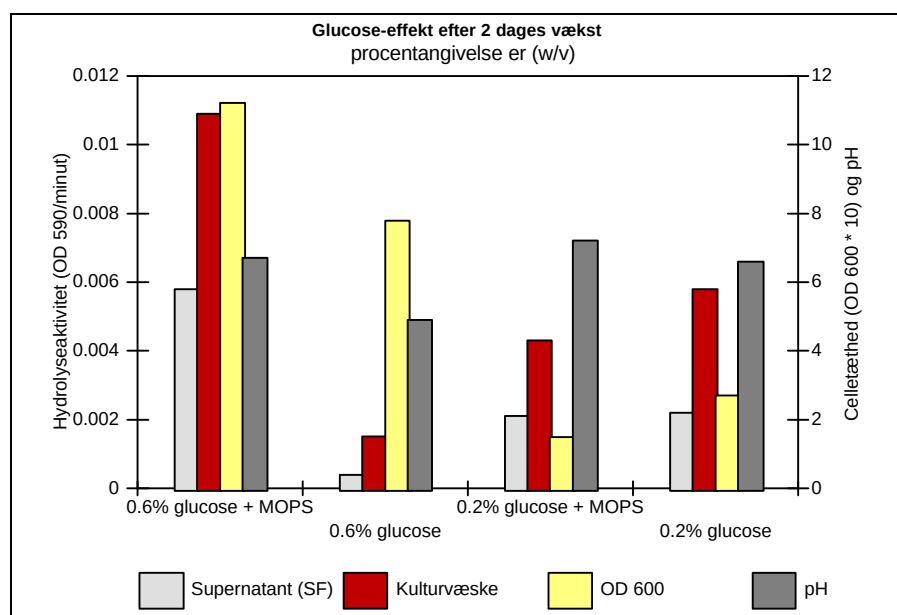
Figur 28: Der anvendes samme kultur og supernatant som i temperaturstabilitetsforsøget. Der anvendes HEcellulase standard assay, hvor forskellige koncentrationer af NaCl er tilsat. Der er lavet tidsserier over 120-180 minutter.

Figur 28 viser, at ved tilsætning af øgede NaCl-koncentrationer i assay sker der ikke en større ændring i hydrolyseaktiviteten, førend NaCl koncentrationen kommer over 10%. Aktiviteterne falder til 50-70%, ved en tilsætning på 20% NaCl. Dette tyder på, at cellulaserne er ekstremt halotolerante og måske endda moderat halofile. Denne egenskab må også siges at

være vigtig i det naturlige miljø i jord, hvor der sker udtørring fra tid til anden, og som medfører højere saltkoncentrationer.

Salt-tilsætning til assay kan også forårsage en stimulering af cellulaseaktiviteten. Et eksempel herpå er fra en undersøgelse med supernatant fra *Cellulomonas flavigena*, hvor man fandt en stimulering af CMCaseaktiviteten på 67% ved tilsætning af 10 mM CaCl_2 (Sami et al., 1988).

Glucose-/pH-effekt



Figur 29: Hydrolyseaktivitet af 4 forskellige kulturer mht. glucosetilsætning og MOPS. Hydrolyseaktiviteterne er beregnet ud fra HEcellulase standard assay, i tidsserier over 120-180 minutter.

En høj celletæthed og hydrolyseaktivitet ses hos en kultur tilsat 0.6% (w/v) glucose + MOPS efter 2 dages vækst (figur 29). Hos en anden kultur med 0.6% (w/v) glucose, men uden MOPS, ses også en høj celletæthed, hvorimod hydrolyseaktiviteten er lav, da pH i mediet er faldet meget under væksten (figur 29).

Kulturene tilsat 0.2% (w/v) glucose har overraskende stor forskel i celletæthed (figur 29). I kulturen uden MOPS er celletætheden 1.8 gange højere end kulturen tilsat MOPS, hvilket resulterer i en forskel i kulturvæskenes hydrolyseaktiviteter på 1.3. Supernatantaktiviteterne er tilgængelige ens.

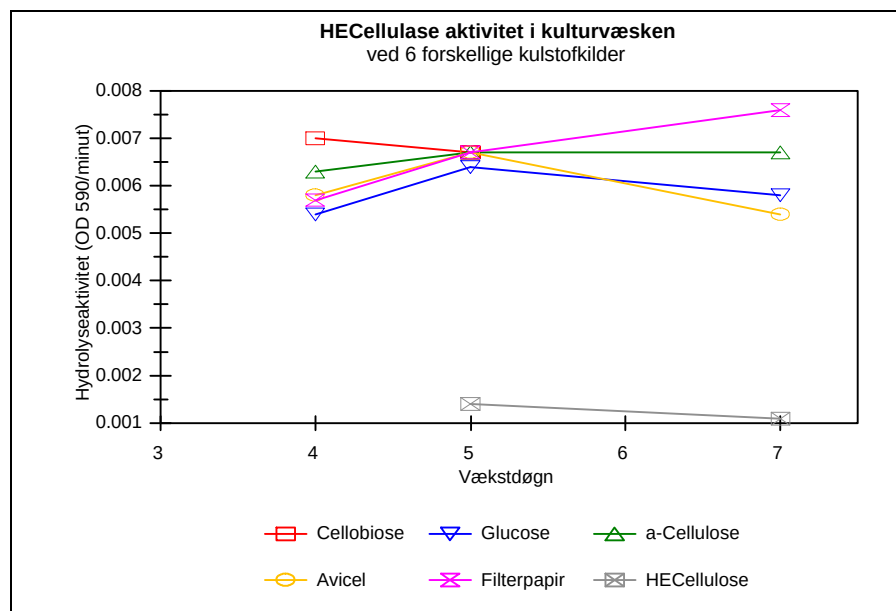
Celletætheden for kulturen tilsat 0.6% glucose + MOPS er 7.5 gange højere end hos kulturen med 0.2% glucose + MOPS, men hydrolyseaktiviteten er kun 2.5 gange højere hos kulturvæsken og 2.8 gange højere hos supernatanten. Det kan skyldes flere årsager: Der kan være forskel på hvor stor en andel af cellerne i de to kulturer, der er levende, hvilket celletætheden

den ikke afslører. En anden forklaring er, at cellulaserne inhiberes eller udsættes for repression. Inhibering af cellulaserne kan ske som produkt inhibition, hvor glucose forhindrer enzymerne i at udføre den normale hydrolyse af substratet. Repression af cellulaserne kan foregå når tilstedeværelsen af sukre undertrykker cellulasesyntesen, fordi det ikke er nødvendigt at opretholde en høj cellulaseproduktion så længe cellerne har tilstrækkeligt med glucose. Omregnes hydrolyseaktiviteten til aktivitet pr. celletæthed ($OD^{590}/\text{minut}/OD^{600}$) så viser det sig, at denne værdi falder hos kulturen med 0.6% glucose + MOPS sammenlignet med værdien hos kulturen tilsat 0.2% glucose + MOPS. Dette indikerer, at der er tale om repression af HECellulase syntesen.

I et forsøg med *Cytophaga globulosa*, hvor der blev tilsat 0.5% glucose i mediet sammen med cellofan, blev der målt på cellofanhydrolyse (Fåhræus, 1946-48). Efter et døgn var cellofanaktiviteten med glucose kun 1/3 af cellofanaktiviteten uden glucose.

Forsøg med glucosetilsætning til mediet hos *Cellulomonas* sp. viste catabolit repression, hvor cellulasesyntesen blev undertrykt i tilstedeværelse af moderate glucosekoncentrationer (Stewart and Leatherwood, 1976). Rodríguez et al. (1996) lavede forsøg med en anden *Cellulomonas* sp., der også viste repression af cellulasesynteserne ved tilsætning af henholdsvis 1% cellobiose, glucose eller xylose til mediet.

HECellulase-aktiviteten sammenlignet efter vækst på forskellige substrater



Figur 30: Hydrolyseaktiviteten hos kulturer dyrket i MSM-medie + 0.2% (w/v) af ovenstående kulstofkilder. HECellulase assay er udført i tidsserier over 180 minutter.

Der er stort set ikke forskel i hydrolyseaktiviteterne efter 5 dages vækst på fem ud af seks kulstofkilder (figur 30). Kulturen på HECellulose skiller sig ud, da der ikke var en tilfredsstillende vækst og de målte rater er således et udtryk for podekulturens aktivitet (der blev podet med 8% (v/v)). Vækst på de krystallinske substrater, α -Cellulose, Avicel og filterpapir, viser en tendens til højere HECellulaseaktivitet (større cellulaseproduktion) efter 7 dage. Derimod er tendensen ved vækst på glucose og cellobiose, at cellulaseaktiviteten er størst efter få dages vækst.

Yamane et al. (1970) lavede forsøg med *Pseudomonas fluorescens* var. *cellulosa*, hvor de bl.a. anvendte kontrollerede kulstoftilførsler til kulturer. Det viste sig, at mangel på en nødvendig C-kilde i vækstmediet generelt stimulerede den extracellulære cellulaseproduktion uanset typen af C-kilde. Dette er et meget interessant resultat og det ville være nærliggende at lave en lignende undersøgelse med *Cytophaga hutchinsonii*, for at se om hydrolyseaktiviteterne kan stimuleres gennem en kontrolleret kulstoftilførsel.

Konklusion

Hydrolyseaktiviteten med AZCL-HECellulose som substrat er konstitutiv.

Cytophaga hutchinsonii udskiller endocellulaser under vækst på glucose, hvor den extracellulære hydrolyseaktivitet i stationærfasen udgør 33% af den samlede hydrolyseaktivitet.

Tilsætning af detergenter til mediet under væksten, Triton X-100 og Tween 80, forøger ikke den totale HECellulaseaktivitet. Detergenterne mindsker den celle-associerede aktivitet, da cellulaserne frigøres fra cellerne. Tilsættes Triton X-100 derimod først senere, før nedfrysning, ses en stimulering af hydrolyseaktiviteten hos kulturvæsken. Ethanoltilsætning hæmmer cellulaseaktiviteten hos kulturvæsken.

Temperaturoptimum for HECellulaserne er 40 °C og cellulaserne er temperaturstabile ved 20 °C.

pH-optimum ligger mellem pH 6-7.

HECellulaserne hæmmes af forhøjede koncentrationer af cellobiose og glucose under assay. Forhøjede niveauer af glucose i vækstmediet medfører catabolit repression.

Cellulaserne er meget halotolerante.

Vækst i batch kulturer med enten krystallinske eller ikke-krystallinske kulstofkilder betyder ikke større forskelle i HECellulaseaktivitet.

Mange af resultaterne viser stort set de samme relative aktiviteter for supernatanten og kulturvæsken og derfor er der sandsynligvis tale om den/de samme cellulase(r).

Perspektivering

En stimulering af endoglucanaseaktiviteten hos *Cytophaga hutchinsoni* kan måske opnås ved at anvende kontrolleret kulstoftilførsel som det er gjort med *Pseudomonas fluorescens* var. *cellulosa* (Yamane et al., 1970).

Der er lavet undersøgelser med anaerobe cellulytiske bakterier i co-kulturer med ikke-cellulytiske bakterier der viser, at cellulose nedbrydes hurtigere i co-kulturer end i monokulturer (Leshine, 1995). Hofsten et al. (1971) observerede ikke-cellulytiske bakterier sammen med *Sporocytophaga* sp. i aerobe berigelseskulturer. Man kunne også undersøge om hydrolyseaktiviteten hos *C. hutchinsonii* påvirkes ved at dyrke den sammen med andre ikke-cellulytiske bakterier.

Den celleassocierede endoglucanaseaktivitet kan måles mere specifik ved at vaske cellerne før assay og evt kombinere med Triton eller Tween behandling. Eventuelt kan man også forsøge at lysere cellerne uden at ødelægge enzymerne (lysozym behandling eller fysisk ødelæggelse af cellerne).

Man kan undersøge om de celleassocierede HEcellulaser er afhængige af levende celler ved at sammenligne vaskede kulturer, hvor den ene kultur er azidbehandlet. En test af cellulaseaktiviteten hos en kultur af *C. hutchinsonii* forbehandlet med azid viste god hydrolyseaktivitet, men aktiviteten kunne udelukkende have været fra supernatantens HEcellulaser.

Cellulaserne tåler tilsyneladende høje NaCl-koncentrationer. Man kunne derfor undersøge hvordan enzymerne klarer udtørring, som er et almindeligt fænomen i jord. Desuden kunne man også undersøge kulturens salttolerance for at se om der er en sammenhæng eller om denne egenskab er forbeholdt enzymerne.

Endelig kunne man også undersøge endocellulasernes egenskaber nærmere ved at lave en oprensning af enzymerne.

Resume

Et naturligt agarmedie baseret på jordekstrakt samt en fosfatbuffer, med cellulose som eneste kulstof- og energikilde, kan anvendes til at detektere en cellulolytisk bakterie som *Cellulomonas uda*. *Cytophaga hutchinsonii* kan ikke vokse på denne simple udformning af mediet, men den vokser på CY-agar, et defineret medie, tilsat et cellulosesubstrat samt lave koncentrationer af cellobiose eller glucose.

Cellulolytisk aktivitet ses direkte som klaringszoner på agarplader, men hydrolyse af krystallinske cellulosesubstrater kan dog først erkendes efter flere ugers inkubationstid.

Defineret flydende MSM-medie tilsat uopløselige farvede substrater, RBB-Cellofan eller RBB-Avicel, kan anvendes til at detektere cellulaseaktivitet hos en bakterietype som *C. hutchinsonii*.

Substituerede cellulosesubstrater, CMC og HECellulose, kan hydrolyseres af *C. hutchinsonii* selvom cellerne ikke kan vokse på substraterne, antageligt fordi de substituerede grupper inhiberer enzymerne så der ikke dannes metaboliserbare produkter. Desuden hydrolyserer bakterien xylan, men den kan ikke vokse på xylan eller xylose; måske er cellerne, i nogle tilfælde, i deres naturlige omgivelser afhængige af, at kunne hydrolysere xylan for at få adgang til cellulose.

Exocellulaseaktivitet hos *Cytophaga hutchinsonii* kan ikke måles tilfredsstillende vha. assays, som måler produktion af reducerende sukre. Reagenserne interfererer med substraterne eller der er manglende respons og cellobiose påvirker farveudviklingen i assays meget sammenlignet med ens molære koncentrationer af glucose.

Måling af exocellulaseaktivitet som farvefrigivelse fra RBB-Avicel er et bedre assay til at måle exocellulaseaktivitet hos *C. hutchinsonii*. Avicelaseaktiviteten må være tilknyttet cellerne, da kultursupernatant tilsyneladende ikke kan hydrolysere substratet. Enzymerne eller deres aktive sites, er sandsynligvis lokaliseret på celleoverfladen. Hydrolyseaktiviteten hæmmes når cellerne er døde efter behandling med azid.

Exocellulaseaktiviteten generelt, er meget langsom med en bakterietype som *Cytophaga hutchinsonii*.

Måling af endocellulaseaktivitet som produktion af reducerende sukre viser, at supernatant fra *Cytophaga hutchinsonii* indeholder endocellulaser, der hydrolyserer CMC, men en del af denne aktivitet stammer fra celleassocierede enzymer.

Farvefrigivelse fra AZCL-HECellulose som substrat, er et meget bekvemt og tilstrækkeligt følsomt assay til bestemmelse af endocellulaseaktivitet hos *C. hutchinsonii*. HECellulaseakti-

viteten er konstitutiv og *C. hutchinsonii* udskiller endocellulaser under vækst på glucose, hvor den extracellulære hydrolyseaktivitet i slutningen af den eksponentielle vækstfase udgør 33% af den samlede hydrolyseaktivitet. Ekskretion af cellulaser er ikke tidligere rapporteret for denne bakterie. Den relative HEcellulaseaktivitet hos supernatanten og kulturvæsken er i mange tilfælde sammenfaldende og derfor er der sandsynligvis tale om den/de samme cellulase(r).

Tilsætning af detergent, Triton X-100, før nedfrysning, stimulerer hydrolyseaktiviteten i kulturvæsken. Vækst i batch kulturer med enten krystallinske eller ikke-krystallinske kulstofkilder betyder ikke større forskelle i hydrolyseaktivitet.

Cellulaserne er kun temperaturstabile ved 20 °C og deres temperaturoptimum er 40 °C.

HEcellulaserne er pH tolerante og de er meget halotolerante.

Cellulaserne hæmmes af forhøjede koncentrationer af cellobiose og glucose under assay, og forhøjede niveauer af glucose i vækstmediet medfører catabolit repression.

Litteraturliste

- Bayer, E.A., E. Morag, Y. Shoham, J. Tormo and R. Lamed (1996).** The Cellulosome: A cell surface organelle for the adhesion to and degradation of cellulose. *Bacterial Adhesion: Molecular and Ecological Diversity*. M. Fletcher, Ed. New York. Wiley-Liss, Inc.: 155-182.
- Berg, B., B.V. Hofsten and G. Pettersson. (1972).** Growth and Cellulase Formation by *Cellvibrio fulvus*. *Journal of Applied Bacteriology*. 35: p. 201-214.
- Béguin and J.-P. Aubert. (1994).** The biological degradation of cellulose. *FEMS Microbiology Reviews*. 13: p. 25 - 58.
- Breuil, C. and J.N. Saddler. (1985).** Comparison of the 3,5-dinitrosalicylic acid and Nelson-Somogyi methods of assaying for reducing sugars and determining cellulase activity. *Enzyme and Microbial Technology*. 7: p. 327-331.
- Brock, T.D., M.T. Madigan, J.H. Martinko and J. Parker (1994).** *Biology of Microorganisms*. 7th Edition. Prentice-Hall International Editions.
- Chan, M., C. Breuil, W. Schwald and J.N. Saddler. (1989).** Comparison of methods for quantifying the hydrolytic potential of cellulase enzymes. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 31: p. 413-418.
- Chang, W.T.H. and D.W. Thayer. (1977).** The cellulase system of a *Cytophaga* species. *Canadian Journal of Microbiology*. 23: p. 1285-1292.
- Christensen, P.J. (1977).** The history, biology, and taxonomy of the *Cytophaga* group. *Canadian Journal of Microbiology*. 23(12): p. 1599-1653.
- Coughlan, M.P. and F. Mayer (1992).** The Cellulose-Decomposing Bacteria and Their Enzyme Systems. *The Prokaryotes*. A. Ballows, H.G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder and K.H. Schleifer, Ed. New York. Springer-Verlag. I: 460-516.
- de Coninck-Chosson, J. (1988).** Aerobic Degradation of Cellulose and Adsorption Properties of Cellulases in *Cellulomonas uda* JC3: Effects of Crystallinity of Substrate. *Biotechnology and Bioengineering*. 31: p. 495-501.
- Dermoun, Z. and J.P. Belaich. (1988).** Crystalline index change in cellulose during aerobic and anaerobic *Cellulomonas uda* growth. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 27: p. 399-404.
- DSM katalog. (1993).** Fra DSMZ, Tyskland.
- Dubios, K., A. Gilles, J.K. Hamilton, P.A. Rebers and F. Smith. (1956).** Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry*. 28: p. 350-356.
- Farkas, V., M. Lisková and P. Biely. (1985).** Novel media for detection of microbial producers of cellulase and xylanase. *FEMS Microbiology Letters*. 28: p. 137-140.
- Fåhræus, G. (1946-48).** On the Cellulose Decomposition by *Cytophaga*. *Symbolae Botanicae Upsalienses*. 9: p. 3-130.

- Gilbert, H.J. and G.P. Hazlewood. (1993).** Bacterial cellulases and xylanases. *Journal of General Microbiology*. 139: p. 187-194.
- Gilkes, N.R., D.G. Kilburn, R.C.M. Jr. and R.A.J. Warren. (1991).** Bacterial Cellulases. *Bioresource Technology*. 36: p. 21-35.
- Güde, H. (1980).** Occurrence of Cytophagas in Sewage Plants. *Applied and Environmental Microbiology*. 39(4): p. 756-763.
- Hofsten, B.V., B. Berg and S. Beskow. (1971).** Observations on Bacteria Occuring Together with *Sporocytophaga* in Aerobic Enrichment Cultures on Cellulose. *Arch. Mikrobiol.* 79: p. 69-79.
- Ingvorsen, K. and B.B. Jørgensen. (1984).** Kinetics of sulfate uptake by freshwater and marine species of *Desulfovibrio*. *Archives of Microbiology*. 139: p. 61-66.
- Jeang, C.-L., Y.-H. Lee and L.-W. Chang. (1995).** Purification and Characterization of a Raw-Starch Digesting Amylase from a Soil Bacterium - *Cytophaga* sp. *Biochemistry and Molecular Biology International*. 35(3): p. 549-557.
- Kauri, T. and D.J. Kushner. (1985).** Role of contact in bacterial degradation of cellulose. *FEMS Microbiology Ecology*. 31: p. 301-306.
- Kjøller, A. and S. Struwe. (1989).** Microfungi and bacteria as decomposers of organic matter in soil. *Opera Botanica*. 100: p. 147-152.
- Kluepfel, D. (1988).** Screening of Prokaryotes for Cellulose- and Hemicellulose-Degrading Enzymes. *Biomass Part A. Cellulose and Hemicellulose*. W. A. Wood and S. T. Kellogg, Eds. San Diego. Academic Press, INC. 160: 180-186.
- Leisola, M. and M. Linko. (1976).** Determination of the Solubilizing Activity of a Cellulase Complex with Dyed Substrates. *Analytical Biochemistry*. 70: p. 592-599.
- Leschine, S.B. (1995).** Cellulose degradation in anaerobic environments. *Annu. Rev. Microbiol.* 49: p. 399-426.
- Li, X., Y. Huang, D. Xu, D. Xiao, F. Jin and P. Gao. (1996a).** Cellobiose-oxidizing enzyme from a newly isolated cellulolytic bacterium *Cytophaga* sp. LX-7. *Biotechnology Letters*. 18(2): p. 205-210.
- Li, X., J. Liu and P. Gao. (1996b).** A simple method for the isolation of cellulolytic myxobacteria and cytophagales. *Journal of Microbiological Methods*. 25: p. 43-47.
- Li, X. and P. Gao. (1997).** Isolation and partial properties of cellulose-decomposing strain of *Cytophaga* sp. LX-7 from soil. *Journal of Applied Microbiology*. 82: p. 73-80.
- Ljungdahl, L.G. and K.-E. Eriksson (1985).** Ecology of Microbial Cellulose Degradation. *Advances in Microbial Ecology*. K. C. Marshall, Ed. New York. Plenum Press. 8: 237-299.
- Malek, M.A., N.A. Chowdhury, Q.M. Youssof and N. Choudhury. (1988).** Bacterial cellulases and saccharification of lignocellulosic materials. *Enzyme Microb. Technol.* 10: p. 750-753.
- Mandels, M. (1976).** Measurement of Saccharifying Cellulase. *Biotechnol. & Bioeng. Symp.* 6: p. 21-33.

- Mayer, F., M.P. Coughlan, Y. Mori and L.G. Ljungdahl. (1987).** Macromolecular Organization of the Cellulolytic Enzyme Complex of *Clostridium thermocellum* as Revealed by Electron Microscopy. *Applied and Environmental Microbiology*. 53(12): p. 2785-2792.
- McCleary, B.V. (1988).** Soluble Dye Labeled Polysaccharides for the Assay of Endohydrolases. *Biomass Part A Cellulose and Hemicellulose*. W. A. Wood and S. T. Kellogg, Eds. San Diego. Academic Press, INC. 160: 74-86.
- Miller, G.L. (1959).** Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*. 31(3): p. 426-428.
- Miller, G.L., R. Blum, W.E. Glennon and A. Burton. (1960).** Measurement of Carboxymethylcellulase Activity. *Analytical Biochemistry*. 2: p. 127-132.
- Moore, R.L., B.B. Basset and M.J. Swift. (1979).** Developments in the Remazol Brilliant Blue dye-assay for studying the ecology of cellulose decomposition. *Soil Biological Biochemistry*. 11: p. 311-312.
- Mullings, R. (1985).** Measurement of saccharification by cellulases. *Enzyme and Microbial Technology*. 7: p. 586-591.
- Nakamura, K. and K. Kitamura. (1982).** Isolation and Identification of Crystalline Cellulose Hydrolyzing Bacterium and its Enzymatic Properties. *J. Ferment. Technol.* 60(4): p. 343-348.
- Nakamura, K. and K. Kitamura. (1983).** Purification and Some Properties of a Cellulase Active on Crystalline Cellulose from *Cellulomonas uda*. *J. Ferment. Technol.* 61(4): p. 379-382.
- Nakamura, K. and K. Kitamura (1988).** Cellulases of *Cellulomonas uda*. *Biomass Part A Cellulose and Hemicellulose*. W. A. Wood and S. T. Kellogg, Eds. San Diego. Academic Press INC. 160: 211-216.
- Okada, H. and A. Shinmyo (1988).** Xylanase of *Bacillus pumilus*. *Biomass Part A Cellulose and Hemicellulose*. W. A. Wood and S. T. Kellogg, Eds. San Diego. Academic Press, INC. 160: 632-637.
- Poincelot, R.P. and P.R. Day. (1972).** Simple dye release for determining cellulolytic activity of fungi. *Applied Microbiology*. 23: p. 875-879.
- Rauen, H.M. (1964).** *Biochemisches Taschenbuch*. Springer
- Reichenbach, H. (1989).** Genus I. Cytophaga Winogradsky 1929, 577, emend. *Bergeys Manual*. 3: 2015-2032.
- Reichenbach, H. (1992).** The Order Cytophagales. *The Prokaryotes*. A. Ballows, H.G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder and K.H. Schleifer, Ed. New York. Springer Verlag. IV: 3631-3675.
- Richmond, P.A. (1991).** Occurrence and Functions of Native Cellulose. *Biosynthesis and biodegradation of cellulose*. C. H. Haigler and P. J. Weimer, Eds. New York, NY. Marcel Dekker: 5-23.
- Robson, L.M. and G.H. Chambliss. (1989).** Cellulases of bacterial origin. *Enzyme Microb. Technol.* 11: p. 626-642.

Rodríguez, H., F. Alea and E. Kyslíková. (1996). Regulation of cellulolytic activity in *Cellulomonas* sp. IIBC. Bioresource Technology. 55: p. 79-82.

Safarik, I. and M. Safariková. (1991). Black substrate for spectrophotometric determination of cellulase activity in coloured solutions. Journal of Biochemical and Biophysical Methods. 23: p. 301-306.

Sami, A.J., M.W. Akhtar, N.N. Malik and B.A. Naz. (1988). Production of free and substrate-bound cellulases of *Cellulomonas flavigena*. Enzyme Microb. Technol. 10: p. 626-631.

Schlegel, H.G. and K. Schmidt (1986). General Microbiology. Cambridge, UK, Cambridge University Press.

Schnaitman, S.C. (1981). Cell Fractionation. Manual of Methods for General Bacteriology. P. Gerhardt, R.G.E. Murray, R.N. Costilow, E.W. Nester, W.A. Wood, N.R. Krieg, Ed. Washington DC 20006. American Society for Microbiology: 52-61.

Schwald, W., M. Chan, C. Breuil and J.N. Saddler. (1988). Comparison of HPLC and colorimetric methods for measuring cellulolytic activity. Applied Microbiology and Biotechnology. 28: p. 398-403.

Sinner, M. and J. Puls. (1978). Non-corrosive dye reagent for detection of reducing sugars in borate complex ion-exchange chromatography. Journal of Chromatography. 156: p. 197-204.

Stanier, R.Y. (1940). Studies on the Cytophagas. Journal of Bacteriology. 40: p. 619-635.

Stanier, R.Y. (1942). The Cytophaga Group: A Contribution to the Biology of Myxobacteria. Bacteriol. Rev. 6: p. 143-196.

Stewart, B.J. and J.M. Leatherwood. (1976). Derepressed Synthesis of Cellulase by *Cellulomonas*. Journal of Bacteriology. 128(2): p. 609-615.

Stoppok, W., P. Rapp and F. Wagner. (1982). Formation, Location, and Regulation of Endo-1,4- β -Glucanases and β -Glucosidases from *Cellulomonas uda*. Applied and Environmental Microbiology. 44(1): p. 44-53.

Stryer, L. (1988). Carbohydrates. Biochemistry. New York. W.H. Freeman and Company: 331-348.

Tomme, P., R.A.J. Warren and N.R. Gilkes (1995). Cellulose Hydrolysis by Bacteria and Fungi. Advances in Microbial Physiology. R. K. Poole, Ed. London. Academic Press. 37: 2-81.

Vardavakis, E. (1989). Seasonal fluctuations of aerobic cellulolytic bacteria, and respiratory activities in a soil profile under a forest. Plant and Soil. 115: p. 145-150.

Veldkamp, H. (1965). Isolation of Cytophaga and Sporocytophaga. Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene. suppl. 1: p. 81-90.

Warke, G.M. and S.A. Dhala. (1968). Use of Inhibitors for Selektive Isolation and Enumeration of Cytophagas from Natural Substrates. J. gen. Microbiol. 51: p. 43-48.

Warren, R.A.J. (1996). Microbial hydrolysis of polysaccharides. *Annu. Rev. Microbiol.* 50: p. 183-212.

Wirth, S. (1991). Entwicklung und anwendung..... Berichte des Forschungszentrums Waldökosysteme der Universität Göttingen. Reihe A 66: p. 158.

Wirth, S.J. and G.A. Wolf. (1992). Micro-plate colourimetric assay for Endo-acting cellulase, xylanase, chitinase, 1,3- β -glucanase and amylase extracted from forest soil horizons. *Soil Biol. Biochem.* 24(6): p. 511-519.

Wolf, G.A. and S.J. Wirth (1990). Application of soluble chromogenic substrates for assays of polysaccharide endo-hydrolase activity. *Methods in Phytobacteriology.* Z. Klement, K. Rudolph and D. C. Sands, Eds. Budapest. Akademiai Kiado, Publishing House of the Hungarian Academy of Sciences: 409-413.

Wood, T.M. and K.M. Bhat (1988). Methods for Measuring Cellulase Activities. *Biomass Part A. Cellulose and Hemicellulose.* W. A. Wood and S. T. Kellogg, Eds. San Diego. Academic Press, INC. 160: 87-112.

Wood, T.M. (1988). Preparation of crystalline, amorphous, and dyed cellulase substrates. *Biomass Part A. Cellulose and Hemicellulose.* W. A. Wood and S. T. Kellogg, Eds. San Diego. Academic Press, INC. 160: 19-25.

Wood, T.M. and V. Garcia-Campayo. (1990). Enzymology of cellulose degradation. *Biodegradation.* 1: p. 147-161.

Yamane, K., H. Suzuki, M. Hirotsu, H. Ozawa and K. Nisizawa. (1970). Effect of Nature and Supply of Carbon Sources on Cellulase Formation in *Pseudomonas fluorescens* var. *cellulosa*. *The Journal of Biochemistry.* 67(1): p. 9-18.

Zemek, J., L. Kuniak and J. Augustín. (1981). Production of Polysaccharide-hydrolyzing Enzymes - A new Method for Selection of Producing Strains. *Abhandlungen der Akademie der Wissenschaften der DDR N3.* : p. 47-53.

Appendix A: Tabeller

Tabel 2: Anaerob/fakultativt aerobe cellulytiske bakterier

Bakterie	Stamme	Isolerede enzymer	M _r (kDa)
<i>Acetivibrio cellulolyticus</i>	NRCC2248	Exoglucanase CI	38.0
<i>A. cellulolyticus</i>	ATCC33288	Endoglucanase C2	33.0
		Endoglucanase C3	10.4
		β-Glucosidase B1	81.0
<i>Bacteroides (Fibrobacter) succinogenes</i>		Endoglucanase EG2	118.0
		Cellodextrinase	40.0
		Cellobiosidase	75.0
<i>B. cellulosolvens</i>	S-85	Endoglucanase EG1	65.0
<i>B. xylanolyticus</i>			
<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>			
<i>Caldocellum saccharolyticum</i>	Tp8.T6331	β-Glucosidase	52.0
<i>Clostridium acetobutylicum</i>			
<i>C. aldrichii</i> ¹			
<i>C. celerecrescens</i> ¹			
<i>C. cellobioparum</i>			
<i>C. cellulofermentans</i> ¹			
<i>C. cellulolyticum</i>			
<i>C. cellulovorans</i>			
<i>C. josui</i>		Endoglucanase	45.0
<i>C. lentocellum</i> ¹			
<i>C. papyrosolvens</i>			
<i>C. populeti</i> ¹			
<i>C. stercorarium</i>	BW	Endoglucanase	91.0
<i>C. thermocellum</i>	LQRI	Endoglucanase I	94.0
<i>C. thermocellum</i>	NCIB10682	Endoglucanase	56.0
<i>C. thermocellum</i> (klonet i E. coli)	NCIB10682	Endoglucanase A	49-52
		Endoglucanase B	53.55.66
		Endoglucanase C	38.0
		Endoglucanase D	65.0
		β-Glucosidase	50.0
<i>C. thermocopriae</i>	JT3-3	Endoglucanase	46.0
		β-Glucosidase	46.0
<i>Erwinia carotovora</i>			
<i>E. chrysanthemi</i> (klonet i E. coli)	Y3937	Endoglucanase Z	45.0
		Endoglucanase Y	35.0
<i>Eubacterium (Cillobacterium) cellulosolvens</i>			
<i>"Micromonospora propionici"</i>			
<i>"M. ruminantium"</i>			
<i>Pseudonocardia thermophila</i>			
<i>Ruminococcus albus</i>	SY3	Endoglucanase	30.0
	F-40	Cellobiosidase	100.0
	F-40	β-Glucosidase	82.0
<i>R. albus</i> (klonet i E. coli)	F-40	Endoglucanase	
	AR67	Endoglucanase	
	AR68	Endoglucanase	
<i>R. flavefaciens</i>		Exoglucanase A ²	118

Hvor intet andet er angivet er kilden Coughlan and Mayer (1992)

¹Leschine (1995)

²Gilkes et al.(1991)

Bakterierne i citationstegn er ikke korrekt klassificerede.

Tabel 3: Aerobe/fakultativt anaerobe cellulytiske bakterier

Bakterie	Stamme	Isolerede enzymer	M _r (kDa)
<i>Acidothermus cellulolyticus</i>			
<i>Actinoplanes brasiliensis</i>			
<i>A. phillipinensis</i>			
<i>Actinopolyspora halophila</i>			
<i>Archangium</i> spp.			
<i>Arthrobacter</i> spp.			
<i>Bacillus brevis</i>			
<i>B. coagulans</i>			
<i>B. firmus</i>			
<i>B. licheniformis</i>	1	Endoglucanase	-
<i>B. pasteurii</i>			
<i>B. polymyxa</i>			
<i>B. pumilus</i>			
<i>Bacillus</i> sp. (alkalofil)	1139	Endoglucanase	92
<i>Bacillus</i> sp. (alkalofil) (klonet i <i>E. coli</i>)	N-4	Endoglucanase celA	54
		Endoglucanase celB	46
		Endoglucanase celC	100
<i>Bacillus</i> sp. (neutrofil)	KSM-522	Endoglucanase	35
<i>B. stearothermophilus</i>			
<i>B. subtilis</i>	DLG	Endoglucanase	35
<i>B. subtilis</i> ¹		Endoglucanase	23
<i>B. subtilis</i> (klonet i <i>B. megaterium</i>)		Endoglucanase	33
<i>Clellulomonas biazotea</i>			
<i>C. cellulans</i> (før <i>C. cartae</i>)			
<i>C. cellasea</i>			
" <i>C. fermentans</i> "			
<i>C. fimi</i>		Endoglucanase A ¹	50
<i>C. fimi</i>		Exoglucanase ¹	48.5
<i>C. flavigena</i>		Endoglucanase ¹	40
<i>C. gelida</i>			
<i>Cellulomonas</i> sp. ¹		Endoglucanase	118
		Endoglucanase ¹	50
		Endoglucanase ¹	54
		Endoglucanase I ¹	63
		Endoglucanase II ¹	44
		Endoglucanase III ¹	63
		Endoglucanase IV ¹	77
		Endoglucanase V ¹	143
		Endoglucanase VI ¹	121
" <i>C. turbata</i> "			
<i>C. uda</i>		Exocellobiohydrolase	81
<i>C. uda</i> ¹		Endoglucanase	48
		Endoglucanase ¹	56
" <i>Cellvibrio flavescens</i> "			
" <i>C. fulvus</i> "			
" <i>C. gilvus</i> "	ATCC 13127	Cellobiose phosphorylase	280 (4 x 70)
" <i>C. mixtus</i> "			
" <i>C. ochraeus</i> "			
" <i>C. viridus</i> "			
" <i>C. vulgaris</i> "			
<i>Corynebacterium michiganense</i>			
<i>Cytophaga aprica</i>			
<i>C. aquatilis</i>			
<i>C. aurantiaca</i>			
<i>C. hutchinsonii</i>			
<i>C. johnsonae</i>			

Tabel 3 (fortsat)

" <i>Cytophaga krzemieniewskae</i> "			
<i>C. pectinovora</i>			
" <i>C. rubra</i> "			
<i>Cytophaga</i> sp. ¹	WTHC 2421	Exoglucanase	6.3
		Endoglucanase	8.7
" <i>C. tenuissima</i> "			
" <i>C. winogradskii</i> "			
<i>Frankia</i> sp?			
<i>Herpetosiphon geysericolus</i>			
<i>Microbispora bispora</i>		Endoglucanase I	44
		Endoglucanase II	57
		Exoglucanase I	75
		Exoglucanase II	95
		β-Glucosidase	-
" <i>Micromonospora aurantiaca</i> "			
<i>M. chalcae</i>			
<i>M. inositola</i>			
<i>M. melanosporea</i>			
<i>M. olivasterospora</i>			
<i>Polyangium</i> spp.			
<i>Pseudomonas fluorescens</i> var. <i>cellulosa</i>		Cellulase A ¹	50
		Cellulase B ¹	>100
		Cellulase C ¹	-
<i>P. solanacearum</i>		Endoglucanase ¹	43
<i>Serratia marcescens</i>			
<i>Sorangium</i> spp.			
<i>Sporocytophaga myxococcoides</i>		Endoglucanase I	46
		Endoglucanase II	52
		Exoglucanase ¹	67
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>			
<i>Streptomyces albogriseolus</i>			
<i>S. celluloflavus</i>			
<i>S. cellulosa</i>			
<i>S. flavogriseus</i>		Exoglucanase ¹	45
<i>S. lividans</i>			
<i>S. nitrosporeus</i>			
<i>S. olivochromogenes</i>			
<i>S. thermodiastaticus</i>			
<i>S. thermovulgaris</i>			
<i>S. viridosporus</i>			
<i>Thermoactinomyces cellulosa</i>			
<i>Thermomonospora curvata</i>		Endoglucanase ¹	23
		Endoglucanase ¹	46
		Endoglucanase ¹	146
<i>T. fusca</i>	YX	Endoglucanase 1	94
		Endoglucanase 2	46
	ER-1	Endoglucanase 1	108
		Endoglucanase 2	42
		Endoglucanase 3	71
		Endoglucanase 4	106
		Endoglucanase 5	45
<i>Xanthomonas albilineans</i>			
<i>X. campestris</i>			

Hvor intet andet er angivet er kilden Coughlan and Mayer (1992)

¹Gilkes et al. (1991)

Bakterierne i citationstegn er ikke korrekt klassificerede.

Tabel 4: Karakteristika for *Cytophaga hutchinsonii*

Cellelængde (µm)	2-5 ^a ; 2-10 ^b
Cellebredde (µm)	0.4 ^a ; 0.3-0.5 ^b
Tilspidsning af celleende ^a	varierer
Cellemassens farve ^a	lys gul
Flexirubin reaktion ^a	positiv
Temperatur ^b	minimum 15 °C; optimum 30, 20; maximum: <37,30
G+C base forhold	39
Vokser aerobt ^b	ja
Vokser anaerobt ^b	nogle stammer er fakultativ anaerobe
Habitat ^a	jord
Kvælstofkilder:	
Peptone ^a	ja
Gærekstrakt ^b	ja
Casaminosyrer ^a	ja
NH ₄ ⁺ ^a	ja
NO ₃ ⁻ ^a	ja
Vokser alene på peptone ^a	nej
NH ₃ frigivet fra peptone ^a	ja
Vækst på sukre:	
Glucose som eneste kulstof- og energi-kilde ^a	ja
Syreproduktion fra kulhydrater (aerob) ^a	ja
Fruktose ^b (og api 50 CH kit)	nej
Galaktose ^b (og api 50 CH kit)	nej
Mannose ^b (og api 50 CH kit)	nej
Sorbose, fucose, rhamnose, lyxose, ribose, laktose, maltose, mellibiose, sucrose, trehalose, melezitose, raffinose, gentiobiose, turanose, lyxose, tagatose (api 50 CH kit og "substrattest")	nej, alle forsøg er negative
Arabinose ^b (og api 50 CH kit)	nej
Cellobiose ^b	ja
Xylose ^b (og api 50 CH kit samt "substrattest")	nej
Vækst på polysaccharider:	
Cellulose (filterpapir ^a , α-Cellulose, Avicel og Cellofan)	ja
CMC	ja ^a , jeg får <u>ikke</u> vækst i mine forsøg, men der sker hydrolyse af CMC
HE-Cellulose	nej, jeg får ikke vækst i mine forsøg, men der sker hydrolyse af AZCL-HECellulose
Xylan (Roth, testet i "substrattest")	nej, ingen vækst, men hydrolyse af AZCL-Xylan
Agar ^a	nej
Chitin ^a	nej
Pectin ^a	nej
Inulin (api 50 CH kit og "substrattest")	nej
Stivelse ^a (og api 50 CH kit)	nej
Alkoholer:	
Adonitol, arabitol, dulcitol, erythritol, glycerol, inositol, sorbitol, xylitol (api 50 CH kit)	alle substrater er negative
Mannitol ^b (og api 50 CH kit)	nej
Organiske syrer:	
Acetat, fumarat, citrat, glutamat, gluconat, laktat, malat, format, pyruvat, caprat, adipat (api 50 CH; api 20 ne; "substrattest")	alle substrater er negative
Aspartat ^b	ja

Tabel 4 (fortsat)

Aminosyrer:	
Glutaminsyre ^a , Asparaginsyre ^a , Asparagin ^b	ja
L-Arginin, Acetylglucosamin ("substrattest")	nej
Andre substrater:	
Betain, xylosid, mannosid, glucosid (api 50 CH kit; "substrattest")	alle substrater er negative
Andre forsøg:	
NO₃⁻ → NO₂⁻ (api 20 ne kit)	positiv
Catalase	negativ ^a / positiv ^b
Oxidase	positiv ^a / negativ i mine tests
β-glucosidase (testet med p-Nitrophenyl β-D-Glucopyranoside)	positiv
api zym kit er lavet, men inkubationstiden var 30 timer imod de anbefalede 4 timer	der var kun svage reaktioner i # 2 til 8 og 11. β-glucosidaseaktivitet kunne ikke påvises her.
Antibiotika:	
Chloramphenicol ^c	6.0 µg/ml (minimal inhibitorisk koncentration)
Penicillin ^c	25 units/ml (minimal inhibitorisk koncentration)
Natrium taurocholate ^c	20.4 mg/ml (minimal inhibitorisk koncentration)
Natrium cholate ^c	20.0 mg/ml (minimal inhibitorisk koncentration)
Penicillin (15 units/ml) + Chloramphenicol (5.0 µg/ml) ^c	ingen inhibering
5.0 mg/ml Natrium taurocholate + Natrium cholate ^c	ingen inhibering

Fed skrift angiver mine tests, hvor ingen referencer er fundet.

"substrattest" henrører til egne vækstofforsøg.

^aReichenbach (1989).

^bChristensen (1977).

^cWarke and Dhala (1968).

Tabel 5: Substratforslag til screening og assay over cellulytiske enzymer

Enzym eller system	Substrat	Assay/princip
Komplet system	<u>Screening:</u> Filterpapir ^a (fint formalet) Farvet Avicel ^a (RBB-Avicel)	Udvikling af klaringszoner omkring kolonierne
	<u>Assay:</u> Bomuld Filterpapir Avicel Solka flocc Farvet Avicel (RBB-Avicel)	Frigivelse af reducerende sukre ^b , udtrykt som glucoseækvivalenter Frigivelse af farve ^b
Cellobiohydrolase (exoglucanase)	Avicel Farvet Avicel (RBB-Avicel) Cellooligosaccharider Amorf cellulose	Frigivelse af reducerende sukre ^b Frigivelse af farve ^b Forøgelse i reducerende ækvivalenter eller HPLC analyse ^b Frigivelse af reducerende sukre eller ændring i turbiditet ^b
Endo-1,4-β-glucanase (endoglucanase)	<u>Screening:</u> CMC ^a Farvet CMC (RBB-CMC ^a) Farvet HECcellulose (OBR-HEC ^a)	Farvning med Congo rødt ^c , med udvikling af klaringszoner Udvikling af klaringszoner omkring kolonierne
	<u>Assay:</u> Amorf cellulose Carboxymethylcellulose (CMC) Hydroxyethylcellulose	Frigivelse af reducerende sukre ^b Frigivelse af reducerende sukre eller formindskelse i viskositet ^b Formindskelse i viskositet ^b
	Farvet CMC (RBB-CMC) Farvet HE-cellulose (AZCL-HEC) Cellooligosaccharider	Frigivelse af farve ^d Frigivelse af farve Forøgelse i reducerende ækvivalenter eller HPLC analyse ^b
β-Glucosidase	p-Nitrophenyl β-D-glucosider	frigivelse af p-Nitrophenol ^b

^aSubstrat indbygges i minimal agarmedie.

^bWood and Bhat (1988).

^cKluepfel (1988).

^dMcCleary (1988).

Appendix B: Medier og substrater

Medier

Fremstilling af jordekstrakt

Agar-medie til isolering af mikroorganismer fra jord: Basis-jordekstrakt modificeret efter metode af Wolf and Wirth (1990) og Wirth (1991).

1 kg jord lufttørres natten over og sies (2 mm) inden tilsætning af 1.5 liter hanevand. Autoklaveres (20 minutter ved 121 °C). Suspensionen filtreres gennem glasuld og centrifugeres ved 1.469 g (Sorvall Centrifuge RC 5; 3.000 rpm) i 30 minutter. Volumen af supernatanten afmåles og der fyldes op til 1 liter med autoklaveret Millipore vand. Som buffer tilsættes KH_2PO_4 til en slutkoncentration på 10 mM. pH justeres til 7 med 0.5 M NaOH. Agar 1.5% (w/v) tilsættes før autoklaving. Jordekstrakten (uden agar) kan opbevares ved 4 °C eller nedfryses ved -20 °C.

Medie til *Cytophaga hutchinsonii*

CY-medie (+/- agar) modificeret efter opskrift nr. 160 i DSM katalog 1993, til *C. hutchinsonii*, angivet per liter:

3.00 g Trypticase Peptone (BBL); 1.36 g $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$; 1.00 g Gærekstrakt (BACTO); (15 g agar). pH indstilles til 7.2 med 0.5 M NaOH før autoklaving.

Kulstofkilder: glucose og cellobiose (sterilfiltreret, Sartorius 0.20 µm sterilfilter) tilsættes efter autoklaving.

Mineralsaltsmedie (MS)

Efter Li et al. (1996a) (+/- peptone) angivet per liter:

200 mg $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$; 750 mg KNO_3 ; 655 mg $\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$; 20 mg $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$; 40 mg $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$; (2.0 g Peptone). pH justeres til 7.2 med 0.5 M NaOH før autoklaving.

Kulstofkilder: glucose og cellobiose (sterilfiltreret) tilsættes efter autoklaving. Filterpapir (Whatman #1), α -Cellulose (Sigma; C-8002) og Avicel (SERVA) steriliseres sammen med det øvrige medie.

Modificeret mineralsaltsmedie (MSM)

Efter Li and Gao (1997) angivet per liter:

200 mg $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$; 1.000 mg $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 750 mg KNO_3 ; 500 mg NaCl; 30 mg $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$; 40 mg $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$; 2 ml TMS-3* (sporstoffer); 1.000 mg $\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$ (autoklaveres separat). pH justeres til ca 7.3 med 0.5 M NaOH før autoklaving.

Kulstofkilder: Som til MS mediet.

I tilfælde hvor pH falder for meget under væksten benyttes medium indeholdende 8 g MOPS buffer (3-[N-Morpholino] propanesulfonic acid Sodium Salt; Sigma, M-9381) og 0.2 g K_2HPO_4 .

*TMS-3 (sporstoffer), modificeret efter Ingvorsen and Jørgensen (1984):

HCl (32%) 10 ml

Følgende komponenter opløses i HCl i den angivne rækkefølge:

$\text{FeCl}_2 \times \text{H}_2\text{O}$	2.0 g
$\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$	250 mg
$\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$	100 mg
ZnCl_2	70 mg
H_3BO_3	6 mg
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$	40 mg
$\text{NiCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$	70 mg
$\text{CuCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$	2 mg
$\text{AlCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$	60 mg
$\text{Na}_2\text{WO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$	6 mg

Fyld op til 1 liter med Millipore vand.

Medie 53 til *Cellulomonas uda*

Modificeret efter opskrift nr. 53 i DSM katalog 1993 (+/- agar), angivet per liter:

2.5 g Trypticase peptone; 1.25 g Gærekstrakt; 1.25 g Glucose; 1.25 g NaCl. pH indstilles til 7.2 - 7.4 med 1 M NaOH før autoklaving. Tilsættes evt. 15 g agar.

Substrater

Indkøbte substrater

Avicel (SERVA; PH 105)

AZCL-HECellulose (Mega Zyme; Batch AZCLCE 21102)

Cellofan (325p uncoated; British Cellophane Ltd. UK)

CMC (low viscosity, Sigma; C-5678,)

Filterpapir (Whatman # 1)

OBR-HECellulose (Hydroxyethylcellulose farvet med Ostazin Brilliant Red, Sigma; O-6879)

Remazol Brilliant Blue R (Sigma; R-8001), farvestof til fremstilling af "blå" substrater

Fremstilling af filterpapirsoverlag

Modificeret efter Stewart and Leatherwood (1976): 1 stk filter (ca. 1.6 g) blendes i en hus-holdningsblender med 70 ml Millipore vand. Derefter i sedimentknuser (Retsch Centrifugal Ball Mill, Type S2) i 3 døgn. Papirmassen autoklaveres og opbevares sterilt, eller nedfryses efter tilvirkning. Før anvendelse i plader tilsættes jordekstrakt eller defineret medie så filter-papirskoncentrationen i det færdige medie er 0.2-0.5% (w/v) herefter indstilles pH til 7.2-7.4 med 0.5 M NaOH, hvorefter 1.5% (w/v) agar tilsættes og mediet autoklaveres.

Fremstilling af RBB-Avicel

Farvemethoden er efter Wood (1988). Reagenser:

10 g Avicel; 100 ml 1% (w/v) Remazol Brilliant Blue R; 20 g Na₂SO₄; 10 ml 10% (w/v) opløsning af Na₃PO₄; Millipore vand og 96% ethanol.

Avicel blandes i 100 ml vand og opvarmes til 50 °C under omrøring i et vandbad på en magnetomrører med varmeplade. RBB opløst i Millipore vand tilsættes. Over 45 minutter tilsættes Na₂SO₄ i små portioner under kraftig omrøring.

Na₃PO₄ -opløsning tilsættes indtil pH er over 12 og omrøringen fortsætter i yderligere 75 minutter.

Overskydende farve fjernes ved at vaske kornene med Millipore vand og centrifugere indtil der ikke længere frigives farve.

RBB-Avicel vaskes med ethanol og tørres. Opbevares ved stuetemperatur.

Til brug i agarmedie: suspenderes i jordekstrakt til koncentrationer på 0.2-0.75% (w/v) + 0.02% (w/v) CMC, pH indstilles til 7.2-7.4 med 0.5 M NaOH, hvorefter der tilsættes 1.5% (w/v) agar og mediet autoklaveres.

Fremstilling af RBB-cellofan

Reagenser til farvning af 1 g cellofan. Farvemethoden er efter Moore et al. (1979):

1 g cellofan klippet i passende stykker (10 x 10 cm); 0.5 g Remazol Brilliant Blue R; 10 g Na_2SO_4 og 0.833 g $\text{Na}_3\text{PO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$.

Cellofanen koges ad to omgange i 170 ml Millipore vand. Vandet fjernes og der tilsættes 170 ml koldt Millipore vand. Blandingen varmes op til 80 °C under omrøring. RBB tilsættes.

Na_2SO_4 opløses i 33 ml Millipore vand og tilsættes ad 5 gange med 2 minutters interval.

$\text{Na}_3\text{PO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$ opløses i 5 ml Millipore vand og tilsættes. Reaktionsblandingen holdes på 80 °C i 20 minutter, hvorefter cellofanstykkerne skylles med varmt Millipore vand indtil skyllevandet er farveløst. Stykkerne autoklaveres i 15 minutter ved 121 °C i 300 ml Millipore vand og lufttørres. Opbevares ved stuetemperatur.

Til brug i agarmedie: Passende stykker (1 x 2 cm) autoklaveres i Millipore vand og placeres sterilt ovenpå agar med jordekstrakt. Inokulum fra flydende kultur dryppes ovenpå cellofanen.

Fremstilling af RBB-CMC

Farvemethoden er modificeret efter McCleary (1988). Reagenser til ca. 150 ml RBB-CMC opløsning:

7.69 g CMC; 1.54 g Remazol Brilliant Blue R; 15.38 g Na_2SO_4 ; 1.8 g $\text{Na}_3\text{PO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$ og 96% ethanol.

CMC opløses i 80 ml Millipore vand. RBB opløses i 60 ml Millipore vand før tilsætning. Opvarmes til 50 °C i vandbad på en magnetomrører med varmeplade.

Over 30 minutter tilsættes Na_2SO_4 ad ca. 10 omgange.

Na_3PO_4 opløses i Millipore vand (ca. 30 ml). Denne opløsning tilsættes gradvist til de øvrige ingredienser indtil pH er 11.5.

Temperaturen hæves til 70 °C og står i 2 timer under omrøring.

Fældningsprocedure: Reaktionsblandingen fældes med 1.5 x volumen 96% ethanol. Stilles på is i 30 minutter.

Overskydende væske hældes fra og "massen" centrifugeres ved 16.318 g (Sorvall centrifuge RC 5; 10.000 rpm) ved 4 °C i 30 minutter. Overskydende væske hældes igen fra og pellet resuspenderes med 80 °C varmt Millipore vand. Fældningsproceduren gentages.

Den vaskede RBB-CMC hældes i dialyseposer (SERVA 44146, Servapor®, diameter 29 mm) og dialyseres imod 3 liter Millipore vand natten over.

Dialyseret RBB-CMC hældes i plast-petriske og tørrer i stinkskab. Opbevares ved 4 °C.

Til brug i agarmedie (modificeret efter Wolf and Wirth, 1990): RBB-CMC opløses i jordekstrakt eller CY-medie til koncentrationer på 0.2-0.5% (w/v), pH indstilles til 7.2-7.4 med 0.5 M NaOH, hvorefter der tilsættes 1.5% (w/v) agar og mediet autoklaveres.

Standardmetode til farvning af CMC-plader med Congo rødt

Metoden er efter Kluepfel (1988): Når vækst er opstået på pladerne farves med Congo rødt (Fluka; 60910). Congo rødt reagerer med β -1,4-glucaner, hvilket giver en rødfarvning. Fremgangsmåde: 0.1% (v/v) Congo rød opløsning oversvømmer pladen (ca. 10 ml) i 20 minutter. Farveopløsningen hældes fra og pladen oversvømmes herefter med en 5 M NaCl opløsning. Efter yderligere 20 minutter hældes NaCl opløsningen fra og hydrolysezoner ses såfremt substratet er blevet hydrolyseret.



Til udarbejdelse af dette speciale
og det bagved liggende materiale
er anvendt følgende programmel:

tekstbehandling

Micosoft Word 97

regneark

Corel Quattro pro 8

billedbehandling

Aldus PhotoStyler 2.0

billedbehandling

Adobe Photoshop 4.0

litteraturadministration

Niles & Associates Inc. End Note Plus 2.1

scannersoftware

HP ScanJet II c

elektronisk udgivelse

Adobe Acrobat 3.0

Rapporten er skrevet med teksttypen "Ariel", og udskrevet på HP deskjet 895 cxi.
Den samlede rapport kan rekvireres i PDF format på CD eller i elektronisk udgave
via internettet ved henvendelse til forfatteren på E-mail: annemette@teliamail.dk