

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Maja KAMBIČ

**VPLIV BIOTEHNOLOŠKE OBDELAVE LESA NA
DELEŽ KRISTALINIČNOSTI CELULOZE**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2011

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Maja KAMBIČ

**VPLIV BIOTEHNOLOŠKE OBDELAVE LESA NA DELEŽ
KRISTALINIČNOSTI CELULOZE**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**IMPACT ON CELLULOSE CRYSTALLINITY WITH
BIOTECHNOLOGICAL APPROACH**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2011

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija Biotehnologije. Opravljeno je bilo na Katedri za kemijsko, biokemijsko in ekološko inženirstvo Fakultete za kemijo in kemijsko tehnologijo Univerze v Ljubljani ter Katedri za patologijo in zaščito lesa Oddelka za lesarstvo Biotehniške Fakultete Univerze v Ljubljani.

Po sklepu Komisije za dodiplomski študij Oddelka za biotehnologijo z dne 28. januarja 2011 je bila za mentorico diplomskega dela imenovana doc. dr. Polona ŽNIDARŠIČ PLAZL, za somentorja pa prof. dr. Franc POHLEVEN.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Branka JAVORNIK
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Članica: doc. dr. Polona ŽNIDARŠIČ PLAZL
Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo

Član: prof. dr. Franc POHLEVEN
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za lesarstvo

Član: izr. prof. dr. Miha HUMAR
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za lesarstvo

Datum zagovora:

Diplomsko delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisana se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddala v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Maja Kambič

KLJUČNA INFORMACIJSKA DOKUMENTACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 606:630*84(043.2)=163.6
KG	kristaliničnost/celuloza/celulaze/rjava trohnoba/kelator/praškovna difrakcija
AV	KAMBIČ, Maja
SA	ŽNIDARŠIČ PLAZL, Polona (mentorica)/ POHLEVEN, Franc (somentor)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta
LI	2011
IN	VPLIV BIOTEHNOLOŠKE OBDELAVE LESA NA DELEŽ KRISTALINIČNOSTI CELULOZE
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	XI, 47 str., 7 preg., 35 sl., 2 pril., 43 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Namen naloge je bil prispevati k poznavanju do sedaj znanih encimskih in neencimskih mehanizmov razgradnje lesa z glivo rjave trohnobe <i>Gloeophyllum trabeum</i> . Preučevali smo vpliv te glive in njenih ekstracelularnih encimov na delež kristaliničnosti v vzorcih smrekovine (<i>Picea abies</i>). Del lesnih vzorcev smo za različna časovna obdobja izpostavili delovanju glive <i>Gloeophyllum trabeum</i> , del pa smo jih izpostavili grobem encimskemu pripravku, ki je bil pripravljen s koncentriranjem filtrata submerznega produkcijskega gojišča glive. S praškovno difrakcijo smo spremljali spremembo deleža kristaliničnosti celuloze v lesnih vzorcih. Ugotovili smo, da se je delež kristaliničnosti po dveh tednih inkubacije z glivo povečal kar za 16 % glede na začetno vrednost. Tudi v vzorcih, ki so bili izpostavljeni grobem encimskemu pripravku glive <i>Gloeophyllum trabeum</i> , smo že po nekaj dneh dosegli povišanje deleža kristaliničnosti, kar je lahko obetaven pristop za izboljšanje predvsem fizikalnih lastnosti lesa (gostota, akustične lastnosti lesa). S sleditvijo celulaznih in ksilanaznih aktivnosti med submerznim gojenjem glive <i>Gloeophyllum trabeum</i> v produkcijskem gojišču z žagovino smreke <i>Picea abies</i> smo dokazali, da gliva izloča visoke koncentracije hidrolitičnih ekstracelularnih encimov.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDK 606:630*84(043.2)=163.6
CX crystallinity/cellulose/cellulases/brown rot/chelator /X-ray diffraction
AU KAMBIČ, Maja
AA ŽNIDARŠIČ PLAZL, Polona (supervisor)/ POHLEVEN, Franc (co-advisor)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty
PY 2011
TI IMPACT ON WOOD CELLULOSE CRYSTALLINITY WITH BIOTECHNOLOGY APPROACH
DT Graduation thesis (University Studies)
NO XI, 47 p., 7 tab., 35 fig., 2 ann., 43 ref.
LA sl
AL sl/en
AB This work is aimed at improving our current knowledge of the enzymatic and non-enzymatic mechanisms involved in wood decay by brown-rot fungus *Gloeophyllum trabeum*. The impact of fungus and its extracellular enzymes on wood crystallinity was studied. *Picea abies* was exposed to fungus *Gloeophyllum trabeum* for various time periods, as well as to crude enzyme preparation obtained from submerged cultivation of this fungus. X-ray diffraction was used to evaluate the changes in wood crystallinity. Results obtained showed that specimens of *Picea abies* incubated with fungus reached up to 16 % increase in wood crystallinity by the 2nd week of incubation. The incubation of wood with crude enzyme preparation of *Gloeophyllum trabeum* also resulted in an increase in wood crystallinity already after few days, which is a promising approach for improving the quality of wood. Determination of cellulase and xylanase activity during submerged cultivation of *Gloeophyllum trabeum* with *Picea abies* sawdust showed high yields of these extracellular enzymes.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA INFORMACIJSKA DOKUMENTACIJA.....	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE.....	V
KAZALO SLIK.....	VIII
KAZALO PRILOG	X
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XI
1 UVOD	1
2 PREGLED OBJAV	2
2.1 ZGRADBA LESA.....	2
2.1.1 Makroskopska zgradba lesa	2
2.1.2 Mikroskopska zgradba lesa iglavcev	3
2.1.3 Zgradba in kemijska sestava rastlinskih celičnih sten.....	3
2.1.4 Celuloza	4
2.1.5 Hemiceluloza	6
2.1.6 Lignin.....	7
2.2 GLIVE RJAVE TROHNOBE.....	7
2.2.1 Navadna tramovka (<i>Gloeophyllum trabeum</i>)	7
2.3 ENCIMSKI SISTEM GLIV RJAVE TROHNOBE.....	8
2.3.1 Celulaze	8
2.3.2 Ksilanaze	10
2.4 BIOLOŠKI RAZKROJ LESA	11
2.4.1 Razkroj S2 sloja celične stene traheide.....	11
2.4.2 Vloga oksalne kisline pri razkroju	12
2.4.3 Vpliv razkroja lesa na kristaliničnost.....	12
2.4.4 Vloga nekaterih nizkomolekularnih spojin pri razkroju lesa	13
2.5 RENTGENSKA PRAŠKOVNA DIFRAKCIJA (XRD, ang. X-Ray Powder Diffraction)	14
3 MATERIALI IN METODE	16
3.1 RAST GLIVE NA LESNIH VZORCIH	16
3.1.1 Mikroorganizem <i>Gloeophyllum trabeum</i> ZIM L017	16
3.1.2 Priprava vzorcev lesa	16
3.1.3 Sterilizacija.....	16

3.1.4	Priprava hranilnega trdnega gojišča	16
3.1.5	Izpostavitev lesnih vzorcev delovanju glive	17
3.1.6	Določitev izgube mase lesnih ploščic.....	17
3.1.7	Določitev deleža kristaliničnosti.....	18
3.2	MATERIALI IN METODE ZA RAST GLIVE NA TEKOČEM GOJIŠČU	19
3.2.1	Gojišče za vzdrževanje kulture <i>Gloeophyllum trabeum</i> ZIM L017.....	19
3.2.2	Priprava statične tekoče kulture	19
3.2.3	Priprava vcepka za rast peletov	20
3.2.4	Priprava submerznega produkcijskega gojišča.....	20
3.2.5	Analizne metode.....	20
4	REZULTATI IN RAZPRAVA.....	26
4.1	PRERAŠČANJE LESNIH VZORCEV Z GLIVO <i>Gloeophyllum trabeum</i>	26
4.1.1	Izgled lesnih vzorcev.....	27
4.1.2	Izguba mase lesnih vzorcev.....	27
4.1.3	Sprememba kristaliničnosti lesnih vzorcev	28
4.1.4	Sprememba mase kristaliničnega in amorfnega dela.....	29
4.2	SUBMERZNA PROIZVODNJA ENCIMOV Z GLIVO <i>Gloeophyllum trabeum</i> ..	30
4.2.1	Priprava submerzne kulture glive <i>Gloeophyllum trabeum</i>	30
4.2.2	Spremljanje submerznega gojenja <i>Gloeophyllum trabeum</i> v produkcijskem gojišču	32
4.2.3	Opredelitev optimalne pH vrednosti za delovanje celulaz in ksilanaz glive <i>Gloeophyllum trabeum</i>	35
4.3	INKUBACIJA LESNIH VZORCEV Z ENCIMSKIM PRIPRAVKOM GLIVE <i>Gloeophyllum trabeum</i>	37
4.3.1	Izgled lesnih ploščic	37
4.3.2	Sprememba mase lesnih vzorcev.....	38
4.3.3	Sprememba kristaliničnosti lesnih ploščic	39
4.4	INKUBACIJA ŽAGOVINE V FILTRATU Z ENCIMSKIMI PRIPRAVKI GLIVE <i>Gloeophyllum trabeum</i>	40
5	SKLEPI	42
6	POVZETEK	43
7	VIRI	44
	ZAHVALA	
	PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Splošni podatki o celulaznih encimih glive <i>G. trabeum</i>	9
Preglednica 2: Pregled splošnih podatkov za ksilanaze gliv rjave trohnobe <i>L. edodoe</i> in <i>C. cerebela</i>	11
Preglednica 3: Povprečna sprememba mase lesnih vzorcev po inkubaciji pri 30°C z grobim encimskim pripravkom, dobljenim z membrano z MWCO 10000 Da.....	38
Preglednica 4: Povprečna sprememba mase lesnih vzorcev po inkubaciji pri 30 °C z grobim encimskim pripravkom, dobljenim z membrano z MWCO 10000 Da in nato v razmerju 2:1 razredčenim s filtratom, dobljenim z membrano z MWCO 1000 Da	39
Preglednica 5: Povprečna sprememba kristaliničnosti v zmletih lesenih ploščicah po treh dneh inkubacije v demineralizirani vodi pri 30°C.....	39
Preglednica 6: Povprečna sprememba kristaliničnosti žagovine po treh dneh inkubacije v demineralizirani vodi pri 30°C	41
Preglednica 7: Povprečna sprememba mase in kristaliničnosti žagovine pred in po spiranju adsorbiranih snovi v vzorcih.....	41

KAZALO SLIK

Slika 1: Makroskopska zgradba lesa (Leban, 2007).....	2
Slika 2: Mikroskopska zgradba lesa iglavcev (Leban, 2007).....	3
Slika 3: Shematska slika tkiva lesa (Kirk, 1998).....	4
Slika 4: Molekula celuloze (Tancek, 2009).....	5
Slika 5: Shematski prikaz celulozne mikrofibrile (Blomstedt, 2007)	5
Slika 6: Struktura D-galaktoze (Tancek, 2009).....	6
Slika 7: Struktura D-manoze (Tancek, 2009).....	6
Slika 8: Molekula ksilana (Tancek, 2009).....	6
Slika 9: <i>Gloeophyllum trabeum</i> (Lindsey, 2007)	8
Slika 10: Encimska hidroliza celuloze (Smerajec, 2009).....	9
Slika 11: Prikaz delovanja ksilanaz (Tancek, 2009).....	10
Slika 12: Prikaz različnega načina razkroja celuloze glive rjave in bele trohnobe (Kleman-Leyer in sod., 1992).....	13
Slika 13: Geometrijski prikaz Braggovega zakona (Meden, 2010).....	15
Slika 14: Micelij glive <i>G. trabeum</i> na PDA	16
Slika 15: Izpostavitve lesnih vzorcev glivi <i>G. trabeum</i>	17
Slika 16: Shema difraktometra s primarnim monokromatrojem (Meden, 2010)	19
Slika 17: Centrifugirka z ultrafiltracijsko membrano (Fischer Scientific, 2006).....	23
Slika 18: Ultrafiltracijska celica	23
Slika 19: Preraščanje lesa z glivo <i>Gloeophyllum trabeum</i> (a) 0. teden (b) 2. teden (c) 3. teden (d) 4. teden (e) 6. teden	26
Slika 20: Primer izgleda ploščice po : a) dveh tednih; b) treh tednih; c) štirih tednih; d) šestih tednih inkubacije z glivo <i>Gloeophyllum trabeum</i> ; e) kontrola brez glive	27
Slika 21: Časovna odvisnost povprečne izgube mase vzorcev lesa v odstotkih, po inkubaciji z gobo <i>G. trabeum</i>	28
Slika 22: Časovna odvisnost deleža kristaliničnosti vzorcev lesa po inkubaciji z <i>G. trabeum</i>	29
Slika 23: Časovna odvisnost kristalinične, amorfne in celokupne mase lesnih vzorcev po inkubaciji z glivo <i>G. trabeum</i>	30
Slika 24 a in b: Rast <i>G. trabeum</i> na statičnem tekočem gojišču v erlenmajerici po enem tednu	31
Slika 25: Peletna rast glive <i>G. trabeum</i> a) v rastnem gojišču 1 teden po precepitvi iz statičnega gojišča b) peleti <i>G. trabeum</i> preneseni v petrijevko	31
Slika 26: Gliva <i>G. trabeum</i> , submeržno razraščena v rastnem gojišču a) 40X povečava; b) 100X povečava	32
Slika 27: Submeržno gojenje na stresalnik.....	32
Slika 28: Časovna odvisnost vrednosti pH v filtratih, odvzetih med submerznim gojenjem glive <i>G. trabeum</i>	33
Slika 29: Časovna odvisnost izmerjene koncentracije reducirajočih sladkorjev in proteinov v filtratih, odvzetih med submerznim gojenjem glive <i>G. trabeum</i>	34
Slika 30: Časovna odvisnost izmerjene aktivnosti celulaz in ksilanaz v filtratih, odvzetih med submerznim gojenjem glive <i>G. trabeum</i>	35
Slika 31: Odvisnost relativne celulazne aktivnosti glive <i>G. trabeum</i> od pH vrednosti.....	36
Slika 32: Relativna ksilanazna aktivnost glive <i>G. trabeum</i> v odvisnosti od pH vrednosti..	36

Slika 33: Inkubacija pomočenih lesnih vzorcev v filtrat produkcijskega gojišča <i>G. trabeum</i>	37
Slika 34: Slike ploščic namočenih v koncentrate filtratov produkcijskega gojišča glive <i>G. trabeum</i> , pridobljenih z membrano MWCO 10000 Da po a) štirih b) sedmih in c) desetih dnevih inkubacije; d) kontrola inkubirana v vodi	38
Slika 35: Časovna odvisnost deleža kristaliničnosti vzorcev lesa po inkubaciji lesnih vzorcev v koncentratih produkcijskega gojišča <i>G. trabeum</i>	40

KAZALO PRILOG

- Priloga 1: Prikaz difraktogramov od drugega do četrtega tedna inkubacije lesnih vzorcev z glivo *G. trabeum*
- Priloga 2: Prikaz difraktogramov po šestem in dvanajstem tednu inkubacije lesnih vzorcev z glivo *G. trabeum*

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

PDA	krompirjev dekstrozni agar
2,4-DHBA	2,4-dihidroksibenzojska kislina
RZV	relativna zračna vlažnost
PVC	polivinilklorid
CMC	karboksimetilceluloza
MWCO	ang. molecular weight cut off
<i>G. trabeum</i> / Gt	<i>Gloeophyllum trabeum</i>

1 UVOD

Les je naravno obnovljiv material z veliko raznolikostjo lastnosti in uporabnosti. Nenadomestljiv je v gradbeništvu, proizvodnji stavbnega in notranjega pohištva, za galanterijske izdelke, glasbene instrumente, v papirništvu in še kje.

V zgodovini je bila obdelava lesa vsega spoštovanja vredna obrt. Znotraj nje je bila zelo cenjena izdelava glasbil. Instrumenti, ki so bili izdelani izpod roke Antonia Stradivarija v poznih letih sedemnajstega in zgodnjih letih osemnajstega stoletja, danes dosegajo večmilijonske vrednosti. Skrivnost dela mojstrov je bilo poznavanje lesa in upoštevanja naravnih zakonitosti. Tako so skrbno izbran les počasi naravno sušili in kondicionirali več kot 10 let.

Les, primeren za izdelavo vrhunskih glasbil je resonančni les. Tega je v naravi relativno malo. Značilnosti resonančnega lesa so nizka gostota, enakomerne in ozke branike, čim bolj pravilna zgradba s čim manj kasnega lesa ter brez grč in smolnih kanalov. Zaradi tega prihaja do velikega prebiranja lesa in posledično do slabih izkoristkov (Leban, 2007).

Les ima pomembne akustične lastnosti. Zvok se v lesu širi najhitreje v smeri lesnih vlaken. Pomembni dejavniki, ki vplivajo na hitrost širjenja zvoka v lesu, so poleg gostote lesa in smeri širjenja zvoka še elastičnost, vlažnost in temperatura lesa ter frekvenca zvoka (Leban, 2007). S spremembo deleža celulozne kristaliničnosti lesa, vplivamo na fizikalne lastnosti lesa in posredno bi s tem lahko bile izboljšane tudi akustične lastnosti lesa.

Pri obdelavi lesa z različnimi postopki in uporabo različnih kemičnih snovi, ki trajno vplivajo na lastnosti lesa, se je uveljavil izraz modifikacija lesa. Izraz je v ožjem smislu bolj uveljavljen na področju zaščite lesa pred škodljivci. Danes se vse bolj uveljavljajo postopki modifikacije lesa, pri katerih s spremembo strukture lesa na molekularnem nivoju spremenimo lastnosti lesa. Modifikacijo lesa razdelimo na: kemično, fizično, termično in encimsko (Gorišek, 2008).

Pri postopku modifikacije lesa se lesni masi spremeni struktura osnovnih gradnikov ali polimerov (celuloza, hemiceluloza, lignin) v celični steni. Zmanjša se zmožnost vpijanja vode, s tem pa posledično tudi nabrekanje in krčenje. Po drugi strani pa zaradi spremenjene kemične zgradbe lesa glive ali insekti modificiranega lesa ne prepoznajo več kot vir hrane.

Modifikacija lesa z encimi je zaenkrat najmanj raziskano področje. Uporaba encimov omogoča modifikacijo lesa že pri sobnih pogojih. Tudi s pomočjo encimov lahko spremenimo osnovno molekularno strukturo lesa. Encim lakaza na primer spremeni strukturo lignina in s povečanjem reaktivnih mest ugodno vpliva na lastnosti pri vročem stiskanju lesnih vlaken in tako nastane nova molekulska struktura celične stene.

V diplomskem delu smo želeli z glivo rjave trohnobe *Gloeophyllum trabeum* (*G. trabeum*) in njenih ekstracelularnih encimov vplivati na spremembo v deležu kristaliničnosti celuloze smrekovega lesa.

2 PREGLED OBJAV

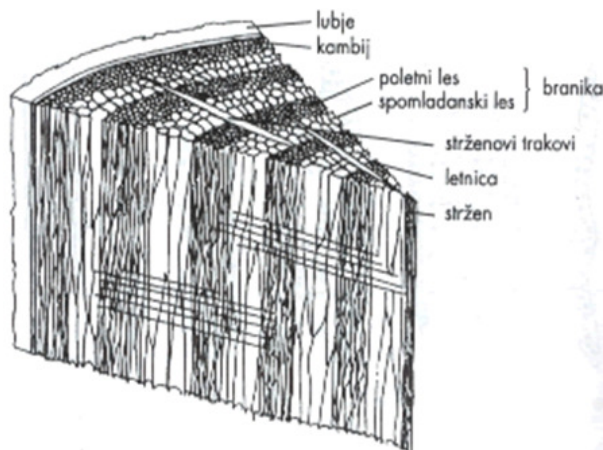
2.1 ZGRADBA LESA

2.1.1 Makroskopska zgradba lesa

Zgradbo lesa, ki jo lahko vidimo s prostim očesom, imenujemo makroskopska. Različne celice ustvarjajo značilno strukturo in videz lesa, ki se razlikujeta glede na smer prereza debla.

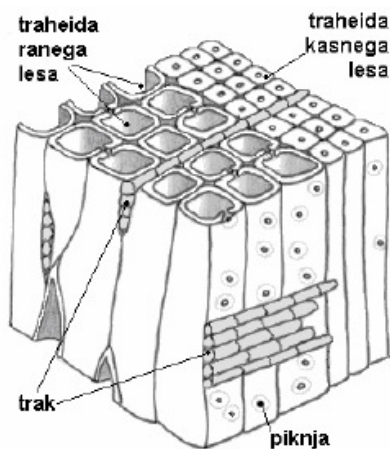
Najbolj zunanji del prerezanega debla je skorja. Skorji sledi kambij, ki je pomemben za rast drevesa, skrbi za delitev celic in priraščanje lesa navznoter ter skorje navzven. Kambiju proti notranjosti sledijo prirastne plasti lesa. V normalnih okoliščinah v zmernem podnebnem pasu nastane ena prirastna plast letno in jo imenujemo letni prirastek ali branika. Med branikami so vidne meje - letnice. Sredi prečnega prereza je stržen, ki ni sestavljen iz običajnih lesnih celic. Vidni so tudi lesni trakovi kot tanke črte, ki potekajo od skorje proti strženu pravokotno na letnice. Prečni prerez debla je prikazan na sliki 1.

Zunanji del branike je pri iglavcih ponavadi temneje obarvan in je trši. Les, ki je priraščal proti koncu vegetacijske dobe in traheide v tem delu branike imajo relativno ozke lumne ter debele stene. Imenujemo ga kasni les. Del branike iz bolj mehkega lesa, ki je nastajal na začetku rastne sezone, imenujemo rani les in ga sestavljajo traheide z relativno širokimi celičnimi lumni in tankimi stenami (Leban, 2007).



Slika 1: Makroskopska zgradba lesa (Leban, 2007)

2.1.2 Mikroskopska zgradba lesa iglavcev



Slika 2: Mikroskopska zgradba lesa iglavcev (Leban, 2007)

Les iglavcev (slika 2) je pod mikroskopom viden kot tkivo z zelo urejenimi nizi celic. Te celice so aksialne traheide, ki opravljajo v lesu iglavcev tako prevajalno kot oporno funkcijo. Traheide ranega lesa imajo tanjše celične stene in večje lumne. Priraščajo na začetku rastne dobe, to je spomladi. Traheide kasnega lesa pa imajo zelo debele celične stene in majhne lumne. Priraščajo poleti, ko drevo proizvaja največ hrane. Aksialne traheide so v drevesu usmerjene vzporedno z osjo drevesa. Trakovne traheide pa najdemo v lesnih trakovih. Parenhimske celice predstavljajo le okrog 5 % lesnega tkiva iglavcev. Tudi te celice so lahko trakovne in osne oz. aksialne.

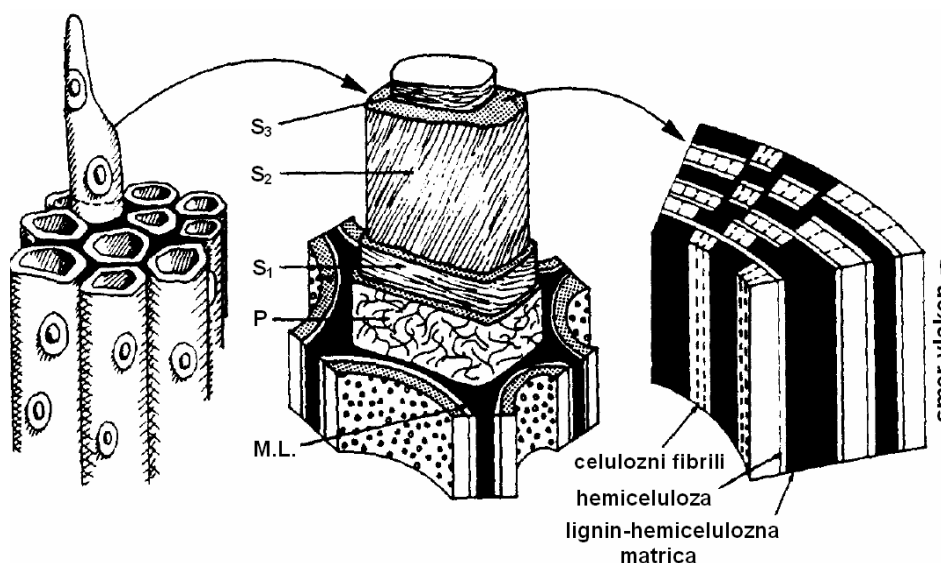
Lesni trakovi so lahko glede na vrsto celic, ki jih sestavljajo:

- homocelularni – sestavljajo jih le trakovne parenhimske celice (primer: jelka)
- heterocelularni – sestavljajo jih trakovne traheide in parenhimske celice (primer: smreka, bor)

V lesu iglavcev, ki vsebuje smolo, lahko vidimo smolne kanale z epitelnimi celicami (Leban, 2007).

2.1.3 Zgradba in kemijska sestava rastlinskih celičnih sten

Celične stene lesnih celic so zgrajene iz primarnega in sekundarnega sloja. Sekundarni sloj je nadalje razdeljen na zunanji sloj S_1 , srednji sloj S_2 in notranji sloj S_3 (Hill, 2006). Celice se med seboj stikajo z osrednjo lamelo, ki je sestavljena iz lignina, kalcija in pektinov (Schwarze, 2007), (slika 3).



Slika 3: Shematska slika lesnega tkiva (S1 - S3 - sekundarna stena celice, P- primarna stena, M.L. - osrednje lamele) (Kirk, 1998)

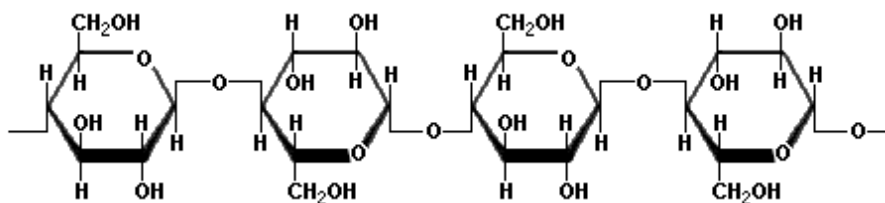
Mlade in rastoče celice imajo samo primarno celično steno, ki je iz neurejeno potekajočih celuloznih fibril, med katerimi so pektini in hemiceluloze ter je dokaj prožna. Ko celica raste, se povečuje tudi površina primarne celične stene, tako da se nove celulozne fibrile, ki nastajajo v citoplazmi, vlagajo med že obstoječe sestavne dele stene.

Po končani primarni površinski rasti celice se prično na primarno celično steno z notranje strani celice nalagati elementi sekundarne celične stene, ki je večinoma triplastna in precej debelejša od primarne stene. Celulozne fibrile so v tem sloju precej urejeno razvrščene. Debelinska rast poteka tako, da se v citoplazmi nastale molekule celuloze in hemiceluloz od znotraj nalagajo na že obstoječe stenske elemente (Leban, 2007).

Sekundarna celična stena je zaradi prisotnosti lignina bolj toga kot primarna stena in deluje predvsem kot oporna struktura. Sekundarna celična stena je običajno tudi precej debelejša od primarne celične stene. V celicah lesa je do 25 % lignina, zato so te celice izredno trde in odporne na razkroj. Proces lignifikacije celičnih sten pri iglavcih in listavcih poteka podobno. Lignifikacija vedno sledi odlaganju polisaharidov in poteka v treh značilnih stopnjah. Najprej se prične v celičnih vogalih ter združeni srednji lameli, po tem ko se oblikuje S1 sloj sekundarne stene. Med oblikovanjem srednjega sloja S2 sekundarne celične stene poteka proces lignifikacije počasneje. Glavnina lignina se odloži po sintezi polisaharidov v sloju S3. Lignifikacija sekundarne stene se prične v zunanjem sloju S1 in se centripetalno širi proti lumnu. Lignifikacija srednjega sloja S2 ni zaključena pred pričetkom odlaganja notranjega sloja S3 sekundarne stene (Blomstedt, 2007).

2.1.4 Celuloza

Vsebnost celuloze v lesu znaša okoli 40 do 50 % (Fengel in Wegener, 1989). Sestavljajo jo β -D-glukopiranozne monomerne enote, ki so med seboj povezane z β (1-4)-glikozidnimi vezmi (slika 4). Dve glukozni enoti, povezani z β (1-4)-glikozidno vezjo, tvorita osnovni gradnik celulozne verige, celobiozo (Eaton in Hale, 1993).



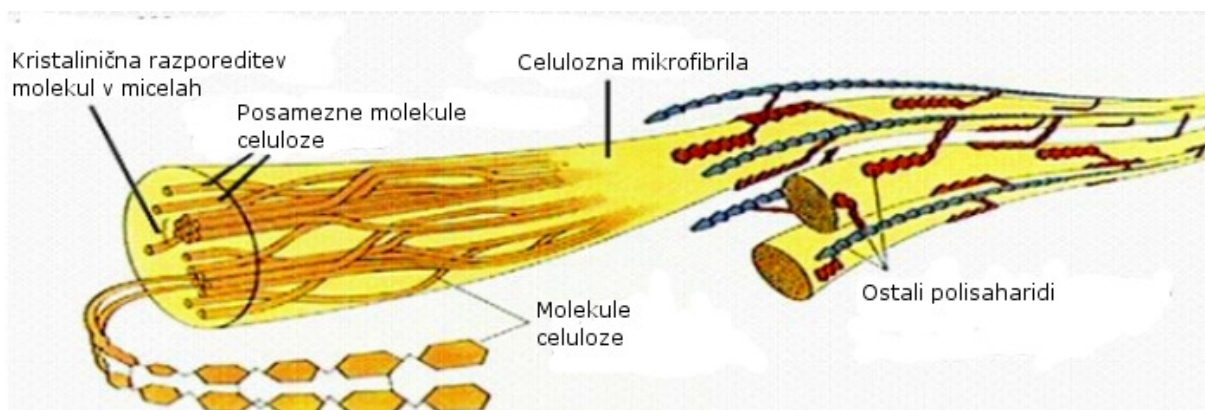
Slika 4: Molekula celuloze (Tancek, 2009)

Polimerne celulozne verige so linearne. Stopnja polimerizacije je odvisna od posamezne rastlinske vrste (15000 pri bombažu in 10000 pri celulozi lesa). Zaradi linearne zgradbe lahko polimeri med seboj tvorijo intra- in intermolekularne vodikove vezi. Vzporedno potekajoče celulozne verige se agregirajo v mikrofibrile z izmenjujočimi se kristaliničnimi in amorfnimi regijami. V kristalinskih delih mikrofibril so molekule celuloze med seboj povezane s kemičnimi (vodikovimi) vezmi, v amorfnih delih pa molekule niso vzdolžno povezane (Leban, 2007). Kristalinične regije so skoraj v celoti iz celuloze (glukanov). Zaradi zelo tesne povezave med molekulami, je ta regija težje dosegljiva za encimsko hidrolizo, medtem ko je amorfna regija za encimsko razgradnjo bolj dostopna. Amorfne regije med kristaliničnimi deli sestavljajo hemiceluloza, lignin, ekstraktivne vezi in minerali (Cowling, 1961). Med ekstraktivne snovi uvrščamo snovi, ki služijo kot hranilne snovi (škrob, sladkorje, beljakovine), inhibitorne snovi (smole, tanin, barvila, pektine, glikozide, fenole, alkaloidi) in privlačne snovi (eterična olja) (Blažič, 2010).

Celulozne mikrofibrile so temeljno ogrodje celične stene. Kristalinski pasovi dajejo ogrodju veliko trdnost in odpornost, amorfni pasovi pa potrebno prožnost.

Različne stopnje krčenja in nabrekanja lesa v smeri lesnih vlaken, lesnih trakov in v smeri letnic so posledica razporeditve celuloznih fibril v oleseneli celični steni ter razporeditve in lastnosti kristalinskih in amorfnih področij znotraj mikrofibrile.

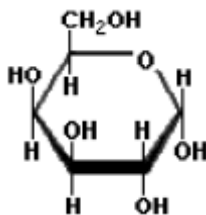
Mikrofibrile se združujejo v fibrile, te pa v celulozna vlakna (Richardson, 1993), (slika 5).



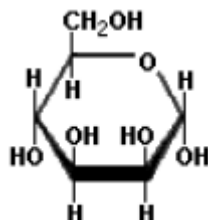
Slika 5: Shematski prikaz celulozne mikrofibrile (Blomstedt, 2007)

2.1.5 Hemiceluloza

Hemiceluloza predstavlja 25 do 30 % lesne mase. Količina hemiceluloze v lesu variira tako med listavci in iglavci kot tudi med drevesnimi vrstami. Hemicelulozo sestavljajo razmeroma kratki in razvejani homo- in heteropolimeri iz različnih sladkorjev (D-glukoza, D-galaktoza (slika 6), D-manoza (slika 7), D-ksiloza, L-arabinoza in L-ramnoza) in uronska kislina. Monomeri so povezani z 1-3, 1-6 ali 1-4 glikozidnimi vezmi. Stopnja polimerizacije je od 150 do 200 sladkornih enot.



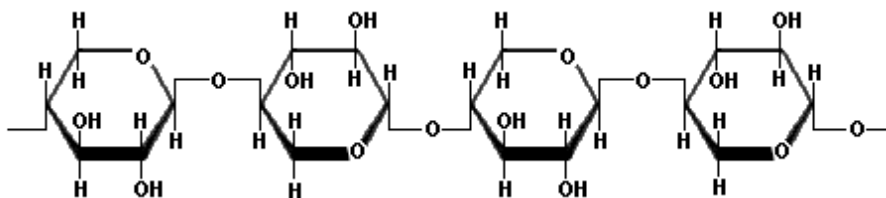
Slika 6: Struktura D-galaktoze (Tancek, 2009)



Slika 7: Struktura D-manoze (Tancek, 2009)

Hemiceluloza se od celuloze razlikuje po tem, da ima v stranskih verigah sladkorje, sladkorne kisline in acetilne estre. Posledica teh stranskih skupin je nekristaliničnost ali nizka stopnja kristaliničnosti hemiceluloze. Hemiceluloza razmeroma zlahka hidrolizira v osnovne monomere. Ugotovljeno je bilo, da hemiceluloza, v povezavi s celulozo, vpliva na organizacijo lignina (Kirk in Cullen, 1998).

2.1.5.1 Ksilan



Slika 8: Molekula ksilana (Tancek, 2009)

Ksilani spadajo v skupino hemiceluloz. So skupina heteropolimerov, katerih osnovna veriga je sestavljena iz D-ksilopiranozidnih (D-ksiloznih) ostankov, povezanih z $\beta(1-4)$ -glikozidnimi vezmi (slika 8). Na osnovno verigo so z glikozidnimi vezmi pripete različne sladkorne skupine. Z estrskimi vezmi se lahko vežejo tudi različne nesladkorne substituentne, npr. ferulna, p-kumarna in očetna kislina. Acetilni ostanek se veže na ksilozo,

ferulna in p-kumarna pa sta zaestreni na arabinofuranozilnem ostanku. Poleg tega se p-kumarna kislina lahko neposredno veže na ksilozo z glikozidno vezjo (Bajpai, 1997).

Veliko število substituent na osnovni verigi poveča vodotopnost ksilanov. Pomembno vlogo imata ferulna in p-kumarna kislina, ki s tvorbo diferulnih prečnih mostičev povezujeta dve sosednji verigi ksilana. Prek fenolnih kislin se ksilani v celični steni povezujejo tudi z ligninom (Aro, 2005). Na celulozo in druge polisaharide se ksilani adsorbirajo z vodikovimi vezmi in tako pripomorejo k trdnosti rastlinske celične stene.

2.1.6 Lignin

Kemične zgradbe lignina ni mogoče natančno določiti, ker molekule lignina nimajo enotne strukture niti določljive molekulske mase. Lignini nastanejo z naključno polimerizacijo treh monomerov fenilpropanskih enot: kumarilalkohola, koniferilalkohola in sinapilalkohola. Za razliko od nitastih celuloznih molekul, so lignini mrežasto prepleteni. Lignini različnih drevesnih vrst se med seboj razlikujejo: les iglavcev ima več koniferilalkohola, les listavcev pa več sinapilalkohola. V lesu listavcev je vsebnost lignina od 18 do 25 %, v lesu iglavcev pa od 25 do 35 %. Lignin je odporen na kemično, bakterijsko in glivno razgradnjo v anaerobnih razmerah, v aerobnih razmerah pa ga razgrajujejo glive bele trohnobe. Delno je topen v alkoholu in v nekaterih organskih kislinah (Leban, 2007).

2.2 GLIVE RJAVE TROHNOBE

Glive, ki povzročajo rjavo trohnobo, spadajo med najpogostejše in najdestruktivnejše uničevalce lesa. Med razkrojem močno oslabijo mehanske lastnosti lesa, predvsem natezno trdnost. Glive rjave trohnobe razkrajajo predvsem hemicelulozo in celulozo, medtem ko ostane lignin skoraj nedotaknjen. Razkrojeni les potemni in razpoka ter skoraj popolnoma izgubi trdnost. Organizmi lahko prodrejo v celico prek celične stene mehansko ali pa z razgradnjo celične stene. Slednje je značilno za glive, ki z ustreznimi encimi hidrolizirajo ali oksidirajo sestavine celične stene. V začetnih fazah razkroja hife prodirajo iz celice v celico prek prevajalnih elementov (pikenj) in parenhima. Kasneje pa si z razgradnjo celične stene same ustvarjajo prehode (Eaton in Hale, 1993).

Najbolj tipične glive, ki povzročajo rjavo trohnobo, so: kletna goba (*Coniophora puteana*), siva hišna goba (*Serpula lacrymans*), bela hišna goba (*Antrodia vaillantii*, *Oligoporus placenta*), tramovki (*Gloeophyllum trabeum* in *Gloeophyllum saepiarium*), luskasta nazobčenka (*Lentinus lepideus*) in hrastova labirintnica (*Daedalea quercina*) (Humar in Pohleven, 2000).

2.2.1 Navadna tramovka (*Gloeophyllum trabeum*)

Razširjena je v Evropi in Ameriki, najdemo pa jo tudi drugod po svetu. Je najhujša razkrojevalka hlodovine iglavcev (bor, smreka). Listavcev praviloma ne okužuje. Zelo je

razširjena na lesnih skladiščih, pogosto pa jo najdemo na obdelanem masivnem lesu kot so ograje, klopi, pragovi, mostovi, jamski les in strešna konstrukcija.

Trosnjak je najprej rumenkast, pozneje postane temno siv z rumenim (včasih črnim) robom. Prvi trosnjak iz lesa požene po približno petih mesecih. Zgornja površina klobuka je dlakava in temno rjava (slika 9).

Optimalna temperatura za rast tramovke je med 30 in 35 °C. Spore vzklijejo po enem do dveh dneh. Micelij je odporen proti segrevanju, vendar pri temperaturi 69 °C odmre v eni uri.

Les trohni v notranjosti in lahko tudi popolnoma strohni, medtem ko zunanji del lesa ostane nespremenjen. Prvo znamenje razkroja je blede rumena barva lesa, ki postaja vse mehkejši. V končni fazi je trohnoba temna in les prizmatično razpoka ter se v končni fazi spremeni v prah.

Navadna tramovka je tipična razkrojevalka lesa iglavcev, ki je izpostavljen abiotskim dejavnikom. Okužuje beljavo in jedrovino (Benko in sod., 1987).



Slika 9: *Gloeophyllum trabeum* (Lindsey, 2007)

2.3 ENCIMSKI SISTEM GLIV RJAVE TROHNOBE

Za razkroj celuloze in hemiceluloz do enostavnih organskih molekul je potrebno sukcesivno delovanje različnih ekstracelularnih encimov.

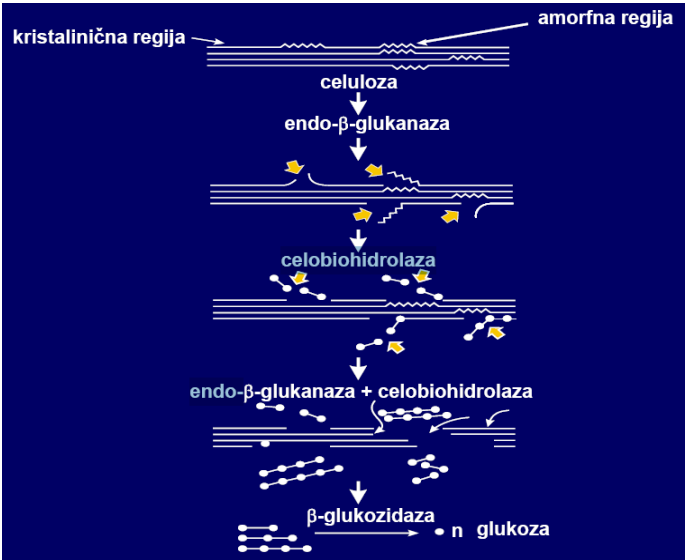
2.3.1 Celulaze

Celulaze (EC 3.2.1.4.) so skupina encimov, ki jih proizvajajo predvsem glive in bakterije. Celulaze imajo široko območje temperature in optimalnega pH, večinoma pa so celulaze aktivne pri pH 5,5 in temperaturi 55 °C.

Celulaze poskrbijo za encimsko razgradnjo celuloze v molekule glukoze (slika 10). Ta glukoza nastane s sinergističnim delovanjem naslednjih celulaz:

- endocelulaze (endo- β -glukanaza) cepijo naključno v notranjosti strukture celuloze, niso zelo aktivne pri cepitvi kristalinične celuloze, so pa sposobne hidrolizirati nadomestno celulozo kot je karboksimetil celuloza. Endocelulaze proizvajajo tudi celulodekstrine.

- eksocelulaze (eksobiohidrolaza, celobiohidrolaza) cepijo kristalinično celulozo na nereducirajočih koncih. Celobiohidrolaza je zelo pomembna saj cepi mikrokristalinično celulozo, ki jo običajno prisotna v zelo omejenih količinah.
- β -glukozidaze (celobiaza) hidrolizirajo celobiozo do glukoze (Aro, 2005).



Slika 10: Encimska hidroliza celuloze (Smerajec, 2009)

Za glive rjave trohnobe je znano, da ne vsebujejo eksoglukanaz (Enoki in sod., 1997; Schilling, 2009).

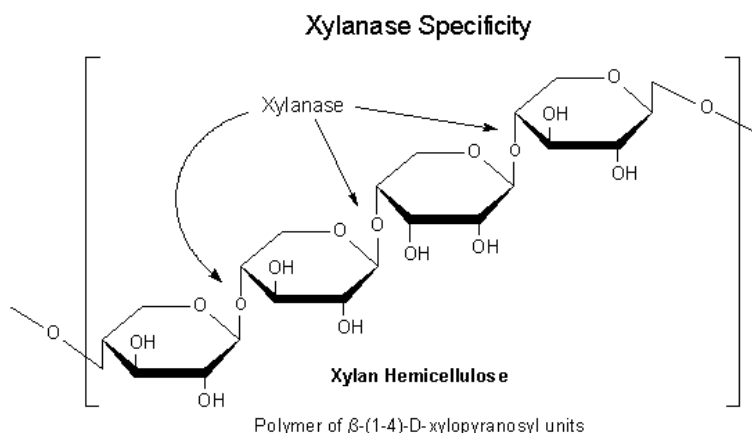
Iz baze podatkov za encime Brenda-The comprehensive enzyme information system (2011) smo za celulaze *G. trabeum* našli sledeče podatke (preglednica 1):

Preglednica 1: Splošni podatki o celulaznih encimih glive *G. trabeum*

Organizem	Encim	Molekulska masa (Da)	Optimalni pH	Optimalna T (°C)
<i>Gloeophyllum trabeum</i> (<i>Lenzites trabea</i>)	endo β (1,4)-glukanaza (EC 3.2.1.4.)	29000	4,4	70
	β -glukozidaza (EC 3.2.1.21)	320000	4,5	75

Cohen in sod. (2005) zatrjujejo, da β -endoglukanaze iz *G. trabeum* sodelujejo v razgradnji nekristalinične oziroma amorfne celuloze skupaj z neencimskimi reakcijami. Zaradi svoje nizke molekulske mase pa so najverjetneje prve prisotne pri razgradnji kristalinične celuloze. Razgradnja kristalinične celuloze poteka z glukozidaznimi encimi, ki imajo višje molekulske mase (42 kDa) in β -glukanazami katerih velikost naj bi bila 28 kDa.

2.3.2 Ksilanaze



Slika 11: Prikaz delovanja ksilanaz (Tancek, 2009)

Ksilanaze (EC 3.2.1.8) so encimi, ki razgrajujejo polisaharid β -1,4- ksilan v ksilozo (lesni sladkor). Ksilan sodi med gradnike hemiceluloze, ki so glavna komponenta celične stene rastlin (slika 11). Glede na monosaharid, ki sestavlja glavno verigo, hemiceluloze razdelimo v več skupin: ksilani, manani, galaktani, arabinani in glukani (Biermann, 1996).

Ksilan je zapleteno sestavljena molekula, zato je za učinkovito razgradnjo potrebno sinergistično delovanje več različnih encimov. Encimi, ki hidrolizirajo ksilan, razdelimo v dve skupini. Prva skupina ksilanolitičnih encimov, ki cepijo osnovno verigo ksilana, zajema (Bajpai, 1997):

- endo- β (1,4)-ksilanaze katalizirajo hidrolizo β (1,4)-D-glikozidnih verig v glavni verigi ksilana.
- β -ksilozidaze hidrolizirajo krajše ksilo oligosaharide, največkrat ksilobiozo do ksiloze
- eksoksilanaze odcepljajo ksilozilne ostanke do konca verige ksilo oligomerov.

V drugi skupini so encimi, ki jih imenujemo tudi pomožni ksilanolitični encimi in odcepljajo stranske skupine ksilana.

S pomočjo encimske baze podatkov Brenda-The comprehensive enzyme information system (2011) smo o ksilanazah rjave trohnobe našli sledeče podatke (preglednica 2):

Preglednica 2: Pregled splošnih podatkov za ksilanaze gliv rjave trohnobe *L. edodoe* in *C. cerebela*

Organizem	Encim	Molekulska masa (Da)	Optimalni pH	Optimalna T (°C)
<i>Lentinula edodoe</i>	endo β (1,4)-ksilanaza (EC 3.2.1.8.)	ni podatka	4	50
<i>Coniphora cerebela</i>	ksilanaza (EC 3.2.1.8.)	34000	ni podatka	ni podatka
	β -ksilozidaza (EC 3.2.1.37)	38000	ni podatka	ni podatka

2.4 BIOLOŠKI RAZKROJ LESA

Razkroj lesa se pod ugodnimi pogoji začne z infekcijo s sporami, konča pa se, ko je les popolnoma razkrojen - mineraliziran. V začetni fazi glive s hifami prodirajo v lumne celičnih sten in jih fizično osvojijo. V tej stopnji navadno še ne opazimo izgube mase lesa, zato običajno to stopnjo imenujemo tudi nevidno. Ko razkroj napreduje, se pojavijo rahla razbarvanja in spremembe v teksturi lesa. To fazo poimenujemo zgodnja. V tej stopnji je razkroj opazen, vendar ne očiten. Pojavi se tudi prva občutna izguba mase. Stopnji, ko prvič brez problema prepoznamo razkrojeni les, pravimo vmesna. V tej stopnji les še ohrani svoje strukturne lastnosti. Med seboj še lahko ločimo posamezne drevesne vrste. V zadnji fazi pa les popolnoma izgubi svojo teksturo. Glive razgradijo les bodisi do lignina ali polioz. Les izgubi tudi svoje mehanske lastnosti, tako da ga lahko zdrobimo s prsti (Zabel in Morrell, 1992).

Glive rjave trohnobe navadno močno oslabijo mehanske lastnosti lesa, predvsem natezno trdnost, še preden sploh gravimetrično opazimo izgubo mase. Richards (1954) poroča, da je izmeril za 75 % slabšo žilavost pri lesu, ki je izgubil samo 1 % svoje mase. Tlačna trdnost pravokotno na vlakna se pri 2 % izgube mase zmanjša za 18 % (Toole, 1971).

Drastično izgubo mase v zgodnjih stopnjah razkroja lahko pripišemo de-polimerizaciji polioznih molekul, medtem ko lignin ostane skoraj nedotaknjen (Green in sod., 1991). Ker celulozne fibrile obdaja hemiceluloza (Fengel in Wegener, 1989), morajo encimi glive prodreti prek njih, da pridejo do celuloze. In prav razgradnja hemiceluloz vpliva na začetno zmanjšanje trdnostnih lastnosti lesa bolj kot naknadna razgradnja celuloze (Green in Highley, 1997).

2.4.1 Razkroj S2 sloja celične stene traheide

Če je les v stiku z glivami, se micelij med celicami lesa širi prek pikenj in vrzeli v celični steni. Vse celice lesa so med razkrojem dokaj kmalu okužene. Razkroj v prvih fazah najbolj prizadene S2 sloj celične stene (Humar in Pohleven, 2000). V zgodnji fazi razkroja se hifa pritrdi na S3 sloj celične stene in sprostí snovi z nizko molekularno maso, ki difundirajo v celično steno. V tej fazi encimi prodrejo v celotno sekundarno celično steno

in razkrojijo celuloze in hemiceluloze. Les se skrči in nastajajo razpoke znotraj sekundarne stene (Schwarze, 2007).

Glive rjave trohnobe hitro razgradijo S2 sloj, medtem ko S3 sloj in osrednja lamela, ki je zgrajena predvsem iz lignina, ostaneta nerazgrajena (Schwarze, 2007).

Splošno sprejeto dejstvo je, da S3 sloj ostane nepoškodovan do zadnjih faz razkroja (Kuo in sod., 1988). Odpornost plasti S3 so dokazali z opazovanji razkrojenega lesa z elektronskim mikroskopom. Opazili so tudi da je bila S3 plast prekrita z ekstracelularnimi snovmi. Zato je možno, da so S2 sloji razkrojeni s snovmi z nizko molekulsko maso, ki jih izloča gliva in lahko prodirajo prek S3 sloja. Ko se celuloza razkroji v enostavne sladkorje morajo le-ti prek plasti S3 preiti nazaj do hife. Oksalna kislina je zelo verjetno ena izmed snovi ki jo izločajo glive in zlahka povzroči depolimerizacijo celuloznih vlaken (Humar in Pohleven, 2000).

Poleg ekstracelularnih snovi, ki so naložene na S3 sloj, je ta sloj tudi bolj lignificiran kot S2 (Fengel in Wegener 1989). Glive rjave trohnobe ga morda zato ne morejo sprva razgraditi (Humar in Pohleven, 2000).

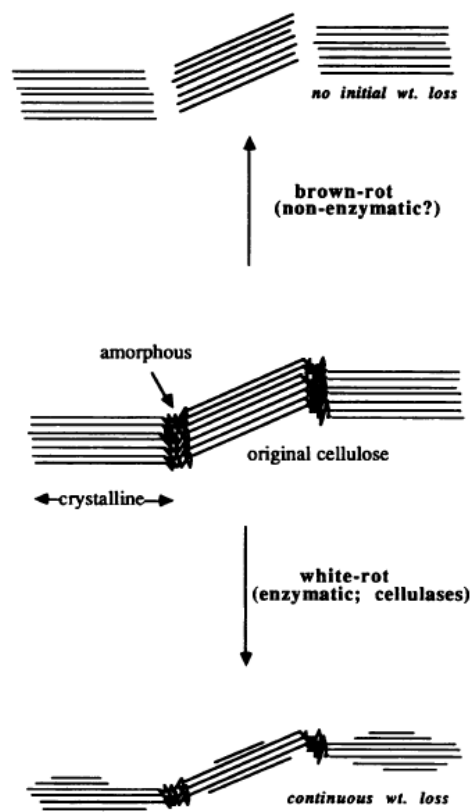
2.4.2 Vloga oksalne kisline pri razkroju

Oksalna kislina je ena najmočnejših organskih kislin ($pK_1 = 1,27$, $pK_2 = 4,26$) (Skoog in sod., 1992) in je vključena v procese razkroja celuloze (Green in sod., 1991; Jellison in sod., 1997).

Izjema med glivami rjave trohnobe je tramovka (*G. trabeum*). Zanj je značilno, da izloča malo oksalne kisline, vendar kljub temu izredno intenzivno razkroja les. Espejo in Agosin (1991) domnevata, da izloča druge snovi s katerimi zakisa substrat. Za druge glive rjave trohnobe pa je značilno, da z izločanjem oksalne kisline močno zakisajo lesno maso. Hitrost razkroja je vsaj pri nekaterih glivah močno povezana z intenziteto izločanja oksalne kisline. Glive rjave trohnobe mnogo bolj zakisajo les kot glive bele trohnobe (Jellison in sod., 1997; Humar in sod., 1999).

2.4.3 Vpliv razkroja lesa na kristaliničnost

Trend naraščanja kristaliničnosti v zgodnjih fazah razkroja, ki ji nato sledi padec, je bil opažen s strani raziskovalcev, ki so preučevali razkroj lesa z glivami (Highley in sod., 1988; Klemen-Leyer in sod., 1992). Highley in sod. (1988) so spoznali, da se celokupna kristaliničnost poveča po delovanju glive rjave trohnobe. Načeloma so depolimerizacijski agensi oz. agensi z nizko molekulsko maso v glivah rjave trohnobe sposobni razgraditi amorfne dele celuloze, medtem ko kristaliničnega dela ne razgradijo. Agensi v začetni stopnji razgradijo amorfne dele, nato pa celuloze pričnejo z nadaljnjo razgradnjo kristaliničnega dela. Začetna depolimerizacija celuloze pri glivah rjave trohnobe se zgodi preden se zazna izguba v masi. Glive bele trohnobe razgrajujejo mikrofibrile celuloze površinsko. Razgradnja amorfnega in kristaliničnega dela poteka istočasno, zato se tudi hitreje zazna izguba mase (Klemen-Leyer in sod., 1992), (slika 12).



Slika 12: Prikaz različnega načina razkroja celuloze glive rjave in bele trohnobe (Kleman-Leyer in sod., 1992)

2.4.4 Vloga nekaterih nizkomolekularnih spojin pri razkroju lesa

Glive rjave trohnobe selektivno razgradijo celulozne in hemicelulozne komponente lesa (Flournoy in sod., 1991). Mehanizem razgradnje celuloze z glivami rjave trohnobe še ni popolnoma razumljiv. Znano je, da v začetni fazi razkroja lesa encimi zaradi svoje velikosti, ne morejo prehajati skozi vrzeli celične stene lesne celice. Zato razkroj pričnejo spojine z majhno molekulsko maso, ki so sposobne prečkati pore celične stene, depolimerizirati celulozo in jo tako pripraviti na nadaljnjo razgradnjo z encimi (Wang, Geo, 2003). Te nizkomolekularne spojine so ekstracelularne spojine imenovane biokelatorji (Xu in Goodel, 2001).

Cowling in Brown (1969) sta domnevala, da imajo pri glivah rjave trohnobe pomembno vlogo neencimske oksidativne spojine. Predlagana je bila možnost, da glive razkrajajo celulozo s fentonskim reagentom ($\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}^{2+}$). Ta reagent povzroči nastanek hidroksilnega radikala oziroma podobnega oksidanta. Dokazano je bilo, da les vsebuje dovolj železa in da so glive rjave trohnobe sposobne proizvajati vodikov peroksid. Prisotnost peroksida v okuženem lesu je sporna (Flournoy, 1994), medtem ko je prisotnost hidroksilnega radikala nedvoumno dokazana. Dokazali so ga v agarju, tekočem gojišču in v lesu s številnimi metodami (Green in Highley, 1997). Domnevajo pa tudi, da naj bi bili hidroksilni radikali vključeni pri razgradnji kristaliničnega dela celuloze (Koenigs, 1972; Hirano in sod., 2000).

Železo, vodikov peroksid, biokelatorji in oksalna kislina igrajo pomembno vlogo v razgradnji celuloze z glivami rjave trohnobe (Xu in Goodell, 2001).

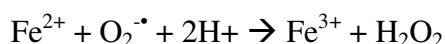
Enoki in sodelavci so leta 1992 iz glive *Gloeophyllum trabeum* izolirali ekstracelularne substance z molekulsko maso od 1 – 5 kDa. Okarakterizirali so jih kot glukopeptide (Enoki in sod., 1992; Wang in Gao, 2002). Te spojine z majhno molekulsko maso so poimenovali Gt kelatorji. Večinoma gre za fenolne spojine. Dokazali so, da imajo visoko afiniteto za vezavo železa, s katerim tvorijo kelate. Posledica tvorbe železovih kelatov je redukcija železa iz Fe^{3+} v Fe^{2+} (Goodell in sod., 1997). Enako redukcijsko lastnost ima tudi oksalna kislina (Steenkjaer in sod., 2010).

Oksidativna razgradnja celuloze z Gt kelatorji in Fentonovo reakcijo v zgodnji fazi razkroja je sledeča:

1. Gt kelatorji vežejo Fe^{3+} in ga reducirajo do Fe^{2+} .



2. V prisotnosti O_2 , Fe^{2+} oksidira molekulo kisika z eno-elektronsko oksidacijo do $\text{O}_2^{\cdot -}$, ki nato tvori H_2O_2 :



3. V Fentonovi reakciji se tvori hidroksilni radikal $\text{HO}^{\cdot}$:



S pomočjo $\text{HO}^{\cdot}$ se razdrejo inter- in intra- vodikove vezi v celuloznih verigah. To povzroči depolimerizacijo celuloznih verig in tvori se več reducirajočih in nereducirajočih koncev celuloze. Celuloza je tako pripravljena za razgradnjo z encimi (Enoki in sod., 1997; Wang in Gao, 2003).

2.5 RENTGENSKA PRAŠKOVNA DIFRAKCIJA (XRD, ang. X-Ray Powder Diffraction)

Rentgenski žarki so del elektromagnetnega spektra, tako kot UV in IR žarki. Območje rentgenske svetlobe je med 0,01 nm in 100 nm oz. med 0,1 in 10 Å. Območje rentgenske svetlobe, ki ga najbolj pogosto uporabljamo za difrakcijo, je med 0,1 in 2,5 Å.

Kot izvor rentgenskih žarkov uporabljamo rentgensko cev ali sinhrotron. Večinoma se uporabljajo monokromatski rentgenski žarki z določeno izbrano valovno dolžino, kar pomeni, da s pomočjo filtrov oz. monokromatorjev odstranimo ostale žarke z neželeno valovno dolžino.

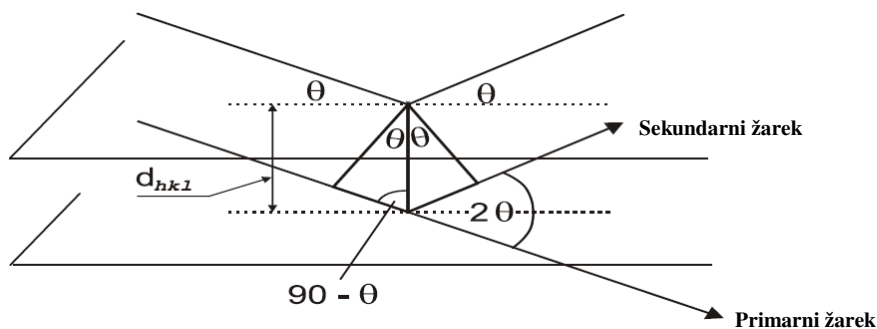
Trdna snov je lahko kristalinična ali amorfna. Kristalinična je sestavljena iz množice kristalov, katerih bistvena lastnost je urejenost notranje zgradbe, ki je povezana s periodičnostjo – nek osnovni motiv se periodično ponavlja od meje do meje kristala v treh

smereh prostora. Amorfnosti se od kristaliničnih razlikujejo v tem, da niso periodične (lahko imajo urejenost kratkega dosega).

Ko monokromatska rentgenska svetloba (primarni žarek) pade na kristal, pride do različnih pojavov. Eden od njih je Thomsonovo (koherentno, elastično) sipanje na elektronih v urejeni snovi. Le-to se najprej sestavi na vseh elektronih vsakega atoma, nadalje se sestavi valovanje vseh atomov posamezne osnovne celice in nazadnje še z vseh osnovnih celic celotnega kristala. Sipanje na atomih je razpršeno v vseh smereh. Razporeditev atomov se v kristalu perijodično ponavlja, zato pride do konstruktivne interference oz. uklanjanja rentgenskih žarkov v samo določenih smereh, ki so odvisne od velikosti in oblike osnovne celice kristala oz. od medploskovnih razmakov d v družinah kristalnih ravnin. To geometrijsko povezanost opisuje Braggova enačba:

$$n \cdot \lambda = 2 \cdot d_{hkl} \cdot \sin \theta$$

kjer je n red uklona, λ valovna dolžina primarnega rentgenskega žarka, d_{hkl} razdalja med dvema sosednjima ravninama iz družine ravnin z indeksi hkl , θ pa polovica uklonskega kota, to je kota med primarnim in sekundarnim žarkom (slika 13).



Slika 13: Geometrijski prikaz Braggovega zakona (Meden, 2010)

Rezultat rentgenske praškovne difrakcije je difraktogram, ki podaja odvisnost intenzitete uklonjene svetlobe od uklonskega kota rentgenske svetlobe. Položaj vrhov oz. smer uklonov je odvisna od oblike in velikosti osnovne celice, intenziteta uklonov pa od razporeditve atomov v kristalni strukturi.

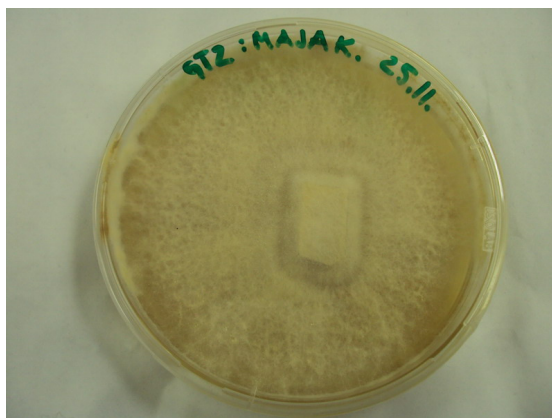
Z merjenjem in obdelavo rentgenskih praškovnih difraktogramov lahko dobimo odgovore na številna vprašanja o materialu, ki ga analiziramo. Vidimo lahko, ali je material kristaliničen ali amorfen, dobro ali slabo kristaliziran. V amorfni trdni snovi so delci razporejeni neperiodično, zato amorfen material siplje v vse smeri in prispeva k intenziteti ozadja. Kristalinične snovi imajo jasno izražene vrhove. Delež kristalinične faze je sorazmeren s površino pod uklonskimi vrhovi v primerjavi s celotnim sipanjem vzorca, ki poleg površine pod uklonskimi vrhovi vključuje tudi ozadje (Meden, 2010).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 RAST GLIVE NA LESNIH VZORCIH

3.1.1 Mikroorganizem *Gloeophyllum trabeum* ZIM L017

Uporabili smo sev glive *Gloeophyllum trabeum* z oznako Gt₂ (slika 14). Kultura micelija je bila vzeta iz Zbirke industrijskih organizmov (ZIM) z depozivno oznako ZIM L017, ki se hrani na Katedri za patologijo in zaščito lesa Oddelka za lesarstvo na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani.



Slika 14: Micelij glive *G. trabeum* na PDA

3.1.2 Priprava vzorcev lesa

Iz beljave smrekovine (*Picea abies*) smo izdelali vzorce dimenzij 5 × 25 × 25 mm. Les za vzorce je bil zdrav, brez vidnih napak, grč, smolnih kanalov in zračno suh.

3.1.3 Sterilizacija

Les smo zavili v folijo in ga 45 min avtoklavirali pri tlaku 1,5 bar oziroma temperaturi 121 °C. Plastične mrežice smo zložili v časo, jih sprali z etanolom, obtežili in prekrili z folijo. Tako pripravljene smo dali avtoklavirati zraven lesnih vzorcev.

Po končani sterilizaciji smo vzorce in mrežice prenesli v laminarno komoro in počakali, da se ohladijo.

3.1.4 Priprava hranilnega trdnega gojišča

Hranilno gojišče za glivo smo pripravili v steklenih kozarcih s pokrovčkom volumna 500 mL. V pokrovček smo izvrtali luknjo in jo zaprli z vato. Kozarce in pokrovčke smo razkužili z etanolom. Zatem smo pripravili PDA, ki smo ga pripravili po navodilih proizvajalca. V 1000 mL destilirane vrele vode smo zamešali 39 g PDA. Nato smo v vsak kozarec vlili 50 mL še vročega hranilnega gojišča. Kozarce s pokrovčki in hranilnim

gojiščem smo sterilizirali v avtoklavu 45 min pri 121 °C oz. 1,5 bar. Še vroče kozarce smo iz avtoklava (Sutjeska, Jugoslavija) prestavili v laminarno komoro in jih 10 min obsevali z UV svetlobi. Ohlajeno in strjeno hranilno gojišče smo inokulirali s kulturo glive *G. trabeum*. Inokulirane kozarce smo za teden dni postavili v rastno komoro (Kambič, Slovenija) z optimalnimi pogoji (27 °C in 75 % RZV). Po enem tednu, ko so glive prerasle rastno gojišče, smo v kozarce položili lesne vzorce.

3.1.5 Izpostavitve lesnih vzorcev delovanju glive

Na gojišča, ki so bila dobro preraščena z glivo, smo položili PVC mrežico (premer 80 mm). Nato smo na mrežico vstavili še sterilne lesne vzorce (slika 15). Plastična mrežica je preprečevala direkten stik vzorcev s hranilnim gojiščem. V vsak kozarec smo položili 4 vzorce. Vstavljanje PVC mrežic in vzorcev smo izvajali v brezprašni komori pri sterilnih pogojih. Ves pribor smo sproti razkuževali z alkoholom in plamenom. Vzorce smo izpostavili razkroju v rastni komori (28 °C in 75 % RZV) do 12 tednov. V določenih tedenskih presledkih (po 2, 3, 4, 6, in 12 tednih izpostavitve glivam) smo lesne vzorce odstranili z gojišča in jih uporabili za nadaljnje raziskave (merjenje kristaliničnosti in izgube mase).



Slika 15: Izpostavitve lesnih vzorcev glivi *G. trabeum*

3.1.6 Določitev izgube mase lesnih ploščic

Vse vzorce smo pred in po inkubaciji z glivo *G. trabeum* osušili do konstantne mase (24 ur pri 95 °C) in jih tehtali s pomočjo HR83 (Mettler Toledo, ZDA).

Izgubo mase smo izračunali po formuli:

$$\text{Izguba mase} = \frac{m_1 - m_2}{m_1} * 100\%$$

Kjer je m_1 masa vzorca pred inkubacijo, m_2 pa masa vzorca po inkubaciji z glivo.

3.1.7 Določitev deleža kristaliničnosti

Pri vsakem poskusu smo po določenih časih iz inkubacije vzeli po štiri vzorce, ki smo jih najprej posušili (24 h pri 95 °C) in zatem zmleli po dva skupaj v mlinčku (Moulinex, Francija). Nato smo iveri presejali skozi 0,25 mm sito (Saolas, Francija). Tako je bila velikost delcev za določitev kristaliničnosti pod 0,25 mm. Delež kristaliničnosti se je določal z rentgensko praškovno difrakcijo (XRD). Vsak vzorec je bil pomejen s trikratno ponovitvijo.

Vzorci so bili snemani na rentgenskem praškovnem difraktometru X'Pert PRO, proizvajalca PANalytical (Nizozemska), z Alfa1 konfiguracijo. Pripravljeni so bili v originalnem nosilcu premera 27 mm.

Za snemanje smo uporabili naslednje pogoje oz. merilni program:

FKKT 150 A1 5-35 0.034 200s F1-16 S0.04 M20

Razlaga parametrov:

FKKT 150 – oznaka merilnega programa

A1 – Alfa1 konfiguracija

5-35 – kotno območje v stopinjah 2θ

0.034 – korak v stopinjah

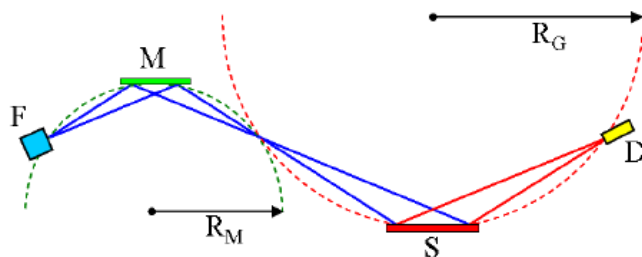
200 s – čas na korak

F1-16 – kombinacija rež (divergenčna in protisipna reža 1/16 stopinje)

S0.04 – Sollerjeve reže 0.04 rad

M20 – Maska 20 mm

Vzorec smo namestili v središče merilnega kroga. Med merjenjem se vzorec vrti okrog osi, pravokotna na vzorec, hkrati pa se nagiba glede na primarni žarek. Detektor potuje okrog vzorca in zaznava uklonjeno rentgensko sevanje. Nagibanje vzorca in potovanje detektorja je usklajeno tako, da je kot med primarnim žarkom in detektorjem glede na vzorec vedno 2θ , vpadni kot primerne žarka pa θ (Slika 16). Napravo krmili računalnik.



Slika 16: Shema difraktometra s primarnim monokromatorjem. F – fokus izvora žarkov (rentgenske cevi), M – monokromator, S – vzorec, D – detektor, RM – radij monokromatorskega kroga, RG – radij fokusirnega kroga (Meden, 2010)

Analizo difraktogramov smo naredili s programom X'Pert HighScore Plus (PANalytical B.V. Almelo, Nizozemska).

Najprej smo analizirali difraktogram s posnetkom prazne silicijeve ploščice oziroma nosilca. Program nam je podal vsoto celokupnega sipanja zraka, ki smo jo delili s podanim številom točk. Na ta način smo dobili vrednost ozadja, ki nam je povedala, koliko sipanje zraka v povprečju prispeva k izmerjeni intenziteti.

Nato smo na osnovi difraktograma vzorca s korekcijo sipanja zraka iz razmerja med intenziteto (površino) uklonskih vrhov in celokupno sipano intenziteto, vključno z ozadjem, izračunali odstotek kristaliničnosti v vzorcu.

V programu smo tako difraktogramu vzorca nastavili konstantno ozadje (Determine background → Manual → Accept), kar je omogočilo ločitev površine uklonov od celokupnega sipanja. Nato smo vrednost sipanja zraka vnesli v tabelo Scan Statistic pod polje Constant background in program je izračunal odstotek kristaliničnosti v polju Crystallinity[%].

Primeri difraktogramov se nahajajo v prilogi 1 in 2.

3.2 MATERIALI IN METODE ZA RAST GLIVE NA TEKOČEM GOJIŠČU

3.2.1 Gojišče za vzdrževanje kulture *Gloeophyllum trabeum* ZIM L017

Micelijsko kulturo smo vzdrževali na Petrijevih ploščah. Za gojišče smo uporabili krompirjev dekstrozni agar (PDA). Pripravljen agar smo sterilizirali v avtoklavu 20 min pri 1,5 bara oz. 121 °C. Še topel agar smo prelili v sterilne petrijevke in jih zatesnili s parafilmom.

Kulturo smo vsake 4 tedne precepili pod sterilnimi pogoji in jo inkubirali v inkubatorju Pio LFVP 12 (Iskra, Slovenija) pri 27 °C. Tako smo vzdrževali aktivnost glive.

3.2.2 Priprava statične tekoče kulture

Iz petrijevke, ki je bila dobro preraščena z sevom glive, smo izrezali po tri kvadratke površine 1 cm². Vsak tak košček agarja, preraščenega z glivo, smo sterilno prenesli v 250

mL erlenmajerico s 50 mL rastnega gojišča (pH 5,5) naslednje sestave: 10 g dm⁻³ glukoze, 0,2 g dm⁻³ peptona, 0,3 g dm⁻³ kvasnega ekstrakta, 0,8 g/L KH₂PO₄, 0,2 g/L Na₂HPO₄, in 0,5 g/L MgSO₄ · 7H₂O (Tišma in sod., 2010). Pripravljeno gojišče smo predhodno sterilizirali v avtoklavu 20 min pri 121 °C in 1,2 bara. Glivo smo iz agarnih plošč prenesli s sterilnim nožem. Celoten postopek prenosa je potekal v laminarni komori pod sterilnimi pogoji. Pripravili smo 6 gojišč za en eksperiment.

Tako pripravljeno kulturo smo en teden inkubirali v inkubatorju Pio LFVP 12 (Iskra, Slovenija) pri 27 °C brez mešanja, da se je goba lepo razrasla po površini gojišča.

3.2.3 Priprava vcepka za rast peletov

Po enem tednu rasti glive na statičnem gojišču smo vsa gojišča pod sterilnimi pogoji zlili v mlinček, pokrili s pokrovom in mlinček vklopili za 30 s. Na ta način smo gojišča, ki so bila preraščena z glivo, homogenizirali in dobili vcepek. Iz mlinčka smo odpipetirali po 10 mL vcepka in ga prenesli v 500 ml erlenmajerice, ki so vsebovale 90 ml rastnega gojišča. Sestava gojišča in pH je bila enaka kot za statično kulturo. Nacepljena gojišča smo za en teden postavili na stresalnik STR-30 TJ (Iskra, Jugoslavija) pri 30 °C in 135 min⁻¹. Po enem tednu so v gojiščih zrasli peleti s katerimi smo nacepili produkcijska gojišča.

3.2.4 Priprava submerznega produkcijskega gojišča

Sestava produkcijskega gojišča na 100 mL: 4,5g kvasnega ekstrakta; 1,2 g KH₂PO₄, 0,33 g MgSO₄*7H₂O, 0,06 g KCl, 0,23 g (NH₄)₂SO₄, 0,5 g_{s.s.} neposušene žagovine (Mansfield in sod., 1998). pH gojišča je bil 5,5. Gojišča so bila pripravljena v 500 mL erlenmajericah, zatesnjenih z vatastimi zamaški in sterilizirana 20 min pri tlaku 1,5 bara oz. 121 °C.

Vsako gojišče je bilo nacepljeno z 1,5 g mokre mase peletov glive *Gloeophyllum trabeum* pod sterilnimi pogoji. Tako pripravljena gojišča smo postavili na stresalnik pri 30 °C in 135 min⁻¹ za teden dni. Vmes smo merili vsebnosti encimov, reducirajoče sladkorje in pH.

3.2.5 Analizne metode

3.2.5.1 pH vrednost

pH vrednost smo določevali v odvzetih vzorcih z uporabo digitalnega pH – metra MA-5730 (Iskra, Slovenija).

3.2.5.2 Vsebnost reducirajočih sladkorjev

V filtratih odvzetih vzorcev smo določali vsebnost sladkorjev. Uporabili smo metodo spektrofotometrično metodo za določanje koncentracije reducirajočih sladkorjev z 3,5-dinitrosalicilno kislino (DNS).

Za določevanje koncentracije reducirajočih sladkorjev smo najprej naredili umeritveno krivuljo z glukozo. V epruvete z obrusi smo odpipetirali po 1,2 mL raztopine glukoze različnih koncentracij ter dodala po 0,4 mL DNS reagenta, vse dobro premešali in postavili

epruvete v vrelo vodno kopel za 5 min. Epruvete smo imeli zaprte s steklenim zamaškom, da smo preprečili izgubo vode zaradi odparevanja. Vzorce smo postavili v mrzlo vodo in po ohladitvi na sobno temperaturo odčitali absorbanco pri 540 nm na spektrofotometru Cary 50 Probo (Varian, ZDA). Vzoredno smo pripravili še slepi vzorec na enak način, le da smo namesto raztopine glukoze dodali demineralizirano vodo.

Vzorce smo pripravili na enak način. V epruvete z obrusi smo odpipetirali po 1,2 mL vzorca in dodali po 0,4 mL DNS-reagenta. Vse smo dobro premešali in segrevali vzorce v vreli vodni kopeli 5 min, ohladili na sobno temperaturo in odčitali absorbanco, kot je opisano zgoraj. Koncentracijo reducirajočih sladkorjev v vzorcih smo določili iz umeritvene krivulje.

3.2.5.3 Določanje aktivnosti celulaze

Kot metodo za določanje celulaznih aktivnosti smo izbrali CMC-azno aktivnost, ki kot substrat uporablja karboksimetil celulozo (CMC). Osnova za merjenje aktivnosti so reducirajoči sladkorji, ki jih sprostijo encimi pri razgradnji CMC.

Meritve smo opravili z tremi različno pripravljenimi reakcijskimi raztopinami. Slepi vzorec smo uporabili za meritev ozadja reagentov, reakcijsko zmes s standardi za umeritveno krivuljo in reakcijsko zmes z našimi vzorci.

Za umeritveno krivuljo smo za standard pripravili glukozo s koncentracijami od 0 do 0,3 g/L v acetatnem pufru. Standardu smo dodali 1,5 mL DNS reagenta ter kuhali v vreli vodi 10 min.

V epruvete smo dali vzorce, razredčene z acetatnim pufrom (0,1 M, pH 4,5) in dodali raztopino CMC (volumsko razmerje filtrat: raztopina CMC 1:1), dobro premešali in jih postavili v vodno kopel pri 37 °C za 30 min. Po 30 min smo vzeli vzorce iz kopeli, dodali reagent DNS in segrevali 10 min v vreli vodni kopeli. Po ohladitvi na sobno temperaturo smo merili vzorec proti slepemu vzorcu pri 540 nm Cary 50 Probo (Varian, ZDA). Encimske aktivnosti smo izrazili v enotah (U) kot količino encima, potrebno za sprostitvev reducirajočih sladkorjev, ekvivalentnih 1 μ molu glukoze, na minuto.

3.2.5.4 Določanje aktivnosti ksilanaz

Meritve smo opravili enako kot pri aktivnosti celulaz, s tremi reakcijskimi zmesi:

- substrat ksilana,
- encim – filtrat submerzne kulture,
- standardi ksiloze za umeritveno krivuljo.

Za umeritveno krivuljo za reducirajoče sladkorje je bilo potrebno pripraviti standard s ksilozo s koncentracijami od 0 do 0,3 g/L v fosfatnem pufru. Standardu smo dodali 1,5 mL DNS reagenta ter kuhali v vreli vodi 10 min ter po ohladitvi določili absorbanco pri 540 nm kot je opisano zgoraj.

Za določitev aktivnosti ksilanaz v vzorcih, smo filtrate submerznih kultur inkubirali z raztopino 0,1 M ksilana (volumsko razmerje filtrat: raztopina ksilana 1:1), dobro premešali

in jih postavili v vodno kopel pri 50 °C za 10 min, nato pa smo jih postavili na led za 5 min. Potem smo vzorce 2 min centrifugirali pri 10000 min⁻¹. Dodali smo še DNS reagent in 5 min kuhali. Po ohlaiditvi na sobno temperaturo smo merili absorbanco, kot opisano zgoraj. Encimske aktivnosti smo izrazili v enotah (U) kot količino encima, potrebno za sprostitvev reducirajočih sladkorjev, ekvivalentnih 1 µmol ksiloze, na minuto.

3.2.5.5 Določanje vpliva pH vrednosti na aktivnost celulaz in ksilanaz glive *G. trabeum*

Aktivnosti celulaz in ksilanaz smo merili pri pH vrednostih od 4 do 7. Za merjenje pri vrednostih od pH od 4 do 5 smo uporabili 0,1 M acetatni pufer, za merjenje vrednosti pri pH od 5 do 7 pa smo uporabili 0,1 M fosfatni pufer. Metode določitve encimskih aktivnosti so opisane v poglavjih 2.2.5.4 in 2.2.5.5.

3.2.5.6 Določanje vsebnosti proteinov

Proteine smo kvantitativno določali z uporabo Bradfordove metode, ki temelji na spektrofotometričnem določanju absorbance pri 595 nm. Pri tem smo uporabili Bradfordov reagent (Sigma), ki se veže s proteini v vzorcu (predvsem z Arg, His, Lys) in tvori vijolično obarvan kompleks. Reakcija je dokaj hitra, saj poteče že po nekaj minutah. Obarvanost ostane enaka približno eno uro (Bradford, 1976).

V epruveto smo dali 50 µL vzorca in mu dodali 1,5 mL Bradfordovega reagenta in premešali na vortreksu. Po približno 10 min smo merili absorbanco na spektrofotometru pri 595 nm proti slepemu vzorcu z demineralizirano vodo. Iz govejega serumskega albumina smo pripravili proteinske standarde, ki smo jih uporabili za izdelavo umeritvene krivulje.

3.2.5.7 Koncentriranje gojišč

Po tednu dni smo produkcijska gojišča prefiltrirali in jim na ta način odstranili žagovino in biomaso. Nato smo gojišča koncentrirali z dvema načinoma ultrafiltracije.

3.2.5.7.1 Ultrafiltracija s centrifugiranjem

Uporabili smo centrifugirke z membranami Amicon Ultra – 15 (slika 17) z NMWL (nominal molecular weight limit) 10000 Da, saj je molekulska masa celulaz in ksilanaz večja od 20000 Da. Pri ultrafiltraciji smo dodali začetni volumen vzorca 10 mL v centrifugirko. Pri 4000 min⁻¹ sem vzorec centrifugirala 10 min do končnega volumna 1,5 mL. Ultrafiltriranje sem večkrat ponovila do želene količine končnega pripravka.

Dobitek neprepuščenega dela (Φ) pomeni razmerje med količinama komponente v

koncentratu (V_r, c_r) in začetnem volumnu (V_0, c_0).

$$\Phi = \frac{V_r c_r}{V_0 c_0}$$

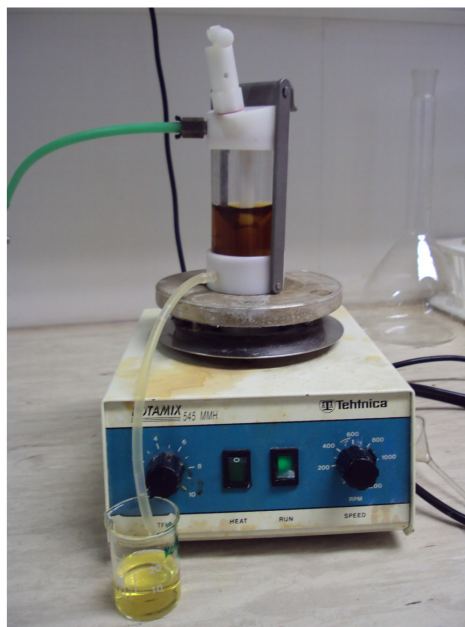
Koncentracijski faktor α je razmerje med začetnim volumnom in volumnom koncentrata. $\alpha = V_0/V_r$. (Žnidaršič in Pavko, 2002).



Slika 17: Centrifugirka z ultrafiltracijsko membrano (Fischer Scientific, 2006)

3.2.5.7.2 Ultrafiltracija z ultrafiltracijsko celico Amicon

Del filtrata, ki smo ga dobili po koncentriranju gojišča z ultrafiltracijo s centrifugiranjem in membrano MWCO 10000 Da, smo obdržali in ga skoncentrirali še s pomočjo ultrafiltracijske celice 8400 (Amicon, ZDA), (slika 18). V ultrafiltracijski modul Amicon 8400 smo vstavili membrano, ki prepušča samo molekule manjše od 1000 Da in nalili vzorec. Nato smo celico postavili na magnetno mešalo in priklopili na jeklenko z dušikom in nadtlaku približno 3 bare. Tako smo dobili koncentrat, ki je vseboval molekule večje od 1000 Da in manjše od 10000 Da.



Slika 18: Ultrafiltracijska celica

3.2.5.8 Izpostavljanje lesnih vzorcev raztopinam encimov

Del vzorcev smo potopili v koncentrat produkcijskega gojišča *G. trabeum*, ki smo ga pripravili s koncentriranjem preko ultrafiltracijske membrane MWCO 10000 Da.

Del vzorcev pa smo potopili v koncentrat *G. trabeum*, katerega filtrat smo po koncentriranju skozi ultrafiltracijsko membrano MWCO 10000 Da zadržali in ga ponovno ultrafiltrirali skozi membrano MWCO 1000 Da. Končni koncentrat je vseboval 2/3 (10 mL) koncentrata MWCO 10000 Da in 1/3 (5 mL) koncentrata MWCO 1000 Da. pH koncentratov smo naravnali na 4,0 s pomočjo 0,1 M H₃PO₄.

V vsako čašo smo potopili tri vzorce, jih obtežili s steklenimi epruvetnimi zamaški in pokrili z aluminijasto folijo. Čaše smo za določeno časovno obdobje pustili inkubirati v inkubatorju pri 30 °C.

Ploščicam smo po inkubaciji določili maso suhe snovi in delež kristaliničnosti. V rezultatih smo podali povprečno vrednost vseh sprememb mas in deleža kristaliničnosti vzorcev in standardni odklon. Kot slepi poskus smo lesne vzorce tri dni pri 30°C inkubirali v demineralizirani vodi. Nato smo jim določili spremembo mase in izmerili delež kristaliničnosti.

3.2.5.9 Izpostavitev žagovine *Picea abies* raztopinam encimov

Žagovino lesa *Picea abies* smo tri dni pri 30 °C inkubirali v demineralizirani vodi kot kontrolo. Žagovini smo pred in po inkubaciji določili maso suhe snovi in delež kristaliničnosti. Po poskusu smo izračunali spremembe v masi snovi in spremembe v deležu kristaliničnosti. V rezultatih smo podali povprečno vrednost vseh sprememb mas in kristaliničnosti in standardni odklon.

Sočasno s kontrolo smo žagovino inkubirali tri dni v grobem encimskem pripravku, dobljenem z membrano MWCO 10000 Da in nato v razmerju 2:1 razredčenem s filtratom, ki je vseboval tudi topljence z molekulsko maso med 1000 in 10000 Da, ter ji po inkubaciji ponovno izmerili maso in kristaliničnost. Nato smo žagovino sprali z demineralizirano vodo, da smo v največji možni meri odstranili adsorbirane snovi in ponovno izmerili suho maso snovi ter delež kristaliničnosti po spiranju. Po poskusu smo izračunali spremembe v masi snovi in spremembe v deležu kristaliničnosti.

3.2.5.10 Izračun spremembe mase in kristaliničnosti v vzorcih

Vzorcem smo pred in po inkubaciji določili maso suhe snovi v analizatorju vlage HR83 (Mettler Toledo, ZDA). Nato smo izračunali spremembe mas vzorcev po formuli:

$$\text{Sprememba mase suhe snovi} = \frac{m_2 - m_1}{m_1} * 100\%$$

Kjer je m_1 masa vzorca pred inkubacijo, m_2 pa masa vzorca po inkubaciji v raztopini encimov.

Prav tako smo vzorcem pred in po inkubaciji določili deleže kristaliničnosti. Spremembe v deležih kristaliničnosti smo izračunali po formuli:

$$\text{Sprememba deleža kristaliničnosti} = \frac{(\%_{\text{kristaliničnosti}})_2 - (\%_{\text{kristaliničnosti}})_1}{(\%_{\text{kristaliničnosti}})_1} * 100\%$$

Kjer je $(\%_{\text{kristaliničnosti}})_1$ delež kristaliničnosti vzorca pred inkubacijo, $(\%_{\text{kristaliničnosti}})_2$ pa delež kristaliničnosti vzorca po inkubaciji v raztopini encimov.

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1 PRERAŠČANJE LESNIH VZORCEV Z GLIVO *Gloeophyllum trabeum*

Gliva *Gloeophyllum trabeum* je lesne vzorce, inkubirane pri 25 °C in pri 75 % relativni zračni vlagi, dobro preraščala. Na slikah 19 a do e je vidno preraščanje glive na lesu v odvisnosti od časa. Po dveh tednih inkubacije je bilo na vzorcih lesa zaznati rahel bel puh micelija (slika 19 b). S časom je micelij postajal vse bolj gost. Največja gostota je bila vidna po šestih tednih inkubacije (slika 19 e). Po četrtem tednu rasti je micelij postajal rumenkaste barve (sliki 19 d in e).

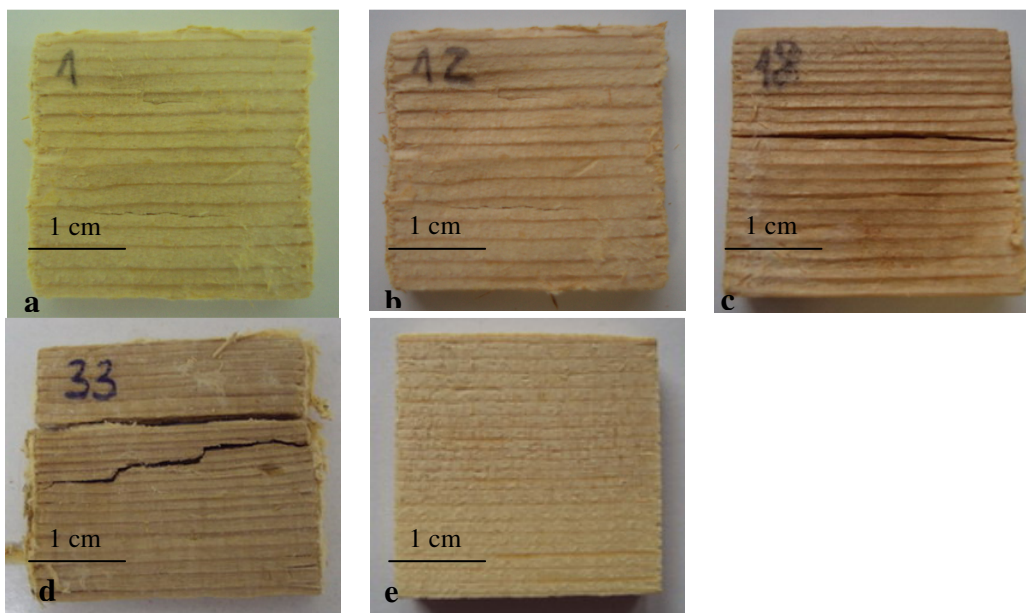


Slika 19: Preraščanje lesa z glivo *Gloeophyllum trabeum* (a) 0. teden (b) 2. teden (c) 3. teden (d) 4. teden (e) 6. teden

4.1.1 Izgled lesnih vzorcev

Lesni vzorci so s časom inkubacije vidno izgubljali mehanske lastnosti (slika 20 a-d). Po drugem tednu inkubacije (slika 20 a) je bil razkroj lesa dokaj malo opazen. Les je še ohranil strukturne lastnosti do te mere, da rokovanje z lesom ni bilo problematično. Po tretjem tednu inkubacije (slika 20 b) pa je bila površina lesa že močno zgubana, videle so se razpoke, ki so bile še razvidnejše v četrtem tednu (slika 20 c). Razpoke po definiciji nastanejo, ko sile med sušenjem presežejo trdnost lesa. Predvidevamo, da je vzrok za te poškodbe sušenje lesa, ki je bilo zelo ostro, zato so v lesu nastale napetosti, ki so presegle natezno trdnost lesa. Natezna trdnost lesa pa je v največji meri odvisna od celuloze. Ker je bila celuloza razkrojena, zaradi inkubacije lesa z glivo, so se mehanske lastnosti lesa zmanjšale.

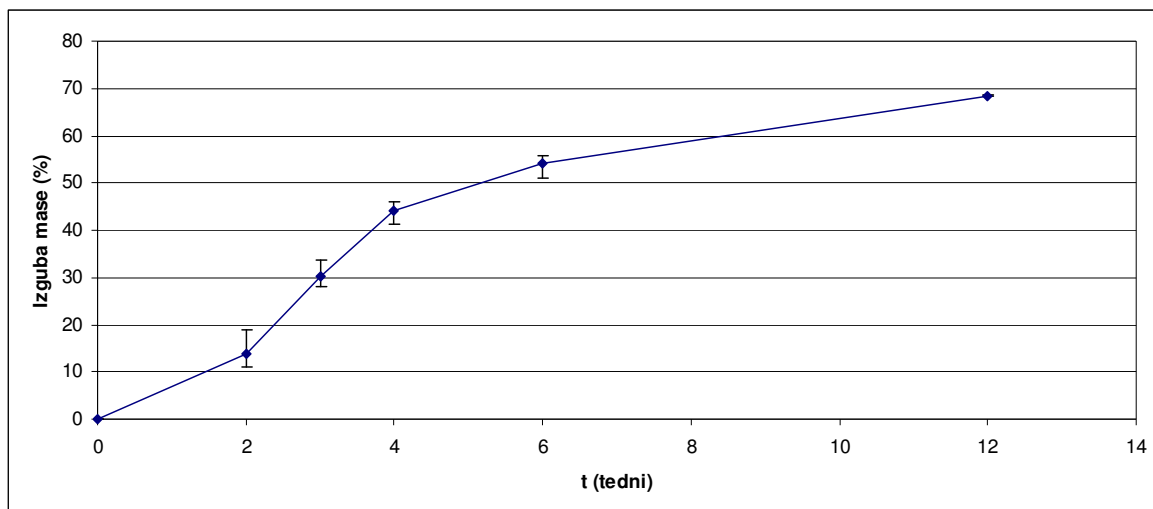
Rokovanje z lesom, ki je bil z glivo inkubiran več kot štiri tedne, je bilo zelo težko, saj je bil zelo rahel in je pokal ob vsakem bolj grobem dotiku.



Slika 20: Primer izgleda ploščice po : a) dveh tednih; b) treh tednih; c) štirih tednih; d) šestih tednih inkubacije z glivo *Gloeophyllum trabeum*; e) kontrola brez glive

4.1.2 Izguba mase lesnih vzorcev

Lesni vzorci, izpostavljeni glivi *Gloeophyllum trabeum*, so s časom izgubljali maso. Izguba mase po drugem tednu inkubacije je bila 14 %, po tretjem tednu 30 %, po 12 tednu pa celo 68 % (slika 21).

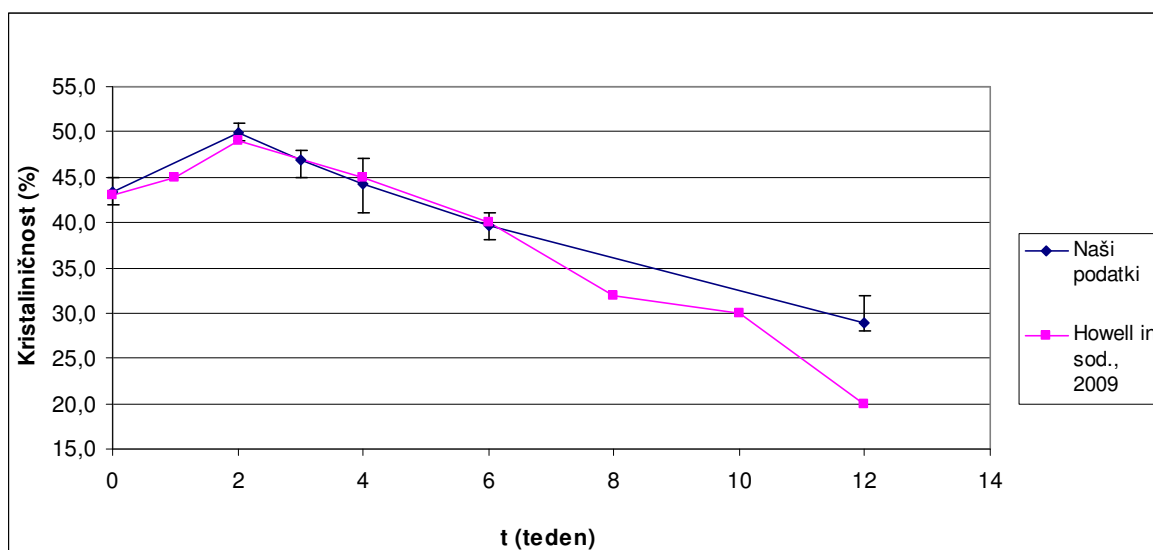


Slika 21: Časovna odvisnost povprečne izgube mase vzorcev lesa v odstotkih, po inkubaciji z gobo *G. trabeum*

Podobne podatke so za borovino, preraščene z glivo *Gloeophyllum trabeum*, dobili tudi drugi raziskovalci (Howell in sod., 2009). Dogajanje v lesu, izpostavljenem glivi *G. trabeum*, so Howell in sod. (2009) v prvih dveh tednih razložili z razgradnjo hemiceluloz, kar se je kazalo v zmanjšanju koncentracije manoze in ksiloze v lesu, medtem ko je bila razgradnja glukanov (celuloze) v enakem času zelo nizka. V isti študiji je bil po štirih tednih inkubacije lesnih vzorcev z glivo *G. trabeum* poleg nadaljnjega upada koncentracije manoze in ksiloze viden tudi upad glukanov. Predvidevamo, da je tudi v naših vzorcih izguba mase do drugega tedna posledica razgradnje hemiceluloze, kar glivi omogoča dostop do celuloze (Fengel in Wegener, 1989). V naslednjih tednih inkubacije pa je izguba mase predvsem posledica razgradnje celuloze.

4.1.3 Sprememba kristaliničnosti lesnih vzorcev

Delež kristaliničnosti se najbolj poveča v začetni fazi razgradnje lesa z glivo. Po dveh tednih inkubacije se je delež kristaliničnosti povečal kar za 16 % glede na začetno vrednost. Z daljšim izpostavljanjem lesa glivi delež kristaliničnosti pada, kar je povezano tudi z izgubo mase (slika 22).



Slika 22: Časovna odvisnost deleža kristaliničnosti vzorcev lesa po inkubaciji z *G. trabeum*

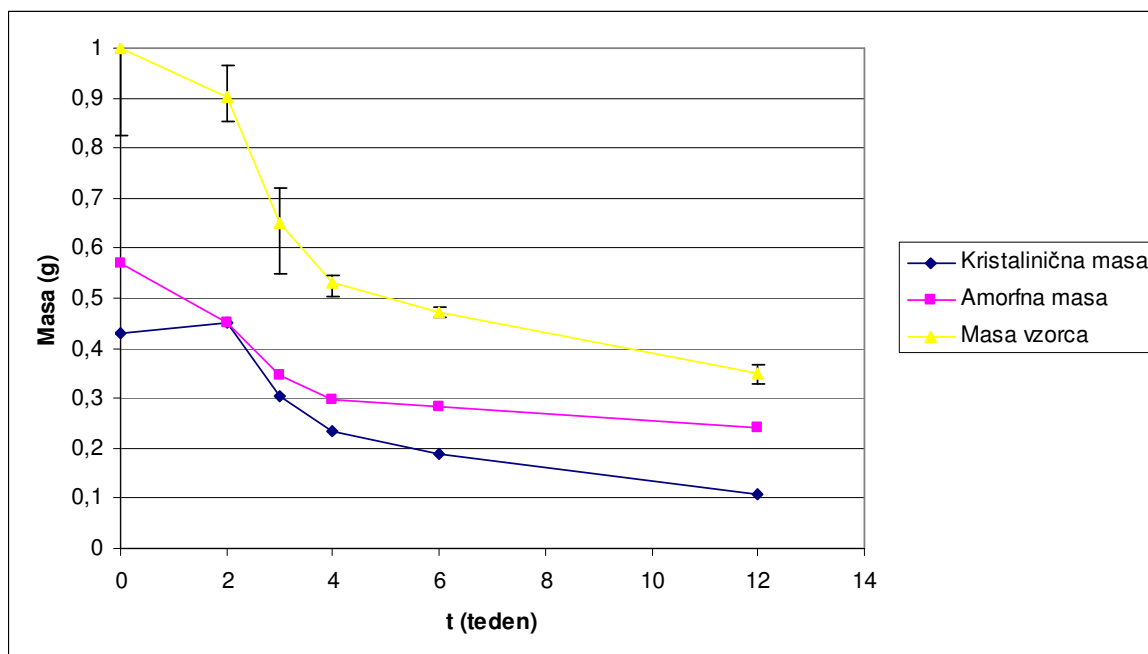
Naši podatki se skoraj v celoti ujemajo z meritvami Howella in sod. (2009), ki so spremljali vzorce lesa bora, inokulirane z glivo *Gloeophyllum trabeum*. To vsekakor potrjuje ustreznost eksperimentalnih pogojev in meritev, ki so glede na veliko variabilnost v naravi lahko zelo neponovljive.

Sklepamo, da je začetno povečanje deleža kristaliničnosti posledica razgradnje amorfne delce lesa, kar je v skladu z ugotovitvami drugih avtorjev (Highley in sod. 1988, Howell in sod., 2009). Razgradijo se predvsem hemiceluloze in verjetno tudi amorfne celuloze, ki so za glivo tudi lažje razgradljive kot pa kristalinična celuloza. Kristalinični del, ki je težje razgradljiv zaradi urejene zgradbe, je po dveh tednih razgradnje z glivo verjetno še vedno ohranjen.

Kot navajata Kirk in Cullen (1998) imajo hemiceluloze nekristalinično razporeditev oziroma je njihova stopnja kristaliničnosti nizka. Zato njihov razkroj po dveh tednih inkubacije z glivo poviša celokupno kristaliničnost lesa. Po drugem tednu inkubacije pa iz rezultatov predvidevamo, da gliva pričenja tudi z razgradnjo kristalinične celuloze, saj kristaliničnost po drugem tednu začne upadati. Predvidevamo, da je gliva do četrtega tedna razgradila polovico kristalinične celuloze v lesu, v dvanajstem tednu pa sklepamo, da S2 sloj v lesnih vzorcih bil popolnoma razgrajen.

4.1.4 Sprememba mase kristaliničnega in amorfne delca

Izračun izgube amorfne in kristalinične delce lesa, je pokazal, da se pri inkubaciji z glivo amorfni del lesa izgublja že od samega začetka. Zato sklepamo, da gre v tem času predvsem za izgubo hemiceluloz in amorfne celuloze. Po drugem tednu inkubacije se začne izgubljati tudi kristalinična masa. Po četrtem tednu inkubacije se izguba amorfne delce skoraj ustavi, medtem ko kristalinični delež upočasnjeno pada (slika 23).



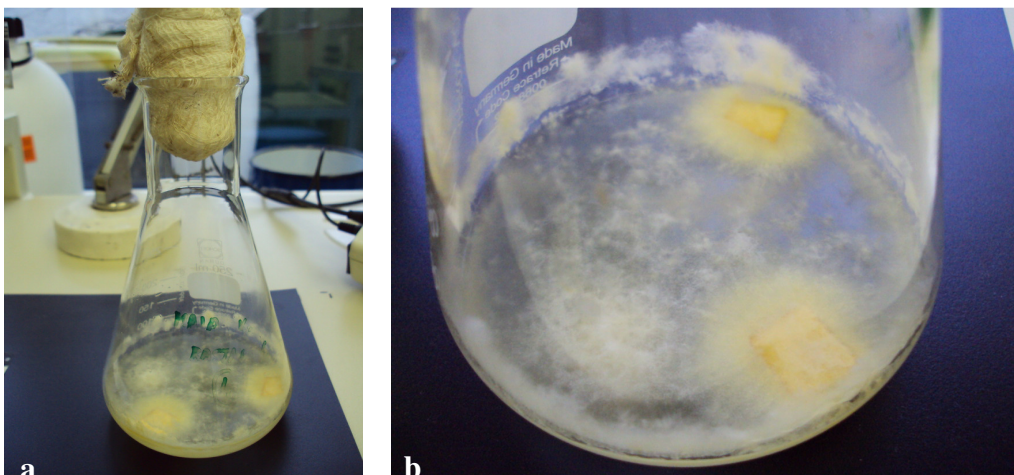
Slika 23: Časovna odvisnost kristalinične, amorfne in celokupne mase lesnih vzorcev po inkubaciji z glivo *G. trabeum*

Rezultat je lahko posledica tega, da gliva pretvarja kristalinični material v amorfne, le-tega pa nato porabi za svoj metabolizem. Zaradi glivnega konstantnega črpanja razgrajenih sladkorjev za svoj metabolizem masa ploščic vztrajno pada. (Howell in sod., 2009).

4.2 SUBMERZNA PROIZVODNJA ENCIMOV Z GLIVO *Gloeophyllum trabeum*

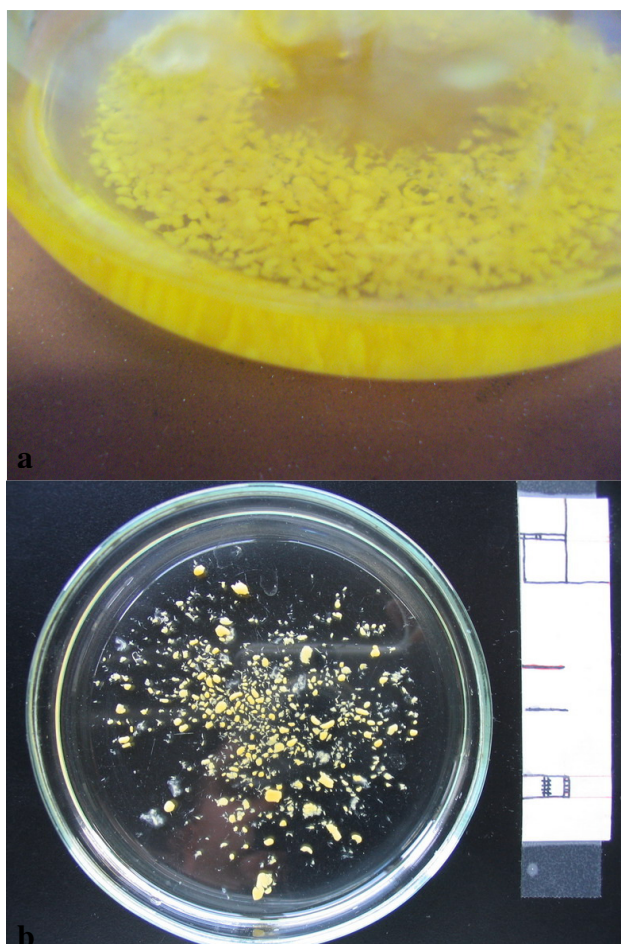
4.2.1 Priprava submerzne kulture glive *Gloeophyllum trabeum*

Glivo smo iz PDA gojišča za en teden prenesli v statično tekoče gojišče, kjer je gliva rasla površinsko (slika 24).

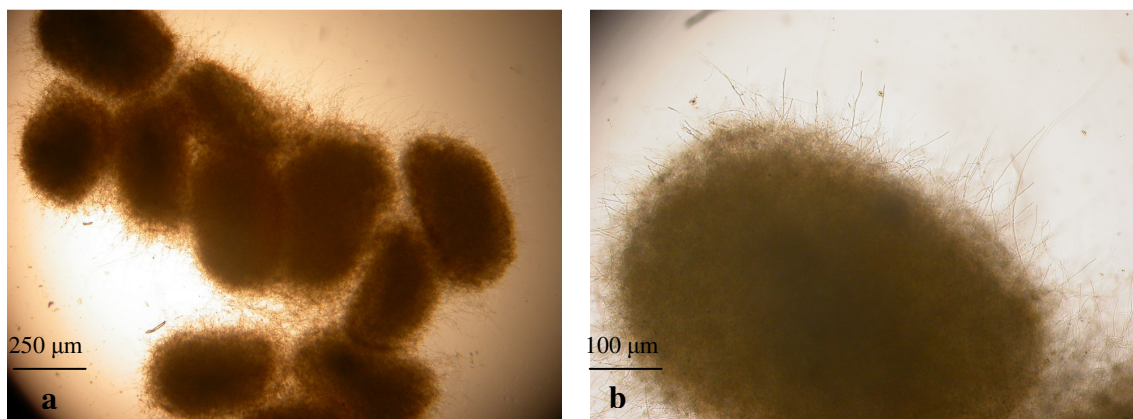


Slika 24 a in b: Rast *G. trabeum* na statičnem tekočem gojišču v erlenmajerici po enem tednu

Po rasti na statičnem tekočem gojišču smo glivo precepili v novo rastno gojišče, ki smo ga za sedem dni postavili na stresalnik ($30\text{ }^{\circ}\text{C}$, 135 min^{-1}). Po enem tednu je gliva zrasla v peletni obliki (sliki 25 a in b in 26).



Slika 25: Peletna rast glive *G. trabeum* a) v rastnem gojišču 1 teden po precepitvi iz statičnega gojišča
b) peleti *G. trabeum* preneseni v petrijevko



Slika 26: Gliva *G. trabeum*, submeržno razraščena v rastnem gojišču a) 40X povečava; b) 100X povečava

Pelete glive smo nato zatehtali in sterilno prenesli v produkcijska gojišča, katerim je bila kot substrat dodana žagovina (slika 27).



Slika 27: Submeržno gojenje na stresalnik

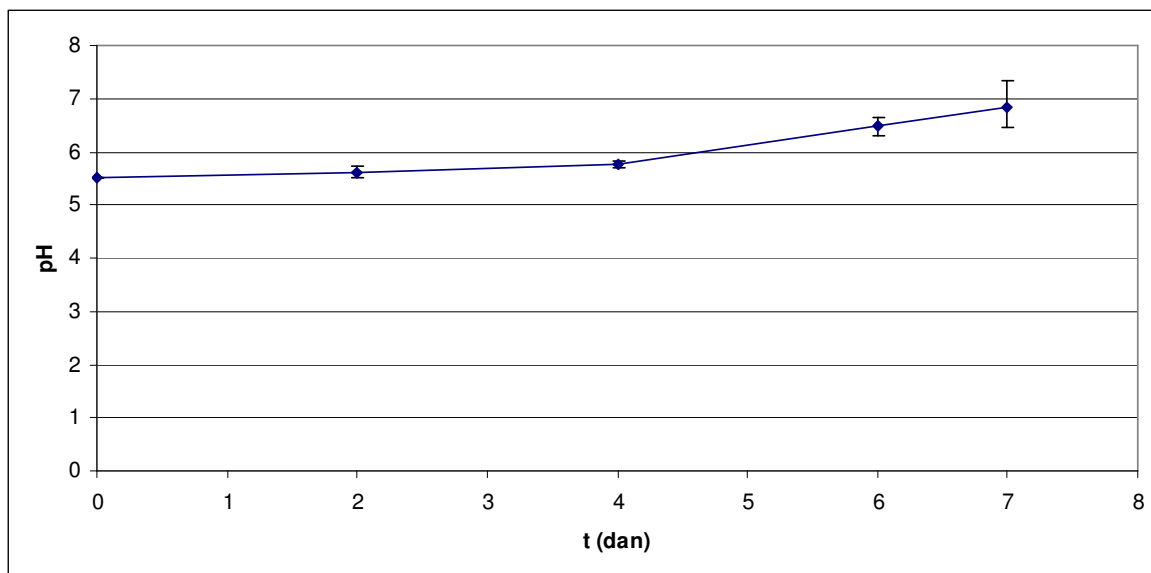
4.2.2 Spremljanje submerznega gojenja *Gloeophyllum trabeum* v produkcijskem gojišču

Pri submerznem gojenju *G. trabeum* v produkcijskem gojišču smo spremljali sledeče parametre: pH vrednost, koncentracijo reducirajočih sladkorjev in proteinov ter encimske aktivnosti celulaz in ksilanaz.

4.2.2.1 pH vrednost

pH na začetku procesa je bil naravnani na vrednost 5,5. Pri vodenju bioprocesa v erlenmajericah pH vrednosti nismo regulirali. Zato na spreminjanje pH vrednosti vplivajo le procesi, ki potekajo v gojišču.

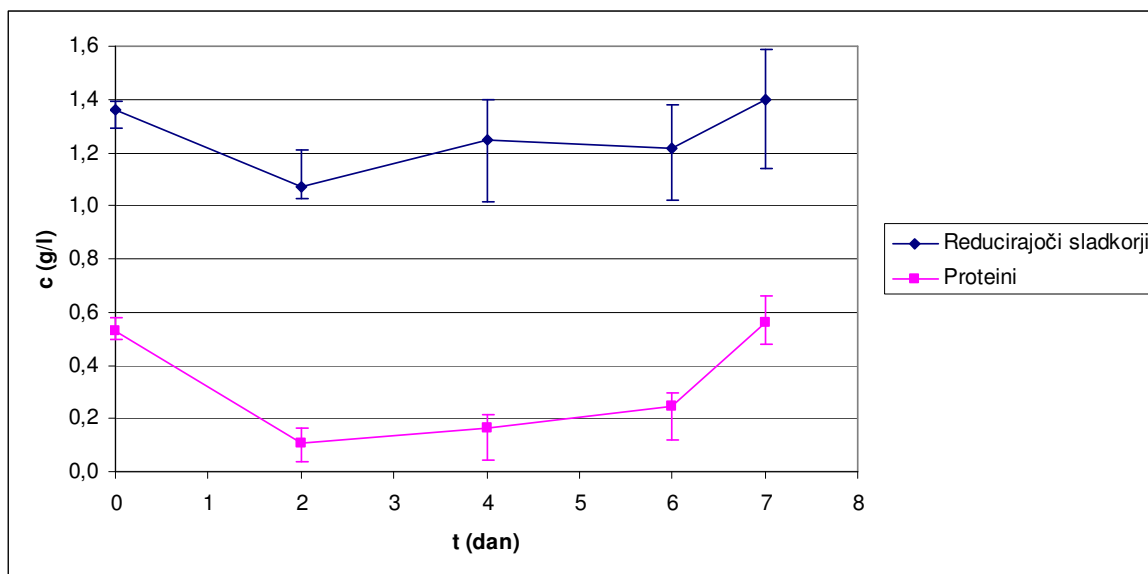
S časom je pH vrednost naraščala. Iz začetne pH vrednosti 5,5 je sedmi dan narasla na pH vrednost 6,8. Poviševanje pH vrednosti je najpogosteje posledica reakcij deaminacije proteinov, prisotnih v substratih (kvasni ekstrakt) (slika 28).



Slika 28: Časovna odvisnost vrednosti pH v filtratih, odvzetih med submerznim gojenjem glive *G. trabeum*

4.2.2.2 Vsebnost reducirajočih sladkorjev in proteinov

Koncentracija reducirajočih sladkorjev v drugem dnevu pade. Vidimo, da je bilo nekaj reducirajočih sladkorjev prisotnih že v pripravljenem gojišču. V začetni fazi rasti gliva te sladkorje porablja za tvorbo svoje biomase in tudi za produkcijo encimov za razgradnjo substrata (žagovine). Koncentracija sladkorjev po drugem dnevu inkubacije začne naraščati, saj se verjetno začnejo polimerni sladkorji v substratu (žagovina, kvasni ekstrakt) cepiti na reducirajoče mono- in dimere in tako se celokupna vrednost reducirajočih sladkorjev večja. Njihova vrednost se dviga vse do konca procesa.



Slika 29: Časovna odvisnost izmerjene koncentracije reducirajočih sladkorjev in proteinov v filtratih, odvzetih med submerznim gojenjem glive *G. trabeum*

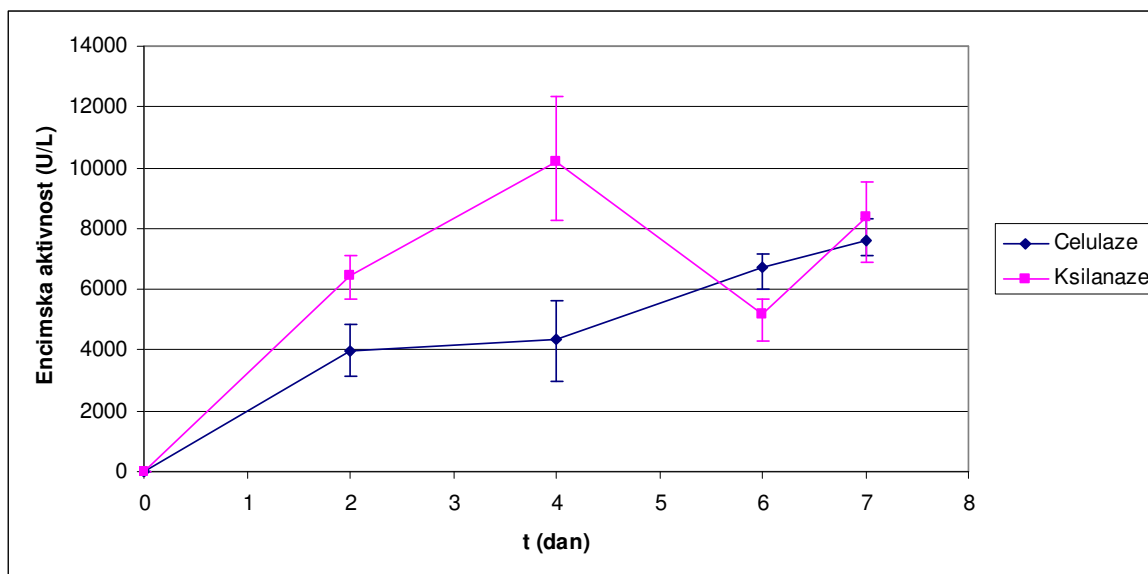
Na osnovi naraščanja koncentracije reducirajočih sladkorjev lahko sklepamo, da gliva sprošča eksoencime za razgradnjo kompleksnega substrata, ki vsebuje tudi celulozo in hemicelulozo.

Koncentracije proteinov prav tako v drugem dnevu padejo, nato pa se njihova vrednost povišuje. Začetni padec koncentracije je verjetno posledica porabe proteinov iz gojišča (kvasni ekstrakt), kasnejše naraščanje koncentracije proteinov pa je posledica povišanja koncentracije encimov. Trditev sovпада tudi z naraščanjem koncentracije celulaz in ksilanaz iz slike 29, saj se je tudi koncentracija encimov povečevala po drugem dnevu inkubacije.

4.2.2.3 Določanje encimskih aktivnosti

Med gojenjem glive *G. trabeum* v submerznem produkcijskem gojišču smo poleg celulaz in ksilanaz preliminarно spremljali tudi encimske aktivnosti lakaz in lignin peroksidaz. Slednje so bile prisotne v zanemarljivih količinah (podatki niso prikazani), zato jih v nadaljevanju nismo spremljali. To potrjuje, da *G. trabeum* kot gliva rjave trohnobe ne sintetizira encimov za razgradnjo lignina.

Ksilanaze so najvišjo vrednost dosegle četrtega dne, medtem ko so celulazne vrednosti postopoma rasle vse do sedmega dne. S tem trendom lahko razložimo encimski sistem v gojišču. V glivi od začetka ni moč zaznati aktivnosti teh hidrolaz, saj ima gliva dovolj enostavno razgradljivih hranil za tvorbo micelija. Encime za hidrolizo kompleksnih substratov začnejo glive najpogosteje sproščati zaradi pomanjkanja vira ogljika ali dušika (Blažič, 2010).

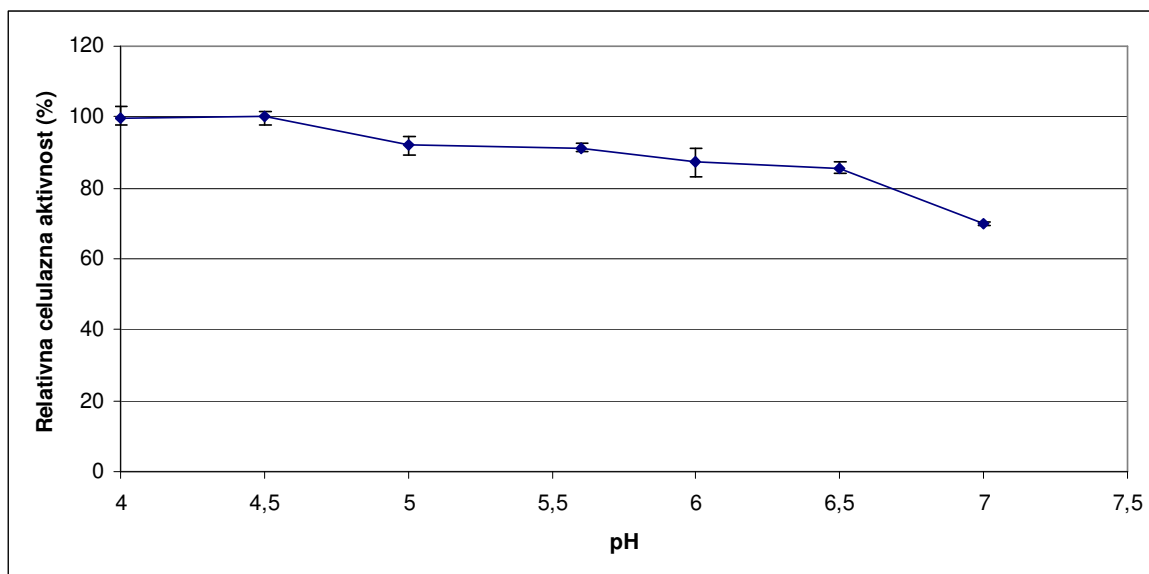


Slika 30: Časovna odvisnost izmerjene aktivnosti celulaž in ksilaž v filtratih, odvzetih med submerznim gojenjem glive *G. trabeum*

Ker so bile maksimalne vrednosti encimov visoke: ksilaž 10210 U/L in celulaž 7628 U/L, lahko rečemo, da je žagovina ugodno vplivala na encimsko produkcijo z glivo *G. trabeum* (slika 30).

4.2.3 Opredelitev optimalne pH vrednosti za delovanje celulaž in ksilaž glive *Gloeophyllum trabeum*

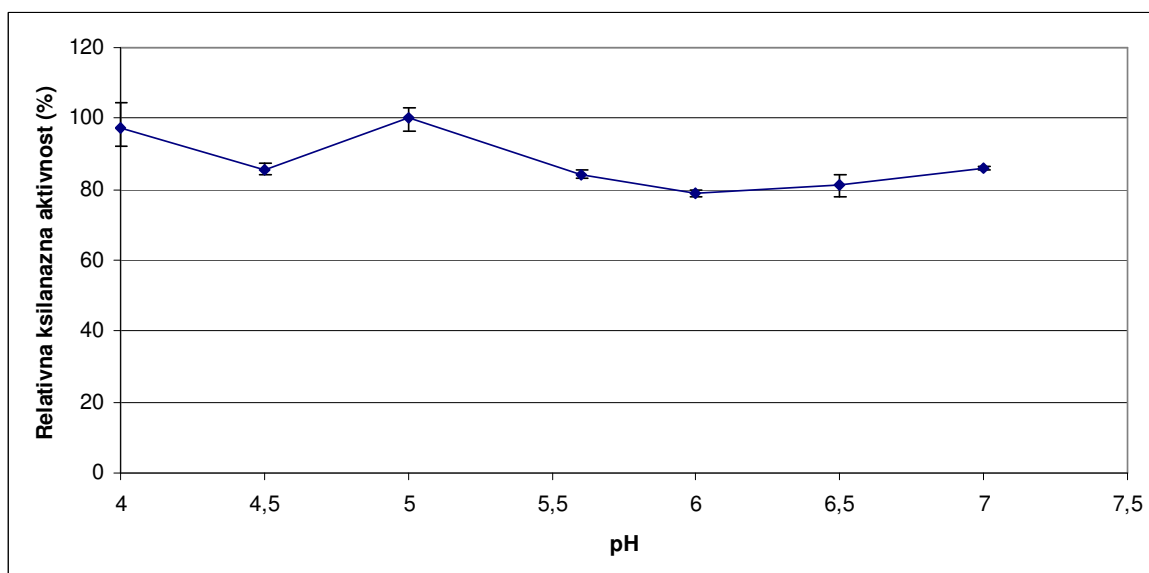
Rezultati testiranja celulažne aktivnosti v odvisnosti od pH vrednosti so pokazali, da imajo celulaže *G. trabeum* najvišjo aktivnost pri pH vrednosti od 4 do 4,5. Pri pH 4 je bila vrednost 99,92 % glede na najvišjo vrednost (100 %), ki je bila določena pri pH 4,5, in sicer 7326 U/L (slika 31).



Slika 31: Odvisnost relativne celulazne aktivnosti glive *G. trabeum* od pH vrednosti

Tudi v encimski bazi podatkov Brenda so za glivo *G. trabeum* kot optimalne vrednosti pH za celulaze podane vrednosti pH 4,4 in 4,5 (preglednica 1).

Rezultati testiranja ksilanazne aktivnosti v odvisnosti od pH vrednosti so pokazali, da imajo ksilanaze glive *Gloeophyllum trabeum* najvišjo encimsko aktivnost pri pH 5, le nekoliko nižja pa je pri pH vrednosti 4 (slika 32).



Slika 32: Relativna ksilanazna aktivnost glive *G. trabeum* v odvisnosti od pH vrednosti

Iz encimske baze podatkov Brenda konkretnih podatkov za optimalen pH ksilanaz glive *G. trabeum* nismo našli. Za glivo rjave trohnohe *Lentinula edodes* pa je znan podatek, da imajo ksilanaze optimalno pH vrednost 4 (preglednica 2).

Na podlagi teh rezultatov smo se odločili, da lesne vzorce inkubiramo v koncentratih, katerim smo z 0,1 M H_3PO_4 umerili pH na vrednost 4.

4.3 INKUBACIJA LESNIH VZORCEV Z ENCIMSKIM PRIPRAVKOM GLIVE *Gloeophyllum trabeum*

Vzorci lesa *Picea abies* smo inkubirali v skoncentriranem filtratu produkcijskega gojišča glive *G. trabeum* (slika 33). Koncentrat je vseboval 53400 U/L celulaz in 58800 U/L ksilanaz.

Vzorci smo inkubirali pri temperaturi 30 °C. Kot slepi poskus smo lesne ploščice pri istih pogojih inkubirali v demineralizirani vodi.

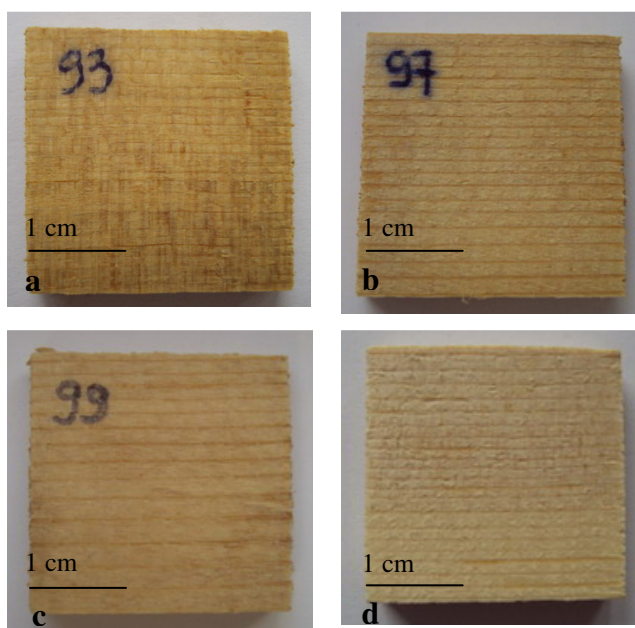


Slika 33: Inkubacija pomočenih lesnih vzorcev v filtrat produkcijskega gojišča *G. trabeum*

Večino gojišč smo koncentrirali z ultrafiltracijo z membrano z MWCO 10000 Da. Na ta način smo v teh koncentratih obdržali celulazne in ksilanazne aktivnosti. Delu filtratov, skoncentriranih z membrano MWCO 10000 Da, pa smo v razmerju 2:1 dodali še filtrat, skoncentriran z membrano MWCO 1000 Da, saj smo na ta način v koncentratu poleg encimov želeli obdržati tudi agense z nizko molekulsko maso ali t.i. kelatorje.

4.3.1 Izgled lesnih ploščic

Izgled ploščic se po inkubaciji z vodnimi raztopinami ni bistveno spremenil (slike 34 a-d). Sklepamo, da razgradnja lesnih hemiceluloz in celuloz ni bila tako intenzivna, da bi to vplivalo na mehanske lastnosti lesnih vzorcev.



Slika 34: Slike ploščic namočenih v koncentrate filtratov produkcijskega gojišča glive *G. trabeum*, pridobljenih z membrano MWCO 10000 Da po a) štirih b) sedmih in c) desetih dnevih inkubacije; d) kontrola inkubirana v vodi

4.3.2 Sprememba mase lesnih vzorcev

Da bi ugotovili vpliv vodnih raztopin encimov na maso ploščice, smo le-te najprej inkubirali v demineralizirani vodi. Po treh dneh inkubacije pri 30 °C smo izmerili $0,95 \pm 0,48$ % zmanjšanje mase vzorcev glede na začetno maso vzorcev pred inkubacijo. Iz tega sklepamo, da v sami vodi pride do hidrolize celuloze, saj je pH vrednost v lesu kislja in les vsebuje dovolj kovin. Majhna sprememba pa je možna tudi zaradi ponovne sušitve vzorca za določanje suhe snovi.

V vzorcih, inkubiranih s filtrati produkcijskega gojišča glive *G. trabeum* je bilo v vseh primerih zaznati naraščanje suhe mase. V filtratih, pridobljenih z membrano MWCO 10000 Da je bil opažen porast mase do 9 % (preglednica 3), medtem ko je bilo pri inkubaciji s filtrati, najprej dobljenimi s koncentriranjem z membrano MWCO 10000 Da in nato v razmerju 2:1 razredčenimi s filtrati, ki so vsebovali tudi topljence z molekulkno maso med 1000 in 10000 Da, ta porast največ do 6 % (preglednica 4).

Preglednica 3: Povprečna sprememba mase lesnih vzorcev po inkubaciji pri 30°C z grobim encimskim pripravkom, dobljenim z membrano z MWCO 10000 Da

Čas inkubacije s filtratom (dan)	Povprečna sprememba mase (%)
5	$9,00 \pm 1,7$
7	$7,24 \pm 3,6$

Preglednica 4: Povprečna sprememba mase lesnih vzorcev po inkubaciji pri 30 °C z grobim encimskim pripravkom, dobljenim z membrano MWCO 10000 Da in nato v razmerju 2:1 razredčenim s filtratom, dobljenim z membrano MWCO 1000 Da

Čas inkubacije s filtratom (dan)	Povprečna sprememba mase (%)
4	4,50 ± 2,3
7	1,45 ± 1,0
10	6,04 ± 2,3

Predvidevamo, da je do višanja mas v vzorcih prišlo zaradi adsorpcije snovi iz encimskega pripravka na površino lesnih vzorcev. To domnevo potrjuje tudi višji porast mase ploščic v primeru inkubacije s filtratom, ki je vseboval koncentracijo delcev nad 10.000 Da v primerjavi s filtratom, dobljenim z membrano MWCO 10000 Da in nato v razmerju 2:1 razredčenim s filtratom, dobljenim z membrano MWCO 1000 Da.

4.3.3 Sprememba kristaliničnosti lesnih ploščic

Tudi pri vplivu inkubacije z vodnimi raztopinami na kristaliničnost lesa smo najprej preverili vpliv inkubacije v demineralizirani vodi.

Po treh dneh inkubacije ploščic lesa v demineralizirani vodi je delež kristaliničnosti narasel v povprečju za 1,8 %, kar je skoraj 4 % povečanje glede na začetno vrednost (preglednica 5).

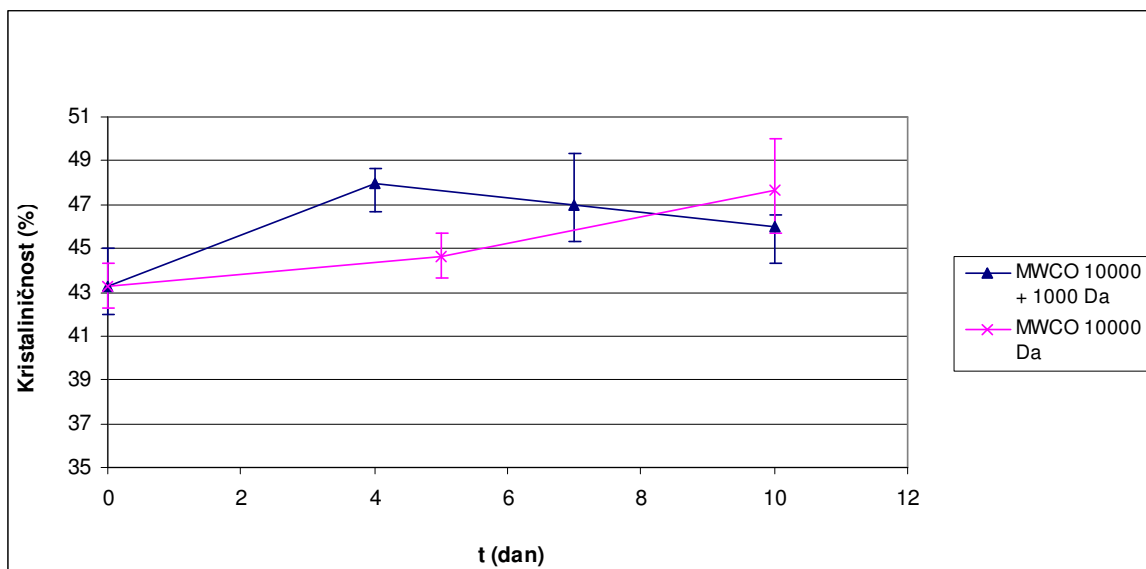
Preglednica 5: Povprečna sprememba kristaliničnosti v zmletih lesnih ploščicah po treh dneh inkubacije v demineralizirani vodi pri 30 °C

Kristaliničnost vzorcev pred inkubacijo (%)	Kristaliničnost vzorcev po inkubaciji (%)	Povečanje kristaliničnosti glede na začetno vrednost (%)
45,8 ± 1,2	47,6 ± 1	3,9 ± 1

Ker v tem času tudi masa ploščic pade skoraj za 1 %, sklepamo, da je to delno posledica dejstva, da voda iz lesa odplavlja nizkomolekularne snovi, ki prispevajo k amorfne delu.

Nadaljevali smo z meritvami kristaliničnosti pri vzorcih, inkubiranih s koncentratu filtratov produkcijskega gojišča glive *G. trabeum*, koncentriranih na dva načina oz. z uporabo dveh različnih membran. V obeh primerih je prišlo do dviga deleža kristaliničnosti v vzorcih.

Delež kristaliničnosti vzorcev, inkubiranih s filtrati, katerim so bile odstranjene molekule pod 10000 Da, je s časom naraščal in je najvišjo izmerjeno vrednost ($48,0 \pm 2$ % oz. 11,6 % glede na začetno vrednost) dosegel deseti dan inkubacije (slika 35).



Slika 35: Časovna odvisnost deleža kristaliničnosti vzorcev lesa po inkubaciji lesnih vzorcev v koncentratih produkcijskega gojišča *G. trabeum*

Znano je, da se amorfni del razgradi pred kristaliničnim (Kleman-Leyer in sod., 1992; Cowling, 1961) in tudi slepi poskus z demineralizirano vodo je pokazal, da se snovi s časom izplavljajo iz lesa, vendar pa je potrebno pri tem upoštevati tudi adsorpcijo snovi na les.

Vzorci, ki so bili namočeni v filtratih, najprej dobljenimi s koncentriranjem z membrano MWCO 10000 Da in nato v razmerju 2:1 razredčenimi s filtrati, ki so vsebovali tudi topljence z molekulsko maso med 1000 in 10000 Da, pa so že četrty dan dosegli najvišji delež kristaliničnosti ($47,8 \pm 1$ %). Glede na začetno vrednost je bilo povečanje 11,1 %. Do desetega dne se je delež kristaliničnosti počasi nižal in deseti dan je znašal $46,0 \pm 1$ % oz. 7 % glede na začetno vrednost. Zaradi širokega razpona intervalov napak obstaja tudi možnost, da kristaliničnost v lesu po četrtem dnevu ostaja konstantna (slika 35).

Vidimo, da je naraščanje deleža kristaliničnosti hitreje opazno pri lesnih vzorcih, inkubiranih v filtratih, kjer so se še vedno nahajale molekule z nizko molekulsko maso, med katerimi so tudi t. i. kelatorji, ki pričnejo z depolimerizacijo celuloze pred encimi (Wang in Geo, 2003). Ker teh kelatorjev v filtratih, ki vsebujejo samo molekule nad 10000 Da ni, bi lahko sklepali, da smo z dodatkom molekul z nizko molekulsko maso vplivali na hitrejše povečanje deleža kristaliničnosti lesa. Vendar pa je potrebno ob tem upoštevati, da tudi sama voda doseže povečanje kristaliničnosti v vzorcih. Prav tako sklepamo, da snovi, ki so bile adsorbirane na površini vzorcev, vplivajo na navidezni delež kristaliničnosti lesa.

4.4 INKUBACIJA ŽAGOVINE V FILTRATU Z ENCIMSKIMI PRIPRAVKI GLIVE *Gloeophyllum trabeum*

Ker nas je zanimalo, v kolikšni meri adsorbirani deli iz koncentrata vplivajo na kristaliničnost, smo izvedli še poskus z zmleto žagovino.

Pri inkubaciji žagovine v demineralizirani vodi po treh dneh pri 30 °C spremembe v masi nismo zaznali (podatki niso prikazani), medtem ko je delež kristaliničnosti narasel za $4,4 \pm 1$ % glede na izmerjeno kristaliničnost pred inkubacijo (preglednica 6).

Preglednica 6: Povprečna sprememba kristaliničnosti žagovine po treh dneh inkubacije v demineralizirani vodi pri 30 °C

Kristaliničnost žagovine pred inkubacijo (%)	Kristaliničnost žagovine po inkubaciji (%)	Povečanje kristaliničnosti glede na začetno vrednost (%)
$45,8 \pm 1,2$	$47,8 \pm 0,8$	$4,4 \pm 1$

Potrdili smo, da že inkubacija v demineralizirani vodi in ponovno sušenje vzorca delno vplivata na povečanje deleža kristaliničnosti lesa. Ker ni bilo zaznati sprememb v masi žagovine, je sprememba očitno posledica strukturnih sprememb v lesu.

Pri inkubaciji žagovine s filtratom, najprej dobljenimi s koncentriranjem z membrano MWCO 10000 Da in nato v razmerju 2:1 razredčenimi s filtrati, ki so vsebovali tudi topljence z molekulsko maso med 1000 in 10000 Da, smo zaznali kar 47 % povečanje mase vzorca. Proteini, polisaharidi in ostale snovi iz produkcijskega gojišča, so se po koncentriranju zadržale v koncentratu in prispevale k velikemu povišanju suhe mase žagovine po inkubaciji. Tudi po spiranju žagovine z vodo je na njej ostalo še precej snovi iz filtratov produkcijskega gojišča glive *Gloeophyllum trabeum* (preglednica 7).

Preglednica 7: Povprečna sprememba mase in kristaliničnosti žagovine pred in po spiranju adsorbiranih snovi v vzorcih

Povečanje mase žagovine pred spiranjem (%)	Povečanje mase žagovine po spiranju (%)	Povečanje kristaliničnosti žagovine glede na začetno vrednost pred spiranjem (%)	Povečanje kristaliničnosti žagovine glede na začetno vrednost po spiranju (%)
$47,7 \pm 2,0$	$24,1 \pm 2,0$	$4,6 \pm 1,0$	$3,0 \pm 1,0$

Velika površina snovi je očitno omogočila učinkovito adsorpcijo na žagovino, saj adsorbiranih snovi tudi s spiranjem nismo uspeli popolnoma odstraniti. Kot smo potrdili z meritvami kristaliničnosti, so te snovi prispevale k povečanju kristaliničnosti lesa, saj se je po spiranju adsorbiranih snovi navidezni delež kristaliničnosti v lesu zmanjšal (preglednica 7).

5 SKLEPI

Iz raziskav diplomske naloge lahko povzamemo naslednje zaključke:

Izpostavljanje lesa glivi *G. trabeum* v prvih dveh tednih privede do povišanja deleža kristaliničnosti v lesu. Z daljšo izpostavitvijo lesa glivi se delež kristaliničnosti manjša, vse višja pa je izguba mase lesa. Les pri daljši inkubaciji spreminja tudi mehanske lastnosti. Potrdili smo, da gliva *G. trabeum* v začetni fazi razkroja lesa najprej razgradi amorfni material v lesu (hemiceluloza in amorfni del celuloze) in šele nato prične z razkrajanjem kristaliničnega dela celuloze.

Med gojenjem glive *G. trabeum* v produkcijskem gojišču, ki je vseboval žagovino *Picea abies*, smo spremljali ekstracelularne encimske aktivnosti celulaz in ksilanaz, saj so bile ligninolitične aktivnosti zanemarljivo majhne. Po sedmih dni gojenja so aktivnosti celulaz narasle do 7628 U/L in ksilanaz do 10210 U/L.

Opredelili smo tudi odvisnost aktivnosti pridobljenih celulaz in ksilanaz od pH vrednosti. Celulaze so imele najvišjo aktivnost pri pH vrednosti med 4 in 4,5, medtem ko so imele ksilanaze najboljše delovanje pri pH vrednosti 4,0.

Vzorci smrekovega lesa smo poskusili modificirati tudi z grobim encimskim pripravkom, dobljenim s koncentriranjem produkcijskega gojišča. Ugotovili smo, da vzorcem že po nekaj dneh inkubacije naraste delež kristaliničnosti, še posebno v primeru, ko smo zadržali v filtratu tudi nizkomolekularne kelatorje. Ker pa del sprememb lahko pripišemo tudi posledicam inkubacije v vodi in pa adsorpciji snovi iz filtratov na les, bi bile za kvantitativno določitev povečanja deleža kristaliničnosti lesa z encimskimi pripravki potrebne še nadaljnje študije. Smiselno bi bilo meriti tudi spremembe v kemijski sestavi lesa in njegovih fizikalnih lastnosti, vključno z akustičnimi lastnostmi, ki so ključne za izdelovalce glasbil.

6 POVZETEK

Poskuse smo izvedli z glivo rjave trohnobe *G. trabeum*. Glive rjave trohnobe prednostjo razkrajajo hemicelulozo in celulozo, medtem ko ostane lignin skoraj nespremenjen (Eaton in Hale, 1993).

Ugotavljali smo, da gliva rjave trohnobe *G. trabeum* in njen encimski sistem vpliva na spremembo kristaliničnosti smrekovega lesa. Les smo najprej inkubirali s samo glivo in opazovali, kako naravni proces razgradnje lesa z glivo vpliva na kristaliničnost v lesu.

Zaradi lažjega krmiljenja in nadzorovanja raznih biotehnoloških industrijskih procesov je uporaba izoliranih encimskih ali celo biomimetičnih kemičnih sistemov bolj zaželen kot uporaba živih organizmov (Tavzes, 2003). Zato smo lesne vzorce izpostavljali tudi grobim encimskim pripravkom, ki smo jih pridobili s koncentriranjem produkcijskega gojišča glive *G. trabeum*. Kot kontrolo smo lesne vzorce inkubirali v demineralizirani vodi.

Izkazalo se je, da gliva močno vpliva na delež kristaliničnosti v lesu. Najvišji delež kristaliničnosti je dosežen že po dveh tednih delovanja glive na les. Če želimo doseči visoko kristaliničnost lesa, ki ima še ohranjene strukturne lastnosti, vzorcev ne smemo izpostaviti glivi več kot dva tedna.

V drugem delu eksperimenta smo spoznali, da že sama demineralizirana voda vpliva na porast v deležu kristaliničnosti lesa. Zato povišanju kristaliničnosti vzorcev v rezultatih ne moremo z zagotovostjo pripisati vplivu agensov z nizko molekulsko maso ali delovanju encimov. Za potrditev bi bilo potrebno izvesti nadaljnje študije, da bi poleg spremembe kristaliničnosti inkubiranih vzorcev lahko opazovali še spremembe v kemijski sestavi lesa in spremembe fizikalnih lastnosti kot so akustične lastnosti in resonanca.

7 VIRI

- Aro N., Pakula T., Penttilä M. 2005. Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. *FEMS Microbiology Reviews*, 29, 4: 719-739
- Bajpai P., 1997. Microbial xylanolytic enzyme system: Properties and applications. *Applied and Environmental Microbiology*, 43, 2: 141–194
- Benko R., Kervina- Hamovič L. Gruden M. 1987. Patologija lesa – lesna fitopatologija. Ljubljana, Biotehniška fakulteta: 122 str.
- Biermann C. 1996. Handbook of pulping and papermaking. 2nd Ed. San Diego, Academic press: 504 str.
- Blažič T. 2010. Submerzna kultivacija encimov glive *Grifola frondosa*. Diplomsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo: 144 str.
- Blomsteadt M. 2007. Modification of cellulosic fibers by carboxymethyl cellulose – effects on fiber and sheet properties. Helsinki, University of technology: 75 str.
- Bradford, M.M. 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quatitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 1-2: 248-254
- Brenda-The comprehensive enzyme information system. 2011. Nemčija, Technische Univeritat Braunschweig.
<http://www.brenda-enzymes.org> (junij, 2011)
- Cowling E.B. 1961. Comparative biochemistry of the decay of sweetgum sapwood by white-rot and brown-rot fungi. Technical bulletin no. 1258. Washington, U.S. Department of Agriculture: 79 str.
- Cowling E.B., Brown W. 1969. Structural features of cellulosic materials in relation to enzymatic hydrolysis. *Advance chemical series*, 95, 3: 152-187
- Eaton R.A., Hale M.D.C. 1993. Wood deay, pests and protection. London, Chapman & Hall: 546 str.
- Enoki A., Hirano T., Tanaka H. 1992. Extracellular substance from the brown-rot basidiomycete *Gloeophyllum trabeum* that produces and reduces hydrogen peroxide. *Mater Organisation*, 27, 4: 247–261
- Enoki A., Itakura S., Tanaka H. 1997. The involvement of extracellular substances for reducing molecular oxygen to hydroxyl radical and ferric iron to ferrous iron in wood degradation by wood decay fungi. *Journal of biotechnology*, 53, 2: 265-272
- Espejo E., Agosin E. 1991. Production and degradation of oxalic acid by brown-rot fungi. *Applied and Environmental Microbiology*, 57, 7: 1980-1986
- Fengel D., Wegener G. 1989. Wood: Chemistry, Ultrastructure, Reactions. Berlin, New York, Walter de Gruyter & Co: 613 str.

- Fisher Scientific. 2006. USA, Thermo fischer Scientific. Inc.
<http://www.fishersci.com/ecom/servlet/itemdetail?catalogId=29104&productId=2350656&distype=0&fromSearch=0&storeId=10652&langId=-1> (junij, 2011)
- Flournoy D.S., Kirk T.K., Highley T.L. 1991. Wood decay by brown-rot fungi: Changes in pore structure. *Holzforschung*, 45, 5: 383-388
- Flournoy D.S. 1994. Chemical changes in wood components and cotton cellulose as a result of brown rot: Is Fenton chemistry involved? New York, Plenum Press: 76 str.
- Gorišek Ž. 2008. Modifikacija lesa. Ljubljana, Korak.
<http://www.korak.ws/clanki/modifikacija-lesa.html> (marec, 2011)
- Goodell B., Jellison J., Liu J., Daniel G., Paszczynski A., Fekete F., Krishnamurthy S., Jun L., Xu G. 1997. Low molecular weight chelators and phenolic compounds isolated from wood decay fungi and their role in the fungal biodegradation of wood. *Journal of Biotechnology*, 53, 2-3: 133-162
- Green F., Larsen M.J., Winandy J.E., Highley T.L. 1991. Role of oxalic acid in incipient brown-rot decay. *Material und Organismen*, 26, 3: 191-213.
- Green III. F., Highley T.L. 1997. Mechanism of brown-rot decay: Paradigm or paradox. *International Bio-deterioration & Biodegradation*, 39, 2: 113-124
- Highley, T., Ibach, R., Kirk, T.K. 1988. Properties of Cellulose Degraded by the Brown Rot Fungus, *Postia placenta*. IRG/WP/1350. Stockholm, International Research Group on Wood Protection: 100 str.
- Hill C.A.S. 2006. Wood modification: chemical, thermal and other processes. London, John Wiley and sons: 239 str.
- Hirano T, Enoki A, Tanaka H. 2000. Immunogold labeling of an extracellular substance producing hydroxyl radicals in wood degraded by brown-rot fungus *Tyromyces palustris*. *Journal of Wood Science*, 46, 1: 45-51
- Howell C., Steenkjaer Hastrup A.C., Goodell B., Jellison J., 2009. Temporal changes in wood crystalline cellulose during degradation by brown rot fungi. *International biodeterioration & biodegradation*, 63, 4: 414-419
- Humar M., Petrič M., Pohleven F. 1999. Changes of pH of impregnated wood during exposure to wood-rotting fungi. *Holz als Roh- und Werkstoff*, 59, 4: 288-293
- Humar M., Pohleven F. 2000. Značilnosti razkroja lesa z rjavo trohno. *Les*, 52, 7-8: 229-234
- Jellison J., Connolly J., Goodell B., Doyle B., Illman B., Fekete F., Ostrf-sky A. 1997. The role of cations in the biodegradation of wood by the brown rot fungi. *International Bio-deterioration & Biodegradation*, 39, 2-3: 165-179
- Leban I. 2007. Les zgradba. Ljubljana, Center Republike Slovenije za poklicno izobraževanje.
http://www.cpi.si/files/cpi/userfiles/Lesarstvo_tapetnistvo/3-LES_ZGRADBA.pdf (januar, 2011)

- Kirk T.K., Cullen D. 1998. Enzymology and molecular genetics of wood degradation by white-rot fungi. V: Environmentally friendly technology for the pulp and paper industry. Young R.A., Akhtar M. (eds.). New York, John Wiley and sons: 273-307
- Klemen-Leyer K., Agosin, E., Conner A.H., Kirk T.K. 1992. Changes in molecular size distribution of cellulose during attack by white rot and brown rot fungi. Applied and Environmental Microbiology, 58, 4: 1266–1270
- Koenigs, J. W. 1972. Effects of hydrogen peroxide on cellulose and its susceptibility to cellulose. Material und Organismen, 7, 2: 133-147
- Mansfield S.D., Saddler J. N., Gübitz G.M. 1998. Characterization of endoglucanases from the brown rot fungi *Gloeophyllum sepiarium* and *Gloeophyllum trabeum*. Enzyme and Microbial Technology, 23, 1-2: 133–140
- Meden A. 2010. Zgradba in lastnosti trdnin. Spletna učilnica. Ljubljana, Fakulteta za kemijo in kemijsko inženirstvo.
<http://ucilnica.fkkt.si/> (avgust, 2010)
- Richards D.B. 1954. Physical changes in decaying wood. Journal of Forestry, 52, 4: 260-265
- Richardson B.A. 1993. Wood preservation. London, Spon Press: 226 str.
- Schwarze F.W.M.R. 2007. Wood decay under the microscope. Fungal Biology Reviews, 1, 38: 133–170
- Smerajec M. 2009. Laboratorijska simulacija uporabe encimov v procesu proizvodnje papirja. Diplomsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo: 62 str.
- Steenkjaer Hastrup A.C., Jensen B., Green III F. 2010. Chemical mediated depolymerization of cotton cellulose for the understanding of non-enzymatic fungal decay. Stockholm, Sweden, IRG Secretariat: 12 str.
- Tancek T. 2009. Vpliv delovanja encimov na lastnosti eukaliptusovih vlaknin. Diplomsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko inženirstvo: 68 str.
- Tavzes Č. 2003. Proučevanje encimskih in neencimskih procesov razgradnje lesa. Doktorska disertacija. Ljubljana, Univerza v Ljubljani; Biotehniška fakulteta, Interdisiplinarni podiplomski študij biotehnologije: 138 str.
- Tišma M., Žnidaršič-Plazl P., Plazl I., Vasić-Rački Đ., Zelić B. 2010. Oxidation of Coniferyl Alcohol Catalyzed by Laccases from *Trametes versicolor*. Slovenian Chemical Society, 57, 1: 110–117
- Toole E.R. 1971. Reduction in crushing strength and weight associated with decay by rot fungi. Wood Science, 3, 3: 172-178
- Wang W., Gao P.J. 2002. A peptide-mediated and hydroxyl radical HO-involved oxidative degradation of cellulose by brown-rot fungi. Biodegradation, 13, 6: 383–394
- Wang W., Gao P.J. 2003. Function and mechanism of a Low-molecular-weight peptide produced by *Gloeophyllum trabeum* in biodegradation of cellulose. Journal of biotechnology, 101, 2: 119-130

- Xu G., Goodell B. 2001. Mechanisms of wood degradation by brown-rot fungi: chelator-mediated cellulose degradation and binding of iron by cellulose. *Journal of Biotechnology*, 87, 1: 43–57
- Zabel R.A., Morrell J.J. 1992. *Wood microbiology. Decay and its prevention*. San Diego, New York, Academic press: 476 str.
- Žnidaršič P., Pavko A. 2002. *Praktikum iz biokemijskega inženirstva*. Ljubljana, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo: 89 str.

ZAHVALA

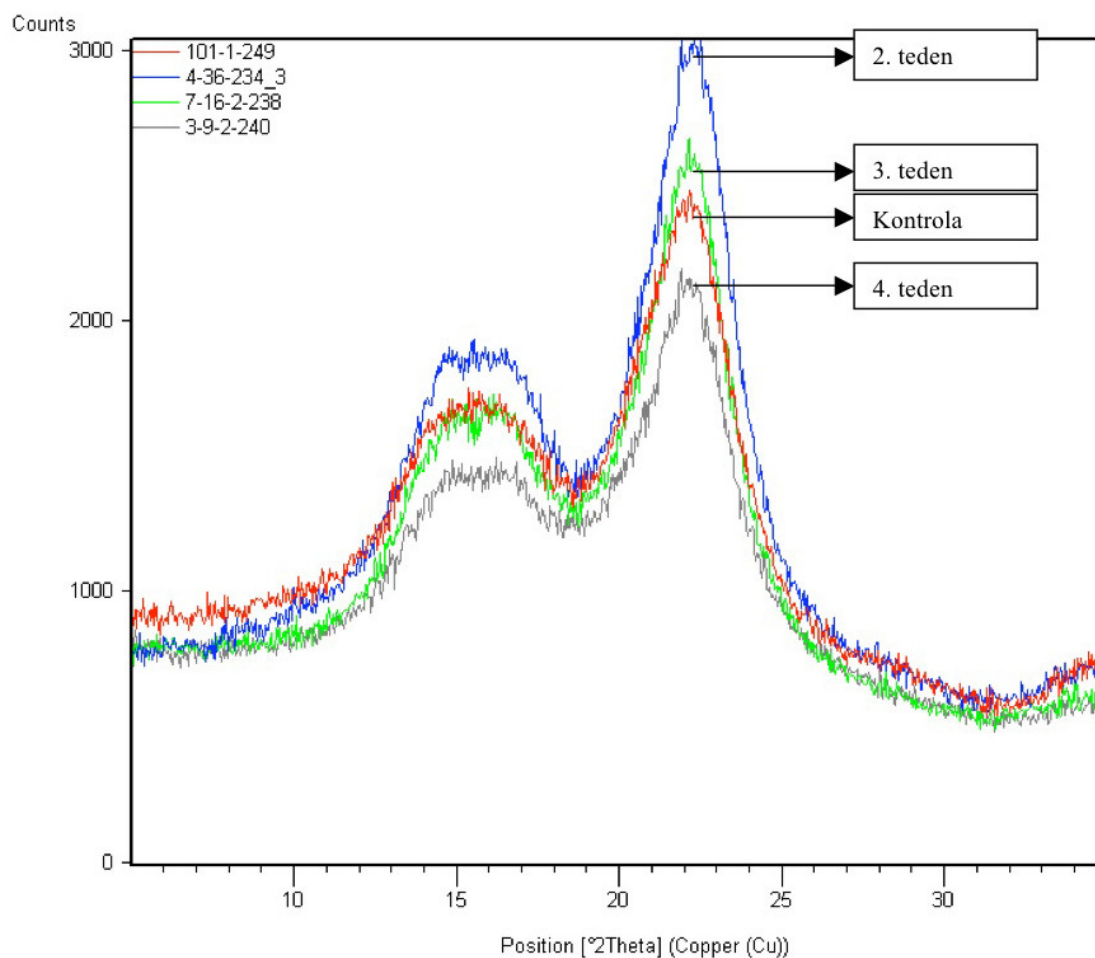
Iskreno se zahvaljujem mentorici doc. dr. Poloni Žnidaršič Plazl in somentorju prof. dr. Francu Pohlevnu za zanimivo temo diplomskega dela ter za pomoč in usmerjanje pri izvajanju eksperimentov in pisanju diplomske naloge.

Hvala tudi prof. dr. Antonu Medenu s Fakultete za kemijo in kemijsko tehnologijo Univerze v Ljubljani za strokovno pomoč pri rentgenski analizi lesa in Ediju Kranjcu s Kemijskega instituta za pomoč pri izvajanju meritev.

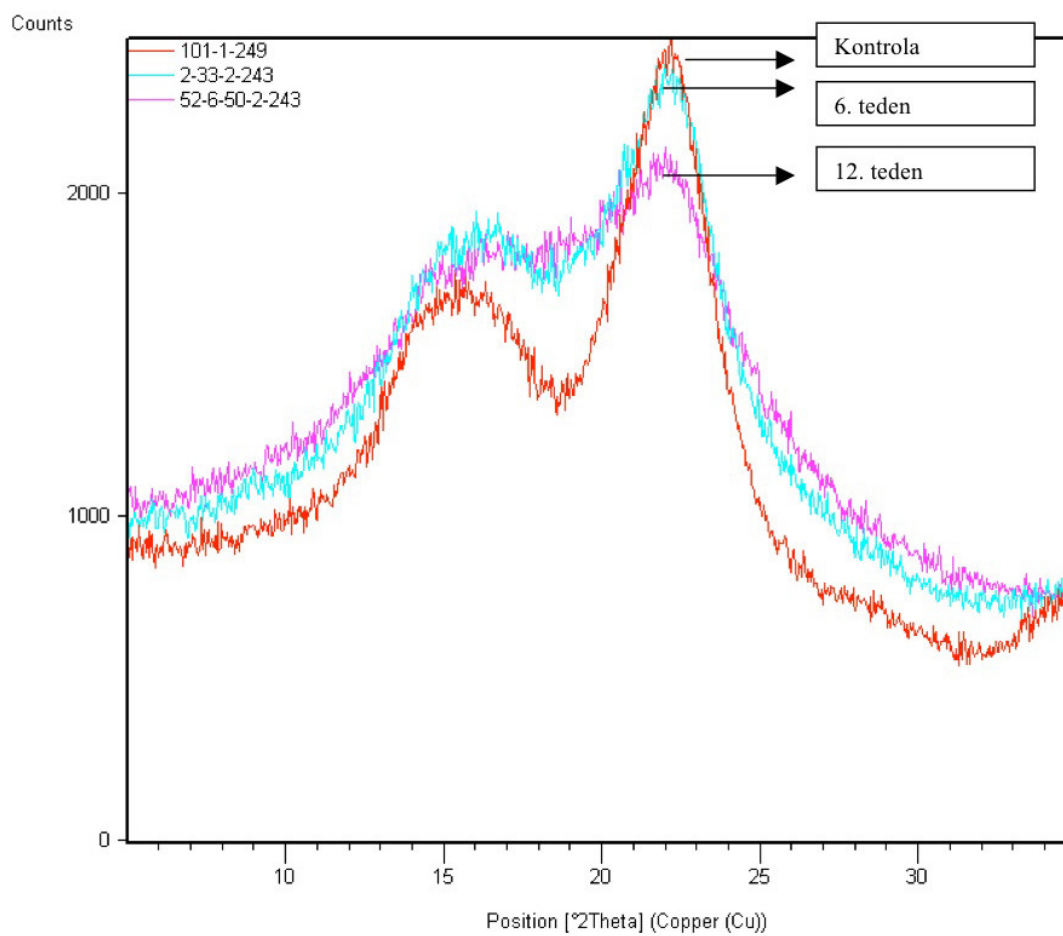
Hvala vsem na na Katedri za kemijsko, biokemijsko in ekološko inženirstvo Fakultete za kemijo in kemijsko tehnologijo Univerze v Ljubljani, ki so mi kakorkoli pomagali pri diplomskem delu.

Hvala tudi prijateljem in družini, ki mi vedno stojijo ob strani.

PRILOGE



Priloga 1: Prikaz difraktogramov od drugega do četrtega tedna inkubacije lesnih vzorcev z glivo *G. trabeum*



Priloga 2: Prikaz difraktogramov po šestem in dvanajstem tednu inkubacije lesnih vzorcev z glivo *G. trabeum*