

Cellulomonas knipt!

-Aantonen van cellulose afbraak door *Cellulomonas sp.*-

Inleiding

In de hout- en papierindustrie ontstaat veel afval in de vorm van cellulose. Als men dit zou kunnen verwerken tot veevoer, wordt waardeloos afvalmateriaal een nuttig product. Het enzym cellulase zet cellulose om in kortere ketens. De meeste cellulase in de handel wordt geproduceerd in grote fabrieksfermentoren. Hierbij wordt gebruik gemaakt van *Trichoderma reesei*, een schimmel die cellulase produceert. Na enige bewerkingen is de cellulase uit de fermentor-inhoud gewonnen.

De bacterie *Cellulomonas sp* kan in een petrischaaltje sneller het enzym cellulase produceren dan de schimmel *Trichoderma reesei*. In deze proef wordt gekeken of *Cellulomonas sp.* ook cellulase uit kan scheiden. Als dat lukt, zou deze bacterie op grote schaal ingezet kunnen worden om in de industrie cellulase te produceren en cellulose om te zetten in kortere ketens.

Doel

Onderzoeken of de bacterie *Cellulomonas sp.* in staat is het enzym cellulase uit te scheiden.

Theorie

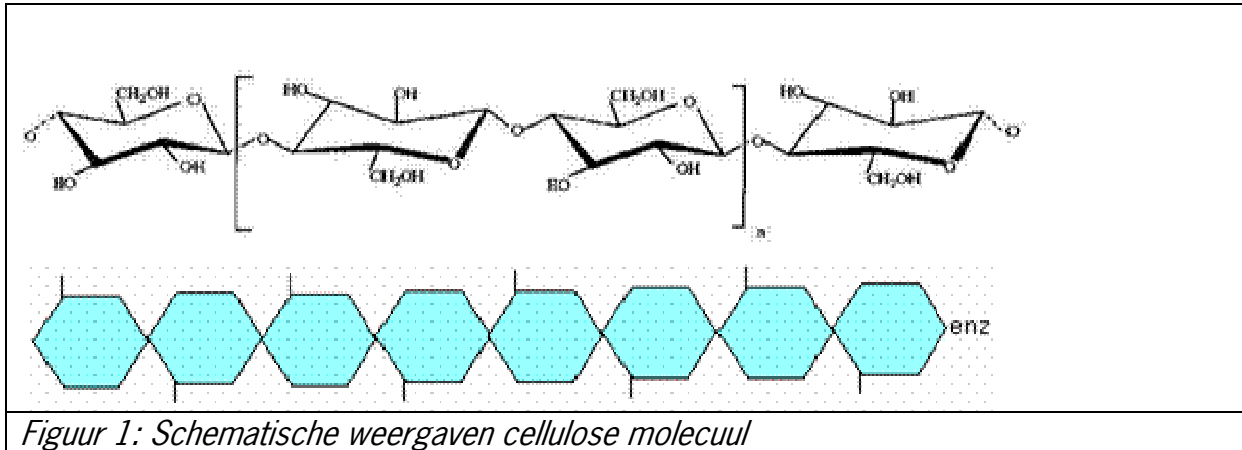
Cellulose

Cellulose is een polysaccharide, een verbinding van aan elkaar gekoppelde glucosemoleculen. Een cellulosemolecuul bestaat uit 15 tot 25.000 glucose-eenheden die via $\beta(1,4)$ -bindingen aan elkaar gekoppeld zijn. De verbinding heeft geen vertakkingen. In Figuur 1 wordt de structuur van cellulose op twee manieren schematisch weergegeven. In het onderste plaatje is duidelijk te zien dat de cellulose uit aan elkaar gekoppelde ringvormige glucosemoleculen bestaat. Een enkel glucose molecuul is weergegeven in Figuur 2.

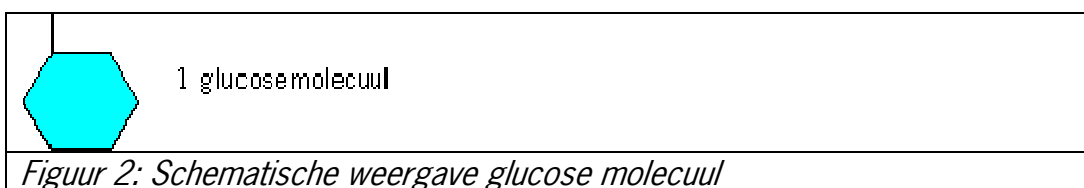


Cellulomonas knipt!

-Antonen van afbraak van cellulose door *Cellulomonas sp.*-



Figuur 1: Schematische weergaven cellulose molecuul



Figuur 2: Schematische weergave glucose molecuul

Hydrolysatie is het opsplitsen van stoffen door het opnemen van water. Doordat celluloseketens met waterstofbruggen aan elkaar verbonden zijn, zijn ze lastig te hydrolyseren. Op industriële schaal is het wel mogelijk na chemische voorbehandeling, mechanische afbraak- of een zwellingsproces. Helaas zijn deze methoden ongeschikt voor veevoerproductie. De behandeling van cellulose met een zuur of een base leidt namelijk tot de afbraak van de geproduceerde glucose. Daarnaast bevat afvalcellulose soms veel vervuiling, wat een hoop ongewenste (soms giftige) bijproducten oplevert.

In de natuur komt cellulose vooral voor in plantencelwanden. Het vormt de voornaamste voedselbron voor grazers, zoals koeien, en veel bacteriën en schimmels. Voordat de cellulose als voedingsstof door het organisme gebruikt kan worden, moet het eerst worden gehydrolyseerd tot afzonderlijke glucosemoleculen. Bacteriën en schimmels produceren hiervoor cellulasen die ze in hun omgeving loslaten. Zodra er glucose gevormd is, kunnen ze deze als voedsel opnemen. Koeien hebben cellulase producerende micro-organismen in hun spijsverteringskanaal om de cellulose in gras te hydrolyseren. Het ligt voor de hand om te onderzoeken of men voor de industriële hydrolyse van cellulosehoudend houtafval tot glucose ook bacteriën zou kunnen inschakelen. In dit experiment werken we in plaats van met hout met een makkelijker hanteerbare vorm van cellulose.

Agar

Bacteriën groeien in een laboratorium op een nutriënt-agar, een stof die bij kamertemperatuur in vaste vorm voorkomt. Eén van de basisbestanddelen van agar is gedroogd zeewier. Daarnaast worden er belangrijke voedingsstoffen toegevoegd waardoor bacteriën beter groeien. In dit experiment gebruik je een zogenaamd CMC-medium. CMC (carboxymethylcellulose) is een vorm van cellulose die gemakkelijk mengt



Cellulomonas knipt!

-Aantonen van afbraak van cellulose door *Cellulomonas sp.*-

met water. De schaal wordt in een broedstoof weggezet bij de optimale groeitemperatuur voor de bacteriën. Na een paar dagen kijk je of er cellulose is omgezet.

Uitvoering

Dit experiment is een bewerking van het experiment 'Cellulase productie' dat ontwikkeld is door het Europees Initiatief voor Biotechnologische Educatie. Het experiment is een onderdeel van module N°1: Inleiding Biotechnologie (1998).

Materialen

De benodigdheden per koppel zijn:

- *Cellulomonas sp* cultuur (suspensie in nutriëntenmedium)
- Steriele petrischaal met ongeveer 15 mL CMC medium. Het medium bevat per 100 mL opgelost:
 - 0,5 gram CMC (acros# 9004-32-4)
 - 0,1 gram NaNO₃
 - 0,1 gram K₂HPO₄
 - 0,1 gram KCl
 - 0,05 gram MgSO₄
 - 0,05 gram gistextract
 - 0,1 gram glucose
 - 1,7 gram agar
- Steriel nutriëntenmedium
- 2 steriele 1 mL pipetten
- Afvalbeker met 5% chlooroplossing
- Congorood-oplossing (1 mg per mL water)
- 1 M NaCl zoutoplossing (los 5.85 gram NaCl op in water tot 100 mL oplossing)
- Ethanol (om kurkboor te steriliseren)
- Kurkboor, ongeveer 5 mm diameter doorsnede
- Entnaald
- Broedstoof, 25-30°C

Veiligheid

Let op het verbrandingsgevaar bij het gebruik van de brander.

Dit experiment dient altijd uitgevoerd te worden onder begeleiding van een docent of toa. Wageningen University aanvaardt geen enkele aansprakelijkheid voor schade die voortvloeit uit het verrichten van dit experiment buiten de campus van Wageningen University.



Cellulomonas knipt!

-Aantonen van afbraak van cellulose door *Cellulomonas sp.*-

Beschrijving

- Maak de petrischaal zo weinig mogelijk open, om de kans op besmetting zo klein mogelijk te houden.
- Doop de kurkboor in de alcohol. Houd de boor kort in een vlam en laat de alcohol verbranden. LET OP! Houd de boor horizontaal, anders gaan de vlammen door de boor heen en kun je je hand verbranden. Dit is vergelijkbaar met opstijgende vlammen in een schoorsteen.
- Til de deksel van een CMC-plaat iets op (vlakbij de brander) en maak met de boor een gat in de agar, niet te dicht bij de rand. Sluit de deksel meteen. Haal zonodig de agarprop weg met een gesteriliseerde entnaald.
- Herhaal dit zodat er twee gaten in de agar ontstaan.
- Markeer elk gat aan de onderkant van de petrischaal met bijvoorbeeld een **C** (voor *Cellulomonas sp.*) en een **B** (voor blanco).
- Pipetteer het gat bij de **C** vol met de suspensie van *Cellulomonas sp.* Hiervoor is maximaal 0,2 mL nodig. Vul het andere gat op dezelfde wijze met steriel nutriëntenmedium (dus zonder de bacteriën). Gebruik telkens een schone, steriele pipet en zet de gebruikte pipet na gebruik in het afvalbakje met de 5% chlooroplossing om deze te desinfecteren.
- Zet de schaal voorzichtig in de broedstoof bij 25-30°C.
- Giet na twee dagen incubatie een beetje Congorood over de plaat.
- Giet na een kwartier de overtollige Congorood-oplossing voorzichtig in een afvalvat.
- Giet de zoutoplossing over de plaat om deze te ontkleuren. Dit duurt een paar minuten.

Resultaten

Maak een tekening in kleur van wat je ziet, of maak een duidelijke foto.

Vragen

- 1 Dit experiment geeft niet genoeg informatie over de geschiktheid van *Cellulomonas sp.* voor de productie van cellulase op industriële schaal. Bedenk enkele experimenten die meer informatie kunnen verschaffen.

- 2 Waarvoor dient het gat met steriel nutriëntenmedium?



Cellulomonas knipt!

-Aantonen van afbraak van cellulose door *Cellulomonas sp.*-

Suggesties voor verder onderzoek

De module N°1: Inleiding Biotechnologie (1998) van het Europees Initiatief voor Biotechnologische Educatie bevat nog meer experimenten. Ze kunnen allemaal gebruikt worden in het kader van microbiologie en DNA technologie. De module staat op de website van het Europees Initiatief voor Biotechnologische Educatie: <http://www.eibe.info/>.

Oriëntatie op vervolgonderwijs

Het onderwerp van dit experiment kom je ook tegen in de volgende opleidingen van Wageningen University:

- Biologie
- Biotechnologie
- Levensmiddelentechnologie
- Plantenwetenschappen
- Moleculaire Levenswetenschappen
- Milieukunde
- Bodem, water en atmosfeer

Kijk voor meer informatie op www.wageningenuniversity.nl/bsc.



Cellulomonas knipt!

-Antonien van afbraak van cellulose door *Cellulomonas sp.*-

Voor de docent of toa

Uitvoering

Materialen

De benodigdheden per koppel zijn:

- *Cellulomonas sp.* cultuur (suspensie)
- Steriele petrischaal met ongeveer 15 mL CMC medium. Het medium bevat per 100 mL opgelost:
 - 0,5 gram carboxymethylcellulose (een oplosbare vorm van cellulose, acros# 9004-32-4)
 - 0,1 gram NaNO_3
 - 0,1 gram K_2HPO_4
 - 0,1 gram KCl
 - 0,05 gram MgSO_4
 - 0,05 gram gistextract
 - 0,1 gram glucose
 - 1,7 gram agar
- Steriel nutriëntenmedium
- 2 steriele 1 mL pipetten
- Afvalbeker met 5% chlooroplossing
- Congorood oplossing (1 mg per mL water)
- 1 M NaCl zoutoplossing (los 5.85 gram NaCl op in 100 mL water)
- Ethanol (om kurkboor te steriliseren)
- Kurkboor, ongeveer 5 mm diameter doorsnede
- Entnaald
- Broedstoof, 25-30°C

Cellulomonas sp.

Een *Cellulomonas sp.* cultuur is verkrijgbaar bij het Laboratorium voor Microbiologie aan Wageningen University. Neem hiervoor contact op met Renée de Vrijer – Albers. Haar email adres is: renee.devrijer-albers@wur.nl. Maak de *Cellulomonas sp.* Cultures twee à drie dagen van tevoren klaar in een basismedium. Dit basis medium bestaat uit 8 g/L nutriënt broth (5 g pancreatic digest of gelatin; 3 g beef extract). Autoclaveer het medium voor gebruik 15 minuten bij 121 °C en incubeer het bij 25-30°C. Per leerling is 1 mL voldoende.



Cellulomonas knipt!

-Antonen van afbraak van cellulose door *Cellulomonas sp.*-

De petrischalen

Giet de platen ruim voor aanvang van de les zodat ze nog kunnen afkoelen. De platen kunnen slechts een paar dagen bij 4 °C in de koelkast worden bewaard.

Maak de platen als volgt:

- Maak eerst het medium. Weeg de aangegeven hoeveelheden zo nauwkeurig mogelijk af en los ze op in water.
- Autoclaveer de media voor gebruik gedurende 15 minuten bij 121 °C. Een snelkookpan is een goed alternatief voor de autoclaaf. Klaargemaakte media kunnen enkele maanden worden bewaard bij 4 °C.
- Het medium dient ongeveer 50 °C te zijn om uit te kunnen gieten. Het op temperatuur brengen kan het beste een waterbad. Giet de platen zo dicht mogelijk bij de brander om besmetting te voorkomen.
- Gebruik voor platen met een diameter van 9 cm 15 mL - 20 mL medium. Droog flessen uit het waterbad met papier af in verband met de hoge besmettingsgraad van het aanhangende water.
- Verwijder met de pink van de rechterhand de kap van de fles en flambeer de hals. Til de deksel van de petrischaal een beetje op en houd deze boven de bodem van de petrischaal.
- Giet de inhoud van de fles in de petrischaal. Gebruik zoveel medium dat deze voor 2/3 bedekt is zodat de laag de juiste dikte krijgt.
- Sluit de petrischaal. Flambeer de hals van de fles en plaats de kap er weer op. Verdeel het medium rustig over de hele bodem van de petrischaal.
- Laat het medium rustig op tafel stollen; verplaats de schalen niet.

Proefbeschrijving

Demonstreer alle handelingen minimaal één maal voor de klas om onnodige besmettingen op de platen door de leerlingen te voorkomen. Zij moeten het belang van steriel werken goed inzien. Waarschuw de leerlingen voor het gevaar van verbrandingen tijdens het steriliseren.

De leerlingen maken twee gaten in de voedingsbodem. Het ene gat enten ze aan met *Cellulomonas sp.* cultuur en het andere met water. Na ongeveer 2 dagen is de *Cellulomonas sp.* cultuur voldoende gegroeid om de omzetting van cellulose aan te tonen. Dit gebeurt met een Congo-roodoplossing, waarbij de *Cellulomonas sp.* heldere zones van zo'n 2 cm doorsnee maakt. Waar de kleur verdwenen is, is de CMC afgebroken tot $\beta(1,4)$ glucaan. Deze stof bevat per molecuul zeven of minder glucose-eenheden. De diameter van de heldere zone levert een kwantitatieve maat voor de activiteit van cellulase.

Vaardigheden

Pipetteren, steriel werken, waarnemingen nauwkeurig weergeven.



Cellulomonas knipt!

-Aantonen van afbraak van cellulose door *Cellulomonas sp.*-

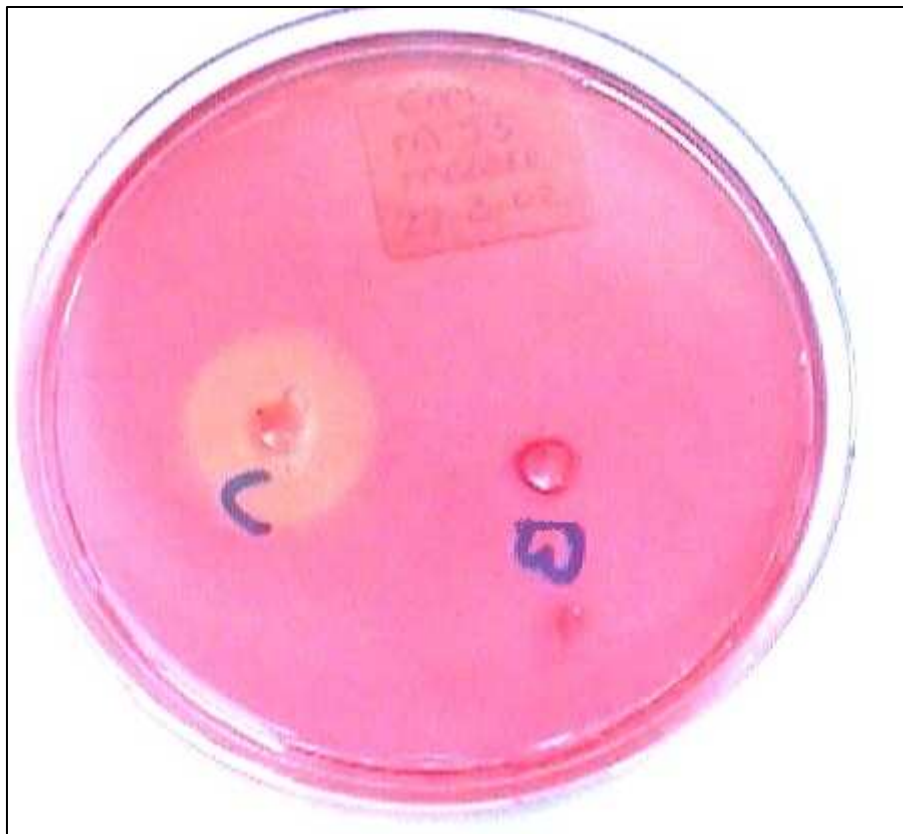
Veiligheid

Let op het verbrandingsgevaar bij het gebruik van de brander.

Dit experiment dient altijd uitgevoerd te worden onder begeleiding van een docent of toa. Wageningen University aanvaardt geen enkele aansprakelijkheid voor schade die voortvloeit uit het verrichten van dit experiment buiten de campus van Wageningen University.

Resultaten

In figuur 1 is een voorbeeld te zien van een plaat, na kleuring met Congorood.



Figuur 1: Plaat na kleuring met Congorood.

Uitwerking van de vragen

- 1 In het antwoord moet terugkomen dat het experiment een groot aantal tekortkomingen kent. Enkele voorbeelden:
 - CMC is een andere stof dan gewone cellulose. De bereikbaarheid van cellulose in houtafval voor cellulase is veel slechter dan CMC in oplossing.
 - De werkelijke productiesnelheid van het cellulase is onbekend.

Cellulomonas knipt!

-Aantonen van afbraak van cellulose door *Cellulomonas sp.*-

- De samenstelling van het voedingsmedium is nogal uitgebreid. Dit kan een te hoge kostenpost betekenen.
 - Je kunt een experiment met agarplaten niet zonder meer opschalen naar een reactor. Industriële reactoren werken bij voorkeur met een vloeibaar medium.
- 2 Om te controleren of het voedingsmedium zonder bacteriën niet zelf al een hydrolyserende werking heeft op de CMC.

