



CHALMERS

Värmestabila enzym från svampen *Scytalidium thermophilum*

Kandidatarbete inom bioteknik

Författare:

BERGKLINT Sofia
BERGMAN Sebastian
LARSSON Elise
NYDAHL Karin
PERSSON Frida
ÅSTRÖM Marianne

Handledare:

LARSBRINK Johan
HÜTTNER Silvia
ARNLING BÅÅTH Jenny

Examinator:

ALBERS Eva

Institutionen för Biologi och bioteknik

CHALMERS TEKNISKA HÖGSKOLA

Göteborg, Sverige 2017

Förord

Vi som har skrivit denna rapport är sex tredjeårsstudenter på civilingenjörsprogrammet i bioteknik, Institutionen för Biologi och bioteknik, Chalmers tekniska högskola. Projektet är vårt kandidatarbete och genomfördes under vårterminen 2017, omfattningen är 15 hp per student.

Arbetet bygger på ett tidigare kandidatarbete, *Karaktärisering av tropiska svampar och deras enzymer*, BBTX01-16-06, som genomfördes våren 2016 av John Andersson, Josefin Blell, Edvin Blomstrand, Olle Hartvigsson, Hanna Törnkvist och Alvina Westling.

Vi vill framföra ett stort tack till vår handledare Johan Larsbrink som under hela projektet har guidat och stöttat oss i projektets utformning. Vi vill särskilt tacka för all din noggranna och konstruktiva kritik vid rapportskrivandet, det var guld värt.

Stort tack även till handledarna Jenny Arnling Bååth och Silvia Hüttner för all hjälp och stöttning med det laborativa arbetet, det hade inte gått utan er. Vi har uppskattat att vi kunnat fråga er om allt ifrån upplägg till små detaljer, när som helst, utan att vi känt oss i vägen eller att vi stört er.

Tack till alla på labbet för industriell bioteknik och tack till Göteborgs Universitet för att vi fick använda er laborationssal.

Sammanfattning

De miljöproblem som världen idag står inför beror till stor del på förbränning av fossila råvaror. En av de största utmaningarna för att minska den negativa miljöpåverkan är att hitta sätt att använda förnybart kol, till exempel i form av växtbiomassa, istället för fossilt. I detta kandidatarbete, som genomförts på Chalmers tekniska högskola år 2017, har den sedan tidigare okända stammen FCH 6.2 av den termofila filamentösa svampen *Scytalidium thermophilum* undersökts som källa till enzym för omvandling av växtbiomassa. Målet med projektet var att hitta så effektiva och värmestabila enzym som möjligt. Därför har svampen odlats på flera olika odlingssubstrat (kolkällor), samt enligt två olika odlingsmetoder, flytande kultur och en kultur där endast en liten mängd vätska tillsätts till kolkällan. Målet var sedan att jämföra resultaten mellan olika odlingar för att se vilken kolkälla och odlingsmetod som genererat mest enzym med så hög enzymatisk aktivitet som möjligt. För att kunna jämföra de olika odlingarna mättes proteinkoncentrationen i extraktionslösningarna. Därefter jämfördes enzymens aktivitet på både naturliga polysackarider och syntetiska enzymsubstrat. Resultatet visade att *S. thermophilum* producerade värmestabila enzym som hade aktivitet vid både 60° C och 70° C. Därav kan enzym producerade av *S. thermophilum* FCH 6.2 vara av intresse för användning inom industrier. Mer forskning skulle kunna visa vilka enzym som produceras vid odling på olika kolkällor. Vidare vore det intressant att jämföra enzymen med kommersiella enzymblandningar för att få en uppfattning om enzymens effektivitet.

Abstract

The environmental problems that the world faces today depends largely on combustion of fossil fuels. One of the greatest challenges is therefore to find novel ways to discover renewable carbon-based energy sources to reduce the negative environmental impact. This could be done by using different forms of plant biomass, instead of fossil. In this bachelor project, conducted at Chalmers University of Technology during 2017, a specific fungus was examined as a source for enzymes for conversion of plant biomass. More specifically, the previously unknown strain named FCH 6.2 of the thermophilic filamentous fungus *Scytalidium thermophilum*. The goal with the project was to find as effective and thermostable enzymes as possible. Therefore, the fungus was grown on several different types of growth substrates and carbon sources. Furthermore, it was grown according to two different types of cultivation techniques, liquid culture and solid state fermentation. The purpose was to compare the results between the different cultures, to see what type of carbon source and cultivation technique that generated the largest amount of enzyme, with the highest possible enzymatic activity. The protein concentrations were measured in the extraction solutions to compare the different cultures. Thereafter the enzymatic activity was compared on both natural polysaccharides and synthetic enzyme substrates. The result showed that *S. thermophilum* produced heat-resistant enzymes with activity at both 60 ° C and 70 ° C. Hence, enzyme produced by *S. thermophilum* FCH 6.2 may be of interest for use in industries. More research could show which enzymes are produced when the fungus is grown on different carbon sources. Furthermore would it be interesting to compare the enzymes with established enzyme cocktails to get an idea of the enzymes efficiency.

Innehållsförteckning

1. Inledning	1
1.1 Syfte och problemformulering	2
1.2 Avgränsningar	2
2. Teori	4
2.1 Kolkällor som användes för odling av <i>S. thermophilum</i>	4
2.1.1 Cellulosa	6
2.1.2 Hemicellulosor	6
2.1.3 Vetekli	8
2.1.4 Trä - uppbyggnad av växtcellväggen	8
2.2 Enzym	9
3. Metod	11
3.1 Sportillväxt	11
3.2 Odling av <i>S. thermophilum</i> på olika kolkällor	12
3.2.1 Flytande odling	12
3.2.2 SSF-odling	12
3.3 Enzymextraktion ur biomassa	13
3.4 Enzymanalys	13
3.4.1 Mätning av proteinkoncentration	13
3.4.2 Koncentrationsmätningar på reducerande sockerändar	13
3.4.3 Aktivitetsmätningar på syntetiska substrat	15
4. Resultat och analys	17
4.1 Odlingar	17
4.2 Bradfordanalys	18
4.3 Aktivitetsmätningar över natt	19
4.4 Koncentrationsmätningar vid tidsuppföljning	21
4.5 Koncentrationsmätningar vid temperaturökning	23
5. Diskussion	27
6. Slutsats	29
Källförteckning	30
Bilaga 1	33
Bilaga 2	35

1. Inledning

En av vår tids största utmaningar är att hitta lösningar på de klimathot som världen står inför. En betydande orsak till den globala uppvärmning som sker idag är förbränning av fossila råvaror. Idag används fossila bränslen inom många olika områden, och förbränning av dessa bränslen leder till koldioxidutsläpp som i sin tur i hög grad bidrar till den globala uppvärmningen. Vidare är tillgången på fossila bränslen begränsad och det är därför inte ett hållbart alternativ varken ur miljösynpunkt eller ur tillgångssynpunkt. Ett sätt att minska den globala uppvärmningen kan vara att byta ut fossilt kol mot förnybart kol i industriella processer (Newman, 2008).

Växtbiomassa är den största källan till förnybart kol på planeten och skulle kunna användas istället för fossilt kol (Kaur et al., 2015). Växtbiomassa är biologiskt material som består mestadels av polymerer såsom polysackarider och lignin (Tao, 2014). Idag används växtbiomassa i många processer inom till exempel skogs- och massaindustrin. Att kunna tillvarata energin som är lagrad i växtbiomassan är önskvärt både vid industriella processer och vid biobränsletillverkning via fermentering av enkla sockerarter. Ett problem med dagens processer är att det i dessa bildas restprodukter av växtbiomassa som är svåra att omvandla till något användbart. Exempel på sådana produkter är lignin och hemicellulosa som bildas som restprodukter i massa- och pappersindustrin (Pińkowska, Wolak, & Złocińska, 2011). Med rätt omvandlingsmetod skulle dessa produkter exempelvis kunna användas som drivmedel (Van Den Brink & De Vries, 2011). En fördel med att ta tillvara på spill- eller outnyttjade produkter är att det inte konkurrerar med nuvarande matproduktion (Cox, 2014).

I naturen bryts växtbiomassa till stor del ner av mikroorganismer som använder sig av enzym för nedbrytningen. Många av dessa nedbrytande mikroorganismer är svampar (Demirbas, 2014). Svampar är heterotrofa, vilket innebär att de får sin energi genom att bryta ner organiskt material såsom växtbiomassa. För att överleva behöver svampen tillgodose sitt behov av flera näringsämnen, bland annat kol, kväve och fosfor. Polysackariderna i växtbiomassan tillgodoser svampen med kol och energi, och kommer i detta arbete att kallas för kolkällor. För att kunna bryta ner växtbiomassan utsöndrar svamparna extracellulära enzym från hyferna (Taylor, Raper, & Williams, 2014). Den nedbrutna växtbiomassan kan sedan tas upp av svampen och användas som näring. Växtbiomassan utgörs av komplexa substrat, som innehåller många olika typer av bindningar, och bryts ner bland annat genom att polysackarider bryts ner till monosackarider och korta oligosackarider (Mäkelä & de Vries, 2014). Det finns grupper av enzym som klipper från kedjornas ändar (exo-aktivitet) och enzym som klipper mitt i en kedja (endo-aktivitet) (Percival Zhang, Himmel, & Mielenz, 2006).

Det är möjligt att utvinna svampars enzym för nedbrytning av växtbiomassa även för industritekniska tillämpningar. Enzym används industriellt inom många olika områden, till exempel vid tillverkning av textil, rengöringsmedel och djurfoder (Mäkelä & de Vries, 2014). Inom industrin finns det idag en stor efterfrågan av enzym som kan bidra till kostnadseffektiva processer (Li, Yang, Yang, Zhu, & Wang, 2012). För att upptäcka nya enzym kan ostuderade svampar studeras. Det finns omkring 1,5 miljoner svamparter och av dem är enbart fem procent beskrivna i litteraturen. Den största biologiska mångfalden förväntas finnas i tropiska miljöer (Berrin et al., 2012). Denna mångfald bidrar till stor diversitet olika arter emellan och därmed också mellan deras enzym. Dessutom påverkar odlingsbetingelser vilka gener som uttrycks hos svampen (Boonlue, Aimi, & Morinaga, 2003), vilket leder till att olika enzym produceras då svampen växer på olika kolkällor. Till en början försöker alltid svampen att ta till sig enkla

substrat som exempelvis glukos eftersom det är mindre energikrävande. Därför uttrycks gener för produktion av enzym som bryter ned mer komplexa substrat först då den filamentösa svampen inte har tillgång på annat (Amore, Giacobbe, & Faraco, 2013). För att få fram effektiva enzymblandningar kan olika svampars enzym kombineras (Mäkelä & de Vries, 2014).

Vid sökandet av nya effektiva enzym är termofila svampar särskilt intressanta. Termofila arter trivs i värme och kan leva vid temperaturer över 40 °C. Många termofila arter har ett temperaturoptimum vid 45- 50 °C (Wiegant, 1992). Enzym från termofila organismer är verksamma vid högre temperaturer och är då särskilt intressanta för industriella processer. Vid högre temperaturer går kemiska processer snabbare och enzym från värmetåliga svampar skulle kunna ge effektivare processer med minskad risk för mikrobiell kontaminering, då färre mikroorganismer kan växa vid höga temperaturer (Madigan, Martinko, Bender, Buckley, & Stahl, 2015). För att öka användningen av enzym fokuserar numera en stor del av enzymforskningen på termofiler för att hitta termostabila enzym med potentiell stor användning inom industrin (Basotra, Kaur, Di Falco, Tsang, & Chadha, 2016).

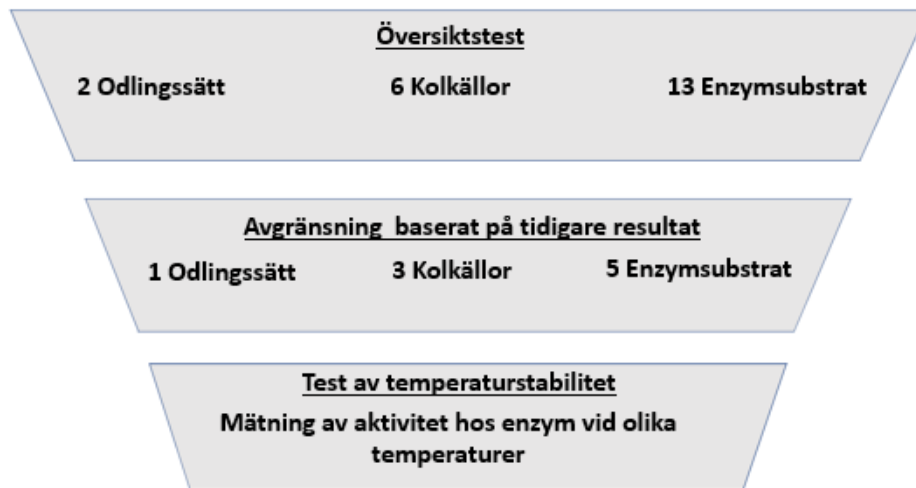
1.1 Syfte och problemformulering

En termofil och filamentös svamp som har visat god tillväxt vid 50 °C och förmåga att bryta ned olika typer av växtbiomassa är *Scytalidium thermophilum* (Wiegant, 1992). I ett kandidatarbete, som genomfördes år 2016 på Chalmers tekniska högskola, studerades bland annat stammen FCH 6.2 av *S. thermophilum* (Blomstrand, Hartvigsson, Törnkvist, & Westling, 2016). Stammen FCH 6.2 är sedan tidigare ostuderad och isolerades från kompost i Vietnam där den växte på flera olika näringskällor. Blomstrand et al. (2016) visade att FCH 6.2 växte bland annat på cellulosa, xylan, xylos och mer komplexa kolkällor som vetekli. Svampstammen valdes ut bland sex andra svampstammar av samma art till detta kandidatarbete, eftersom den växte snabbt och hade tillväxt på många kolkällor. Det är okänt hur mycket FCH 6.2-stammen skiljer sig från andra studerade stammar av *S. thermophilum*.

Målet med detta kandidatarbete är att undersöka värmestabiliteten hos enzym som producerats av svampen *S. thermophilum*. Då svampen odlas på olika kolkällor erhålls olika kombination av enzym, det vill säga olika fenotyper. Därför har inverkan på enzymens stabilitet undersökts, med avseende på olika odlingssubstrat i form av olika kolkällor. För att få en uppfattning om enzymens egenskaper och effektivitet genomfördes aktivitetsmätningar med två olika mätmetoder. För båda metoderna användes spektrofotometri för att mäta färgomslag. Färgomslaget indikerade i hur stor utsträckning en reaktion skett och kan relateras till aktiviteten hos enzymen. Eftersom egenskaperna hos stammen FCH 6.2 till stor del är okända är det intressant att jämföra två olika odlingssätt för att se vilken typ av odling som är bäst för denna stam vid enzymproduktion.

1.2 Avgränsningar

Projektet var från början avgränsat till att endast behandla stammen FCH 6.2 av *S. thermophilum*. Projektet avgränsades så att svampen endast odlades vid 50 °C. Vid temperaturanalyser av enzymen valdes temperaturerna 50, 60 och 70°C. Med hänsyn till projektets tidsbegränsning var det inte genomförbart att testa en större mängd olika kolkällor.



Figur 1. Avgränsningar under projektets gång.

I projektets översiktsförsök odlades svampen enligt två olika odlingsmetoder på de kolkällor som valdes ut vid projektets början: galaktomannan, cellulosa, xylan, vetekli, barkpulver från gran och träpulver från gran. Enzymlösningar från odlingarna analyserades först genom mätning av den totala proteinkoncentrationen och analyserades därefter med två olika aktivitetsmätningar. Den odlingstyp, de kolkällor samt de enzymsubstrat som gav bäst aktivitet valdes ut för fortsatta studier. Figur 1 visar avgränsningar som skedde under projektets gång.

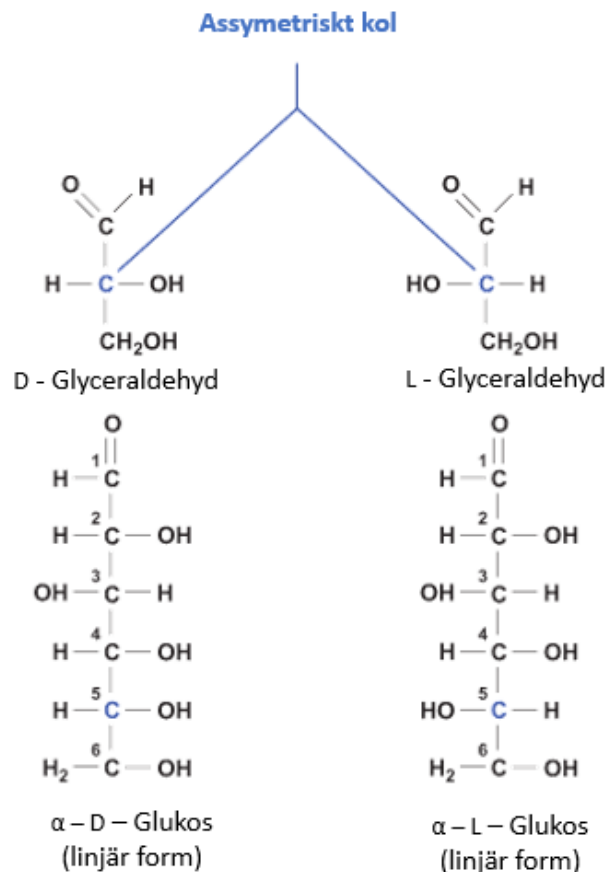
2. Teori

I kapitel två presenteras ett teoretiskt ramverk som är nödvändigt för att förstå kandidatarbetet. Först redovisas de kolkällor som svampen *S. thermophilum* har odlats på, därefter följer ett avsnitt om enzym. Det bör noteras att vissa kolkällor som används som odlingssubstrat även tillämpades som enzymsubstrat för aktivitetsmätning. Begreppet kolkälla definieras i rapporten som det odlingssubstrat som svampen fick växa på för att få tillgång till kol och energi.

2.1 Kolkällor som användes för odling av *S. thermophilum*

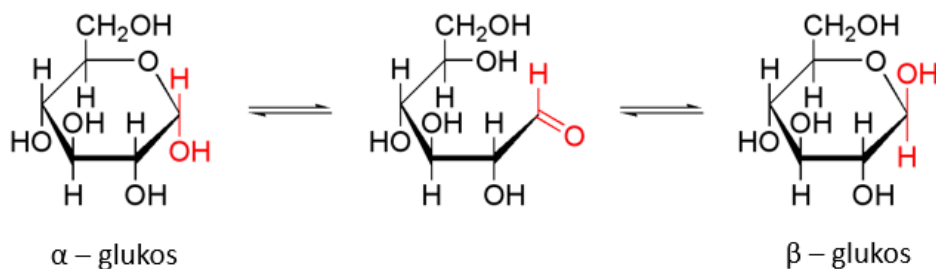
Polysackarider är kolhydrater som består av långa kedjor av sammanlänkade monosackarider. Om polysackariden är uppbyggd av enbart en typ av monosackarid, till exempel stärkelse eller cellulosa som består av D-glukos, klassificeras den som en homopolysackarid. Om den däremot är uppbyggd av olika slags monosackarider klassificeras den istället som en heteropolysackarid. Skillnaden mellan polysackarider och oligosackarider är svårdefinierad, men en tumregel säger att en oligosackarid består av en kortare kedja på mindre än tio sammanlänkade monosackarider (Hassid, 2014).

En monosackarid klassificeras efter dess karbonylgrupp samt antalet kolutomer i molekylen. Om en kolutom kan binda till fyra olika grupper kallas den för kiral. En monosackarid som innehåller en kiral kolutom har stereoisomerer, vilket innebär att de två molekylerna är spegelbilder av varandra men har samma kemiska och fysikaliska egenskaper. De skiljer sig åt gällande i vilken riktning de roterar planpolariserat ljus. Isomeren benämns som D om ljuset roteras åt höger och L om ljuset roteras åt vänster (McGrane, 2014). En vanlig monosackarid är glukos, vars isomerer illustreras i Figur 2.



Figur 2. Stereoisomerer (D och L) av glyceraldehyd och glukos. Då planpolariserat ljus roteras åt höger benämns isomeren som D och om ljuset roteras åt vänster benämns molekylerna istället som L (McGrane, 2014). Figuren används med tillstånd från McGraw-Hill Education.

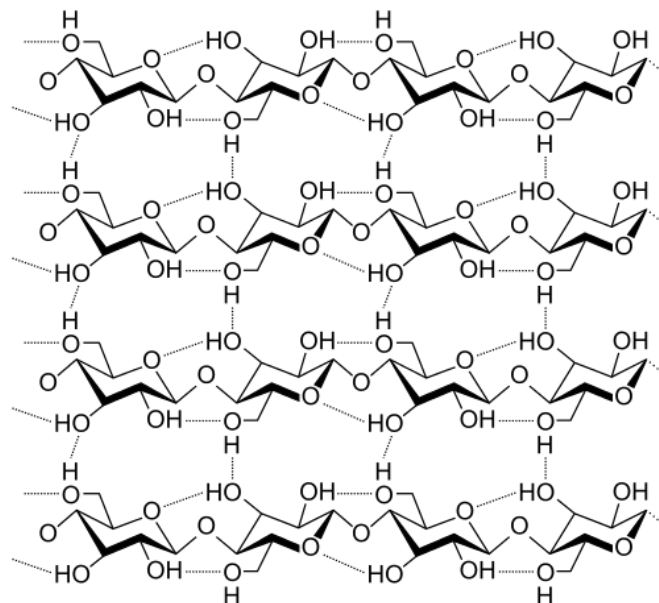
Monosackarider bildar ofta intramolekylära ringstrukturer. Då existerar istället diastereomererna α och β , och strukturen skiftar i lösning mellan dem. Dessa har till skillnad från L- och D-isomerer olika kemiska och fysikaliska egenskaper. Om OH-gruppen pekar ut axiellt från ringen benämns molekylerna som β och om gruppen pekar ut ekvatoriellt klassificeras monosackariden som en α -isomer (McGrane, 2014), vilket illustreras i Figur 3. Då monosackarider binder samman till oligo- eller polysackarider kan de däremot inte skifta mellan α och β strukturer.



Figur 3. Jämvikt för glukosstruktur. Då hydroxidgruppen i en ringformad glukosmolekyl pekar ut ekvatoriellt benämns molekylerna som en α -isomer, då den pekar ut axiellt klassificeras molekylerna istället som en β -isomer (Calvaro, 2006). CC BY-SA.

2.1.1 Cellulosa

Cellulosa är den mest förekommande och starkaste beståndsdel i trä, och är lokaliserad i cellväggen. Polymeren är en homopolysackarid som består av β -D-glukopyranosenheter som binds ihop via glykosidbindningar (Sjöström, 1993), se Figur 4.



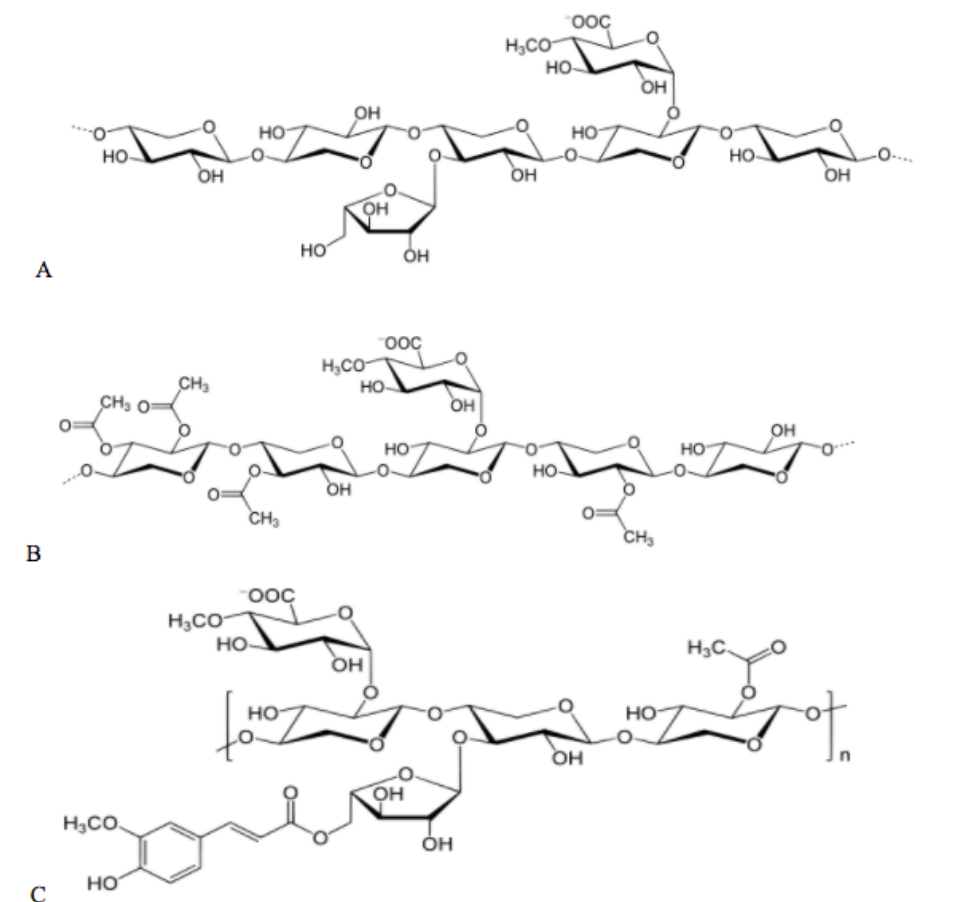
Figur 4. Illustration av den kemiska uppbyggnaden av cellulosa, som är uppbyggd av β -D-glukopyranosenheter länkade via glykosidbindningar (Laghi, I., 2013). CC BY-SA.

Cellulosakedjor är helt linjära och tenderar att bilda intermolekylära vätebindningar. De bildar en kristallin struktur och är helt olösliga. Kedjorna har en icke-reducerande ände och en reducerande ände (aldehyd) (Sjöström, 1993). Även om polymeren består av linjära glukankedjor är den svärnedbruten (Peciulyte, Anasontzis, Karlström, Larsson, & Olsson, 2014).

2.1.2 Hemicellulosor

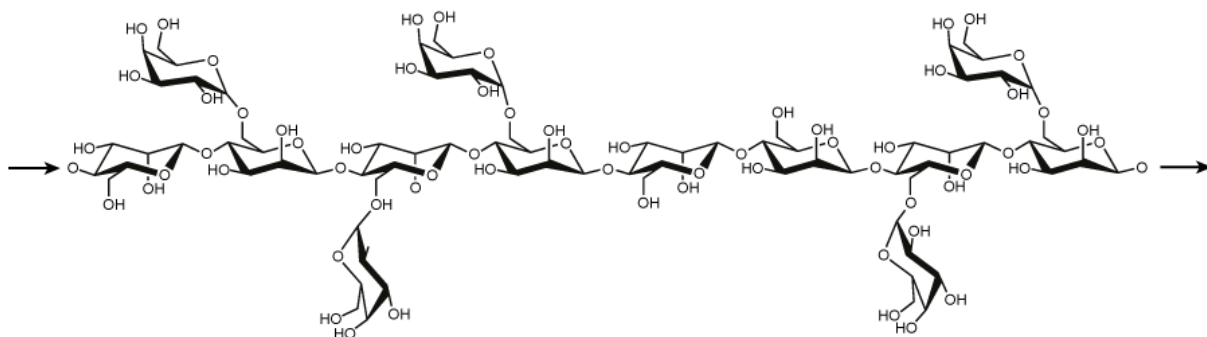
Hemicellulosor är till skillnad från cellulosa generellt heterogena polysackarider. Mängden hemicellulosor i trä är omkring 20–30 % av torrvikten och polysackariderna är viktiga beståndsdelar i cellväggen. Hemicellulosor är uppbyggda av hexoser som D-glukos, D-mannos samt D-galaktos och pentoser, som D-xylos och L-arabins. Uppbyggnaden skiljer sig mellan hemicellulosor i barrved och i lövved. Galaktomannan, arabinoglukuronoxylan och arabinogalaktan är de mest förekommande hemicellulosorna i barrved, medan xylan och glukomannan är de mest förekommande i lövved. Polysackariderna är mindre stabila än cellulosa (Henriksson & Lennholm, 2009).

Xylan är den mest förekommande hemicellulosan som främst består av en huvudkedja av sammanlänkade xylosenheter. Strukturen och uppbyggnaden skiljer sig mellan olika växter, för exempel på strukturer se Figur 5. I barrved är xylaner surare eftersom de innehåller fler 4-O-metyl-D-glukuronosylenheter. Xylaner i barrved innehåller även L-arabinosidogrupper, medan xylaner i lövved är acetylerade (Henriksson & Lennholm, 2009). I gräsarter som exempelvis vetekli innehåller xylan även sidogrupper av fenolsyror (Ebringerová & Heinze, 1999).



Figur 5. A. Illustration av den kemiska strukturen för xylan i lövved. B. Den kemiska strukturen för xylan i barrved. Som illustreras innehåller xylan i barrved fler karboxylsyror och är därmed surare än xylaner i lövved. C. Illustration av xylan i gräsarter. Den aromatiska gruppen är en ferulsyra (Yikrazuul, 2009). CC BY-SA.

En annan typ av hemicellulosa är galaktomannan, som är en vanligt förekommande hemicellulosa i barrved. Uppbyggnaden består av en huvudsakligen linjär molekyllkedja med små förgreningar, se Figur 6. Huvudkedjan består av (1-4) β -D-mannopyranos med sidogrupper av (1-6) α -D-galaktospyranos (Henriksson & Lennholm, 2009).



Figur 6. Den kemiska strukturen för galaktomannan som är uppbyggd av en huvudkedja mannosenheter och sidogrupper av galaktos. Figuren används med tillstånd från Johan Larsbrink.

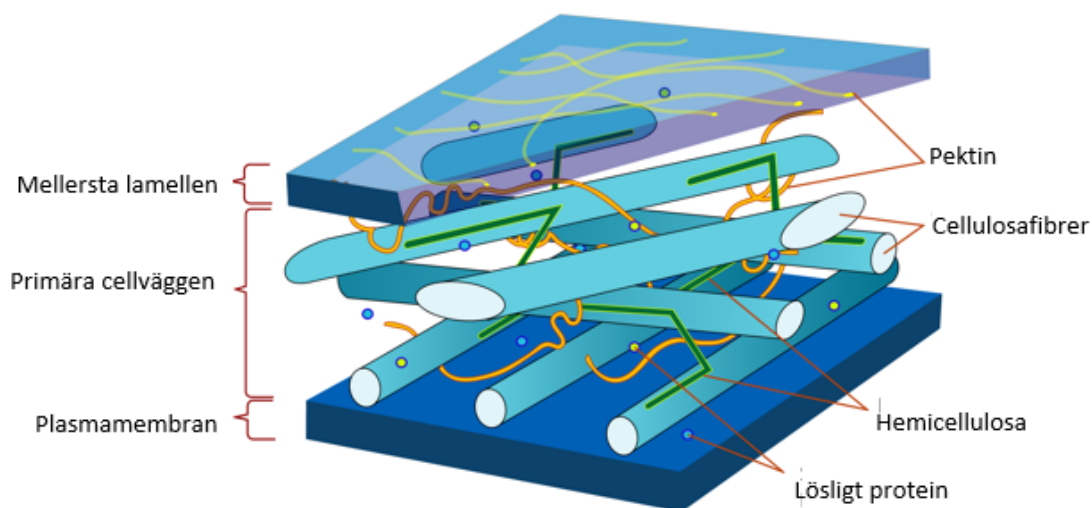
2.1.3 Vetekli

Vetekli är en komplex kolkälla som tas fram från det yttre lagret på vetekornet. Detta lager består av fyra tunna skikt som tillsammans består till 53 % av kostfiber. Resterande innehåll är vitaminer, mineraler och bioaktiva föreningar såsom fenolsyror (Onipe, Jideani, & Beswa, 2015). Kostfiber är de kolhydrater som människans enzym inte kan bryta ned, utan nedbrytningen sker av mikroorganismer i främst tjocktarmen (McGraw-Hill Education, 2003). Materialet är uppbyggt av cellulosa, hemicelluloser och pentosanpolymerer bestående av xylos och arabinos bundna till proteiner. Det finns lösliga och olösliga kostfiber. De lösliga som står för cirka 5 %, består främst av glukos och xylan (Onipe et al., 2015).

2.1.4 Trä - uppbyggnad av växtcellväggen

Cellväggen hos växter består främst av polysackarider, men även lignin, lipider och proteiner. Cellväggen beskrivs ofta utifrån dess primära och sekundära struktur. Alla växtceller omges av en primär cellvägg som ger dess slutgiltiga form och storlek. Den sekundära cellväggen skapas sedan då ved bildas, dess funktion är att ge mekanisk styrka (Sørensen & Rose, 2014).

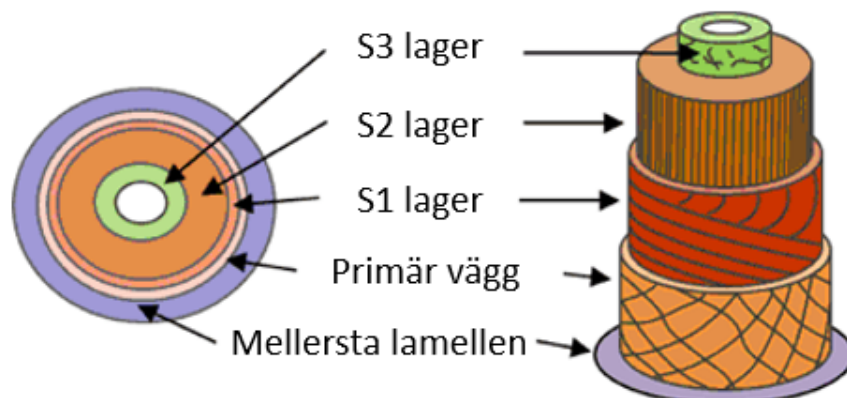
Den primära cellväggen är uppbyggd av ungefär lika mängder cellulosa, hemicelluloser och pektin, se Figur 7. Hemicelluloser binder in till cellulosa, och deras funktion i cellväggen är att ge stadga (Sørensen & Rose, 2014). Pektin är en klass av heterogena polysackarider som har en adhesiv funktion i cellväggen (Whistler & Daniel, 2014).



Figur 7. Illustration över den primära cellväggen hos växter. Cellulosa och hemicellulosa binder till varandra och befinner sig i den primära cellväggen där de ger stadga. Pektiner återfinns i den primära cellväggen samt i mellersta lamellen där de har en adhesiv funktion (Villarreal, 2015). CC BY-SA.

Den sekundära cellväggen är placerad mellan plasmamembranet och den primära cellväggen, och är tjockare än den primära cellväggen. Den består främst av mycket kristallin cellulosa och dess funktion är att ge mekanisk styrka och skydd. Som illustreras i Figur 8 består den

sekundära cellväggen av flera olika lager. Cellulosafibrernas riktning varierar mellan lagren (Sørensen & Rose, 2014), vilket även illustreras i Figur 8.

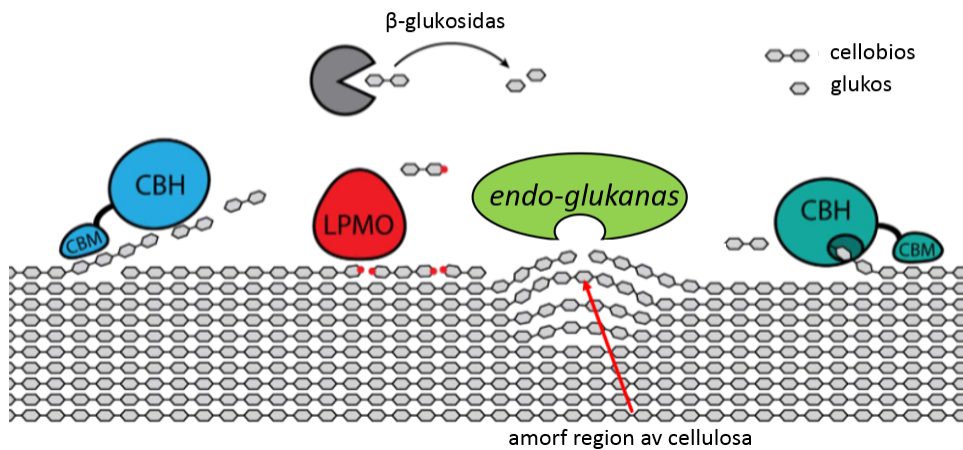


Figur 8. Figuren ger en modell av en sekundär cellvägg med olika lager. Beståndsdelen är främst kristallin cellulosa som har olika riktningar mellan lagren. Den sekundära cellväggen är mycket tjockare än den primära (Sørensen & Rose, 2014). Figuren används med tillstånd från McGraw-Hill Education.

2.2 Enzym

Enzym är mycket specifika katalysatorer, med en mängd olika funktioner i biologiska system. Vid kolhydratnedbrytning kan enzym ha förmåga att skilja på de sockerarter de binder till. De kan vara så specifika att de skiljer på vilken bindning mellan två monosackarider som de bryter ner (Wellner, 2016). Enzym kan erhållas genom att odla organismer på olika kolkällor. Eftersom olika kolhydrater har olika strukturer och bindningar behöver organismer producera olika typer av enzym för att kunna tillväxa på olika kolkällor (Peciulyte et al., 2014).

För att bryta ner kolkällor från växtmaterial krävs en blandning av olika enzym med olika funktioner. Cellulosa kräver ett flertal enzym för nedbrytning trots att det endast innehåller en monosackarid, glukos, med en enda sorts bindning, $\beta(1 \rightarrow 4)$ (Himmel et al., 2007). En orsak till att cellulosa är svårt att bryta ner är att den kompakta strukturen gör det mycket svårt för vatten och därmed enzym i vattenlösning att komma åt molekylen. Nedbrytning av cellulosa sker främst av enzymgrupperna endoglukanaser, cellobiohydrolaser, CBH, och lytiska polysackaridmonooxygenaser, LPMO. Då LPMO kan klippa mitt i strukturen, genom oxidation i kristallina regioner, bildas amorfa regioner som är mer tillgängligt för vatten och andra enzym, till exempel endoglukanaser, som tillsammans spjälkar kolhydratkedjorna till kortare oligosackarider, se Figur 9 (Himmel et al., 2007). Det öppnar upp fler ändar som exoaktiva enzym kan angripa, CBH är exoglukanaser som klyver av disackarider från ändarna av cellulosakedjorna. Disackariderna kallas cellobios, de i sin tur sönderdelas av β -glukosidaser till glukos, vilket minskar produktinhibering för de andra enzymen (Faraco, 2013).

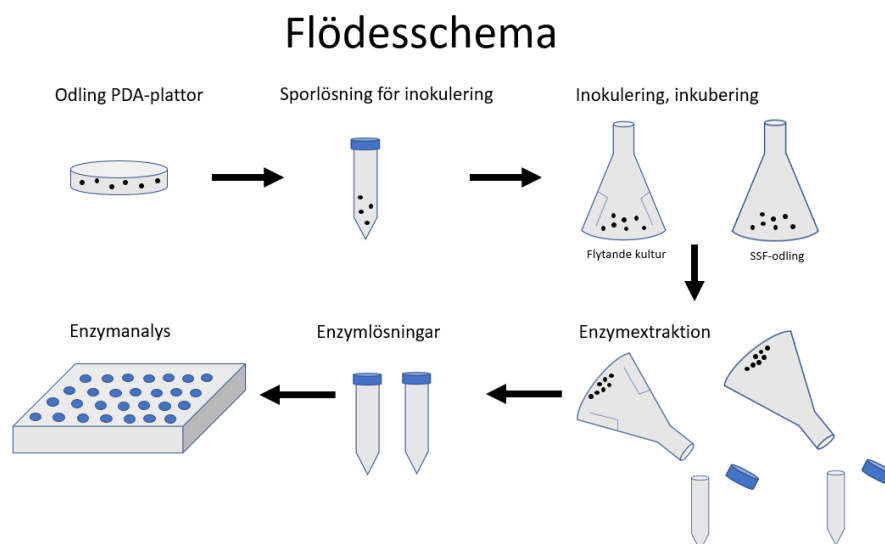


Figur 9. Nedbrytning av cellulosa med hjälp av olika enzym, figuren används med tillstånd från Johan Larsbrink.

Då hemicellulosa är en heterogen grupp av polysackarider krävs fler olika enzym för nedbrytning, dels enzym som bryter bindningar i huvudkedjorna, dels enzym som klipper av de grenade sidokedjorna. Två huvudgrupper av enzym är glykosidhydrolaser, GH och kolhydrateraser, CE (Faraco, 2013).

3. Metod

I kapitel tre presenteras de odlingsmetoder samt metoder för enzymanalys som har använts. Figur 10 visar ett förenklat flödesschema där det går att följa alla steg från de första odlingarna till enzymanalys.



Figur 10. Översiktligt flödesschema för alla steg från odling på PDA-plattor (potatisdextrosagar) till enzymanalys.

Apparater, utrustning och kemikalier som användes fanns på avdelningen för industriell bioteknik. De kemikalierna som köptes in specifikt för projektet var vissa syntetiska enzymsubstrat från Carbosynth. För att undvika kontamination, både till och från svampkulturen, utfördes allt arbete med kulturerna med sterilteknik i laminärflödesbänk, avsedd för arbete med svamp. När enzymen extraherats krävdes inte sterilt arbete, utan enzymanalyserna utfördes i dragskåp som skydd mot de kemikalier som användes. Allt vatten som användes i laborationerna var ultrarenat genom filtrering med vattenrenare från Millipore, så kallat MilliQ®-vatten. Absorbansmätningarna utfördes i en spektrofotometer för mikrotiterplattor, FLUOstar® Omega, BMG Labtech, med linjärt område mellan 0 och 4 för absorbans.

3.1 Sportillväxt

För att erhålla tillräcklig mängd svampsporer som krävs för att inokulera odlingar med *S. thermophilum*, odlades svampen i petriskålar på potatisdextrosagar, PDA. PDA är ett komplext medium som ger god tillväxt för en mängd mikroorganismer. PDA-lösning bereddes genom att PDA-pulver (Sigma-Aldrich) löstes upp i angiven mängd MilliQ®-vatten så att en koncentration på agar 15 g/l, dexros 20 g/l och potatisextrakt 4 g/l erhöles. Den färdigblandade PDA-lösningen autoklaverades innan den, fortfarande varm, hälldes upp i tomma, sterila petriskålar och tilläts stelna.

Till varje PDA-platta tillsattes 1 ml sporlösning från tidigare odling, plattorna inkuberades vid 50 °C i 7 dagar. Efter avslutad tillväxt tillsattes 5-10 ml autoklaverad Tween 80-lösning 0,05 % till varje platta för att frigöra de bildade sporer. Med hjälp av en rackla skrapades sporer av från PDA-plattan. Lösningen pipetterades över till ett 50 ml-provrör och utgjorde sporlösningen som senare användes för inokulation av flytande kulturer och SSF-odlingar.

Ett litet prov av sporlösningen användes för räkning av sporer i Neubauer improved-räknekammare under ett mikroskop, för att bestämma koncentrationen av sporer. Efter tillväxt används sporlösningen för att med känd mängd sporer inokulera andra odlingar. Sporlösningen från PDA-plattorna förvarades i kylskåp vid 4 °C. För att bevara kulturen på längre sikt gjordes 35 % -glycerollösningar, där 875 µl glycerol blandades med 1625 µl sporlösning och placerades i frysen vid -20 °C.

3.2 Odling av *S. thermophilum* på olika kolkällor

En odling av mikroorganismer behöver medium med näringsämnen och spårämnen. Ett minimalt medium användes, då det var viktigt att exakt känna till vilka näringsämnen svampen hade att tillgå. Ingredienser till minimalmedium vägdes upp och blandades. 4 g KH_2PO_4 , 13,6 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,8 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,6 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 6 g Bacto Peptone till 1 liter MilliQ®-vatten lösningen autoklaverades. Spårämneslösning tillreddes separat, 100 mg $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 32 mg $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 28 mg $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 40 mg $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ och 0,4 mg $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ till 100 ml MilliQ®-vatten. 10 ml av spårämneslösningen tillsattes 1 liter av minimalmediet (Peciulyte et al., 2014). Det minimalmediet som bereddades innehöll allt svampen behövde för tillväxt förutom energi- och kolkälla, som tillsattes separat i varje experiment. Den totala halten av kolkälla ska enligt protokollet utgöra ungefär två volymprocent av lösningen (Peciulyte et al., 2014).

De kolkällor som testades var galaktomannan, cellulosa, xylan, vetekli, barkpulver från gran och träpulver från gran.

3.2.1 Flytande odling

De flytande kulturerna preparerades genom att tillsätta 0,5 g kolkälla i en 250 ml E-kolv med bafflar för bättre omblandning och därmed bättre syresättning. E-kolven med kolkällan autoklaverades för att undvika kontamination. Därefter tillsattes 25 ml minimalmedium samt 3 ml sporlösning. E-kolven placerades i en skakinkubator så tillväxt kunde ske vid 50 °C och 150 rpm i sju dagar. Till alla kulturer i E-kolv användes en porös kork som tillät luft passera. Skakinkubatorn hade genomskinliga väggar för ljusgenomsläpp. För att undvika att kolkälla och sporer fastnade på E-kolvens väggar, genomfördes regelbundna kontroller av odlingarna under tillväxtperioden, då försök gjordes att få ner material som fastnat på kärlets väggar. För att erhålla mer statistiskt säkerställda resultat förbereddades två biologiska replikat av varje odling.

I de sista odlingarna som genomfördes användes dubbla mängden av kolkälla, minimalmedium och mängd sporer i en 500 ml E-kolv för att få ut en större volym enzymlösning.

3.2.2 SSF-odling

Liksom den flytande odlingen använder sig SSF-odlingen av minimalmedium och olika typer av kolkällor. SSF är en odling där organismer växer på fast massa. Till skillnad från den flytande odlingen kommer sporer i SSF att växa utan omskakning. Detta odlingssätt efterliknar mer naturliga förhållanden för svampen jämfört med den flytande odlingen, vilket kan resultera i högre enzymkoncentration (Kachlishvili, Penninckx, Tsiklauri, & Elisashvili, 2006).

SSF-odlingarna förbereddades genom att tillsätta 4 g kolkälla i en 125 ml E-kolv utan bafflar som därefter autoklaverades. Efter autoklaveringen tillsattes cirka 12 ml näringsmedium samt 3 ml sporlösning. E-kolven inkuberades därefter i ugn vid 50 °C i sju dagar. Odlingarna följdes upp regelbundet under odlingsperioden för att undvika uttorkning. Till odlingar som ansågs vara för torra tillsattes ytterligare medium. För att erhålla mer statistiskt säkerställda resultat förbereddades två biologiska replikat av varje odling.

3.3 Enzymextraktion ur biomassa

Då tillräcklig tillväxt uppnåtts i den flytande kulturen överfördes odlingen till ett 50 ml-provrör och centrifugerades vid 4500 rpm i 5 minuter för att bli av med celler och stora partiklar från kolkällan. Supernatanten dekanterades över i en bägare. Lösningen drogs upp i engångsspruta och filtrerades genom nylonfilter med porstorlek 45 µm.

Till SSF-odlingen tillsattes 25 ml MilliQ®-vatten till respektive E-kolv och placerades därefter i en skakinkubator i en halvtimme. Därefter filtrerades innehållet genom ett Miracloth-filter i en büchnertratt. Lösningen filtrerades därefter ytterligare genom ett nylonfilter med porstorleken 45 µm. Efter filtrering kommer supernatanten främst innehålla proteinblandningen för just den kolkällan (Kachlishvili et al., 2006). De erhållna lösningarna kallas härnäst enzymlösningar, och de förvarades i kylskåp vid 4 °C.

3.4 Enzymanalys

Projektets metoder för enzymanalys är spektrofotometriska och använder ämnen med kromofora funktionella grupper, till exempel aromatring eller dubbelbindningar (Grimm, Porra, Rüdiger, & Scheer, 2006).

3.4.1 Mätning av proteinkoncentration

För att mäta totala mängden protein som utsöndrats av svampen kan Bradfordanalys utföras. Bradfordanalys ger en snabb och enkel uppskattning av proteinkoncentrationen i en lösning genom att ett färgämnes absorptionsmaximum ändras då det ospecifikt binder till protein (Bradford, 1976).

För att få en standardkurva som relaterar proteinkoncentration till absorbans, tillreddes en spädningsserie med kända koncentrationer av bovin serumalbumin, BSA (ThermoFisher Scientific). Koncentrationerna som tillreddes var 0, 25, 125, 250, 500 och 750 µg/ml. Därefter togs 10 µl av varje spädning samt ett blankprov i triplikat och 200 µl Bradfordreagens (ThermoFisher Scientific) och överfördes till en 96-brunns mikrotiterplatta (Sarstedt). Plattan inkuberades i 10 minuter i rumstemperatur och absorbansmätning genomfördes vid 595 nm. En standardkurva plottades i Excel och en ekvation för att översätta absorbans till koncentration erhöles.

Enzymlösningar från odlingar av *S. thermophilum* på olika kolkällor användes därefter för mätningar av proteinkoncentration. Proverna behandlades enligt samma protokoll som standardkurvan enligt ovan. Proteinkoncentrationen i proverna beräknades med hjälp av standardkurvans relation mellan absorbans och koncentration.

3.4.2 Koncentrationsmätningar på reducerande sockerändar

Enzymaktiviteten i de erhållna enzymlösningarna, kan fastställas genom att mäta antalet reducerande sockerändar. De bildas då enzym klipper långa kolhydratkedjor i mindre bitar, där varje klipp ger en reducerande ände. Den reducerande änden kan detekteras med ett aromatiskt ämne, 3,5-dinitrosalicylsyra, förkortat DNSA. Sockermolekylens reducerande ände reagerar med DNSA vid 90 °C, varmed DNSA reduceras till 3-amino-5-nitrosalicylsyra, ANSA. ANSA är ett rödbrunt ämne med absorptionsmaximum vid 575 nm, som kan användas för detektion i spektrofotometer (Miller, 1959). Metoden är billig, snabb och enkel att utföra. Det som talar emot den är att den inte alltid är specifik utan kan ge utslag för andra reducerande ämnen än sockerarter som kan omvandla DNSA till ANSA. DNSA-metoden mäter ospecifikt endo- och exoaktivitet, då ett klipp i en sockermolekyl ger en reducerande och en icke-reducerande ände oavsett om klippet är i mitten eller i änden av en lång sockerkedja (McKee, 2017).

En stamlösning bereddes med 1 viktsvolym-% dinitrosalicylsyra, DNSA, 0,2 viktsvolym-% fenol och 1 viktsvolym-% natriumhydroxid, NaOH. Ingredienserna blandades i ett dragskåp, då de ingående ämnena är skadliga och stor försiktighet iaktogs. Den färdiga lösningen förvarades i rumstemperatur i skydd mot ljus. Fenol är ett giftigt, frätande ämne som är potentiellt skadligt att arbeta med. Anledningen till att detta ämne ingår i stamlösningen är att det femdubblar färgomslaget i lösningen och ökar analysmetodens upplösning (Miller, 1959).

En standardkurva som relaterade absorbansen med koncentrationen reducerande sockerändar erhöles genom att lösa 1,0 g D-glukosmonohydrat i 100 ml MilliQ®-vatten så att slutkoncentrationen blev 10 mg/ml. Från denna stamlösning bereddes en spädningsserie med koncentrationerna 0, 50, 100, 500, 750, 1000, 1500 samt 2500 µg/ml. 400 µl av varje spädning överfördes till ett eppendorfrör och 400 µl DNSA-lösning tillsattes. Eppendorfrören inkuberades vid 90 °C i 20 minuter, för att låta reaktionen för färgomslag ske och kylades därefter på is i 5 minuter. Triplikat av proven tillsattes sedan till brunnar på en mikrotiterplatta och absorbansmätning genomfördes vid 575 nm.

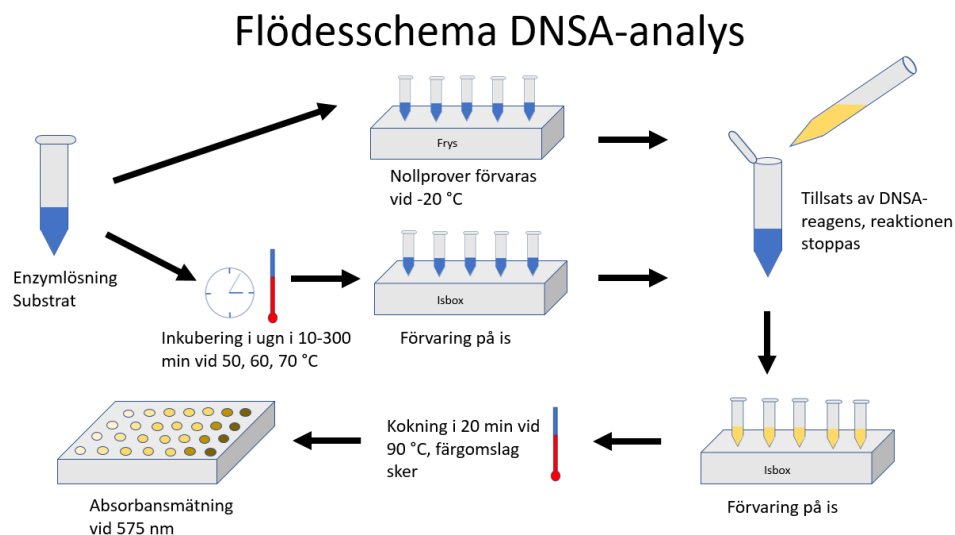
Standardkurvan är enbart gjord på glukos, vilket är lämpligt till försök där cellulosa används som substrat, då cellulosa är en polysackarid uppbyggd av enbart glukos-molekyler. För att få mer exakta resultat borde standardkurvan i varje undersökning anpassas efter vilken polysackarid som används som substrat. När xylan är substrat i DNSA-reaktionen borde således standardkurvan vara gjord på xylos (McKee, 2017), vilket inte utfördes i denna studie.

Fyra stycken 10 ml enzymsubstratlösningar bereddes genom att tillsätta antingen 100 mg mikrokristallin-cellulosa eller 50 mg xylan, galaktomannan eller vetekli till 15 ml provrör. Därefter tillsattes MilliQ®-vatten så att volymen 10 ml erhöles. Slutkoncentrationerna av enzymsubstratlösningarna blev 10 mg/ml för cellulosalösningen och 5 mg/ml för xylan-, mannan- och veteklilösningarna. Till eppendorfrör tillsattes 50 µl av aktuell enzymlösning och 450 µl enzymsubstratlösning i duplikat. Ett prov sattes direkt i frysen som ett nollprov, och det andra provet inkuberades vid 50 °C och omskakning över natt för att få de svårlösta enzymsubstraten att fördelas i provet. För vetekli visade det sig omöjligt att få samma mängd i varje rör med nämnda förfarande. För dessa prover vägdes 2,25 mg vetekli upp i varje eppendorfrör och 450 µl MilliQ®-vatten tillsattes, därefter tillsattes 50 µl enzymlösning.

Efter inkubering eller förvaring i frys, tillsattes lika volym DNSA-lösning (500 µl) för att stoppa den enzymatiska nedbrytningen av enzymsubstratet. Därefter kokades proverna på värmeblock i 90 °C i 20 minuter och kylades sedan på is. 200 µl av både inkuberade prover och nollprover från frysen överfördes till mikrotiterplatta i triplikat och absorbans mättes i spektrofotometer vid 575 nm. Värdena jämfördes med standardkurvan vid analys.

Vid tidsstudie utfördes laborationen enligt ovan med ett rör för varje inkuberingstid: 0, 10, 30, 60, 90, 120, 180, 240 och 300 minuter. Vid temperaturmätning utfördes laborationen enligt ovan vid 60 °C och sedan 70 °C med ett rör för varje inkuberingstid: 0, 10, 30, 60 och 180 minuter.

Figur 11 visar ett översiktligt flödesschema där det går att följa tillvägagångssättet för DNSA-analys.



Figur 11. Översiktligt flödesschema som visar tillvägagångssättet för DNSA-analys.

3.4.3 Aktivitetsmätningar på syntetiska substrat

En metod för att mäta aktiviteten hos enzym är *para*-nitrofenolanalys, så kallad *p*NP-analys. Resultatet från *p*NP-mätningar visar om en specifik enzymaktivitet förekommer. Det finns en mängd olika *p*NP-substrat att tillgå kommersiellt. Då enzymet klipper isär den aktuella bindningen frigörs *p*NP som vid basiska pH har en kraftigt gul färg. Intensiteten i färgen detekteras med hjälp av en spektrofotometer. Ett substrat testas åt gången och om enzymblandningen klyver bindningen mellan sockret och *p*NP-molekylen ger det färgutslag. Slutsatsen blir då att ett enzym med den aktuella aktiviteten som testats för finns i provet. Eftersom sockermolekylen är bundet direkt till *p*NP-molekylen kan metoden endast användas för att påvisa exoaktivitet hos enzym. (Bowers, McComb, Christensen, & Schaffer, 1980). Detta ger information om vilken klass av enzym blandningen innehåller.

En basisk natriumkarbonat-stopplösning, Na_2CO_3 , pH>11 med koncentrationen 1 M tillreddes från salt. Då molmassan för Na_2CO_3 är 105,98 g/mol, tillsattes 21,2 g Na_2CO_3 -salt till en rundkolv. Därefter tillsattes MilliQ®-vatten så att den slutgiltiga volymen i rundkolven blev 200 ml.

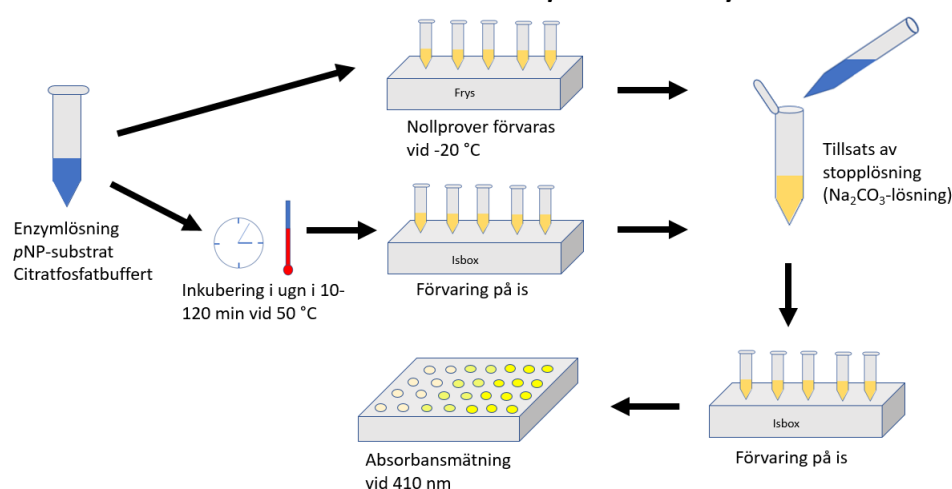
Citratfosfatbuffert tillreddes genom att blanda lösningar av citratsyramonohydrat, $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$, och dinatriumfosfat, Na_2PO_4 . Av citratsyramonohydrat med molvikten 210,14 g/mol vägdes 10,505 g upp i en rundkolv och MilliQ®-vatten tillsattes upp till 500 ml, för att erhålla 0,1 M lösning. Av dinatriumfosfat med molmassan 141,98 g/mol vägdes 14,2 g upp i en rundkolv och MilliQ®-vatten tillsattes upp till 500 ml så en 0,2 M lösning erhöles. De båda lösningarna blandades samtidigt som pH mättes till pH 6,0. Det krävdes ungefär dubbelt så stor volym av dinatriumfosfatlösningen som av citratsyramonohydratlösningen.

En stamlösning med 10 mM *p*NP blandades. Från *p*NP-pulver med molmassan 139,1 g/mol vägdes 13,9 mg upp och 10 ml dimetylsulfoxid, DMSO tillsattes. Lösningen förvarades i -20°C . En standardkurva som relaterade absorbansen med koncentrationen av fritt *p*NP erhöles genom att späda *p*NP-stamlösningen till koncentrationerna 0, 6,25, 12,5, 25, 50, 100 och 150 μM . Stamlösningen späddes med citratfosfatbufferten. Av varje spädning överfördes tre

tekniska replikat om 100 µl till en mikrotiterplatta. Därefter adderades 100 µl natriumkarbonat-stopplösning till varje brunn och absorbansen mättes i en spektrofotometer vid 410 nm.

För aktivitetsmätning av de olika enzymlösningarna gjordes tre tekniska replikat. 200 µl 100 mM natriumfosfatbuffert, 80 µl MilliQ®-vatten, 80 µl enzymlösning och 40 µl *p*NP-substrat av varje kombination av enzymlösning och *p*NP-substrat blandades i duplikat i två eppendorfrör, ett för inkubering och ett för förvaring i fryn. Samtliga enzymprover förvarades på is tills alla prover blivit klara. Därefter sattes hälften av rören i ugn och inkuberades vid 50 °C i 18 timmar. Den andra hälften av proverna förvarades i frysen och användes som referenser, dessa benämns nollprover. Efter inkuberingen överfördes 100 µl natriumkarbonat-stopplösning till varje brunn som användes i en mikrotiterplatta. Därefter pipetterades 100 µl av enzymproven i triplikat till brunnarna på mikrotiterplattan och innehållet i brunnen blandades väl genom pipettering. Absorbansen mättes vid 410 nm. Figur 12 visar ett översiktligt flödesschema där det går att följa tillvägagångssättet som använts för *p*NP-analys i detta projekt.

Flödesschema *p*NP-analys



Figur 12. Översiktligt flödesschema som visar tillvägagångssättet som använts för *p*NP-analys i detta projekt.

Nio olika *p*NP-substrat, alltså monosackarider bundna med *p*NP (α - och β -D-galaktos, α - och β -D-mannos, α - och β -D-glukos, α - och β -D-xylos och α -L-arabinos), användes i en översiktsstudie. Samtliga *p*NP-substrat testades med enzymlösningar från samtliga sex kolkällor (vetekli, galaktomannan, xylan, cellulosa, träpulver från gran och barkpulver från gran). Var och en odlades också med två olika metoder, flytande kultur och SSF, för att se vilka kombinationer som gav högst aktivitet.

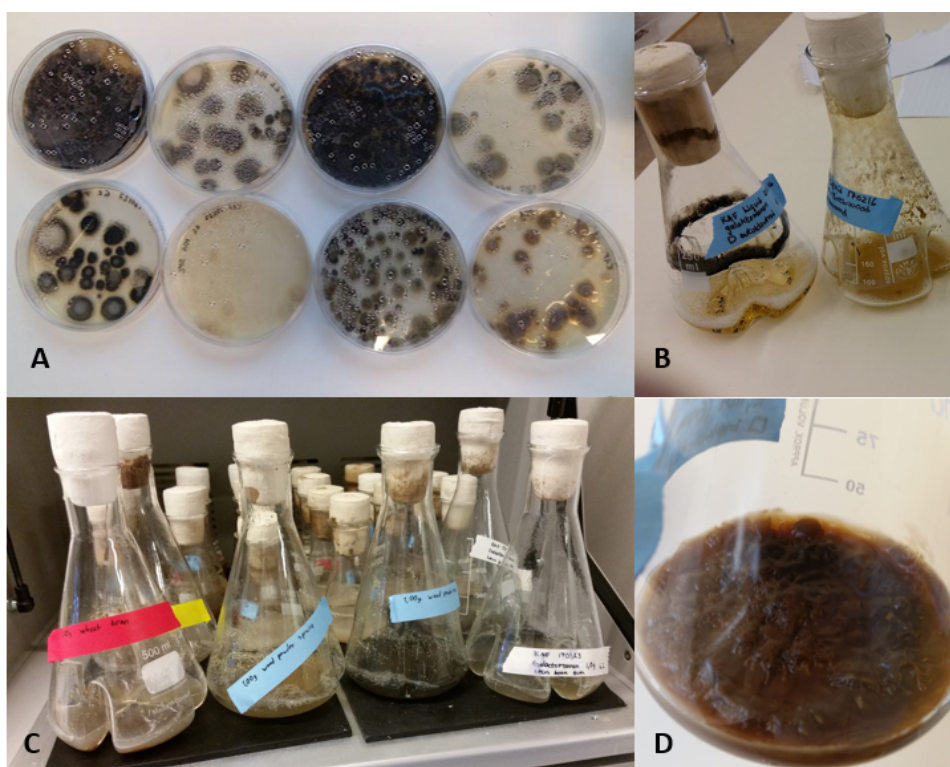
Efter denna förstudie valdes den bästa odlingsmetoden och de bästa kolkällorna ut för vidare studier. Vid tidsstudie utfördes laborationen enligt ovan med ett rör för varje inkuberingstid: 0, 10, 30, 60 och 120 minuter.

4. Resultat och analys

I detta avsnitt presenteras de resultat som erhållits under projektet. Först presenteras resultat från odlingar som genomförts under projektet. Därefter presenteras resultat från Bradfordanalyser som visar uppmätta proteinkoncentrationer i enzymlösningar extraherade från odlingar. Därefter presenteras resultat från aktivitetsmätningar utförda med *p*NP- och DNSA-metoden. Resultaten från aktivitetsmätningar presenteras först för översiktsförsök där en större mängd olika kolkällor och enzymsubstrat testades. Därefter presenteras resultat från aktivitetsmätningar som genomförts regelbundet under en viss tidsperiod, dessa mätningar benämns tidsmätningar. Sist presenteras resultat från DNSA-analys som genomförts vid temperaturerna 50 °C, 60 °C och 70 °C, dessa mätningar benämns temperaturmätningar.

4.1 Odlingar

Flera odlingar genomfördes under projektets gång. Figur 13 visar de olika odlingstyper som har använts under projektet. Svampen bildar svarta kolonier.



Figur 13. A. PDA-plattor. B. Flytande kulturer. C. Flytande kulturer i inkubator. D. SSF-odling. Samtliga bilder är fotograferade under projektets gång.

Figur 13A visar PDA-plattor där tillväxt av svampen har pågått under en vecka. Det framgick att svampen hade god tillväxt på potatisdextrosagar. Figur 13A visar att mängden bildade svampsporer varierade mellan de olika plattorna. I majoriteten av fallen krävdes en veckas odling för att få plattor med tillräckligt mycket svamp för att bereda sporlösning för inokulering av flytande kulturer och SSF-odlingar.

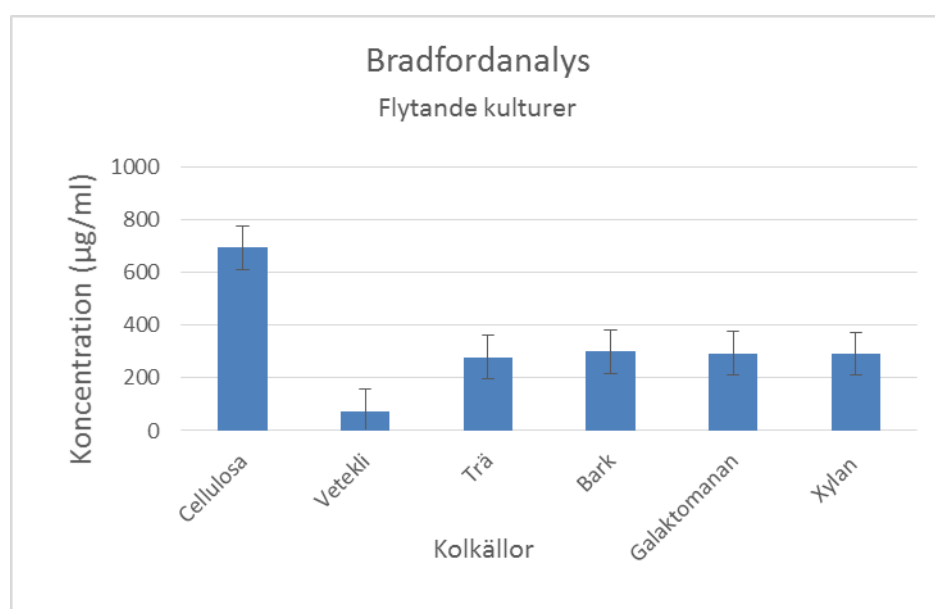
Figur 13B visar flytande kulturer med kolkällorna galaktomannan respektive xylan. Det framgick tydligt av figuren att svampen har växt på E-kolvens väggar för de odlingar med galaktomannan som kolkälla. Det svarta på kanterna är svampens bildade sporer. Figur 13C visar flytande kulturer placerade i en skakinkubator. Det framgick att de flytande kulturerna innehöll svampen

då mängden svarta sporer ökade under tillväxtfasen. Figur 13D visar en bild av en SSF-odling, för dessa odlingar kunde svampen identifieras växa på ytan av kolkällan.

Under odlingsprocessen upptäcktes för- och nackdelar med både flytande kulturer och SSF-odlingarna. Ett problem som uppstod med de flytande kulturerna var att det fastnade partiklar av kolkälla på E-kolvens väggar, något som orsakades av omskakningen i inkubatorn, eftersom vätskenivån under omskakning precis nådde upp till randen svampkolonier och försedde den med näring. Det upptäcktes att några av SSF-odlingarna hade en tendens att torka ut under inkuberingen. För att undvika detta tillsattes mer vätska till torra odlingar. Eftersom flytande kulturer gav bättre resultat presenteras enbart data för flytande kulturer härnäst i rapporten.

4.2 Bradfordanalys

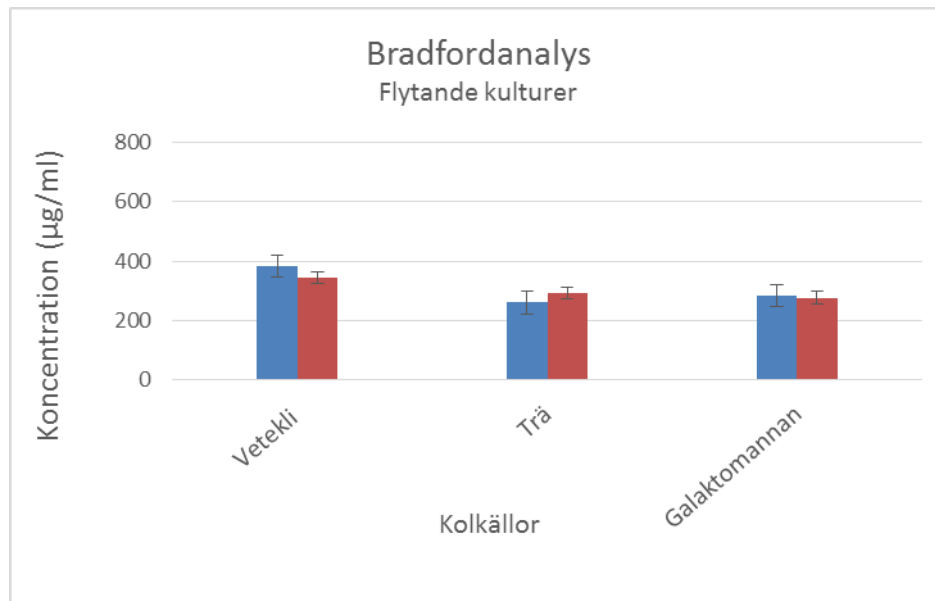
Proteinkoncentrationer i $\mu\text{g/ml}$ för enzymlösningarna extraherade från de odlingar som genomfördes vid översiktsförsöken visas i Figur 14. Dessa odlingar innehöll kolkällorna cellulosa, vetekli, trä, bark, galaktomannan respektive xylan. Standardkurva för Bradford ses i Bilaga 1.



Figur 14. Resultat från Bradfordanalys av enzymlösningar från alla använda kolkällor med felmarginaler utritade.

Det framgår från Figur 14 att enzymlösningen från odlingen med cellulosa hade högst proteinkoncentration. Lägst proteinkoncentration hade enzymlösningen från odlingen med vetekli som kolkälla. Enzymlösningarna från odlingarna med trä, bark, galaktomannan och xylan hade liknande proteinkoncentrationer.

Proteinkoncentrationer i $\mu\text{g/ml}$ i enzymlösningar extraherade från senare odlingar med trä, vetekli och galaktomannan visas i Figur 15. Bradfordanalys genomfördes för två biologiska replikat av varje odling.



Figur 15. Proteinkoncentrationer i två biologiska replikat av enzymlösningar från odlingar med kolkällorna trä, vetekli och galaktomannan, med felmarginaler utritade. De blå staplarna visar resultatet för biologiskt replikat 1, och de röda visar resultatet för biologiskt replikat 2.

Det framgår av Figur 15 att proteinkoncentrationerna i de biologiska replikaten var förhållandevis lika. Figur 15 visar även att skillnaden i proteinkoncentration mellan enzymlösningar från odlingar med olika kolkällor var små.

En jämförelse av resultaten i Figur 14 och Figur 15 visar att enzymlösningar från olika odlingar med kolkällorna trä och galaktomannan innehöll relativt lika proteinkoncentrationer. Det framgår att proteinkoncentrationerna i enzymlösningar från vetekliodlingarna skiljer sig mycket åt. Denna skillnad kan tyda på något problem med den första kulturen av vetekli som gjordes, t.ex. att odlingen inokulerades med en för liten mängd sporer.

4.3 Aktivitetsmätningar över natt

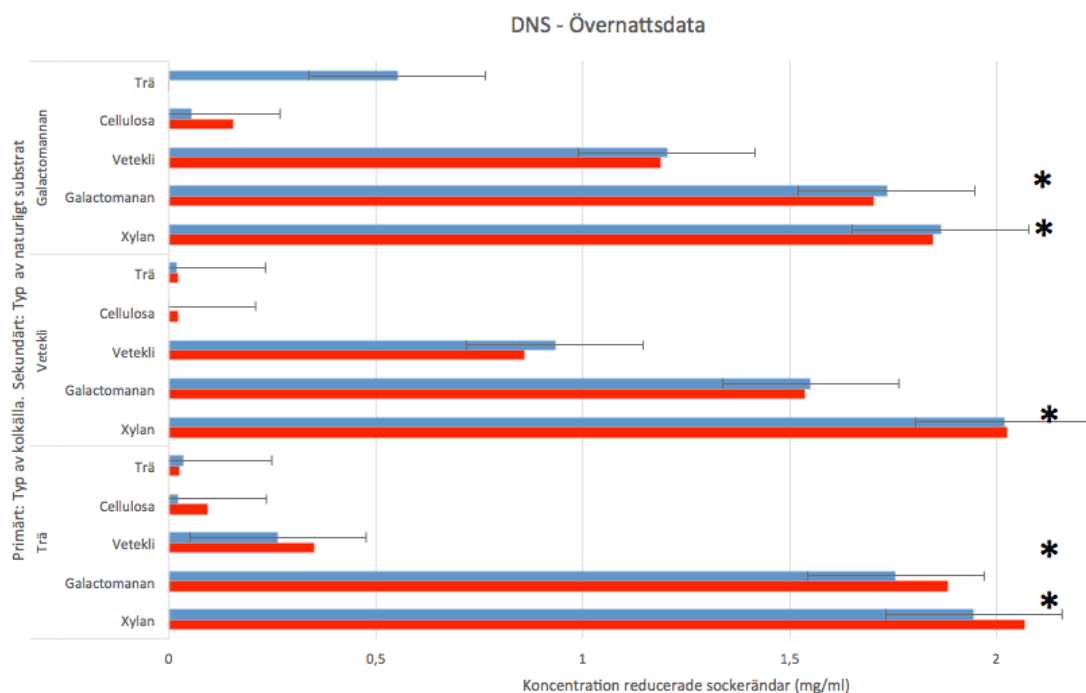
Aktivitetsmätningarna i översiktsförsöken utfördes för att avgränsa projektet ytterligare genom att välja bort kolkällor som genererade enzymlösningar med låg aktivitet. Även enzymsubstrat för *pNP*- och *DNSA*-analys som bedömdes intressanta för fortsatta studier valdes ut. Vid de inledande försöken användes enzymlösningar från samtliga kolkällor som valdes vid projektets start. Enzymlösningarna undersöktes med både *pNP*- och *DNSA*-analys i försök där enzymlösningar och enzymsubstrat inkuberades i 18 timmar under en natt. Dessa försök genererade stora mängder data, övernattsdata, som för *pNP*-analysen presenteras i Figur 23 i Bilaga 2. Det framgick att aktiviteten skiljde mycket mellan olika kombinationer av enzymlösningar och *pNP*-substrat. Lågst aktivitet erhöles från enzymlösningar från odlingar med kolkällorna bark, trä och cellulosa, se Figur 23 i bilaga 2. I dessa mätningar utmärkte sig vetekli och galaktomannan som bra kolkällor då de gav enzym som hade hög aktivitet. Flera av resultaten som indikerar hög aktivitet, exempelvis aktivitet på *pNP*- β -D-xylos, är inte exakta då de uppmätta absorbsvärdena ligger utanför det linjära området på standardkurvan för *pNP*. Detta innebär att de befinner sig i ett område där sambandet mellan absorbs och koncentration av *pNP* är okänt. Därför kan inte exakta värden på aktiviteten beräknas utifrån värden på den framtagna standardkurvan som ses i Figur 21 i Bilaga 1. Även om aktiviteterna som visas i Figur 23 i Bilaga 2 inte är exakta ger den ändå en bra indikation på vilka kolkällor och enzymsubstrat som gav en hög aktivitet. De *pNP*-substrat som gav bra resultat vid dessa

mätningar var aktivitet på p NP- β -D-xylos, β -D-glukos, α -D-mannos och α -D-arabinos. Dessa p NP-substrat valdes därför ut för vidare studier.

Övernattsdata som genererades från DNSA-mätningar presenteras i Figur 24 i Bilaga 2. Även vid dessa mätningar gav olika kombinationer av enzymlösningar och enzymsubstrat olika aktiviteter. Enzymlösningar från odlingar med kolkällorna trä, vetekli och cellulosa observerades ha högst aktiviteter. Vid val av kolkällor för vidare studier togs både p NP- och DNSA-resultat i beaktning. Av denna anledning valdes kolkällorna vetekli, galaktomannan och trä för vidare analys. Då enzymlösningar från odlingar med kolkällan trä uppvisat relativt låg aktivitet vid p NP-analys motiverades valet ytterligare med att trä är en komplex kolkälla som ansågs viktig med tanke på projektets syfte att ta fram enzym som bland annat skulle kunna användas inom industrin för att omvandla restmaterial från skogsindustrin.

Efter de initiala aktivitetsmätningarna togs beslutet att genomföra ytterligare övernattsmätningar med metoderna p NP- och DNSA-analys. Denna gång undersöktes endast enzymlösningar från de kolkällor och p NP-substrat som valts ut baserat på tidigare resultat. Kolkällorna som användes var galaktomannan, vetekli och trä och de testades med p NP-substraten p NP- α -D-arabinos, β -D-xylos, β -D-glukos och α -D-mannos. Dessa försök gjordes för att bekräfta tidigare resultat och se att de nya odlingarna fick liknande värden. Vid försöken användes enzymlösningar från två biologiska replikat som i medel varierade med 10 procent. Resultaten från försöken visade att samtliga hade god aktivitet. Åtta av proverna översteg maskinens mätintervall för absorbans. Detta indikerar att de har en hög koncentration av fritt p NP och därmed en hög aktivitet. På grund av projektets tidsbegränsning eliminerades ett antal kombinationer av kolkällor och p NP-substrat som gett relativt låga resultat. Av denna anledning valdes alla kombinationer innehållande p NP- α -D-arabinos och kombinationen trä med p NP- α -D-mannos bort. En motivering till att göra dessa avgränsningar var hypotesen att dessa kombinationer trots den höga aktiviteten efter en övernattsmätning inte skulle ge lika hög aktivitet under kortare tidsmätningar som genomfördes under projektets andra del.

Resultat från övernattsmätningarna med DNSA-analys utfört på enzymlösningar från odlingar med kolkällorna galaktomannan, vetekli och trä, visas i Figur 16.

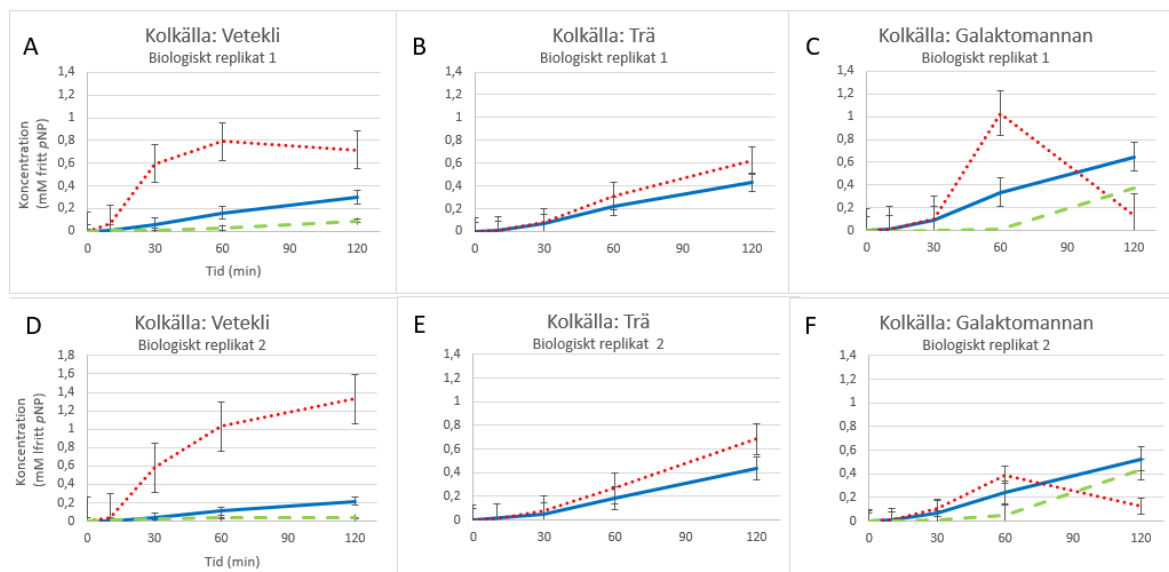


Figur 16. Övernattsdata från DNSA-analys där två biologiska replikat analyserats. Felmarginaler är utmarkerade. Asterixerna visar de fall vars resultat överskred vad som kunde beräknas med standardkurvens ekvation. De blå staplarna visar resultat för biologiskt replikat 1 och de röda visar resultatet för biologiskt replikat 2.

Även i detta fall uppvisar de biologiska replikaten stora likheter gällande enzymatisk aktivitet. För denna analysmetod finns det också fall där de beräknade aktiviteterna överstiger de aktivitetsvärden som motsvarar det största aktivitetsvärde som kan beräknas med standardkurvens ekvation, se Bilaga 1. Värden som översteg en koncentration av 1,5 mg/ml i reducerande sockerändar är utanför standardkurvens ekvation, vilket i Figur 16 blir kolkälla galaktomannan på enzymsubstrat galaktomannan och xylan, kolkälla vetekli på enzymsubstratet xylan samt kolkälla trä på enzymsubstrat galaktomannan och trä.

4.4 Koncentrationsmätningar vid tidsuppföljning

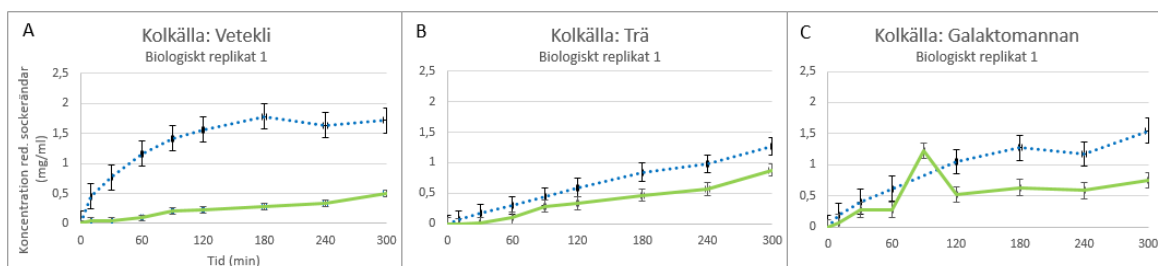
För vidare analys av de intressanta enzymsubstraten utfördes koncentrationsmätningar av fritt *p*NP och reducerande sockerändar regelbundet under en tidsperiod på totalt 120 minuter för *p*NP-analys och 300 minuter för DNSA-analys. Två biologiska replikat undersöktes med metoderna. I Figur 17 presenteras data från koncentrationsmätning av fritt *p*NP i mM i enzymlösningar från två biologiska replikat med kolkällorna vetekli, trä och galaktomannan.



Figur 17. Tidskurvor för koncentrationmätning av fritt pNP i mM från enzymatisk klyvning av pNP-substrat. Koncentrationen av pNP i mM visas mot tiden i minuter. Enzymlösningar från odlingar med vetekli, trä och galaktomannan testades på pNP-substraten pNP-β-D-xylos, pNP-β-D-glukos respektive pNP-β-D-mannos. I **A**, **B** och **C** ses det biologiska replikatet 1 och i **D**, **E** och **F** ses biologiska replikat 2. I **A** och **D** är det vetekli som är kolkälla, i **B** och **E** är det Trä och i **C** och **F** är det galaktomannan. I figuren representeras pNP-β-D-xylos med en blå heldragen linje, pNP-β-D-glukos representeras av röd prickad linje och pNP-β-D-mannos representeras med en grön streckad linje. Felmarginaler representeras av lodräta felstaplar.

Det framgår av Figur 17 att koncentrationmätningarna gav liknande resultat för de biologiska replikaten. Av denna anledning kommer endast data från det första biologiska replikatet att presenteras härnäst. Det framgår av figuren att både enzymlösningar från vetekli och trä gav koncentrationer av frigjort pNP på omkring 0,8 mM då de användes på pNP-β-D-glukos. Eftersom pNP-metoden mäter intensiteten från ett färgomslag orsakat av den mängd pNP som kluvits bort av från pNP-substratet är det inte sannolikt att koncentrationen av pNP kan minska på ett sådant sätt som visas mellan tidpunkt 60 och 120 minuter i Figur 17C. Det frigjorda pNP kommer inte att binda tillbaka till substratet som nu är kluvet och därför bör en minskad enzymatisk aktivitet visas som en konstant koncentration av pNP. Därför är mätvärdet vid 60 minuter för enzym från galaktomannan och pNP-β-D-xylos sannolikt felaktigt. Samtliga enzymlösningar gav liknande koncentrationer av frigjort pNP för pNP-β-D-xylos. Det kromofora substratet pNP-β-D-mannos testades bara med enzymlösningarna vetekli och galaktomannan och gav förhållandevis låga koncentrationer av fritt pNP för båda.

Tidsmätningar utfördes även med DNSA-analys vid inkuberingstemperatur 50 °C. Figur 18 presenterar data från koncentrationmätningar av reducerande sockerändar i mg/ml för det första biologiska replikatet med kolkällorna vetekli, trä och galaktomannan.

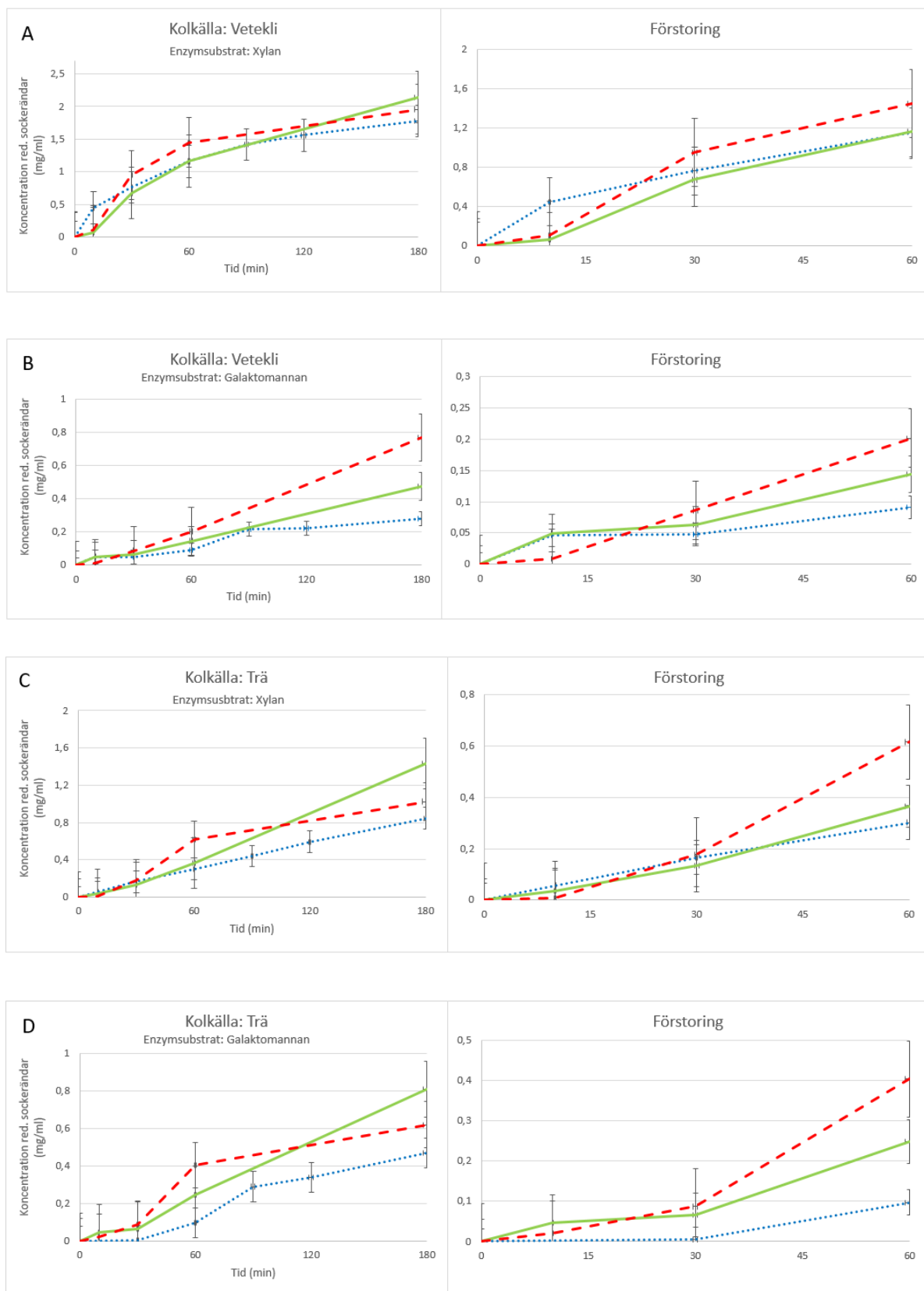


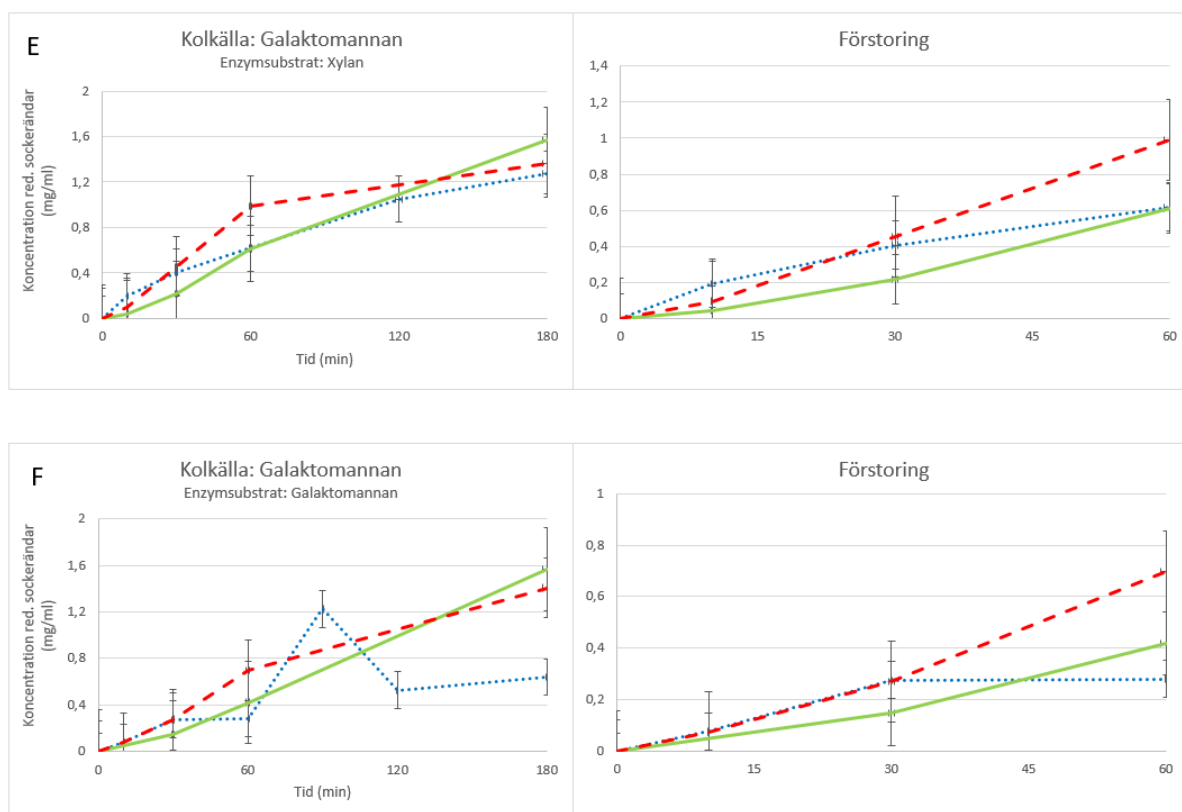
Figur 18. Tidskurvor för koncentrationmätning av reducerande sockerändar i mg/ml från enzymatisk klyvning av enzymsubstrat. Koncentrationen av reducerande sockerändar i mg/ml visas mot tiden i minuter. Enzymlösningar från odlingar med **A.** vetekli, **B.** trä och **C.** galaktomannan testades på enzymsubstraten xylan och galaktomannan i vardera graf. I figuren representeras xylan av en blå prickad linje och galaktomannan representeras av en heldragen grön linje. Felmarginaler representeras av lodräta felstaplar.

Det framgår av Figur 18 att samtliga enzymlösningar gav lägre koncentrationer av reducerande sockerändar då de bryter ner galaktomannan. Enzymlösningen från odling med vetekli på xylan tenderar att plana ut i slutet av mätperioden. Reaktionerna mellan enzymlösningar från trä och xylan och galaktomannan fortsätter någorlunda linjärt under hela mätperioden. Samma gäller även för graferna för galaktomannan. Grafen för enzymlösningen från galaktomannan visar ett kraftigt avvikande värde vid tidpunkt 90 minuter för enzymsubstratet galaktomannan.

4.5 Koncentrationsmätningar vid temperaturökning

För att studera enzymlösningarnas värmestabilitet genomfördes koncentrationmätningar av reducerande sockerändar med DNSA-analys vid olika temperaturer. Vid dessa mätningar höjdes temperaturen vid inkuberingen av enzymlösningar och enzymsubstraten. De temperaturhöjningar som genomfördes var 60 °C och 70 °C. För att se om enzymen överhuvudtaget tålde högre temperaturer genomfördes temperaturmätningar för fyra mätpunkter under 180 minuter. Figur 19 visar koncentrationen av reducerande sockerändar i mg/ml mot tiden i minuter. I diagrammen har koncentrationer från tidigare presenterade mätningar vid inkuberingstemperaturen 50 °C infogats.





Figur 19. Tidskurvor erhållna vid koncentrationmätning av reducerande sockerändar vid olika temperaturer. Koncentrationen av reducerande sockerändar i mg/ml visas mot tiden i minuter. Enzymlösningar från odlingar med **A.** vetekli med enzymsubstrat xylan, **B.** vetekli med enzymsubstrat galaktomannan, **C.** trä med enzymsubstrat xylan, **D.** trä med enzymsubstrat galaktomannan, **E.** galaktomannan med enzymsubstrat xylan samt **F.** galaktomannan med enzymsubstrat galaktomannan. I figuren representeras temperaturen 50 °C med en blå prickad linje, 60 °C representeras en grön heldragen linje och 70 °C representeras med en röd streckad linje. För samtliga grafer är felmarginaler representerade av lodräta felstaplar. Notera de olika skalorna på axlarna i de olika diagrammen.

Vid nedbrytning av xylan, som kan ses i Figur 19A, C och E, är det uppenbart att enzymreaktionerna gick snabbare vid 50 °C än vid både 60 och 70 °C i det initiala skedet. Att det gick snabbare vid 50 °C i början kan framförallt ses i Figur 19A och E. Vid tiden 30 minuter blir koncentrationen vid 70 °C högre än vid 50 °C och det är efter 30 minuter som 70 °C snabbast genererar en hög koncentration reducerande sockerändar vilket kan ses i alla de tre diagrammen som representerar nedbrytning av xylan. Den temperatur som genererar högst koncentration av reducerande sockerändar är 60 °C som har gått om både 50 °C och 70 °C grader då reaktionen fått stå ungefär 120 minuter.

Nedbrytningen av Galaktomannan kan ses i figur 19B, D och F. För 19B ligger 50 och 60 °C på lika värden, i 19D ligger 60 °C något högre än vad 70 °C gör medan 50 °C ligger på 0 fram till 30 minuter. I 19F ligger 50 °C och 70 °C på samma koncentrationer medan 60 °C visar lägre koncentrationer. Vid 30 minuter blir koncentrationen vid 70 °C högre än båda de andra temperaturerna och fortsätter att vara så i 19B. I 19D och E däremot går koncentrationen vid 60 °C förbi 70 °C som planar ut. Det höga koncentrationsvärdet vid 90 minuter i Figur 19F är troligen ett felvärde. Koncentrationen av reducerande sockerändar ökar väldigt kraftigt här, bara för att sedan minska kraftigt. Detta är osannolikt då reducerande sockerändar sker irreversibelt.

I förstoringarna i Figur 19 går det att se hur temperaturerna skiljer sig åt i början av tidsintervallet. I de flesta figurena (dock ej Figur 19B) ses att koncentrationen reducerande sockerändar vid 60 °C blir högre än vid 70 °C efter ungefär 180 minuter. Detta kan tyda på att enzymen inte tål 70 °C en längre tid, vilket även stöds av att linjerna tenderar att plana ut för 70 °C efter längre tid.

5. Diskussion

För att uppfylla syftet har enzym producerade av *S. thermophilum* undersökts med spektrofotometriska metoder. Det som studerats är proteinkoncentration, och efter enzymatisk nedbrytning, koncentration av frigjort *p*NP och koncentration av reducerande sockerändar.

En mängd åtgärder har utförts för att erhålla tillförlitliga resultat med små felmarginaler. Stora felmarginaler kan bero på felaktigt utförd omrörning eller pipettering. Vid odling utfördes två biologiska replikat, som i de flesta fall gav liknande resultat, se Figur 15 och 16. Detta tyder på att svampen odlades under likvärdiga förhållanden. Minst två tekniska replikat utfördes för varje Bradford-, DNSA- och *p*NP-analys under översiktsstudien. Replikaten gjordes för att kontrollera att proverna var korrekt tillredda och om pipetteringen utförts på samma sätt i alla provrör och brunnar. En känd brist hos DNSA-analyserna som har utförts är att endast en standardkurva baserad på glukoskoncentrationsmätningar har använts för att beräkna koncentrationen reducerande sockerändar för enzymsubstraten. Idealt hade varit att göra en standardkurva för varje enzymsubstrat, det bedömdes påverka i så liten omfattning att resultatet inte ändrats (McKee, 2017). Ett annat problem med metoden var att enzymsubstraten cellulosa, trä och vetekli är olösliga i vatten. Därför behövdes ordentlig omrörning för att enzymen skulle få möjlighet att bryta ner de enzymsubstraten i samma utsträckning som galaktomannan och xylan. Trots omrörning hade enzymsubstraten sedimenterat efter en natts inkubering, vilket kan ha gett lägre aktivitet då enzymen hade sämre tillgång till substratet.

I översiktsstudien användes odlingsmetoderna flytande kultur och SSF-odlingar.

I naturen växer svamp oftast på fasta material, det är därför rimligt att anta att SSF-odling skulle vara ett mer gynnsamt odlingssätt för svamp (Pandey, 2003). Resultatet från översiktsstudien, se Figur 13B, visar att svampen har god tillväxt ovanför vätskenivån hos en flytande kultur. Det framgår att tillväxten på kanten av E-kolven är betydligt kraftigare än tillväxten i vätskefasen. Där var fuktigheten hög samtidigt som svampen kunde växa på en fast yta. Detta indikerar att svampen föredrar tillväxt på fasta material. En liten vätskevolym ger en förhållandevis stor avdunstning vid 50 °C. Av denna anledning torkade flera av SSF-odlingarna som genomfördes under projektet. Detta innebär problem då samtliga odlingar inte kunde behandlas enligt samma protokoll, därför valdes detta odlingssätt bort. Resultatet med kraftig tillväxt på kanten av E-kolven indikerar dock att SSF-odlingar kan vara intressanta för framtida forskning. Ett protokoll med optimal mängd näring, fuktighet samt tillväxttid hade då kunnat tas fram.

Resultaten från koncentrationsmätning av reducerande sockerändar efter 18 timmars enzymreaktion, se Figur 16, visar att enzymlösningarna från galaktomannan, vetekli och trä samtliga har god aktivitet på xylan. Detta tyder på att svampens produktion av xylanaser har triggats av tillväxt på dessa kolkällor. Att svampen producerar xylanaser stämmer bra överens med tidigare studier, där xylanasgener påträffats hos andra stammar av *S. thermophilum* (Boonlue et al., 2003). En parallell kan dras till aktiviteten för galaktomannan, då tidigare studier visat att andra stammar av svampen har producerat mannanas (Jatinder, Chadha, & Saini, 2006). Det framgick även av resultaten i Figur 16 att enzymlösningarna från kolkällorna galaktomannan, vetekli och trä hade dålig aktivitet på cellulosa. Det finns flera tänkbara anledningar till detta. Som nämnts tidigare krävs många olika typer av enzymaktiviteter för att kunna bryta ner cellulosa. Det är möjligt att de erhållna enzymlösningarna inte innehöll tillräckliga aktiviteter för nedbrytning. Det är särskilt anmärkningsvärt att enzymlösningen från odlingen med trä inte kan bryta ner cellulosa. En tänkbar förklaring är att trä är ett komplext material som innehåller många andra komponenter som kan påverka svampens uttryck av cellulaser. Hemicelluloser är lättare att bryta ner än cellulosa på grund av den senares kristallina

struktur (Henriksson & Lennholm, 2009). Det är därför troligt att svampen i första hand vill tillgodogöra sig näring från hemicellulosorna xylan och galaktomannan som också finns i trä.

Resultaten från mätningar av reducerande sockerändar vid 50 °C, se Figur 18, visar att det endast är reaktionen med enzymodling med vetekli och enzymsubstratet xylan som visar tendenser till att avstanna under tidsperioden 300 minuter. Det skulle vara intressant att studera de andra reaktionerna under en längre tid för att se hur länge enzymen är aktiva och se reaktionens slut. Det avvikande värdet för galaktomannan betraktas som felaktigt, där tänkbara orsaker är förväxling eller kontaminering av prov. Vid andra absorbansmätningar har enstaka extremvärden förekommit, de har ibland kunnat förklaras med att det funnits vattendroppar på mikrotiterplattans avläsningsyta, något som har åtgärdats genom att torka av plattan och läsa av den igen. I den aktuella punkten fungerar inte det som förklaringsmodell, då standardavvikelsen mellan replikaten inte är större än för andra mätpunkter.

En genomgående trend hos resultaten från temperaturstudien, som visas i Figur 19, är att en högre aktivitet erhålls vid en högre temperatur. Vid 60 °C och 70 °C användes fyra mätpunkter under en tidsperiod på 180 minuter. Dataserier från mätningen vid 50 °C innehåller sex mätpunkter istället för fyra. Det är en nackdel att graferna för 60 °C och 70 °C har färre värden, det blir svårare att tyda trender från dessa data. En möjlig felkälla kan vara att mätningarna vid 50 °C utfördes tidigare under projektet. Eftersom de inte utfördes samtidigt kan det ha funnits förhållanden som påverkat resultaten.

Ett lyckat resultat för en enzymlösning visas i Figur 19B. Resultatet tyder på en stabil aktivitet under lång tid vid hög temperatur, hos enzymlösning från vetekli då det används med enzymsubstratet galaktomannan. Därför hade det varit mycket intressant att vidare undersöka enzym från odling på vetekli med galaktomannan som enzymsubstrat.

I Figur 19A, C, D och E syns en gemensam trend där graferna för 70 °C verkar plana ut mot slutet av tidsperioden. En tänkbar förklaring kan vara att enzymet inte tål högre temperaturer under en längre tid utan denatureras. Det är olyckligt ur ett industriellt perspektiv, då enzym som förblir stabila under en längre tid är eftertraktade (Cherry & Fidantsef, 2003). En annan tänkbar anledning är att enzymen har brutit ner allt substrat. Det skulle visas som en konstant koncentration av reducerande sockerändar. Det framgår även att efter 180 minuter är koncentrationen högst vid 60 °C. Detta indikerar att 70 °C är en för hög temperatur om en stabil process vill erhållas. För att få mer entydiga resultat skulle det vara intressant att utföra mätningar vid fler tidpunkter. Det skulle vara intressant att utföra mätningar under längre tid än 180 minuter. Särskilt intressant skulle det vara att undersöka när koncentrationen reducerande sockerändar planar ut vid 60 °C. Eftersom 60 °C visat bättre resultat än 70 °C för många enzymlösningar skulle det vara intressant att undersöka temperaturer i det intervallet kunnat undersökas för att hitta ett eventuellt optimum. Det hade även varit intressant att undersöka temperaturer högre än 70 °C för att se om det finns enzymaktiviteter som klarar det.

6. Slutsats

Syftet med detta projekt var att undersöka värmestabiliteten hos enzym som producerats av stammen FCH 6.2 av *S. thermophilum*. Resultaten visar att enzym producerade av svampstammen har högre aktivitet vid temperaturerna 60 °C och 70 °C jämfört med 50 °C. Av denna anledning är svampstammen intressant för fortsatta studier av termofila enzym för nedbrytning av växtbiomassa.

För att få reda på mer om vilka slags enzym svampen producerar finns en mängd metoder att tillgå. Med SDS-PAGE hade ytterligare information om producerade enzym kunnat erhållas. För att få intressant information från SDS-PAGE, kan en 2D-PAGE köras. Då proteinlösningen innehåller många olika protein, blir upplösningen högre om den separeras i två dimensioner. För att undersöka hur effektiva de utvunna enzymen är kan det vara intressant att jämföra dem med en kommersiell enzymblandning, för att få ett mått på hur effektiva *S. thermophilum* enzymen från är i jämförelse med etablerade enzymblandningar under samma förhållanden.

I framtida studier hade det varit intressant att studera vilka gener som uttrycks hos *S. thermophilum* vid odling på olika kolkällor, vilket har utförts för andra svampstammar (Amore et al., 2013). För att studera genuttryck behöver svampstammens DNA först sekvenseras. Därefter kan transkriptomi användas för att studera vilka gener som uttrycks vid odling på olika kolkällor. När det är känt vilka gener som uttrycker effektiva enzym kan dessa uttryckas i en lämplig värdorganism. Därefter kan de producerade enzymen eventuellt användas i enzymblandningar. Vidare skulle det vara intressant att studera individuella enzym och deras egenskaper för effektiv nedbrytning av växtbiomassa.

Källförteckning

- Amore, A., Giacobbe, S., & Faraco, V. (2013). Regulation of cellulase and hemicellulase gene expression in fungi. *Current Genomics*, 14(4), 230–49.
<https://doi.org/10.2174/1389202911314040002>
- Basotra, N., Kaur, B., Di Falco, M., Tsang, A., & Chadha, B. S. (2016). *Mycothermus thermophilus* (Syn. *Scytalidium thermophilum*): Repertoire of a diverse array of efficient cellulases and hemicellulases in the secretome revealed. *Bioresource Technology*, 222, 413–421.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.10.018>
- Berrin, J.-G., Navarro, D., Couturier, M., Olivé, C., Grisel, S., Haon, M., Lesage-Meessen, L. (2012). Exploring the natural fungal biodiversity of tropical and temperate forests toward improvement of biomass conversion. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(18), 6483–90.
<https://doi.org/10.1128/AEM.01651-12>
- Blomstrand, E., Hartvigsson, O., Törnkvist, H., & Westling, A. (2016). *Karaktärisering av tropiska svampar och deras enzymer*. Göteborg.
- Boonlue, S., Aimi, T., & Morinaga, T. (2003). Molecular characterization of a xylanase-producing thermophilic fungus isolated from Japanese soil. *Current Microbiology*, 47, 119–124.
<https://doi.org/10.1007/s00284-002-3918-z>
- Bradford, M. M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–254.
- Calvaro. (2006). Glukos [Elektronisk bil]. Hämtad maj 10, 2017, från
https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/2/2f/Glucose_equilibrium.png/799px-Glucose_equilibrium.png
- Cherry, J. R., & Fidantsef, A. L. (2003). Directed evolution of industrial enzymes: an update. *Current Opinion in Biotechnology*, 14(4), 438–443. [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(03\)00099-5](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(03)00099-5)
- Cox, K. (2014). Environmental life-cycle impact of alternative aviation fuels. *Access Science*.
<https://doi.org/10.1036/1097-8542.YB140408>
- Demirbas, A. (2014). Bioethanol production (fungal enzymes). *Access Science*.
<https://doi.org/10.1036/1097-8542.900123>
- Ebringerová, A., & Heinze, T. (1999). Naturally occurring xylans structures, isolation procedures and properties. *Macromolecular Rapid Communications*, 21(9).
- Faraco, V. (2013). *Lignocellulose Conversion*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
<https://doi.org/10.1007/978-3-642-37861-4>
- Grimm, B., Porra, R. J., Rüdiger, W., & Scheer, H. (2006). *Chlorophylls and Bacteriochlorophylls* (Vol. 25, ss. 1-26). Dordrecht: Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/1-4020-4516-6>
- Hassid, W. Z. (2014). Polysaccharide. *Access Science*. <https://doi.org/10.1036/1097-8542.536800>
- Henriksson, G., & Lennholm, H. (2009). *Pulp and Paper Chemistry and Technology Wood Chemistry and Wood Biotechnology. Pulp and paper chemistry and technology: Wood chemistry and wood biotechnology* (Vol. 1, ss. 120). <https://doi.org/10.1515/9783110213409>
- Himmel, M. E., Ding, S.-Y., Johnson, D. K., Adney, W. S., Nimlos, M. R., Brady, J. W., & Foust, T. D. (2007). Biomass Recalcitrance: Engineering Plants and Enzymes for Biofuels Production. *Science*, 315(5813).
- Jatinder, K., Chadha, B. S., & Saini, H. S. (2006). Optimization of culture conditions for production of cellulases and xylanases by *Scytalidium thermophilum* using response surface methodology. *World*

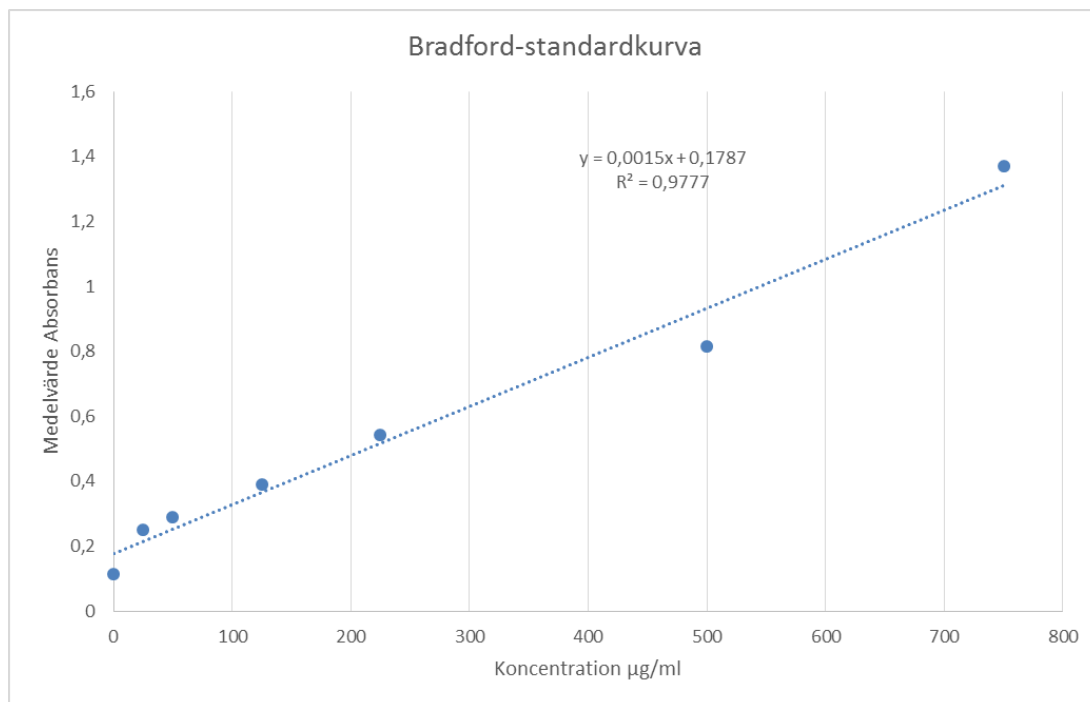
Journal of Microbiology and Biotechnology, 22, 169–176. <https://doi.org/10.1007/s11274-005-9015-2>

- Kachlishvili, E., Penninckx, M. J., Tsiklauri, N., & Elisashvili, V. (2006). Effect of nitrogen source on lignocellulolytic enzyme production by white-rot basidiomycetes under solid-state cultivation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22(4), 391–397. <https://doi.org/10.1007/s11274-005-9046-8>
- Kaur, A. P., Nocek, B. P., Xu, X., Lowden, M. J., Leyva, J. F., Stogios, P. J., Savchenko, A. (2015). Functional and structural diversity in GH62 α -L-arabinofuranosidases from the thermophilic fungus *S cytalidium thermophilum*. *Microbial Biotechnology*, 8(3), 419–433. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12168>
- Laghi, I. (2013). Cellulosa [Elektronisk bild]. Hämtad mars 29, 2017 från https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Cellulose_strand.svg?uselang=sv
- Li, S., Yang, X., Yang, S., Zhu, M., & Wang, X. (2012). Technology prospecting on enzymes: application, marketing and engineering. *Computational and structural biotechnology journal*, 2(3). <https://doi.org/10.5936/csbj.201209017>
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Bender, K. S., Buckley, D. H. (Daniel H., & Stahl, D. A. (2015). *Brock biology of microorganisms* (Uppl. 14, ss. 39). London: Pearson. Retrieved from <http://chans.lib.chalmers.se/record=b2193998>
- McGrane, M. M. (2014). Carbohydrate. *Access Science*. <https://doi.org/10.1036/1097-8542.107910>
- McGraw-Hill Education. (2003). *McGraw-Hill Dictionary of Science and Technical Terms* (Uppl. 6). New York.
- McKee, L. S. (2017). Measuring Enzyme Kinetics of Glycoside Hydrolases Using the 3,5-Dinitrosalicylic Acid Assay. In *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* (Vol. 1588, ss. 27–36). https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6899-2_3
- Miller, G. L. (1959). Use Of Dinitrosalicylic Acid Reagent For Determination Of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*, 31(3), 426–428. Hämtad från <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac60147a030>
- Mäkelä, M. R., & de Vries, R. P. (2014). Plant biomass degradation by fungi. *Fungal Genetics and Biology*, 72, 2–9. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2014.08.010>
- Newman, S. (2008). *Final energy crisis* (Uppl. 1). London: Pluto Press. Hämtad från <http://ebookcentral.proquest.com/lib/chalmers/reader.action?docID=3386420>
- Onipe, O. O., Jideani, A. I. O., & Beswa, D. (2015). Composition and functionality of wheat bran and its application in some cereal food products. *International Journal of Food Science and Technology*, 50(12), 2509–2518. <https://doi.org/10.1111/ijfs.12935>
- Pandey, A. (2003). Solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 13(2), 81–84. [https://doi.org/10.1016/S1369-703X\(02\)00121-3](https://doi.org/10.1016/S1369-703X(02)00121-3)
- Peculyte, A., Anasontzis, G. E., Karlström, K., Larsson, P. T., & Olsson, L. (2014). Morphology and enzyme production of *Trichoderma reesei* Rut C-30 are affected by the physical and structural characteristics of cellulosic substrates. *Fungal Genetics and Biology*, 72, 64–72. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2014.07.011>
- Percival Zhang, Y.-H., Himmel, M. E., & Mielenz, J. R. (2006). Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies. *Biotechnology Advances*, 24(5), 452–481. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2006.03.003>
- Pińkowska, H., Wolak, P., & Złocińska, A. (2011). Hydrothermal decomposition of xylan as a model substance for plant biomass waste – Hydrothermolysis in subcritical water. *Biomass and Bioenergy*,

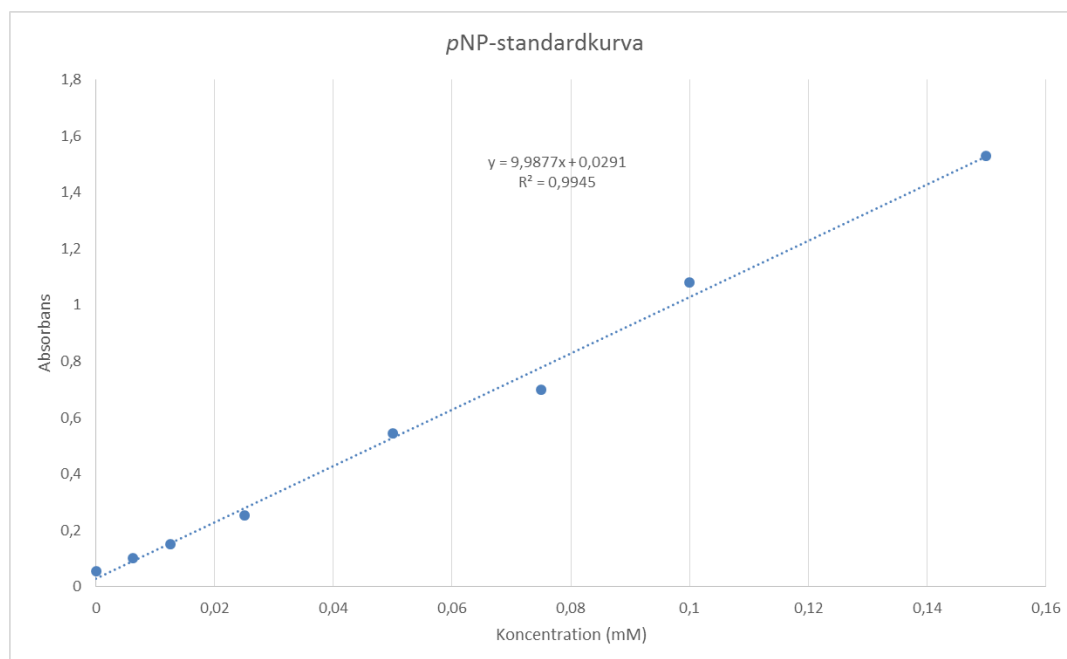
- 35(9), 3902–3912. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2011.06.015>
- Sjöström, E. (1993). Chapter 3 – Wood polysaccharides. In *Wood Chemistry* (ss. 51–70). <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-092589-9.50007-3>
- Sørensen, I., & Rose, J. K. C. (2014). Cell walls (plant). *Access Science*. <https://doi.org/10.1036/1097-8542.117510>
- Tao, B. Y. (2014). Biomass. *Access Science*. <https://doi.org/10.1036/1097-8542.083300>
- Van Den Brink, J., & De Vries, R. P. (2011). Fungal enzyme sets for plant polysaccharide degradation. *Applied microbiology and biotechnology*, 91(6), 1477-92. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3473-2>
- Villarreal, M. R. (2015). Cellväggen hos växter [Elektronisk bild]. Hämtad mars 27, 2017 från https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Plant_cell_wall_diagram_gl.svg
- Wellner, D. (2016). Enzyme. *Access Science*. <https://doi.org/10.1036/1097-8542.236000>
- Whistler, R. L., & Daniel, J. R. (2014). Pectin. *Access Science*. <https://doi.org/10.1036/1097-8542.493700>
- Wiegant, W. M. (1992). Growth characteristics of the thermophilic fungus *Scytalidium thermophilum* in relation to production of mushroom compost. *Applied and Environmental Microbiology*, 58(4), 1302-1307
- Yikrazuul. (2009). Xylan [Elektronisk bild]. Hämtad mars 30, 2017, från <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Xylan.svg>

Bilaga 1

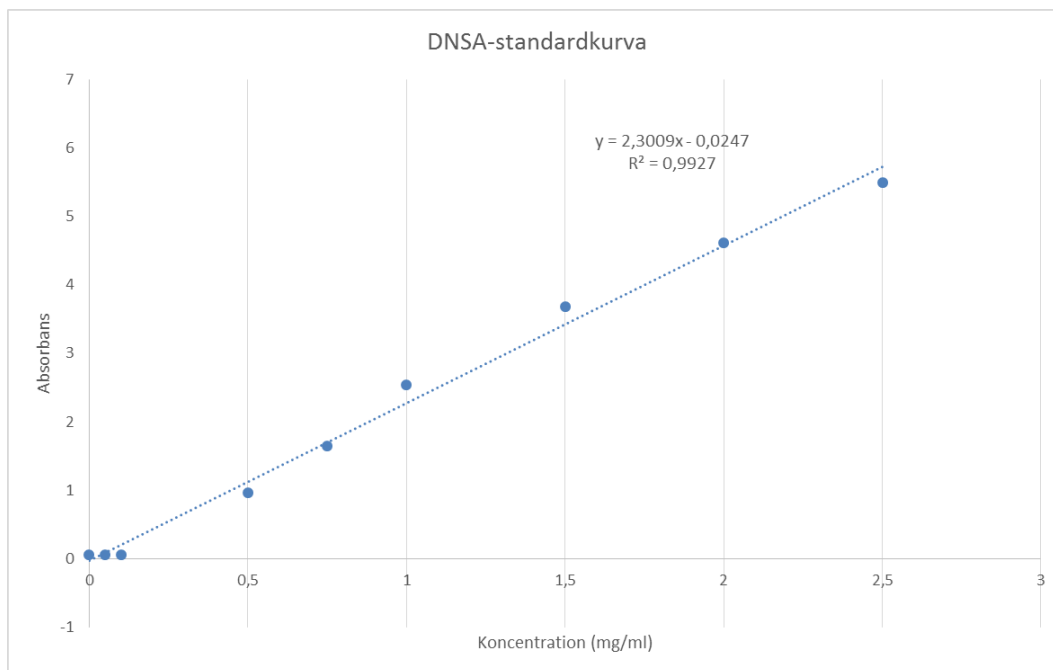
Standardkurvor



Figur 20. Standardkurva för Bradfordanalys, med BSA koncentrationerna 50, 75, 125, 250, 500 och 750 $\mu\text{g/ml}$. Genom en trendlinje genom samtliga punkter fås ett samband mellan absorbans och koncentrationen av BSA. Ekvationen för trendlinjen ses i grafen.



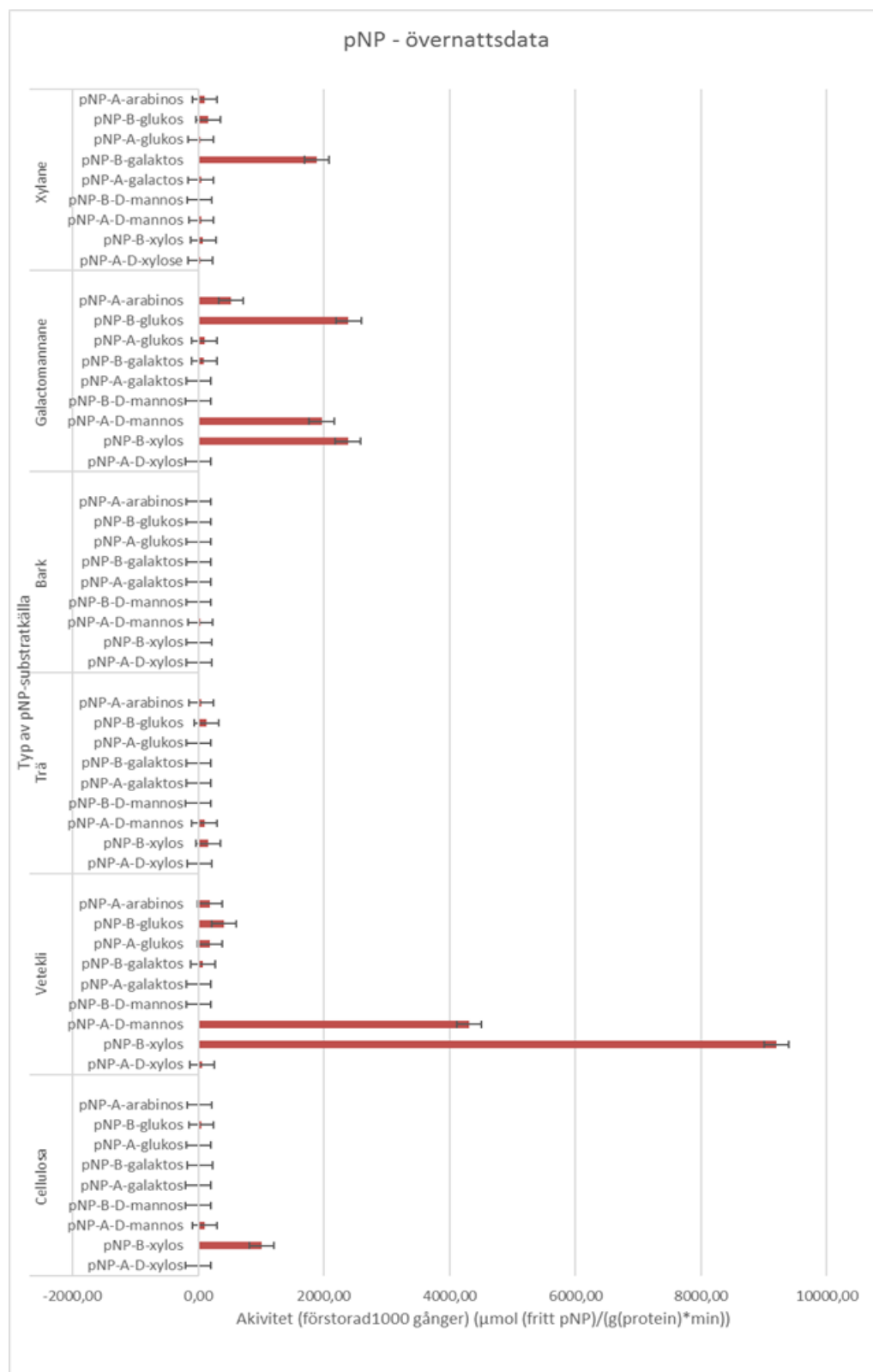
Figur 21. Standardkurva för pNP-analys med fritt pNP i koncentrationerna 0, 0,00625, 0,0125, 0,025, 0,05, 0,075, 0,1 och 0,15 mmol/l. Genom en trendlinje genom samtliga punkter fås ett samband mellan absorbans och koncentration av fritt pNP. Ekvationen för trendlinjen ses i grafen.



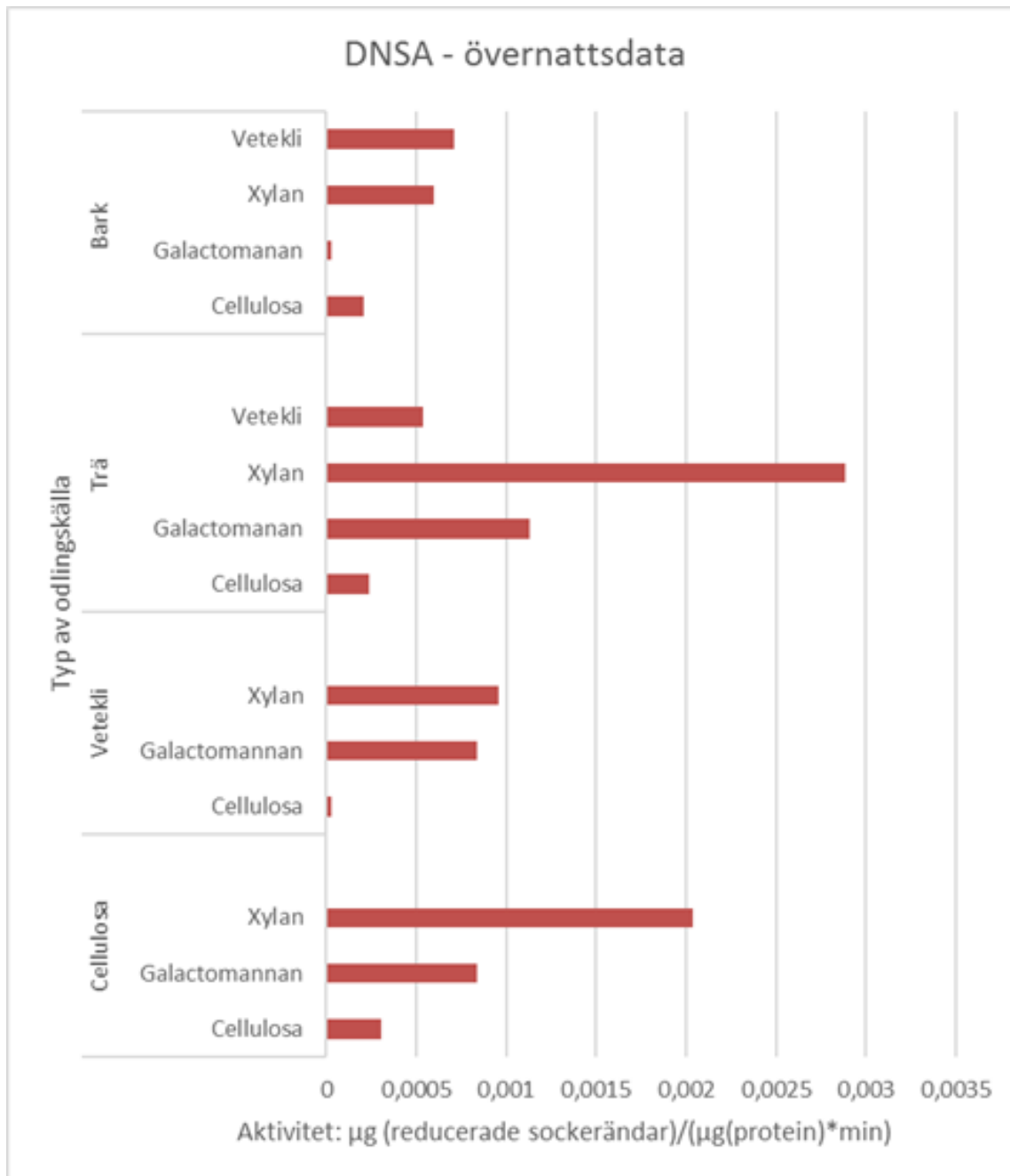
Figur 22. Standardkurva för DNSA-analys med glukos i koncentrationerna 0, 0,05, 0,1, 0,5, 0,75, 1, 1,5, 2 och 2,5 mg/ml. Genom en trendlinje genom samtliga punkter fås ett samband mellan absorbans och koncentration av reducerande ändrar. Anledningen varför glukos användes, var för att den bara kan reduceras en gång. Ekvationen för trendlinjen ses i grafen.

Bilaga 2

Resultat övernattningsmätningar



Figur 23. Övernattingsdata av andra omgången av pNP-analyser, vilket ger svar om vilka syntetiska substrat som användes till senare steg av översiktsstudien.



Figur 24. Övernattsdata av andra omgången av DNSA-analyser, vilket ger svar om vilka enzymsubstrat som användes till senare steg av översiktsstudien.