

KANDIDATPROJEKTSRAPPORT 2015

Enzymatisk extrahering och konvertering av lignin för framtida bioraffinaderier

KBTX01-15-14

Christoffer Bäckberg

Arvid Hagelberg

Rebecka Johansson

Linn Kullberg

Louise Samuelsson

Clara Sundström



Handledare: Carl Johan Franzén och Sylvia Klaubauf
Institutionen för Biologi och Bioteknik
Avdelningen för Industriell bioteknik
CHALMERS UNIVERSITY OF TECHNOLOGY
Gothenburg, Sweden 2015-05-16

Enzymatisk extrahering och konvertering av lignin för framtida bioraffinaderier

Christoffer Bäckberg	chrback@student.chalmers.se
Arvid Hagelberg	arvidha@student.chalmers.se
Rebecka Johansson	rebjoha@student.chalmers.se
Linn Kullberg	klinn@student.chalmers.se
Louise Samuelsson	lousamu@student.chalmers.se
Clara Sundström	clarasu@student.chalmers.se

Handledare: Carl Johan Franzén och Sylvia Klaubauf, Institutionen
för Biologi och Bioteknik

Examinator: Eva Albers, Institutionen för Biologi och Bioteknik

Kandidatprojektsrapport 2015
Institutionen för Biologi och Bioteknik
Avdelningen för Industriell bioteknik
Chalmers Tekniska Högskola
SE-412 96 Gothenburg
Telephone +46 31 772 1000

Skriven i L^AT_EX
Göteborg, Sverige 2015

Abstract

Enzymatic Extraction and Conversion of Lignin for Use in Future Biorefineries

The current methods of producing organic chemicals and fuel from oil are not sustainable in the long term. However, lignin based organic chemistry has the potential to be a renewable alternative to oil but is today an underused resource. This report contributes to research in this field by studying possible valorization of lignin, suitable enzymes for separation of lignin and hemicellulose and by examining fungi which may potentially degrade lignin.

Literature studies allowed for construction of a potential pathway from coniferyl alcohol to the pharmaceuticals L-dopamine and adrenalin. By dehydrogenation, amination and demethylation, L-dopamine can be made from coniferyl alcohol. Adrenaline is made from L-dopamine using enzymes found in the human biosynthesis pathway. The suggested pathway may require modification of the catalysing enzymes. Production of these compounds requires further study, but could provide an economic incentive in the development of biorefineries.

Phylogenetic studies showed that a hypothetical enzyme, DICSQDRAFT_107426, from *Dichomitus squalens* could be of interest for future studies of separation of lignin from lignocellulose. Characterized glucuronoyl esterases capable of breaking ester bonds between lignin and glucuronic acid residues in hemicellulose in organisms closely related to *D. squalens* makes this organism a good candidate for finding new enzymes able to degrade lignin. The organism is of further interest for Swedish industry as it usually grows on coniferous trees, which are prevalent in Sweden. Protocols for characterization have been compiled.

Plating of fungal samples collected from a wooded area in the vicinity of the Chalmers Johanneberg campus show good prospects of finding filamentous fungi capable of utilizing lignin. Further studies may identify additional fungi and enzymes able to separate, purify and degrade lignin.

Extraction of lignin will also impact availability of hemicellulose, which is of interest to the polymer industry. This project can hopefully lay a foundation for future studies on degradation and usage of lignin where the pathway can be tested and *D. squalens* studied.

Keywords: lignin, enzymes, valorization, sustainability, phylogeny, field samples.

Sammanfattning

Oljebaserad kemikalie- och bränsleframställning är inte långsiktigt hållbart. Ligninbaserad kemi har potential att vara ett förnyelsebart alternativ men är idag en underutnyttjad resurs. Denna rapport bidrar till forskningen inom detta fält genom att undersöka möjlig valorisering av lignin och lämpliga enzym för separering av lignin och hemicellulosa samt genom att testa olika svampar som har potential att bryta ned lignin.

Utifrån studier av kända enzymkatalyserade reaktioner kunde en potentiell reaktionsväg från koniferylalkohol till läkemedelssubstanserna L-dopa och adrenalin tas fram. Via dehydrogenering, aminering och demetylering kan L-dopa bildas från koniferylalkohol. Adrenalin föreslås bildas ur L-dopa med hjälp av enzym från den mänskliga biosyntesen. Denna reaktionsväg kan kräva modifiering av de ingående katalyserande enzymen. Framställning av L-dopa och adrenalin ur lignin kräver fortsatta studier men kan komma att bli ett ekonomiskt incitament för utvecklingen av bioraffinaderier.

För extraktion av lignin och hemicellulosa krävs en metod att bryta esterbindningar mellan lignin och glucuronsyror i hemicellulosa. Fylogenetiska studier visade att ett hypotetiskt enzym, DICSQDRAFT_107426, från *Dichomitus squalens* är lämpligt för fortsatta studier kring separation av lignin från lignocellulosa. Karakteriserade ligninbrytande glucuronoylsyraesteraser hos organismer närbesläktade till *D. squalens* gör organismen till en god kandidat att hitta nya ligninbrytande enzym i. Organismen är av ytterligare vikt för svensk industri, då den vanligtvis växer på barrträd. Protokoll för karakterisering av enzymet har sammanställts.

Uppodling av svampprover från området kring Chalmers Johanneberg visade att möjligheten att hitta filamentösa svampar som kan tillgodogöra sig lignin är god. Fortsatta studier kan identifiera fler svampar och enzym med förmåga att separera, rena och bryta ner lignin.

Extraktion av lignin påverkar också tillgängligheten av hemicellulosa, vilket är av intresse för polymerindustrin. Detta projekt kan förhoppningsvis vara en grund för framtida studier kring nedbrytning av och användningsområden för lignin där reaktionsvägarna kan testas och *D. squalens* studeras.

Nyckelord: lignin, enzym, valorisering, hållbarhet, fylogeni, fältprover.

Innehåll

1	Inledning	1
1.1	Syfte och mål	1
1.2	Bakgrund	1
1.3	Avgränsningar	2
2	Teori	2
2.1	Lignin	2
2.2	Enzym för separation och valorisering av lignin	3
2.3	Fylogenetiska träd	4
2.4	Ligninbrytande svampar	6
3	Metod	7
3.1	Enzymatiska reaktionsvägar	7
3.2	Separationsenzym	7
3.3	Ligninbrytande svampar	8
3.3.1	Insamling av prover	8
3.3.2	Agarplattor	8
3.3.3	Odlingsbetingelser	9
3.3.4	Utstryk av prover	9
3.3.5	Renstryk av kolonier	9
3.3.6	Inokulering av renstrykta kolonier	10
3.3.7	Identifiering av svampar	10
4	Resultat	10
4.1	Enzymatiska reaktionsvägar	10
4.1.1	L-dopa och adrenalin	10
4.1.2	Konvertering av koniferylalkohol till L-dopa	11
4.1.3	Konvertering av L-dopa till adrenalin	13
4.2	Separationsenzym	14
4.3	Ligninbrytande svampar	16
4.3.1	Uppodling av svampar	16
4.3.2	Identifiering av svampar	17
5	Diskussion	18
5.1	Enzymatiska reaktionsvägar	18
5.2	Separationsenzym	19
5.3	Ligninbrytande svampar	20
5.4	Slutsats	20
	Källförteckning	22
	Bilaga A Agarplattor med lignin	I
	Bilaga B Agarplattor med potatisextrakt och dextros	III
	Bilaga C LB-media samt agarplattor med LB-media	IV
	Bilaga D PCR-reaktion	V
	Bilaga E Restriktion med EcoRI och XbaI	VII
	Bilaga F Gelelektrofores	VIII

Bilaga G	Upprening av DNA från Agarosgel	X
Bilaga H	Ligering med T4-ligas	XII
Bilaga I	Transformation	XIII
Bilaga J	Genuttryck	XIV
Bilaga K	Proteinextraktion och 6x His-tag proteinrening	XV
Bilaga L	SDS-PAGE	XVII
Bilaga M	Bradfordanalys	XX
Bilaga N	Detektion av aktivitet	XXII
Bilaga O	Beskrivningar av svampkoloniernas utseende efter renstryk	XXIII
Bilaga P	Foton av renstrykta kolonier	XXXIII
Bilaga Q	Plasmidsekvens, aminosyrasekvens och för <i>E. coli</i> kodonoptimerad nukleinsyrasekvens för DICSQDRAFT_107426	XLV

1 Inledning

1.1 Syfte och mål

Syftet med detta arbete är att bidra till forskning som ämnar att ersätta dagens oljebaserade organiska kemi med förnyelsebar ligninbaserad bioteknik. Inom detta projekt har tre mål satts upp för att bidra till denna forskning.

1. Ta fram ett förslag på en enzymatisk reaktionsväg som kan användas för att syntetisera en värdefull kemikalie från lignin.
2. Identifiera ett enzym som förmodas kunna bryta bindningar mellan lignin och hemicellulosa, samt planera arbetsgång för att karaktärisa dess aktivitet.
3. Identifiera svamparter från fältprov som kan bryta ner lignin.

1.2 Bakgrund

Dagens samhälle är på flera sätt beroende av olja. Framförallt används fraktioner av oljan till att framställa flera olika typer av bränsle, men även många av de kemiska produkter som används i stora mängder idag tillverkas med råolja som bas [1]. Oljebaserade kemikalier används även för att göra plast, ett material med många olika användningsområden [2]. Eftersom oljan förr eller senare kommer ta slut [3] kommer tillverkning av bränsle, kemikalier och plast från olja inte kunna upprätthållas för alltid. Det skulle alltså vara bra att redan nu börja tillverka dessa produkter på ett mer hållbart sätt. Trä har potential att fylla alla dessa behov.

Växtcellernas cellvägg består av polysackariderna cellulosa och hemicellulosa som är inbäddade i lignin [4] [5]. Cellulosan består av långa kedjor av glukos vilka kan hydrolyseras och fermenteras till bioetanol [6] som är ett alternativ till fossila bränslen. Idag produceras etanol av stärkelsebaserade grödor vilket medför konkurrens av produktion av mat [7]. Cellulosabaserad etanol har potential att reducera denna konflikt och har dessutom bättre hållbarhetsperspektiv [8].

För att öka den cellulosabaserade bioetanolproduktionens konkurrenskraft i framtiden anses det vara viktigt att även kunna producera värdefulla material eller kemikalier ur beståndsdelar i trä och restprodukter från jordbruk [9]. Hemicellulosa är intressant ur materialsynpunkt då det har visat sig kunna omvandlas till plastfilm [10]. Ligninet har också intressanta egenskaper då det är en komplex polymer bestående av många olika typer av aromatiska komponenter vilka skulle kunna utgöra en grund för biobaserad organisk kemi [11]. För dessa applikationer krävs bra metoder för att separera de olika komponenterna i lignocellulosa. Ligninet verkar hämmande i fermenteringen av cellulosa, vilket sänker reaktionshastighet och utbyte vid bioetanolproduktionen [12]. Nuvarande separeringsmetoder fragmenterar hemicellulosan tillsammans med ligninet [11].

Produktion av geler och plast från hemicellulosa kräver att tvärbindning utförs [13], vilket skulle kunna undvikas om hemicellulosan kan separeras ofragmenterad. Lignin kan också användas för tillverkning av geler [14] och kolfiber [15] vilket gör det intressant att kunna göra försök med intakt lignin.

I detta projekt har litteraturstudier gjorts för att ta fram en potentiell enzymatisk reaktionsväg från en beståndsdel i lignin till en värdefull produkt. Med hjälp av fylogeni har även ett enzym identifierats som tros kunna bryta bindningar mellan lignin och hemicellulosa. En arbetsgång för karaktärisering av detta enzym har även tagits fram. Utöver detta har filamentösa svampar från naturen odlats fram på lignin som kolkälla varpå en enklare identifiering gjordes på ett urval av dem.

1.3 Avgränsningar

När det gäller de enzymatiska reaktionsvägarna lades fokus på en enda slutprodukt från monolignolerna även om ett flertal intressanta slutprodukter kunde identifieras. Resonemanget kring detta var att mer information kring en enda slutprodukt ansågs mer passande än mindre information om flertalet produkter. Övriga slutprodukter kan istället behandlas i framtida projekt. Av samma anledning valdes en specifik organism, *E. coli*, för produktion av separationsenzym. Denna organism studerades därför noga och protokoll för framtida laborationer för att extrahera dessa enzym gjordes enbart för denna organism.

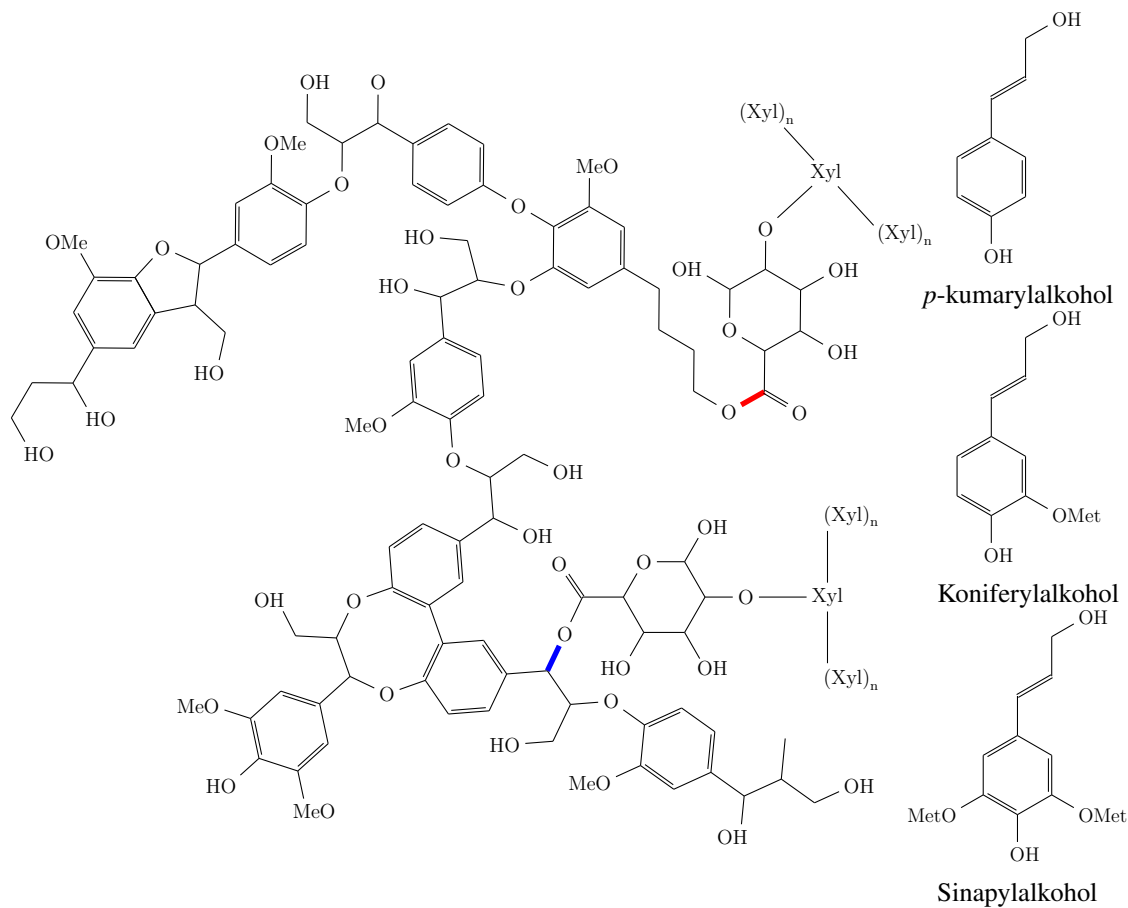
Det laborativa arbetet med de ligninbrytande svamparna begränsades till sju naturprover. Då proven fått växa på olika typer av plattor inokulerades och identifierades bara en andel av det totala antalet prov. Detta gjordes då det var troligt att flera plattor innehöll samma arter och på så sätt kunde upprepande identifieringar undvikas.

2 Teori

Att på ett effektivt och kontrollerat sätt kunna separera lignin ur lignocellulosa har länge varit ett problem för forskare. Att lösa problemet är nödvändigt för att möjliggöra enzymatisk valorisering av lignin, det vill säga att via en enzymatisk process ta fram en värdefull produkt ur ligninet.

2.1 Lignin

Lignin byggs upp av tre byggstenar, vilka gemensamt kallas för monolignoler, via en radikaliseringsprocess i växtcellernas cellvägg [16]. De tre byggstenarna är *p*-kumarylalkohol, koniferylalkohol och sinapylalkohol vars strukturer visas till höger i Figur 2.1. Radikaliseringsprocessen innebär att var och en av monolignolerna radikalieras via olika typer av lackas- och peroxidasenzym för att sedan reagera med varandra [16]. Detta



Figur 2.1: Ett exempel på en ligninstruktur bunden till glucuronoxylan, en typ av hemicellulosa, samt schematiska bilder av monolignolerna. α - och γ -esterbindningarna mellan lignin och glucuronatresten är markerade. α -esterbindningen i rött och γ -esterbindningen i blått. Figur delvis baserad på en bild på glucuronoxylan samt lignin från databasen MetaCyc [18] och ritad i L^AT_EX.

innebär att ligninsyntesen sker väldigt slumpartat då många olika typer av monolignolradikaler kan reagera med varandra för att bilda stora och komplexa molekyler. Till vänster i Figur 2.1 visas en hypotetisk molekyelstruktur för en sådan molekyel. Att extrahera någonting ur ligninet är därför svårt eftersom det ej är ett homogent material. Idag finns olika kemiska processer för extraktion av lignin i sin helhet, men det är oklart hur den molekylära strukturen ser ut för det framtagna ligninet [17].

2.2 Enzym för separation och valorisering av lignin

Enzym är katalyserande protein som tillverkas och används av levande celler för att effektivisera metabolism, biosyntes samt övriga livsuppehållande funktioner [19]. De är effektiva, specifika och kan till skillnad från kemiska katalysatorer verka vid relativt milda förhållanden. Enzym är också stereospecifika, vilket gör dem extra intressanta att utnyttja vid produktion av kirala molekyler [19]. Många enzym kräver en extern komponent, en

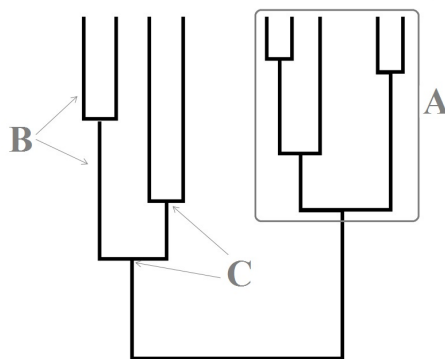
så kallad kofaktor, för att fungera [19]. Denna kan exempelvis vara en vitamin eller en metalljon.

Det är möjligt att på bioteknisk väg modifiera enzym för att påverka deras egenskaper [19]. På detta sätt kan användningsområdet för enzymer ökas. Att valorisera lignin med hjälp av enzym är därmed en intressant möjlighet. Ett steg på vägen är att hitta reaktionsvägar mellan hypotetiska ligninfragment och en särskild produkt. Ett exempel på en sådan reaktionsväg presenterades av Gutman et al. år 2014 [20] där man tänkte sig konvertera para-xylen till tereftalsyra.

För att bättre kunna utnyttja lignin, och även hemicellulosa, vore det också bra att kunna separera dessa utan att förstöra dess inre struktur. För detta behöver bindningarna mellan materialen brytas utan att några inre bindningar bryts. Då enzym ofta är specifika för en sorts bindning kan ett eller flera separationsenzym vara en bra lösning på problemet. Det som här kallas *separationsenzym* är ett enzym som ska kunna bryta α - och γ -arylalkylesterbindningar mellan hemicellulosa och lignin. Dessa bindningar visas i Figur 2.1. Nya upptäckter av glucuronoylsyraesteraser har gjort att effektiv separering av lignin snart kan komma att bli möjligt. Dessa enzym är mycket specifika och bryter bindningar som andra kolhydratesteraser inte bryter [21]. Man har funnit att de hydrolyserar α - och γ -arylalkylesterbindningar mellan glucuronoxylan, i hemicellulosa, och de monolignoler som bygger upp ligninet [22] [21] [23]. Glucuronoylsyraesteraserna har placerats inom familjen kolhydratesteraser med betäckningen CE15 [24].

2.3 Fylogenetiska träd

Ett fylogenetiskt träd är en avbildning av släktskap mellan olika organismer eller homologer av samma gener och proteiner. Släktskap visas genom att likheter mellan genom eller aminosyrasekvenser hittas. På så sätt skapar fylogenin en karta över evolutionära förändringar i datan [25]. Figur 2.2 visar en skiss av ett fylogenetiskt träd. A markerar en klad, vilken består av en förfader och alla organismer som härstammar ur just den förfadern och B markerar grenar [25]. C markerar noder, eller gemensamma hypotetiska



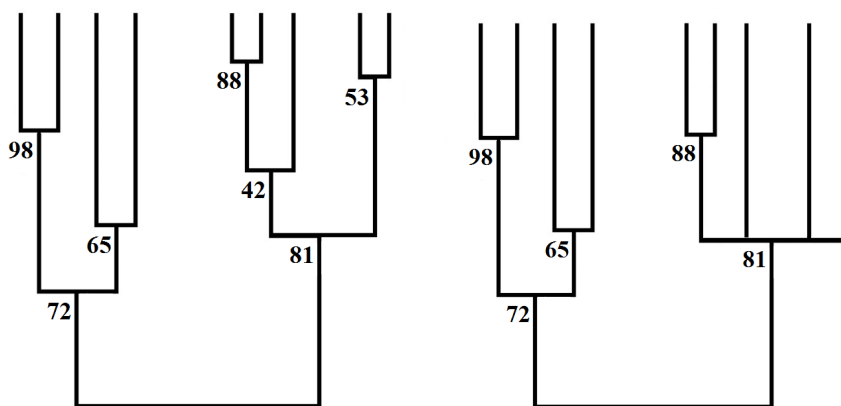
Figur 2.2: En skiss av ett fylogenetiskt träd med klad (A), gren (B) och nod (C) markerade. Egenritad figur.

förfäder [26].

Det finns flera olika metoder för att skapa ett fylogenetiskt träd. Gemensamt för alla dessa metoder är att man först måste göra en linjering, även kallat alignment, av de olika sekvenserna. Linjeringen studeras sedan och abnormaliteter hanteras genom exkludering eller beskärning.

De olika metoderna för att utvärdera släktskapet baserat på linjeringen är huvudsakligen Parsimoni, Neighbour-joining, Maximum likelihood och Bayesisk analys där Maximum likelihood är den mest använda metoden. Maximum likelihood (ML) är en skattning som är väldigt vanlig inom statistik [25]. ML klarar av att avbilda släktskap även då flera mutationer kan ha skett på samma plats [27]. Som namnet antyder kommer därmed ML att producera det träd som med högst sannolikhet beskriver likheter och olikheter i sekvenserna för de undersökta organismerna så att ett troligt släktträd skapas [27]. En stor fördel med ML är att den är robust och oftast ger mer korrekta resultat än Neighbour-joining eller Parsimoni [27]. Dock tar metoden längre tid eftersom den är mycket beräkningsintensiv. För mindre set av data, innehållande cirka 20 sekvenser, är dagens datorer dock mer än tillräckligt snabba för att konsekvent använda ML.

När ett träd har konstruerats är det oftast intressant att se hur robust trädet är, för att säkerställa att resultatet inte är en slump. Ett vanligt sätt att testa det är genom bootstrapping. Bootstrapping bygger på att nya träd konstrueras ur stickprov från mängden sekvenser



Figur 2.3: Exempel på cutoff och kollaps med cutoff-värde på 60. Alla noder med bootstrapvärde under 60 har kollapsats. Egenritad bild.

[27]. Stickprovet görs med återläggning, vilket gör det möjligt att vissa sekvenser väljs flera gånger eller inte väljs alls. Efter att cirka 100 träd har konstruerats på detta sätt räknas hur många gånger träden innehåller de olika kladerna från originalträdet. Detta uttrycks sedan som en procentsats som kallas bootstrapvärde [27]. Ett träd kan då reduceras till bara de statistiskt väl underbyggda noderna, se Figur 2.3, där man har tagit bort alla noder som inte dyker upp i en viss mängd av träden. Detta kallas att man kollapsar trädet. Det bootstrapvärde noden behöver ha för att inkluderas kallas cutoff-värde [27].

2.4 Ligninnedbrytande svampar

De filamentösa svampar som kan bryta ner trä och därmed måste hantera lignin på något sätt delas in i tre grupper: brunröte-, vitröte- och mjukrötesvampar [28]. Brunröte- och mjukrötesvamparna är mer specificerade på att bryta ned cellulosa och hemicellulosa medan de endast modifierar ligninet [28]. När det kommer till nedbrytning av lignin är vitrötessvamparna av intresse.

Vitrötesvamparna tillhör divisionen basidiesvampar (Basidiomycota) och är, tillsammans med vissa bakterier, de organismer man känner till som kan bryta ned lignin till koldioxid, vatten och andra mindre molekyler [28]. För att kunna bryta ned lignin använder sig vitrötesvamparna av extracellulära oxiderande enzym, lackaser och peroxidaser [28]. Svamparna kan inte växa på lignin som enda kolkälla utan bryter troligen ner ligninet för att komma åt cellulosan och hemicellulosan [28]. Försök har gjorts där man odlat upp svampar från skandinaviska jordprover, extraherat deras enzym och lyckats visa att dessa kan bryta ned lignin till mindre fragment [29].

När det kommer till identifiering av svampar brukar spormorfologi, det vill säga hur svampens sporer växer och ser ut, ge en god indikation på vilken art, vilket släkte eller åtminstone vilket fylum svampen tillhör. Zygomyceter är ett fylum av svampar som växer snabbt på agarplattor i rumstemperatur och kan på 2-3 dagar täcka hela plattan med sitt ljusa, fluffiga, sockervaddslänkande mycel [30]. Deras sporer kallas sporangium och ser ut som små svarta sfärer vilka sitter placerade längst ut på hyferna, de celltrådar som tillsammans bildar mycelet. Varje sporangium innehåller hundratals haploida sporer.

En annan vanligt förekommande fylum är Ascomyceter [30], även kallat sporsäcksvampar. Hit hör de vanligt förekommande släktena *Trichoderma*, *Penicillium* och *Alternaria*. *Trichoderma* karakteriseras av att dess konidioforer, de celltrådar hos svampar som bär asexuella sporer [30], är kraftigt grenade [30]. Släktet *Penicillium* karakteriseras av sina asexuella sporer, även kallade konidiosporer, vilka ser ut som borstar [30] medan *Alternaria* karakteriseras av dess droppformade sporer vilka sitter på rad som ett pärlband [30]. Sporerna hos *Alternaria* är uppdelade i flera avdelningar som skiljs åt av skiljeväggar vilka kallas septa [31]. Dessa kan skilja cellerna åt på horisontellt led eller både horisontellt och vertikalt led.

För att förstå hur väl en svamp växer på ett media undersöks kolonins diameter och densitet samt dess sporulering¹. En svamp som växer på ett rikt media producerar oftast mycel först och sedan sporer. Dessa svampar blir ofta stora och fluffiga med mycket mycel. När de växer på näringsfattigt media bildas det inte lika kraftigt mycel men sporer kan fortfarande bildas. För att hyfer ska växa krävs enbart vatten. Hyferna växer då i hopp om att hitta näring och sporer bildas som överlevnadsmekanism. Detta innebär att svamparna, trots brist på kolkälla, kan växa och sporulera.

¹Personlig kommunikation med Sylvia Klaubauf

3 Metod

Följande avsnitt behandlar arbetet som skett under projektets gång. För framtagning av en potentiell reaktionsväg och en planering för fortsatta studier kring separationsenzym utfördes främst litteraturstudier och databassökningar, medan odling och identifiering av svampar innebar laborativt arbete.

3.1 Enzymatiska reaktionsvägar

Som lämplig produkt att ta fram ur lignin eftersöktes en kiral, aromatisk molekyl. För att hitta förslag till produkt gjordes struktursökningar i databaserna Chemspider [32], Chemicals Data Base [33] och SciFinder [34]. Sökningarna utgick från bensenringar samt strukturer som liknade monolignolerna. Även listor av aromatiska molekyler genom-söktes. Möjliga produkter rangordnades efter användningsområde och potential att hitta en marknad att sälja produkten på.

Efter konsultation med handledare bestämdes det att gruppen skulle ta fram en reaktionsväg från koniferylalkohol till L-dopa vidare till adrenalin. För att hitta enzym som katalyserar nödvändiga reaktioner mellan koniferylalkohol och L-dopa användes databaserna Kegg [35] och Brenda [36]. För reaktioner mellan L-dopa och adrenalin gjordes litteraturstudier för att undersöka huruvida steg ur biosyntesen av adrenalin i människa kan användas för produktion av adrenalin i *Saccharomyces cerevisiae*. Homologisökningar för dessa enzym gjordes med BLAST-algoritmen för proteiner genom databasen NCBI [37] för att undersöka om liknande enzym finns i släktet *Saccharomyces*.

3.2 Separationsenzym

Arbetet började med homologisökningar mot karaktäriserade eukaryotiska enzym på CAZy [24] samt de enzym som var karaktäriserade i artikeln "Functional expression of a thermophilic glucuronoyl esterase from *Sporotrichum thermophile*: identification of the nucleophilic serine" [38]. Homologisökningarna utfördes med hjälp av BLAST-algoritmen gentemot databasen NCBI [37]. Med hjälp av BLAST-sökningarna byggdes ett bibliotek av liknande och förhoppningsvis närbesläktade enzymer. Dessa sekvenser linjäriserades sedan i programmet MEGA via algoritmen MUSCLE [39] och fylogenetiska träd konstruerades, se Figur 4.5 och 4.6. Träden konstruerades med Maximum likelihood som algoritm, bootstrap med 500 iterationer och ett cutoff-värde på 60 %. Utifrån de fylogenetiska träden samt diskussioner med handledare valdes att gå vidare med ett hypotetiskt protein, DICSQDRAFT_107426, från organismen *Dichomitus squalens*.

När enzymet valts utvärderades olika organismer och vektorer som kan användas för att uttrycka det. Efter diskussion med handledare valdes *Escherichia coli* som organism för att överuttrycka enzymet i, och ett passande media för att odla *E. coli* valdes ut. En vektor för proteinuttryck med hjälp av T7/lac-systemet i *E. coli*, erhållen av Joakim Norbeck,

utvärderades. Utöver uttrycket av proteinet planerades även försök för karakterisering av enzymet.

Protokoll och tillvägagångssätt för transformation och karakterisering sammanställdes tillsammans med recept för de olika media och reagens som krävs. Informationen inhämtades från litteraturstudier och direkt kontakt med forskare på institutionen för Biologi och Bioteknik. Plasmiden lades in i SnapGene [40] för att underlätta konstruktion av primers.

För att undersöka enzymets kinetik krävs ett reagens som ger en tydlig signal då α - och γ -arylalkylesterbindningar, markerade i Figur 2.1, bryts av enzymet. Artiklar om liknande försök med de redan karakteriserade enzymen studerades, eftersom det är rimligt att samma reagens kan användas för detta enzym då det förväntas ha samma funktion.

3.3 Ligninnedbrytande svampar

För att hitta svampar som kan tillgodogöra sig lignin odlades insamlade prover från området kring Chalmers Johanneberg samt prover erhållna från handledare på olika lignin-innehållande media. För ökad chans att hitta intressanta svampar skedde odling i olika temperatur samt anaerobt respektive aerobt. Identifiering utfördes med hjälp av spormorfologi.

3.3.1 Insamling av prover

Prover hämtades i ett grönområde (57°41'49" N, 11°58'32" Ö) i närheten av Götabergsgatan i Göteborg den 2a mars 2015. Prover togs av torr bark, vitröta, fuktigt trä, en ticka samt fuktig jord. Torra prover förvarades i kuvert och fuktiga prover i 50 ml falconrör i rumstemperatur över natten. Lövprover och svampprover erhöles också från handledare Sylvia Klaubauf.

3.3.2 Agarplattor

Proverna odlades på plattor med lignin som främsta kolkälla för att undersöka deras förmåga att tillgodogöra sig ligninet. Tre sorters lignin användes: Lignoboost (LiB), Sigma-Aldrich Lignin kraft alkali (AL) samt Sigma-Aldrich Lignin alkali, low sulfonate (ALLS). Då försöket kretsar kring att hitta svampar som kan tillgodogöra sig lignin tillsattes ampicillin till alla plattor för att förhindra bakterietillväxt. Ligninplattorna göts enligt protokoll i Bilaga A.

Som negativ kontroll användes agarplattor som göts enligt protokoll i Bilaga A, dock utan tillsats av lignin. Agarn som plattorna består av kan potentiellt utnyttjas som kolkälla. Den negativa kontrollen användes därför för att undersöka om det finns någon skillnad i tillväxt

på plattor utan respektive med lignin. För att verifiera att det finns viabla mikroorganismer odlas även prov på plattor med potatisextrakt- och dextrosagar (PDA) som en positiv kontroll. Dessa göts enligt protokoll i Bilaga B. Nya plattor gjordes inför första utstryket samt inför inokulering av renstrykta prov.

För uppodling av utstryk användes glukosplattor samt Yeast Peptone Dextrose-plattor (YPD-plattor). YPD-plattorna erhöles av handledare Sylvia Klaubauf och innehöll inte antibiotika. Glukosplattorna göts enligt Bilaga A, dock utan lignin, med tillsats av glukos till 25 mM efter autoklivering. Dessa plattor användes även vid utvärdering av svampars förmåga att växa på lignin.

3.3.3 Odlingsbetingelser

För att öka sannolikheten att hitta intressanta svampar odlades proven under flera olika betingelser. Lignin- och PDA-plattor odlades i rumstemperatur respektive 30°C, samt aerobt respektive anaerobt. På grund av begränsad möjlighet att odla anaerobt prioriterades odling på PDA-plattor över ligninplattor i anaeroba betingelser, då proverna förväntades växa bättre på dessa. Enstaka ligninplattor odlades i anaeroba förhållanden. Av dessa valdes plattor med prover som rimligtvis skulle kunna innehålla svamp som kan växa anaerobt.

3.3.4 Utstryk av prover

En spädningsserie gjordes av jordprovet. 1g jord i 10 ml MQ-vatten blev spädning 1x. Ur denna lösning gjordes även spädning 10x, 100x, och 1000x. Spädning 10x och 100x användes till odling på ligninplattorna, medan spädning 100x och 1000x användes till PDA-plattorna. 10 µl lösning ströks ut på varje platta.

Bark-, löv-, och träprov smulades sönder, medan övriga prov hackades. Proven placerades utspritt på lignin- och PDA-plattorna. Provets yta steriliserades i 70 % etanol innan de placerades på PDA-plattorna. Då kolonibildning och sporulering syntes på plattorna förseglades de med parafilm och flyttades till kylrum tills dess renstryk skulle ske.

3.3.5 Renstryk av kolonier

Av 84 aeroba plattor renströks totalt 33. De med tydligast kolonier och sporer valdes för renstryk på glukos medan resten ströks på YPD. I de fall sporer syntes skedde renstryk med en ympnål. I andra fall skars tre bitar av kolonier ut med skalpell och placerades på en ny platta. För alla prover krävdes två renstryk, där alla renstryk i andra omgången skedde på PDA, för att få fram rena kulturer som kunde inokuleras. För två prov krävdes ytterligare ett renstryk på PDA.

3.3.6 Inokulering av renstrykta kolonier

Av de renstrykta plattorna valdes 23 stycken vilka ansågs ha god tillväxt, tydlig sporulering och rena kolonier, det vill säga kolonier som inte bestod av flera arter. 3-5 ml vatten tillsattes till de renstrykta plattorna och med hjälp av en rackla suspenderades sporer i vattnet. 1 ml av suspensionen överfördes med pipett till ett Eppendorfrör. Från detta Eppendorfrör pipetterades sedan 5 μ l upp och placerades som en droppe i en av de fem nytillverkade plattorna med olika förhållanden. Från varje renstrykt koloni placerades tre droppar på varje typ av ligninplatta samt glukos- och agarplatta. Plattorna placerades i lådor i rumstemperatur. När tillräcklig tillväxt skett flyttades plattorna till kylrum. Slutligen jämfördes svamparnas tillväxt på glukos, agar och lignin.

3.3.7 Identifiering av svampar

Som sista steg identifieras några av de olika typerna av svampar. De som såg mest olika ut och visat någon tillväxt på ligninplattorna valdes för identifiering. Ett litet prov av sporulerande koloni blandades i en droppe mjölksyra och observerades i mikroskop. Proven släktbestämdes med hjälp av boken *Food and Indoor Fungi* av Samson et al. [30]. De identifierade svamparna sparades i glycerol i -80°C.

4 Resultat

I detta avsnitt presenteras resultaten av de litteratur- och databassökningar som gjordes inom arbetet med enzymatiska reaktionsvägar och separationsenzym, samt det praktiska arbetet som gjorts för att hitta ligninbrytande svampar.

4.1 Enzymatiska reaktionsvägar

I denna del av projektet gjordes litteratursökningar för att finna en enzymatisk reaktionsväg från en monolignol till lämpliga produkter. Startmolekylen valdes till koniferylalkohol, produkterna valdes till L-dopa samt adrenalin och en reaktionsväg mellan start- och slutprodukt föreslogs vilken presenteras i detta avsnitt.

4.1.1 L-dopa och adrenalin

Som lämpliga produkter att ta fram ur lignin valdes L-dopa och adrenalin. De är båda etablerade läkemedelssubstanter inom sjukvården och borde således vara relevanta för produktion även på lång sikt. Initialt granskades även de potentiella läkemedlen apocyanin

och gingerol [41] [42] [43], smakämnet etylvanillin samt den redan kända läkemedels-substansen paracetamol. Dessa valdes dock bort för att de ansågs vara svåra att modifiera alternativt inte lika eftersträfvansvärda som molekyler.

L-dopa är en intermediär i människans biosyntes av dopamin och adrenalin [44]. Det används som behandling mot Parkinsons sjukdom, vilken orsakar en brist av dopamin i hjärnan. Behandling med L-dopa sker kontinuerligt och kan ge några års fördröjning av sjukdomssymptomen [44]. År 2004 uppgavs produktionen av L-dopa vara 250 ton per år, varav 50 % producerades via en dyr och långsam kemisk process [45] [46]. Det kan därför vara av intresse att ta fram en enzymatisk tillverkning av L-dopa.

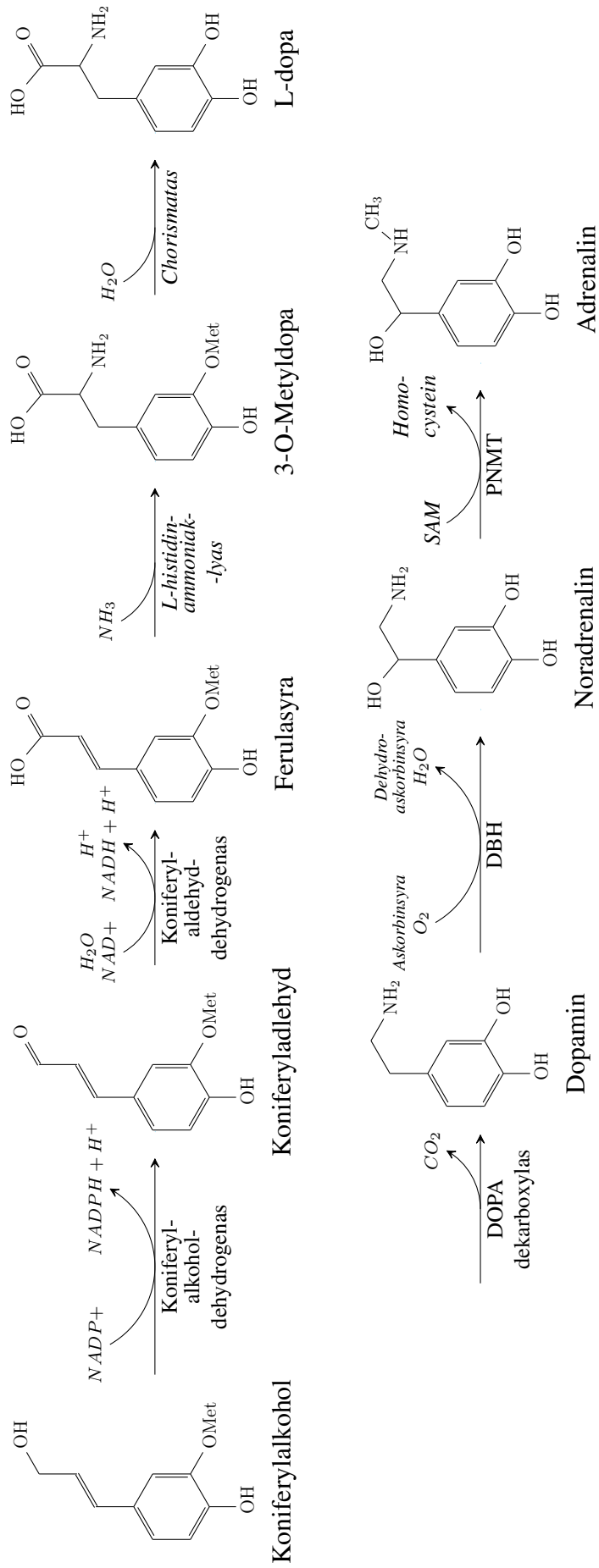
Adrenalin ges via injektion för behandling av anafylaxi, en plötslig och potentiellt dödlig allergisk reaktion, vanligen mot mat eller insektsstick [47] [48] [49]. Det förhindrar akuta symptom genom att vidga luftrör och förhindra utsläpp av inflammationsorsakande ämnen som histamin och tryptas [47] [49].

4.1.2 Konvertering av koniferylalkohol till L-dopa

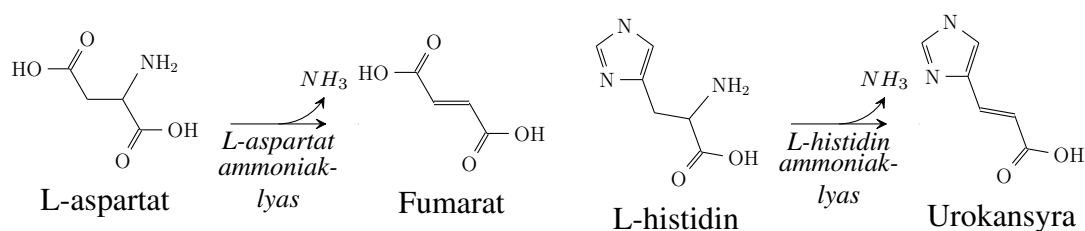
Koniferylalkohol, eller 4-(3-hydroxi-1-propenyl)-2-metoxifenol, visas i Figur 2.1. För att konvertera denna molekyl till L-dopa krävs en rad förändringar som var och en katalyseras av ett lämpligt enzym. I Figur 4.1 redovisas hela den tänkta reaktionsvägen från koniferylalkohol till adrenalin via L-dopa.

Först modifieras koniferylalkoholens kolsvans. Koniferylalkoholdehydrogenas (EC 1.1.1.194) [50] kan konvertera koniferylalkohol till koniferylaldehyd genom att oxidera alkoholgruppen på koniferylalkoholens kolkedjesvans till en aldehyd. Därefter kan aldehyden konverteras med hjälp av koniferylaldehyddehydrogenas (EC 1.2.1.68) [51] som oxiderar molekylen vidare till en karboxylsyra vid namn ferulasyra.

Efter detta krävs en aminering, addition av en amingrupp, över dubbelbindningen hos ferulasyra. För denna reaktion hittades två enzym som tros kunna utföra amineringen. Reaktionerna dessa enzym katalyserar syns i Figur 4.2. L-aspartat ammoniaklyas (EC 4.3.1.1) [52] utför en deaminering av L-aspartat för att bilda fumarat och ammoniak. Den andra, L-histidin ammoniaklyas (EC 4.3.1.3) [53] utför en deaminering av L-histidin för att bilda urokansyra och ammoniak. Av dessa två valdes L-histidin ammoniaklyas till den konstruerade reaktionsvägen då urokansyrans ringstruktur gör den mer lik ferulasyra. Den enzymatiska reaktionen för L-histidin ammoniaklyas är reversibel [54] vilket är positivt eftersom den omvända reaktionen är önskvärd i detta fall. På så sätt skulle den tänkta amineringen eventuellt kunna utföras.



Figur 4.1: Förslag på reaktionsväg från koniferylalkohol till L-dopa vidare till adrenalin. Enzymen i den nedre raden är delaktiga i den mänskliga biosyntesen av adrenalin. Enzymnamn i kursiv text visar att enzymet kan behöva modifieras för att reaktionen ska ske. Figur ritad i $\text{\LaTeX}$.



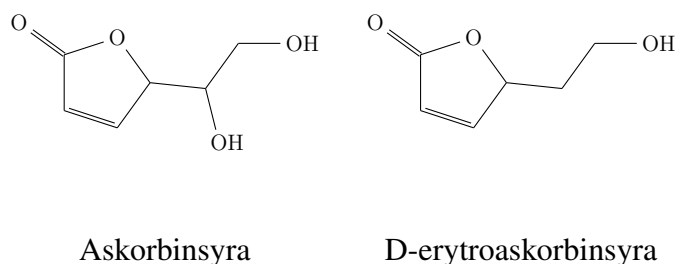
Figur 4.2: Reaktionen som katalyseras av L-aspartat ammoniaklyas respektive L-histidin ammoniaklyas. Figur ritad i L^AT_EX.

Slutligen byts metoxigruppen på kol 2 hos koniferylalkohol mot en hydroxidgrupp. Choris-matas (EC 3.3.2.13) kan hydrolysera en eterbindning mellan en aromatisk molekyl och pyruvat [55]. Detta enzym skulle eventuellt kunna utföra den önskade demetyleringen.

4.1.3 Konvertering av L-dopa till adrenalin

Reaktionsvägen som presenteras i detta avsnitt består av de tre sista enzymen människans biosyntes av adrenalin. Homologisökningarna som gjordes för de tre enzymerna resulterade i så låga värden att ingen av dem kan antas ha några homologa sekvenser i släktet *Saccharomyces*. Därför bör enzym från människa användas för att utföra reaktionerna.

Det första steget är en dekarboxylering av L-dopa för att bilda dopamin. Detta sker via enzymet L-dopa dekarboxylas (EC 4.1.1.28) [56]. Det andra steget är en hydroxylering av dopamin för att bilda noradrenalin med enzymet dopamin- β -hydroxylas (EC 1.14.17.1). Reaktionen kräver tillgång till syre och askorbinsyra [57]. *Saccharomyces cerevisiae* producerar inte själv askorbinsyra, men har en reaktionsväg för att producera ett liknande ämne, D-erytroaskorbinsyra [58] vars struktur visas i Figur 4.3.



Figur 4.3: Askorbinsyra, vilket behövs för människans biosyntes av adrenalin, och D-erytroaskorbinsyra vilket produceras i *Saccharomyces cerevisiae*. Figur ritad i L^AT_EX.

Produktionen av D-erytroaskorbinsyra i *S. cerevisiae* liknar växters produktion av askorbinsyra. Studier har visat att *S. cerevisiae* kan ta upp L-galaktos ur lösning och omvandla denna till askorbinsyra via enzymerna som deltar i produktion av D-erytroaskorbinsyra [58] [59] [60]. Överuttryck av två enzym från *Saccharomyces*, D-arabinoxidohydrogenas (EC 1.1.1.117) och D-arabinoxidolaktas (EC 1.1.3.37) förstärker dess förmåga att producera askorbinsyra [58].

Den tredje reaktionen, metylering av kvävet, katalyseras av fenyletanolamin-N-metyl-

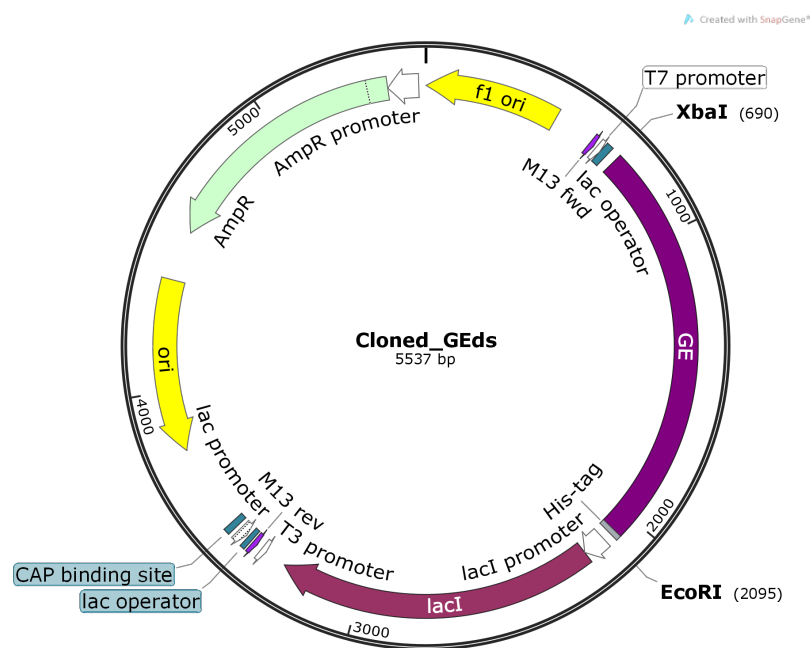
transferas (PNMT) (EC 2.1.1.28) och kräver S-adenosylmetionin (SAM) [61]. SAM finns naturligt i *Saccharomyces*, och kan ansamlas i cellen vid behov. En modifierad stam, SCY4, kunde ackumulera mer än 100 gånger så mycket SAM som omodifierad *Saccharomyces* [62].

4.2 Separationsenzym

För att kunna identifiera ett nytt potentiellt glucuronoylsyraesteras gjordes homologi-sökningar mot redan kända sådana. Signifikant homologa sekvenser användes sedan för att producera fylogenetiska träd. Detta med avsikt att få en ide om vilka enzym som var mest lika de redan karakteriserade enzymen och därmed få en utgångspunkt för att kunna välja ett enzym för fortsatta studier. När sekvenserna linjerades blev det tydligt att flera delar var konserverade hos enzymen vilket talar för att de bör ha liknande funktion.

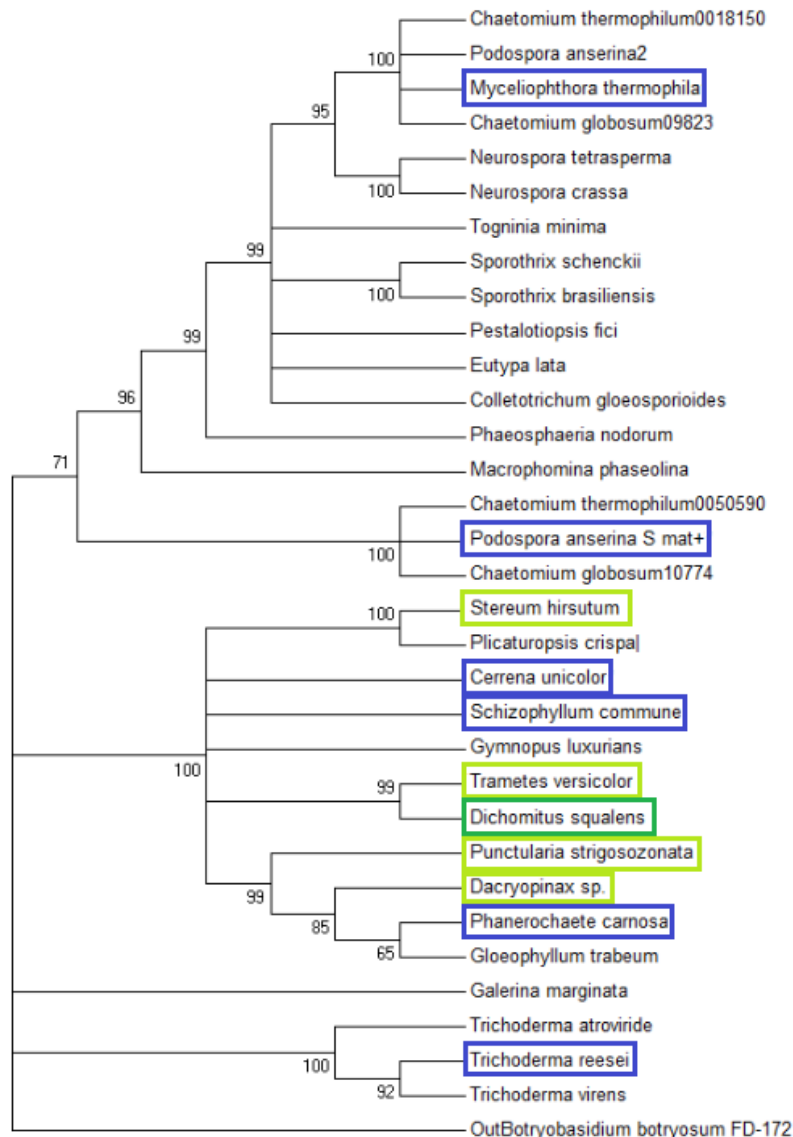
Resultatet av de fylogenetiska studierna, se Figur 4.5 och 4.6, visar att alla vitrötesvampar samlar sig i samma klad. Det framgår i båda träd att dessa enzym är väldigt närbesläktade. Det mörkgrönt markerade enzymet finns i en svamp som i huvudsak växer på barrträd medan de ljusgrönt markerade enzymen finns i svampar som huvudsakligen växer på lövträd [63]. Det mörkgrönt markerade enzymet, från *Dichomitus squalens*, valdes ut för fortsatta studier.

På handledares inrådan kommer uttrycket planeras för *E. coli*. Från Joakim Norbeck erhöles sekvensen för en plasmid, pbluescript_KS+_variant_LacI_LacO (hädanefter pBlue-script), som använder T7/lac-systemet. Sekvensen för enzymet, med en tillsatt 6xHis-tag, har kodonoptimerats för *E. coli*. En karta över plasmiden och genen finns i Figur 4.4.



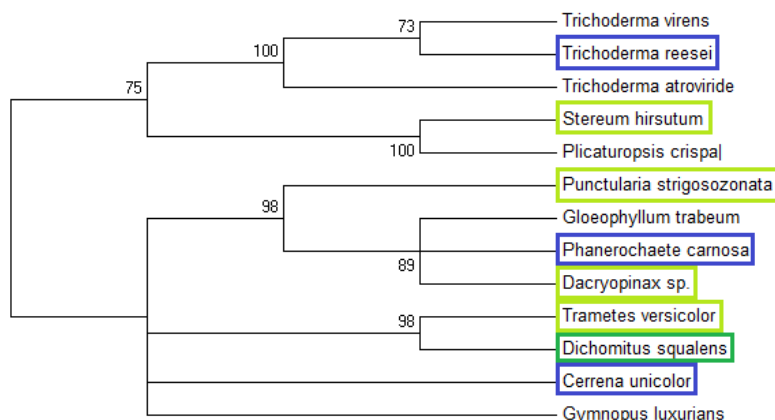
Figur 4.4: Plasmiden pBluescript med insert (GE). Bild gjord i SnapGene.

Protokoll för uttryck och karakterisering av enzymet från *D. squalens* har konstruerats och samlats. Protokoll för beredning av media för odling av *E. coli* finns i Bilaga C. Upplägget av protokollen förutsätter att genen för enzymet beställs. Det planerade försöket börjar med PCR-amplifiering av genen med primrarna 5'-ATCGCATCGGATCTAGTCTAGACGA-3' (uppströms) samt 5'-CGATGCCTAGCAGCTGATAGTGAA-3' (nedströms) enligt Bilaga D. Detta följs av restriktion av plasmid och amplifierad gen med *XbaI* och *EcoRI* enligt Bilaga E och en gelelektrofores enligt Bilaga F, för att rena upp DNA och bekräfta att korrekt PCR och restriktion skett.



Figur 4.5: Fylogenetiskt träd framtaget i MEGA med 60 % cutoff. Redan karakteriserade enzym är markerade i blått, enzym från vitrötessvampar som växer huvudsakligen på lövträd är markerade i ljusgrönt och enzym från vitrötessvampar som växer huvudsakligen på barrträd är markerade i mörkgrönt.

Efter extraktion och upprening av vektor och plasmid från gel enligt Bilaga G ligeras de med *T4 DNA Ligas*, se Bilaga H. Därefter transformeras *E. coli* med hjälp av värmechock enligt Bilaga I. Proteinuttrycks sedan genom att cellerna odlas i närvaro av IPTG, se



Figur 4.6: Fylogenetiskt träd framtaget i MEGA med 60 % cutoff. Redan karakteriserade enzym är markerade i blått, enzym från vitrötessvampar som växer huvudsakligen på lövträd är markerade i ljusgrönt och enzym från vitrötessvampar som växer huvudsakligen på barrträd är markerade i mörkgrönt.

Bilaga J, och skördande av enzymet sker via lysering och rening med 6xHis-tag-system enligt Bilaga K. Med hjälp av en SDS-PAGE och Bradfordanalys kan sedan enzymets massa respektive koncentration bestämmas, se Bilaga L och M.

Enzymets aktivitet kommer sedan bestämmas med hjälp av en bensyl-D-glucuronat-assay, enligt Bilaga N. Hydrolys av esterbindningen i ämnet av ett glucuronoylsyraesteras bildar fenol, som sedan kan detekteras med hjälp av kromatografi.

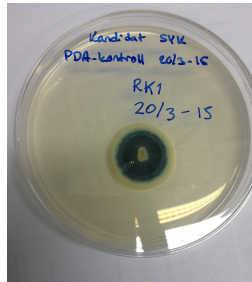
4.3 Ligninbrytande svampar

Överlag skedde måttlig till god tillväxt på nästan alla aeroba initiala plattor. Ingen tillväxt uppvisades på de anaeroba plattorna. Av de kolonier som renströks ansågs flertalet vara av samma art och sex stycken identifierades. Vid identifikationen fastställdes det att svamparna var av släktena *Penicillium*, *Trichoderma* och *Alternaria* samt fylumet *Zygomycota*.

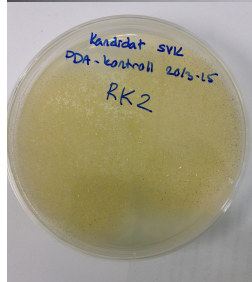
4.3.1 Uppodling av svampar

Av de 23 prover som inokulerades på glukos-, lignin- och agarplattorna uppvisades tillväxt på 110 av de totalt 115 plattorna, se Bilaga O och P. Det uppvisades en bättre tillväxt av svamparna på glukosplattorna jämfört med både agarplattorna och de olika ligninplattorna, se till exempel Figur P.1 i Bilaga P. Några plattor uppvisade ingen tillväxt, som i Figur P.10, men de flesta sorters svampar uppvisade bättre tillväxt på ligninplattorna än på agarplattorna, se till exempel Figur P.19. De enda prov som verkade växa bättre på agarplattorna än på ligninplattorna var 18 och 31, se Figur P.15 och Figur P.23. Detta är även mer utförligt beskrivet i Bilaga O.

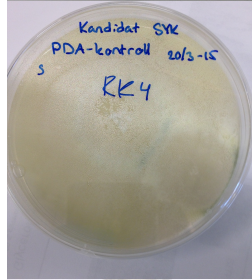
4.3.2 Identifiering av svampar



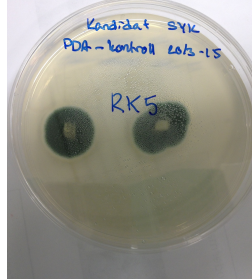
1: Kolonin var beige i mitten med gröna kanter. De var 1,5-2 cm i diameter. Kolonin var platt men mycelet hade en höjd i mitten på 3-4 mm. Den hade tätt mycel och tydliga sporuleringsborstar. Svampen identifierades som tillhörande släktet *Penicillium*.



2: Kolonierna var ljusgula med svarta prickar. De var 3-4 cm i diameter och mycelet var mycket fluffigt. Sporerne satt på hyferna. Svampen identifierades som tillhörande fylumet Zygomyceter.



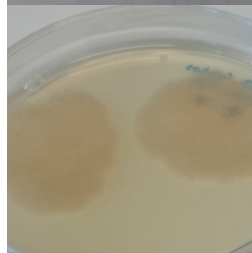
4: Kolonierna var transparenta i mitten och hade en gul ytterkant med några gula fläckar. Diametern hos kolonierna var ungefär 4 cm och de hade ett platt och ganska tätt mycel. Svampen sporulerade i kluster och i mikroskåpet kunde man se som trädgrenar hos mycelet. Svampen identifierades som tillhörande släktet *Tricoderma*.



5: Kolonierna var blågröna med vit mitt och ytterkant, täckta av mycel. Kolonierna var ungefär 1,5 cm i diameter och mycelet i mitten var tydligt högre än resten, cirka 4 mm jämfört med 2 mm. Sporerne var formade som borstar och svampen identifierades som tillhörande släktet *Penicillium*.



6: Kolonierna var ljus beige med vit mitt. Diametern hos kolonierna var 2,5-3 cm och mycelet var väldigt platt. Sporerne satt på tunna hyfer och var formade som borstar. Svampen identifierades som tillhörande släktet *Penicillium*.



12.3: Kolonierna var ljus beigerosa och diametern var cirka 3 cm. Mycelet var lätt fluffigt och inte så tätt. Sporerne var droppformade med horisontella och vertikala septa. Svampen identifierades som tillhörande släktet *Alternaria*.

5 Diskussion

I detta avsnitt diskuteras varför reaktionsvägen från lignin till adrenalin via L-dopa är av intresse, varför *Dichomitus squalens* valdes, vilka för- och nackdelar det finns med att använda *E. coli* i de planerade försöken samt vad tillväxten på de olika plattorna säger oss om svamparna.

5.1 Enzymatiska reaktionsvägar

Valet av L-dopa och adrenalin som slutprodukter gjordes av flera skäl. Till att börja med ansågs de vara goda kandidater eftersom molekylerna är någorlunda lika monolignolen koniferylalkohol, samt att de är kirala molekyler. Detta gör dem intressanta för mikrobiell produktion eftersom enzym är kiralt specifika. Dessutom tros efterfrågan på dessa molekyler öka i framtiden vilket gör dem intressanta att ta fram genom metoder som skiljer sig från den traditionella långsamma och dyra kemiska framställningen [45]. Med en åldrande befolkning i Sverige och resten av Europa [64] [65] är det rimligt att anta att fler personer riskerar att insjukna i Parkinsons sjukdom vilket skulle innebära en ökad efterfrågan på L-dopa. Det finns även forskning som pekar på att fler personer blir allergiska [66] [67] vilket innebär att efterfrågan på adrenalinsprutor med stor sannolikhet kommer att öka.

Som startmolekyl i reaktionsvägen har monolignolen koniferylalkohol valts. Detta innebär att reaktionsvägen inte kan utföras i dagsläget eftersom extraktion av specifika strukturer, än mindre omättade monolignoler, ur lignin ännu inte är möjligt. En monolignol ansågs ändå vara en rimlig utgångsmolekyl då det är en struktur som alltid förekommer i lignin i någon form.

För ökad kontroll kan det vara önskvärt att utföra reaktionsvägen i ett celllysat. Här skulle olika organismer kunna testas för korrekt uttryck av de enzym som behövs. Här kan också hög produktion av protein kunna prioriteras över robusthet hos mikroorganismen. Detta kan dock vara svårt i syntesen av adrenalin, då dessa reaktioner kräver tillsats av metaboliter. I detta fall kunde det vara enklare att låta reaktionerna ske i levande celler.

För syntes av adrenalin har *S. cerevisiae* undersökts som lämplig organism, eftersom den är robust och kan ansamla höga koncentrationer av både SAM [62] och L-askorbinsyra intracellulärt [58] [59] [60]. Tyvärr saknas tidigare studier kring uttryck av biosyntes-enzymen DOPA-dekarboxylas, DBH och PMNT i *S. cerevisiae* och homologisökningar efter dem hos *S. cerevisiae* gav inga lovande resultat. Detta innebär att enzym från mänskiska behöver uttryckas i *S. cerevisiae* vilket kan innebära problem med veckning och posttranslationella modifikationer. Det skulle kunna vara intressant att vidare undersöka möjligheterna med att uttrycka dessa enzym i någon annan värdorganism, exempelvis *Pichia pastoris*.

Syntesen av L-dopa behöver också studeras innan reaktionsvägen går att implementera. Chorismatas avlägsnar vanligtvis en pyruvat från en kolring, istället för en metoxigrupp, vilket är föreslaget i reaktionsvägen. Detta enzym kan behöva modifieras för att kunna

utföra denna reaktion. Även L-histidin ammoniaklyas kan behöva modifieras då den reagerar med L-histidin snarare än ferulasyra. Skillnaden mellan dessa två molekyler är dock relativt liten, och det är möjligt att enzymet fungerar utan modifikation. Ordningen i vilken chorismatas och L-histidin ammoniaklyas bör användas kan diskuteras. Det är svårt att avgöra lämpligast ordning utifrån teorin och det bör därför snarare undersökas laborativt. Däremot är det av största vikt att både amineringen och demetyleringen sker efter att koniferylalkholen oxiderats till ferulasyra. Detta eftersom koniferylalkohol och koniferylaldehyd är de naturliga substraten till respektive oxiderande enzym, varför dessa reaktioner bör ske först.

5.2 Separationsenzym

Fylogenetiska träd gjordes med Maximum likelihood. Träden kan anses vara pålitliga, men det är möjligt att annorlunda resultat erhållits om en annan metod använts. De genererade träden ansågs vara rimliga eftersom alla vitrötessvampar hamnat i samma klad och de flesta värden var goda. De fylogenetiska träden pekade dock inte entydigt mot att ett specifikt enzym vore mest lämpligt för fortsatta studier. Därför undersöktes organismernas egenskaper för att lättare kunna välja en lämplig kandidat. *D. squalens* brukar, till skillnad från de andra vitrötessvamparna, växa på barrträd [63] vilket gör den intressant för svensk industri där den huvudsakliga tillgången till lignocellulosa kommer från just barrträd [68].

Problem kan uppstå om genen amplifieras ur *D. squalens* och sedan inte uttrycks i en närbesläktad organism. Därför valde vi att utgå från att genen beställs eftersom den då går att kodonoptimera. Vi löser då problemet med att *E. coli* inte kan hantera gener innehållande introner, eftersom man kan utesluta intronerna i den beställda genen. Kostnaden för att beställa syntetiska gener har sjunkit kraftigt de senaste åren och är nu nere kring 5000 kronor för en gen av vår storlek [69]. Det är alltså inte orimligt att beställa den. När vi uttrycker genen i *E. coli* finns ändå risken att den inte uttrycks korrekt eftersom posttranslationell modifikation fungerar annorlunda i *E. coli*. Däremot kan *E. coli* snabbt producera stora mängder av enzymet med hjälp av T7/lac-systemet. Generellt kan alla plasmider med detta system användas för försöket. Vi valde dock att planera utifrån att pBluescript-plasmiden, eftersom den finns tillgänglig för oss. Det finns risk att icke-kommersiella plasmider fungerar sämre, men då pBluescript är etablerad på Chalmers har vi anledning att tro att den är lämplig för det planerade arbetet.

6xHis-tag-rening är en snabb och enkel metod för att rena protein där sex stycken histidin i slutet av proteinet fungerar som reningsmarkör, men markören kan ha effekt på proteinets funktion. Om N-terminalen är viktig för proteinets katalytiska förmåga kan den förändra eller förstöra enzymets funktion. Vad vi har sett i arbetet med fylogenin är att de bevarade sekvenserna är längre in i enzymet, och vi tror alltså inte att reningsmarkören kommer vara i vägen.

5.3 Ligninnedbrytande svampar

Alla svampar utom två visade en bättre tillväxt på ligninplattorna i jämförelse med den negativa kontrollen, se Bilaga O och P, vilket innebär att de med stor sannolikhet kan utnyttja ligninet som kolkälla. Dock kan det finnas spår av andra kolkällor i ligninpulvret som användes för att gjuta plattor. Detta innebär att vi inte säkert kan säga att svamparna växt enbart på lignin. Att vidare undersöka dessa svampar genom att ta fram cellysat och undersöka vilka enzym dessa kan tänkas innehålla är önskvärt för att identifiera nya enzym med intressanta egenskaper.

De två svamparterna som växte bättre på den negativa kontrollen kan ses i Figur P.15 och P.23 i Bilaga P. Troligtvis har ligninet en inhiberande effekt på dessa svampar. Det fanns även ligninplattor utan tillväxt, till exempel både AL-och LiB-plattan i Figur P.23. Även här kan ligninet antas ha en inhiberande effekt. Vidare tenderar tillväxten på AL-plattorna att vara sämre än på LiB- och ALLS-plattorna. Detta skulle kunna vara en indikation på att svamparna generellt sett inte kan tillgodogöra sig kraftigt sulfonerat lignin eftersom AL-mediet innehåller mer sulfonatgrupper än ALLS-mediet. Huruvida AL-mediet innehåller högre halter av sulfonatgrupper än LiB vore intressant att undersöka.

Av de sex olika svampar som identifierades var fem svåra att få mer specifika än släktet och för den sista lyckades bara fylum bestämmas. Detta beror bland annat på att vi odlade dessa svampar på glukosplattor vilket gör att man inte kan jämföra färg och storlek på våra uppodlade kolonier med de bilder som fanns i boken "*Food and indoor fungi*". Oavsett är det svårt, om inte omöjligt, att artbestämma svampar utan sekvensering så förväntan att kunna mer än släktbestämma svamparna under mikroskop är inte rimlig.

Valet att använda två typer av alkaliligninplattor, en med färre sulfonatgrupper, och Ligno-boost gjordes i samråd med handledaren då dessa är intressanta media vid studerandet av svampar. För ytterligare information om svamparnas nedbrytningsförmåga hade det varit av intresse att testa andra ligninbaserade media.

Trots att arbetet har skett i sterilt dragskåp såg vi kontaminering på två av plattorna. Detta kan bero på att plattan råkat öppnas när den skulle förflyttas, att kontamineringen funnits där innan vi hällde på mediet eller att kvalster lyckats ta sig in.

5.4 Slutsats

En reaktionsväg från koniferylalkohol till L-dopa och adrenalin har föreslagits. Möjligheten att genomföra denna reaktionsväg beror på framtida förmåga att separera omättade monolignoler ur lignin samt möjligheten att uttrycka enzymen i *S. cerevisiae* eller någon annan värdorganism. Vidare har en organism som producerar ett enzym med potential att kunna bryta bindningar mellan lignin och hemicellulosa identifierats och protokoll för extraheringen och karakteriseringen av detta enzym har sammanställts. Identifiering av svampar har inte lyckats ske på artnivå utan på släkt- och ordningsnivå. Dessa svampar klarade sig måttligt med lignin som kolkälla.

Tack till

Tack till Joakim Norbeck, som tillhandahållit sekvensen för T7/lac-systemets plasmid. Tack till David Julleson som varit så vänlig att dela med sig av sina protokoll för diverse rutinarbete i ett labb. Tack till Jonatan Kilhamn för all hjälp med $\text{\LaTeX}$. Slutligen, ett stort tack till våra handledare Carl Johan Franzén och Sylvia Klaubauf.

Källförteckning

- [1] J. G. Speight. *Petrochemical*. AccessScience. McGraw-Hill Education. 2014. URL: <http://www.accessscience.com/content/petrochemical/502100> (hämtad 2015-02-12).
- [2] J. G. Speight. *Petroleum Processing and Refining*. AccessScience. McGraw-Hill Education. 2014. URL: <http://www.accessscience.com/content/petroleum-processing-and-refining/503100> (hämtad 2015-02-12).
- [3] W. V. Reid. *Conservation of Resources*. AccessScience. McGraw-Hill Education. 2014. URL: <http://www.accessscience.com/content/conservation-of-resources/157900> (hämtad 2015-02-12).
- [4] I. Sørensen och J. R. K. Campbell. *Cell Walls (plants)*. AccessScience. McGraw-Hill Education. 2014. URL: <http://www.accessscience.com/content/cell-walls-plant/117510> (hämtad 2015-02-12).
- [5] I. S. Goldstein. *Wood Chemicals*. AccessScience. McGraw-Hill Education. 2014. URL: <http://www.accessscience.com/content/wood-chemicals/748300> (hämtad 2015-02-12).
- [6] T. Nakata, H. Miyafuji och S. Saka. "Bioethanol from cellulose with supercritical water treatment followed by enzymatic hydrolysis". I: *Applied biochemistry and biotechnology* 130.1-3 (2006), s. 476–485. DOI: 10.1385/ABAB:130:1:476.
- [7] R. Rathmann, A. Szklo och R. Schaeffer. "Land use competition for production of food and liquid biofuels: An analysis of the arguments in the current debate". I: *Renewable Energy* 35.1 (2010), s. 14–22. DOI: 10.1016/j.renene.2009.02.025.
- [8] J. I. Zerbe. *Ethanol from wood*. AccessScience. McGraw-Hill Education. 2008. URL: <http://www.accessscience.com/content/ethanol-from-wood/YB081420> (hämtad 2015-05-15).
- [9] H. M. N. Iqbal, G. Kyazze och T. Keshavarz. "Advances in the valorization of lignocellulosic materials by biotechnology: an overview". I: *BioResources* 8.2 (2013), s. 3157–3176. DOI: 10.15376/biores.8.2.3157-3176.
- [10] P. Oinonen, D. Areskog och G. Henriksson. "Enzyme catalyzed cross-linking of spruce galactoglucomannan improves its applicability in barrier films". I: *Carbohydrate polymers* 95.2 (2013), s. 690–696. DOI: 10.1016/j.carbpol.2013.03.016.
- [11] J. Zakzeski et al. "The catalytic valorization of lignin for the production of renewable chemicals". I: *Chemical reviews* 110.6 (2010), s. 3552–3599. DOI: 10.1021/cr900354u.
- [12] S. D Mansfield, K-Y. Kang och C. Chapple. "Designed for deconstruction–poplar trees altered in cell wall lignification improve the efficacy of bioethanol production". I: *New Phytologist* 194.1 (2012), s. 91–101. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2011.04031.x.

- [13] M. Söderqvist Lindblad et al. "Biodegradable polymers from renewable sources: rheological characterization of hemicellulose-based hydrogels". I: *Biomacromolecules* 6.2 (2005), s. 684–690. DOI: 10.1021/bm049515z.
- [14] J. Hartman et al. "Oxygen barrier materials from renewable sources: Material properties of softwood hemicellulose-based films". I: *Journal of Applied Polymer Science* 100.4 (2006), s. 2985–2991. ISSN: 1097-4628. DOI: 10.1002/app.22958.
- [15] J. F. Kadla et al. "Lignin-based carbon fibers for composite fiber applications". I: *Carbon* 40.15 (2002), s. 2913–2920. DOI: 10.1016/S0008-6223(02)00248-8.
- [16] D. Fengel och G. Wegener. *Wood: chemistry, ultrastructure, reactions*. Walter de Gruyter, 1983.
- [17] D. R. Dimmel. *Lignin*. McGraw-Hill Education. 2014. URL: <http://www.accessscience.com/content/lignin/382150> (hämtad 2015-04-21).
- [18] R. Caspi et al. "The MetaCyc database of metabolic pathways and enzymes and the BioCyc collection of Pathway/Genome Databases". I: *Nucleic acids research* 42.D1 (2014), s. D459–D471. DOI: 10.1093/nar/gkt1103.
- [19] D. Wellner, G. P. Royer och E. J. Stellwag. *Enzyme*. McGraw-Hill Education. 2015. URL: <http://www.accessscience.com/content/enzyme/236000> (hämtad 2015-04-23).
- [20] J. Gutman et al. *Mikrobiell biokonvertering av para-xylen från lignin för produktion av tereftalsyra i framtida bioraffinaderier*. 2014.
- [21] X-L. Li et al. "Identification of genes encoding microbial glucuronoyl esterases". I: *FEBS letters* 581.21 (2007), s. 4029–4035. DOI: 10.1016/j.febslet.2007.07.041.
- [22] S. Špáníková och P. Biely. "Glucuronoyl esterase–novel carbohydrate esterase produced by *Schizophyllum commune*". I: *FEBS letters* 580.19 (2006), s. 4597–4601. DOI: 10.1016/j.febslet.2006.07.033.
- [23] C. d'Errico et al. "Enzymatic degradation of lignin-carbohydrate complexes (LCCs): Model studies using a fungal glucuronoyl esterase from *Cerrena unicolor*". I: *Biotechnology and Bioengineering* (2015), n/a–n/a. ISSN: 1097-0290. DOI: 10.1002/bit.25508.
- [24] V. Lombard et al. *Carbohydrate-active enzymes database (CAZy)*. URL: <http://www.cazy.org/>.
- [25] M. Thollesson. *Phylogenetic interference*. Evolutionary Biology Centre, Uppsala Universitet. 2001. URL: http://artedi.ebc.uu.se/course/Embo01/Phylogeny/phylogeny_readme.html (hämtad 2015-04-16).
- [26] M. Keeseey och P. Cantino. *The PhyloCode*. Ohio University. 2000. URL: <http://www.ohio.edu/phylocode/glossary.html> (hämtad 2015-04-14).
- [27] M. Holder och P. O. Lewis. "Phylogeny estimation: traditional and Bayesian approaches". I: *Nature reviews genetics* 4.4 (2003), s. 275–284. DOI: 10.1038/nrg1044.

- [28] C. G. Dosoretz, T. M. Salame och Y. Hadar. *Lignin-degrading fungi*. AccessScience. McGraw-Hill Education. 2014. URL: <http://www.accessscience.com/content/lignin-degrading-fungi/900151> (hämtad 2015-02-12).
- [29] R. Bi et al. "Isolation and identification of microorganisms from soil able to live on lignin as a carbon source and to produce enzymes which cleave the beta-O-4 bond i a lignin model compound". I: *CELLULOSE CHEMISTRY AND TECHNOLOGY* 46.3-4 (2012), s. 227–242. ISSN: 0576-9787.
- [30] R. A. Samson et al. "Food and indoor fungi". I: CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre Utrecht, 2010.
- [31] P. W. Crous et al. "Fungal Biodiversity". I: CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre Utrecht, 2009.
- [32] *ChemSpider*. URL: <http://www.chemspider.com/>.
- [33] *Chemicals Data Base*. URL: <http://www.internetchemistry.com/chemicals/chemicals.htm>.
- [34] *CAS - SciFinder*. URL: <http://www.cas.org/products/scifinder>.
- [35] *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) Reaction Database, IUBMB reactions*. URL: <http://www.genome.jp/kegg/reaction/>.
- [36] *BRENDA (BRaunschweig ENzyme DAtabase)*. URL: <http://www.brenda-enzymes.org/>.
- [37] *Protein BLAST:search protein databases using a protein query*. URL: http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome.
- [38] E. Topakas et al. "Functional expression of a thermophilic glucuronoyl esterase from *Sporotrichum thermophile*: identification of the nucleophilic serine". I: *Applied microbiology and biotechnology* 87.5 (2010), s. 1765–1772. DOI: 10.1007/s00253-010-2655-7.
- [39] R. C. Edgar. "MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput". I: *Nucleic acids research* 32.5 (2004), s. 1792–1797. DOI: 10.1093/nar/gkh340.
- [40] *SnapGene*. URL: <http://www.snapgene.com/>.
- [41] G. S. Madretsma et al. "Anti-inflammatory effect of apocynin, a plant-derived NADPH oxidase antagonist, in acute experimental colitis." I: *The Netherlands Journal of Medicine* 47.2 (1995), 41–41(1). DOI: 10.1016/0300-2977(95)97052-Q.
- [42] J. L. Funk et al. "Comparative Effects of Two Gingerol-Containing Zingiber officinale Extracts on Experimental Rheumatoid Arthritis". I: *Journal of natural products* 72.3 (2009), s. 403–407. DOI: 10.1021/np8006183.
- [43] H.S. Lee et al. "[6]-Gingerol inhibits metastasis of MDA-MB-231 human breast cancer cells". I: *The Journal of Nutritional Biochemistry* 19.5 (2008), s. 313 –319. DOI: 10.1016/j.jnutbio.2007.05.008.

- [44] P. Tuite. *Parkinson's Disease*. McGraw-Hill Education. 2014. URL: <http://www.accessscience.com/content/parkinson-s-disease/489900> (hämtad 2015-04-15).
- [45] R. Krishnaveni et al. "Transformation of L-tyrosine to L-DOPA by a novel fungus, *Acremonium rutilum*, under submerged fermentation". I: *Current microbiology* 58.2 (2009), s. 122–128. DOI: 10.1007/s00284-008-9287-5].
- [46] T. Koyanagi et al. "Effective production of 3, 4-dihydroxyphenyl-L-alanine (L-DOPA) with *Erwinia herbicola* cells carrying a mutant transcriptional regulator TyrR". I: *Journal of biotechnology* 115.3 (2005), s. 303–306. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2004.08.016.
- [47] S. H. Sicherer et al. "Self-injectable Epinephrine for First-Aid Management of Anaphylaxis". I: *Pediatrics* 119.3 (2007), s. 638–646. DOI: 10.1542/peds.2006-3689. eprint: <http://pediatrics.aappublications.org/content/119/3/638.full.pdf+html>.
- [48] R. J. Kemppainen och C. H. Li. *Epinephrine*. McGraw-Hill Education. 2014. URL: <http://www.accessscience.com/content/epinephrine/238400> (hämtad 2015-04-15).
- [49] S. F. Kemp et al. "Epinephrine: the drug of choice for anaphylaxis. A statement of the World Allergy Organization". I: *Allergy* 63.8 (2008), s. 1061–1070. ISSN: 1398-9995. DOI: 10.1111/j.1398-9995.2008.01733.x.
- [50] *EC 1.1.1.194 - coniferyl-alcohol dehydrogenase*. BRENDA (BRAunschweig ENzyme DAtabase). URL: <http://brenda-enzymes.org/enzyme.php?ecno=1.1.1.194> (hämtad 2015-03-17).
- [51] *EC 1.2.1.68 - coniferyl-aldehyde dehydrogenase*. BRENDA (BRAunschweig ENzyme DAtabase). URL: <http://www.brenda-enzymes.org/enzyme.php?ecno=1.2.1.68> (hämtad 2015-03-17).
- [52] *EC 4.3.1.1 - aspartate ammonia-lyase*. BRENDA (BRAunschweig ENzyme DAtabase). URL: <http://www.brenda-enzymes.org/enzyme.php?ecno=4.3.1.1> (hämtad 2015-05-05).
- [53] *HAL histidine ammonia-lyase [Homo sapiens (human)]*. NCBI - National Center for Biotechnology Information Search database. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?Db=gene&Cmd=ShowDetailView&TermToSearch=3034> (hämtad 2015-03-17).
- [54] *EC 4.3.1.3 - histidine ammonia-lyase*. BRENDA (BRAunschweig ENzyme DAtabase). URL: <http://www.brenda-enzymes.org/enzyme.php?ecno=4.3.1.3> (hämtad 2015-05-06).
- [55] *ENZYME: 3.3.2.13*. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes och Genomes. URL: http://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?K18239+3.3.2.13+R10583 (hämtad 2015-03-17).
- [56] M. F. Bear, B. W. Connors och M. A. Paradiso. "Neuroscience: Exploring the Brain, 3rd Edition". English. I: 3rd edition. Philadelphia, PA: Lippincott Williams och Wilkins, febr. 2006, s. 143–146. ISBN: 9780781760034.

- [57] *ExPASy - Dopamine-beta-monooxygenase*. URL: <http://enzyme.expasy.org/EC/1.14.17.1> (hämtad 2015-04-16).
- [58] M. Sauer et al. "Production of L-ascorbic acid by metabolically engineered *Saccharomyces cerevisiae* and *Zygosaccharomyces bailii*". I: *Applied and environmental microbiology* 70.10 (2004), s. 6086–6091. DOI: 10.1128/AEM.70.10.6086-6091.2004.
- [59] R. D. Hancock och R. Viola. "Biotechnological approaches for L-ascorbic acid production". I: *TRENDS in Biotechnology* 20.7 (2002), s. 299–305. DOI: 10.1016/S0167-7799(02)01991-1.
- [60] R. D. Hancock, J. R. Galpin och R. Viola. "Biosynthesis of L-ascorbic acid (vitamin C) by *Saccharomyces cerevisiae*". I: *FEMS microbiology letters* 186.2 (2000), s. 245–250. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2000.tb09112.x.
- [61] *ExPASy - Phenylethanolamine N-methyltransferase*. URL: <http://enzyme.expasy.org/EC/2.1.1.28> (hämtad 2015-04-16).
- [62] S. Y. Chan och D. R. Appling. "Regulation of S-adenosylmethionine levels in *Saccharomyces cerevisiae*". I: *Journal of Biological Chemistry* 278.44 (2003), s. 43051–43059. DOI: 10.1074/jbc.M308696200.
- [63] D. Floudas et al. "The Paleozoic origin of enzymatic lignin decomposition reconstructed from 31 fungal genomes". I: *Science* 336.6089 (2012), s. 1715–1719. DOI: 10.1126/science.1221748.
- [64] *Åldrande befolkning*. Statistiska Centralbyrån (SCB). URL: <http://www.scb.se/sv/Hitta-statistik/Regional-statistik-och-kartor/Statistikatlasen/VisletBehallare/Aldrande-befolkning/> (hämtad 2015-05-06).
- [65] *Population structure and ageing*. Eurostat - statistics explained. URL: http://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php/Population_structure_and_ageing#Further_Eurostat_information (hämtad 2015-05-06).
- [66] J. Johnson et al. "Ten-year review reveals changing trends and severity of allergic reactions to nuts and other foods". I: *Acta Paediatrica* 108.8 (2014), s. 862–867. DOI: 10.1111/apa.12687.
- [67] F. E. R. Simons et al. "World Allergy Organization Anaphylaxis Guidelines: 2013 Update of the Evidence Base". I: *International Archives of Allergy and Immunology* 162.193 (2013), s. 193–204. DOI: 10.1159/000354543.
- [68] *Hur mycket finns det av olika skogstyper?* Länsstyrelsen, Norrbotten. URL: <http://www.lansstyrelsen.se/norrbotten/Sv/miljo-och-klimat/tillstandet-i-miljon/skog/statistik-om-miljotillstandet-i-skogen/hur-mycket-finns-det-av-olika-skogstyper/Pages/default.aspx> (hämtad 2015-04-23).
- [69] *Eurofins Genomics homepage*. Eurofins Genomics. URL: <https://eurofinsgenomics.com/en/products/gene-synthesis/standard-genes.aspx> (hämtad 2015-04-28).

Bilaga A Agarplattor med lignin

Följande protokoll har baserats på protokoll från artikeln *"Isolation and identification of microorganisms from soil able to live on lignin as a carbon source and to produce enzymes which cleave the beta-O-4 bond i a lignin model compound"*².

A.1 Material

En liter lösning ger ungefär 40 plattor.

1. KH_2PO_4 (0,25 g/l)
2. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0,695 g/l)
3. NaNO_3 (0,89 g/l)
4. CaCl_2 (1,0 g/l)
5. $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,25 g/l)
6. FeCl_3 (1,07 mg/l)
7. Agar (15 g/l)
8. Lignin av följande sort (10 g/l):
 - (a) Lignoboost
 - (b) Aldrich Lignin kraft alkali
 - (c) Aldrich Lignin alkali, low sulfonate
9. Ampicillin (100 mg/l)
10. Destillerat vatten
11. 70 % etanol

²R. Bi et al. "Isolation and identification of microorganisms from soil able to live on lignin as a carbon source and to produce enzymes which cleave the beta-O-4 bond i a lignin model compound".I: *CELLULOSE CHEMISTRY AND TECHNOLOGY*. 46.3-4 (2012), s. 227-242.ISSN: 0576-9787.

A.2 Metod

1. Standardlösningar blandas av alla salter samt ampicillin i destillerat vatten.
 - (a) 2.5 g/liter $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
 - (b) 2.5 g/liter KH_2PO_4
 - (c) 13.24 g/liter CaCl_2
 - (d) 0.0183 g/10 ml FeCl_3
 - (e) 0.5 g/5 ml ampicillin
2. Standardlösning av alla salter utom FeCl_3 blandas och behållaren fylls med destillerat vatten till önskad volym.
3. Agar tillsätts under omrörning.
4. pH justeras till 5 med 0.25M NaOH.
5. Lignin tillsätts lösningen.
6. pH testas med pH-papper för att kontrollera att pH inte ändrats vid tillsats av lignin. Om så är fallet justeras pH igen.
7. Lösningen autoklaveras.
8. Innan lösningen stelnat sterilfiltreras FeCl_3 och ampicillin ner i behållaren i sterilt dragskåp.
9. Lösningen hålls i petriskålar och tillåts stelna innan användning.

Bilaga B Agarplattor med potatisextrakt och dextros

Protokoll erhöles från handledare Sylvia Klaubauf.

B.1 Material

1 liter lösning ger ungefär 40 plattor.

1. Potatisextrakt- och dextrosagarpulver
2. Destillerat vatten
3. Ampicillin (100 mg/l)

B.2 Metod

1. 39 g potatisextrakt- och dextrosagarpulver per liter färdig agarlösning hälls i vattnet under omrörning och tillåts lösas upp.
2. Lösningen autoklaveras.
3. Innan lösningen svalnat sterilfiltreras ampicillin ner i lösningen i sterilt dragskåp. Här används en standardlösning om 0.5 g/5 ml ampicillin i destillerat vatten.
4. Lösningen hälls i petriskålar och tillåts svalna innan användning.

Bilaga C LB-media samt agarplattor med LB-media

Följande protokoll har hämtats från artiklarna "*Methods for general and molecular bacteriology*"³ och "*Molecular cloning: a laboratory manual*"⁴.

C.1 Material

1 liter lösning ger ungefär 40 plattor.

1. Trypton
2. Jästextrakt
3. NaCl
4. Agar (om LB-agarplattor önskas)
5. Destillerat vatten
6. NaOH (aq)

C.1 Metod

1. Destillerat eller avjonat vatten hålls upp till hälften av den totala volymen färdig lösning.
2. 10 g trypton per liter färdig lösning tillsätts.
3. 5 g jästextrakt per liter färdig lösning tillsätts.
4. 10 g NaCl per liter färdig lösning löses upp under uppvärmning i destillerat eller avjonat vatten.
5. Lösningens pH justeras till 7.0 med NaOH (aq).
6. Om agarplattor önskas tillsätts 15 g agar per liter färdig lösning och tillåts lösas.
7. Lösningen autoklaveras.
8. Om agarplattor önskas hålls lösningen i petriskålar och tillåts stelna innan användning.

³P. Gerhardt, W. A. Wood och N. R. Krieg. *Methods for general and molecular bacteriology*. Vol. 1325. American Society for Microbiology Washington, DC, 1994.

⁴M. R. Green och J. Sambrook. *Molecular cloning: a laboratory manual*. I: Cold Spring Harbor Laboratory Press New York (2012). ISBN:9781936113422

Bilaga D PCR-reaktion

Följande protokoll har hämtats från ”*PCR Protocol for PhusionTM High-Fidelity DNA Polymerase (M0530)*”⁵.

D.1 Material

Protokollet utgår ifrån en reaktionsvolym på 50 μl .

1. Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (2 μM)
2. Sterilt milli-Q vatten
3. Phusion HF buffert (5x)
4. dNTP-blandning (10 μM vardera av ATP, CTP, TTP och GTP)
5. Uppströms (Forward) primer (10 μM)
6. Nedströms (Reverse) primer (10 μM)
7. Phusion (2 U/ μl)
8. Templat-DNA

D.2 Metod

1. På is tillsätts mellan 0.001 och 250 ng templat-DNA i en volym som inte överstiger 32.5 μl till ett Eppendorfrör.
2. Milli-Q vatten tillsätts till en totalvolym på 32.5 μl
3. Om det behövs samlas blandningen i botten av röret med ett par sekunders centrifugering.
4. 10 μl 5x Phusion HF buffert tillsätts.
5. 1 μl dNTP-blandning tillsätts.
6. 3 μl uppströms primer tillsätts.
7. 3 μl nedströms primer tillsätts.
8. 0.5 μl Phusion DNA polymeras tillsätts. Det är viktigt att tillsätta DNA-polymeraset sist, eftersom det har exonukleasaktivitet i avsaknad av dNTP-blandning

⁵*PCR Protocol for PhusionTM High-Fidelity DNA Polymerase (M0530)* New England BioLabs inc.
URL:<https://www.neb.com/protocols/1/01/01/pcr-protocol-m0530>

9. Blandningen (som hittills hållits på is) pipetteras över till ett PCR-rör som skyndsamt flyttas till en förvärmad PCR-maskin.
10. PCR-maskinen programmeras och körs med program enligt tabell D.1:

Tabell D.1: Program för PCR med hjälp av Phusion DNA polymeras.

Steg	Temperatur	Tid	Antal cykler
Första denaturering	98	30 s	1
Denaturering	98	10 s	25-40
Hybridisering	Lägre T_m+3	10-30 s	
Förlängning	72	15-30 s/kbp	
Slutgiltig förlängning	72	5-10 min	1

Bilaga E Restriktion med EcoRI och XbaI

Följande protokoll baseras på ett produktblad från Thermo Scientific kallat ”*PRODUCT INFORMATION Thermo Scientific FastDigest EcoRI*”⁶ och utgår ifrån en reaktionsvolym på 50 μ l.

E.1 Material

1. FastDigest buffert
2. FastDigest EcoRI (30 U/ μ l)
3. FastDigest XbaI (30 U/ μ l)
4. DNA
5. Milli-Q vatten

E.2 Metod

Håll ständigt enzymet på is.

1. 5 μ l FastDigest buffert sätts till ett sterilt 1.5 ml Eppendorfrör.
2. Upp till 2 μ g DNA tillsätts.
3. 5 μ l FastDigest EcoRI och 5 μ l FastDigest XbaI restriktionsenzym tillsätts och därefter fylls röret upp till en totalvolym av 50 μ l med milli-Q vatten.
4. Lösningen blandas försiktigt och centrifugeras sedan ned i botten av röret.
5. Lösningen inkuberas i 37°C i 5-60 min.
6. Enzymerna inaktiveras genom att inkubera lösningen i 80°C i 5 minuter.

⁶*PRODUCT INFORMATION Thermo Scientific FastDigest EcoRI*. Thermo Fisher Scientific. URL: https://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/MAN0012438_FastDigest_EcoRI_800uL_UG.pdf

Bilaga F Gelelektrofores

Följande protokoll har hämtats från ett protokoll från Addgene kallat "*Agarose Gel Electrophoresis*"⁷ samt produktbladet för GelRed⁸.

F.1 Material

1. Agaros
2. TAE-buffert (Tris-Acetate EDTA) (1x)
3. GelRed eller GelGreen stock (10 000x)
4. Loading dye
5. Molekylviktsstege

F.2 Metod

1. Agaros tillsätts under omrörning till 1xTAE-buffert till en slutkoncentration på 10 g/L.
2. Blandningen värms upp i en mikrovågsugn i ungefär 1-3 min och agarosen tillåts lösas upp.
3. 1 μ l GelRed per 10 ml agaroslösning tillsätts.
4. En kam fästs i tråget för att göra brunnarna i kanten av gelen.
5. Lösningen hålls i tråget och tillåts svalna i ungefär 30 min för att stelna.
6. Loading dye tillsätts till proverna.
7. När gelen stelnat placeras den i gelelektroforesapparaten och apparaten fylls upp med 1xTAE buffer så att gelen täcks ordentligt.
8. Den första brunnen laddas med en molekylviktsstege och prover laddas sedan i de övriga brunnarna.
9. 80 Volts spänning appliceras över gelen tills färglinjen flyttat sig ca 75-80% av gelens längd. Detta tar ungefär 1-1.5 h.
10. När gelen är klar stängs spänningen av och gelen plockas ut ur gelelektroforesapparaten.

⁷*Agarose Gel Electrophoresis*. Addgene. URL:<https://www.addgene.org/plasmid-protocols/gel-electrophoresis/#faq>

⁸*GelRed Nucleic Acid Gel Stain, 10000x Water*. Biotium. URL: <https://biotium.com/wp-content/uploads/2013/07/PI-41003.pdf>

11. Gelen studeras med hjälp av en transilluminator (302 eller 312 nm) och fotograferas sedan.

Bilaga G Upprening av DNA från Agarosgel

G.1 Material

Alla dessa materiel finns i kittet ”*illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit*”⁹ från GE Healthcare.

1. Mikrocentrifugrör
2. GFX MicroSpin kolonn
3. Capture buffert typ 3
4. Wash buffert typ 1
5. Elution buffert typ 4
6. Natriumacetat (3 M)

G.2 Metod

1. Ett 1.5 ml mikrocentrifugrör vägs och vikten antecknas.
2. Med hjälp av en ren skalpell och 365 nm UV-ljus (och minimal exponeringstid) skärs ett agarosband ut och placeras i mikrocentrifugröret.
3. Mikrocentrifugröret innehållande agarosbandet vägs och agarosbandets vikt räknas ut.
4. 10 μ l Capture buffert typ 3 tillsätts per 10 mg agarosband, dock minst 300 μ l per prov.
5. Blandningen inkuberas i 60°C i 15-30 minuter tills agarosen är helt löst och blandas genom invertering var tredje minut.
6. När allt löst sig kontrolleras det om lösningen är gul eller ljust orange. Om så inte är fallet tillsätts ca 10 μ l 3 M natriumacetat, pH 5 och lösningen blandas så att den blir gul eller ljust orange.
7. För varje rening som genomförs placeras en GFX MicroSpin kolonn i ett kollektionsrör.
8. Upp till 800 μ l av lösningen tillsätts till en GFX MicroSpin kolonn.
9. Kolonnerna inkuberas sedan i rumstemperatur i 1 min.

⁹*GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit*. GE Healthcare. URL: https://www.gelifesciences.com/gehcls_images/GELS/Related20Content/Files/1314774443672/litdoc28933585_20150413221957.pdf

10. Kolonnerna centrifugeras 16 000 x g i 30 sekunder.
11. Vätskan i kollektionsröret hålls ur och kolonnen placeras åter i kollektionsröret.
12. Om det finns lösning kvar upprepas steg 8-11 tills all lösning är slut.
13. 500 μ l Wash buffert typ 1 tillsätts till kolonnen.
14. Kolonnen centrifugeras 16 000 x g i 30 s.
15. Kollektionsröret slängs och kolonnen placeras i ett nytt 1.5 ml mikrocentrifugrör.
16. 10-50 μ l Elution buffert typ 4 tillsätts till mitten av membranet i kolonnen.
17. Därefter inkuberas kolonnen i 1 min varefter den centrifugeras 16 000 x g i 1 min för att utvinna det renade DNAt.

Bilaga H Ligerings med T4-ligas

Följande protokoll baseras på ett protokoll från Invitrogen kallat *ExpressLink T4 DNA Ligase*¹⁰ och utgår ifrån en reaktionsvolym på 20 μ l.

H.1 Material

1. Ligase reaction buffer (5x)
2. Vektor DNA
3. Insert DNA
4. Expresslink T4 DNA ligase (5 U/ μ l)
5. Milli-Q vatten

H.2 Metod

1. 4 μ l 5x Ligase reaction buffer tillsätts till ett sterilt 1.5 ml mikrocentrifugrör.
2. 20-100 ng vektor DNA tillsätts och därefter tillsätts även 60-300 ng av insert DNA (3x mängden av vektor DNA).
3. 0.2 μ l Expresslink T4 DNA ligase tillsätts och därefter fylls röret upp till en totalvolym av 20 μ l med milli-Q vatten.
4. Lösningen blandas försiktigt och centrifugeras sedan snabbt för att samla lösningen i botten av röret.
5. Lösningen inkuberas i minst 5 minuter i rumstemperatur.

¹⁰*ExpressLink T4 DNA Ligase*. Invitrogen. URL: https://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/expresslink_dna_ligase.pdf

Bilaga I Transformation

Följande protokoll har hämtats från ett protokoll från Addgene kallat "*Bacterial Transformation*"¹¹ samt ett protokoll från EMBL kallat "*Transformation of competent E.coli cells with plasmid DNA*"¹².

I.1 Material

1. Kompetenta celler
2. DNA i form av plasmid
3. LB-media
4. LB-agarplattor

I.2 Metod

1. Kompetenta celler, (*E. coli*, BL21(DE3)) plockas fram ur -80°C och tinas på is i 20-30 min.
2. 1-5 μ l >10 ng DNA och 20-50 μ l kompetenta celler tillsätts till ett mikrocentrifugrör och blandas genom att knäppa försiktigt på botten av röret några gånger.
3. Blandningen placeras på is i 20-30 min.
4. Varje mikrocentrifugrör värmechockas i 42°C i 30-60 sekunder (45 s är optimalt)
5. Rören placeras återigen på is i 2 min.
6. 250 μ l LB-media (utan antibiotika) tillsätts och cellerna tillåts växa i en 37°C skakinkubator i 45 min.
7. Blandningen med de transformerade cellerna placeras på en eller flera LB-agarplattor innehållande Ampicillin (100 mg/l) och inkuberas över natt.

¹¹*Bacterial Transformation*. Addgene. URL: <https://www.addgene.org/plasmid-protocols/bacterial-transformation/>

¹²*Transformation of competent E.coli cells with plasmid DNA*. EMBL, European Molecular Biology Laboratory. URL: https://www.embl.de/pepcore/pepcore_services/cloning/transformation/

Bilaga J Genuttryck

Följande protokoll har hämtats från ett protokoll från Boddylab kallat *Gene expression in and protein extraction from E. coli*¹³.

J.1 Material

1. LB-media innehållande Ampicillin (100 mg/l)
2. IPTG
3. Lysis buffert (100 mM natriumfosfat, 300 mM NaCl, 10 vikt-% glycerol, 1 µg/ml lysozym, 1 µg/ml pepstatin A, 1-2 µg/ml leupeptin, pH 8.0)

J.2 Metod

Cellerna förvaras hela tiden på is.

1. Cellerna odlas över natt genom att 10 ml LB-media inokuleras med en koloni och inkuberas i 37°C i en skakinkubator vid 180 rpm.
2. Nytt LB-media inokuleras med 0.5 vikt-% av den tidigare kulturen och cellerna tillåts tillväxa vid 37°C i en skakinkubator vid 180 rpm.
3. När OD₆₀₀=0.3-0.6 induceras proteinuttrycket med hjälp av IPTG (slutkoncentration 0.5 mM) och cellerna skakinkuberas vid 30°C tills expressionen är maximal (ca 4 h).

¹³*Gene expression in and protein extraction from E. coli*. Boddylab. URL: http://www.boddylab.ca/file/Gene_expression_and_protein_extraction.pdf

Bilaga K Proteinextraktion och 6x His-tag proteinrening

Följande protokoll är baserat på Invitrogens kit *Ni-NTA Purification System*¹⁴.

K.1.1 Material, Extraktion

1. Native Binding buffert
2. Lysozym
3. RNas A (10 $\mu\text{g/ml}$)
4. DNas I (5 $\mu\text{g/ml}$)

K.1.2 Metod, Extraktion

1. Cellerna skördas genom att 50 ml odling centrifugeras 5000 rpm i 5 min.
2. Cellerna resuspenderas i 8 ml Native Binding buffert.
3. 8 mg lysosym tillsätts och lösningen inkuberas på is i 30 min.
4. Lösningen ultraljudsbehandlas med hög intensitet, sex gånger, 10 sekunder varje gång och tillåts vila på is i 10 sekunder mellan varje behandling. Behandlingen sker med hjälp av en Sonicator utrustad med microtip.
5. Om lysatet är väldigt visköst tillsätts RNas A (10 $\mu\text{g/ml}$) och DNas I (5 $\mu\text{g/ml}$) och lösningen inkuberas på is i 10-15 min.
6. Lysatet centrifugeras 3000 x g i 15 minuter för att pelletera cellresterna och supernatanten flyttas till ett rent rör.
7. 5 μl av lysatet avlägsnas för att köras i SDS-PAGE.

K.2.1 Material, Proteinrening

1. Förberedd Ni-NTA reningskolonn
2. Native Wash buffert
3. Native Elution buffert

¹⁴*Ni-NTA Purification System*. Invitrogen. URL: http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/ninta_system_man.pdf

K.2.2 Metod, Proteinrening

1. 8 ml lysat tillsätts till en förberedd reningskolonn.
2. Proteinet låts binda till kolonnen i 30-60 minuter på en skakplatta.
3. Hartset tillåts sedimentera genom centrifugering på låg hastighet (800 x g) och supernatanten avlägsnas försiktigt för att sparas vid 4°C och sedan köras i en SDS-PAGE.
4. Kolonnen tvättas med 8 ml Native Wash buffert, hartset tillåts sedimentera genom centrifugering på låg hastighet (800x g) och supernatanten avlägsnas försiktigt för att sparas vid 4°C och sedan köras i en SDS-PAGE.
5. Steg 4 upprepas 3 gånger till.
6. Kolonnen monteras så att den hela tiden hålls upprätt och locket i nedre ändan tas bort. Proteinet elueras med 8-12 ml Native Elution buffert, fraktioner om 1 ml samlas och dessa analyseras sedan med SDS-PAGE.

Bilaga L SDS-PAGE

Följande protokoll baseras på protokoll från Assay-Protocol kallade *SDS-PAGE*¹⁵ och *PAGE staining*¹⁶.

L.1.1 Material, Separating gel

För material se Tabeller L.2, L.3, L.4 och L.5

L.1.2 Material, Coomassie staining

För material se Tabeller L.6 och L.7

L.2.1.1 Metod, Separating gel

1. Gjutningsramarna förbereds genom att två glasplattor fästs i gjutningsramarna som placeras i gjutningshållaren.
2. Gellösningen förbereds enligt Tabell L.2 och blandas noggrant men försiktigt.
3. En lämplig mängd av lösningen (se Tabell L.1) pipetteras ner i springan mellan de två glasplattorna.
4. För att övre kanten av gelen ska bli horisontell fylls resten av gjutningsramen med vatten.
5. Gelen tillåts sedan stelna i 20-30 min.

L.2.1.2 Metod, Stacking gel

1. Vattnet ovanpå Separating gelen hålls av.
2. Stacking gel förbereds enligt Tabell L.3 och pipetteras i ovanpå Separating gelen tills vätska rinner över.
3. Den brunnformande kammen sätts i gjutningsramen och gelen tillåts stelna i 20-30 minuter.

¹⁵SDS-PAGE *preparation and protocol*. Assay-Protocol. URL: <http://www.assay-protocol.com/molecular-biology/electrophoresis/denaturing-page>

¹⁶PAGE *staining*. Assay-protocol. URL: <http://www.assay-protocol.com/index.php?page=PAGE-staining>

L.2.1.3 Metod, SDS-PAGE

1. Det kontrolleras att gelen är helt stelnad och kammen tas ur.
2. Glasplattorna flyttas från gjutningsramen och placeras i apparaturen.
3. Den inre kammaren fylls med Running buffert (se Tabell L.5) tills den svämmas över och bufferten når rätt nivå i den yttre kammaren.
4. Proven blandas med sample buffer (se Tabell L.4) och hettas upp i kokande vatten i 5-10 min.
5. Den första brunnen laddas med en molekylviktsstege och därefter laddas proven i de resterande brunnarna.
6. Locket monteras på apparaturen och strömkällan kopplas på.
7. En lämplig spänning ställs in, exempelvis 180 V och gelen körs tills den nedersta delen av molekylviktsstegen når botten av gelen.

L.2.2 Metod, Coomassie staining

1. Gelen läggs i en behållare, täcks med Staining solution förberedd enligt Tabell L.6 och placeras på en skakplatta i 20-30 min.
2. Lösningen byts ut mot Destaining solution förberedd enligt Tabell L.7 och placeras återigen på skakinkubatorn i 20-30 min.
3. Steg två upprepas 3-5 gånger tills banden i gelen blir klara och den blåa bakgrundsfärgen är så gott som borta.

Tabell L.1: Geltjocklek.

Geltjocklek	Volym stacking gel	Volym separating gel
0.75 mm	2 ml	4 ml
1.0 mm	3 ml	6 ml
1.5 mm	4 ml	8 ml

Tabell L.2: 10 ml Separating gel. Notera att Ammoniumpersulfat och TEMED måste tillsättas precis före användning.

Procent akrylamid	10 %
H ₂ O	3.8 ml
Akrylamid/Bis-akrylamid (30%/0.8% w/v)	3.4 ml
1.5 M Tris (pH=8.8)	2.6 ml
10 % (w/v) SDS	0.1 ml
10 % (w/v) Ammoniumpersulfat	100 µl
TEMED	10 µl

Tabell L.3: 5 ml Stacking gel. Notera att Ammoniumpersulfat och TEMED måste tillsättas precis före användning.

H ₂ O	2.975 ml
0.5 M Tris-HCl, pH 6.8	1.25 ml
10 % (w/v) SDS	0.05 ml
Akrylamid/Bis-akrylamid (30%/0.8% w/v)	0.67 ml
10 % (w/v) Ammoniumpersulfat	0.05 ml
TEMED	0.005 ml

Tabell L.4: 5x Sample buffert

10 % (w/v)	SDS
10 mM	β-mercaptoetanol
20 % (v/v)	Glycerol
0.2 M	Tris (pH=6.8)
0.05 % (w/v)	Bromophenolblue

Tabell L.5: 1x Running buffert

25 mM	Tris-HCl
200 mM	Glycin
0.1 % (w/v)	SDS

Tabell L.6: Staining solution

0.3 % (w/v)	Coomassie Brilliant Blue R-250
45 % (v/v)	Metanol
10 % (v/v)	Vattenfri ättiksyra
45 %	Destillerat vatten

Tabell L.7: Destaining solution

20 % (v/v)	Metanol
10 % (v/v)	Vattenfri ättiksyra
70 %	Destillerat vatten

Bilaga M Bradfordanalys

Följande protokoll är baserat på produktbladet för Bradfordreagenset¹⁷.

M.1 Material

1. Bradfordreagens
2. BSA proteinstandard (2 mg/ml)
3. Native Elution buffert
4. Kyvetter
5. Prov med okänd proteinkoncentration

M.2 Metod

0.1 ml av 0.1-1.4 mg/ml proteinprov används.

1. Bradfordreagensen blandas försiktigt och värms till rumstemperatur.
2. Proteinstandarder med lämplig koncentration förbereds enligt tabell M.1

Tabell M.1: Visar exempel på standardanalys. Nummer 6 representerar ett okänt prov med 2x spädning. Denna spädning kan ändras beroende på vilken proteinkoncentration provet förväntas ha.

Nummer	Prov (ml)	[BSA] protein (mg/ml)	Bradford-reagens
1	0.1	0	3
2	0.1	0.25	3
3	0.1	0.5	3
4	0.1	1.0	3
5	0.1	1.4	3
6	0.1	Okänd	3

3. När lösningar förberetts enligt Tabell M.1 vortexas rören för att blanda lösningen ordentligt.
4. Proven inkuberas sedan i rumstemperatur i 5-45 min.

¹⁷Product information, Bradford Reagent. Sigma-Aldrich. URL: <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Bulletin/b6916bul.pdf>

5. Proven flyttas över till kyvetter och absorbans mäts vid 595 nm. Absorbansen för alla prov måste mätas inom 10 minuter och den sista absorbansen måste mätas inom 60 minuter från det att proven förbereddes.
6. De prov med kända koncentrationer används för att producera en standardkurva (Absorbans mot [BSA]) och utifrån den bestäms proteinkoncentrationen i det okända provet.

Bilaga N Detektion av aktivitet

Följande protokoll är baserat på artikeln ”*Enzymatic degradation of lignin-carbohydrate complexes (LCCs): Model studies using a fungal glucuronoyl esterase from Cerrena unicolor*”¹⁸

N.1 Material

1. Bensyl-D-glucuronat
2. Upprenat enzym
3. HCl (0,5 M)
4. Milli-Q vatten

N.1 Metod

1. Bensyl-D-glucuronat löses upp i milli-Q vatten och spädes till en koncentration av 30 mM.
2. Lösningens pH justeras till 6 med 0,5 M HCl.
3. 1 ml bensyl-D-glucuronat (30 mM) sätts till ett 1,5 ml Eppendorfrör.
4. Enzymet pipetteras ned i lösningen.
5. Lösningen inkuberas i 30°C i 48 h.
6. Prover tas efter 2, 18 och 48 h och analyseras med HPLC för fenol.

¹⁸C. d’Errico et al. ”Enzymatic degradation of lignin-carbohydrate complexes (LCCs). Model studies using a fungal glucuronoyl esterase from Cerrena Unicolor”. 1:*Biotechnology and Bioengineering* 0. ISSN: 1097-0290.

Bilaga O Beskrivningar av svampkoloniernas utseende efter renstryk

Tabell O.1: Sammanställning av alla renstrykta fältprover. Alla renstrykningar gjordes av sporlösningar.

Medium	Tillväxt	Utseende	Diameter	Namn
Renstrykning av barkprovet odlat på ALLS i rumstemperatur, från vita sporer				
Glukos	6 dagar	Tre kolonier, sammanväxta kanter. Vita och fluffiga med, cirka 1 cm in, en ring (cirka 0,5 cm bred) med gula och vita sporer. Fluffig i mitten.	5 cm	30, glukos
Agar	6 dagar	Tre kolonier, grågröna sporer, ojämnt utspridda i yttre kant.	3 cm	30, agar
ALLS	7 dagar	Tre kolonier. Täta, platta, genomskinliga nätverk med små vita flagor inom 0,5 cm.	5 cm	30, ALLS
LiB	7 dagar	Tre kolonier. Glesa vita nätverk som växer platt, med vita/ljusgröna flagor jämnt utspritt inom en 2 cm radie från koloniernas mitt.	3 cm	30, LiB
AL	7 dagar	Tre kolonier. Otydliga, täta, platta nätverk.	3 cm	30, AL
Renstrykning av svampprovet, odlat på ALLS i rumstemperatur, från mycel				
Glukos	5 dagar	Tre kolonier. Vitt/ljusrosa mycel, ganska tät.	2-3 cm	, 12.1, glukos
Agar	7 dagar	Otydliga kolonier, helt sammanvuxna. Tunt, genomskinligt mycel som täcker hela plattan.	Hela plattan	12.1, agar
ALLS	7 dagar	Två kolonier. Tunt, genomskinligt mycel, väldigt lite vitt fluff som är koncentrerat i mitten av kolonierna.	4 cm	12.1, ALLS
LiB	7 dagar	Tre kolonier, sammanväxta kanter. Tätt, genomskinligt mycel. Lite vitt fluff i mitten av kolonierna.	4 cm	12.1, LiB
AL	7 dagar	Tre kolonier. Tunt, genomskinligt mycel med tunt vitt fluff jämnt utspritt över kolonierna.	4 cm	12.1, AL

Fortsättning på tabell O.1				
Medium	Tillväxt	Utseende	Diameter	Namn
Glukos	20 dagar	Tre kolonier. Vit/beige mycel.	2-3 cm	12.2, glukos
Agar	7 dagar	Tre kolonier. Tätt, genomskinligt mycel.	3-4 cm	12.2, agar
ALLS	7 dagar	Tre kolonier. Täta, genomskinliga. Lite vitt fluff i centrum av en koloni.	3 cm	12.2, ALLS
LiB	7 dagar	Tre kolonier. Tätt, genomskinligt mycel. Helt platta.	3 cm	12.2, LiB
AL	7 dagar	Tre kolonier. Tätt, genomskinligt mycel. Lite vitt fluff jämnt utspritt över två kolonier.	3 cm	12.2, AL
Glukos	5 dagar	Tre kolonier. Vit/beige mycel åt det lite luftigare hållet.	3 cm	12.3, glukos
Agar	7 dagar	Tunt, genomskinligt, ganska tätt mycel som täcker hela plattan.	Hela plattan	12.3, agar
ALLS	7 dagar	Två kolonier. Tunt, genomskinligt, tätt mycel.	3 cm	12.3, ALLS
LiB	7 dagar	Tom, inget har hänt.	-	12.3, LiB
AL	7 dagar	Två kolonier. Glest, tunt, vitt fluff, mest i centrum av kolonierna.	3 cm	12.3, AL
Renstrykning av jordprovet (100x spädning), odlat på LiB i rumstemperatur, från vita sporer				
Glukos	6 dagar	Fem kolonier, varav två små. Tydligt vitt nätverk. Platta. Vit fläck i mitten.	2 cm (1 cm små)	23, glukos
Agar	7 dagar	Tre kolonier. Tydliga, platta, täta, genomskinliga nätverk.	5-6 cm	23, agar
ALLS	11 dagar	Tre kolonier. Vitt pulver men grönaktiga i mitten och mycel i kanterna.	2-3 cm	23, ALLS
LiB	7 dagar	Tre stora kolonier. Täta, platta, genomskinliga, tydliga nätverk, vita fält inom 0,5 cm radie från koloniernas mitt. Tio små kolonier.	2 cm (små 0,5 cm)	23, LiB

O Beskrivningar av svampkoloniernas utseende efter renstryk

Fortsättning på tabell O.1				
Medium	Tillväxt	Utseende	Diameter	Namn
AL	11 dagar	Sju kolonier, Tre ursprungliga och fyra utöver. Ser ut som lager med vitt pulver. De små växer utefter kanterna och runt en av de ursprungliga kolonierna.	2-3 cm	23, AL
Renstrykning av barkprovet odlat på LiB i rumstemperatur, från gröna sporer				
Glukos	6 dagar	Tre kolonier, otydliga kanter. Fluffig längs kanterna med tre ringar (0,5 cm breda) med vita och gula sporer.	5 cm	26, glukos
Agar	6 dagar	Tre kolonier, mörkgröna sporer, ojämnt utspritt i yttre kant.	3 cm	26, agar
ALLS	7 dagar	Tre kolonier. Otydliga, täta, genomskinliga nätverk. Små vita prickar jämnt utspritt.	2 cm	26, ALLS
LiB	7 dagar	Tre kolonier. Glesa vita nätverk som till viss del växer upp som fluff. Vita fläckar inom 1,5 cm radie från koloniernas mitt.	3 cm	26, LiB
AL	7 dagar	Tre kolonier. Otydliga nätverk med vita flagor i mitten - dessa är tydligast i en av kolonierna och finns knappt i en annan.	3 cm	26, AL
Renstrykning av svampprovet odlat på LiB i rumstemperatur, från mycel				
Glukos	6 dagar	Tre kolonier, tydliga beiga nätverk. Växer vitt fluff uppåt, tydligast i mitten.	3 cm	2, glukos
Agar	6 dagar	Tre kolonier, svåra att se, endast nätverk.	3-4 cm	2, agar
ALLS	22 dagar	Vitt fluff, jämnt spritt (glest) över hela plattan.	Hela plattan	2, ALLS
LiB	22 dagar	Vitt fluff, jämnt spritt (glest) över hela plattan.	Hela plattan	2, LiB
AL	22 dagar	Tomt, inget har hänt.	-	2, AL
Renstrykning av rötprovet odlat på AL i rumstemperatur, från gröna sporer				

Fortsättning på tabell O.1				
Medium	Tillväxt	Utseende	Diameter	Namn
Glukos	6 dagar	Fem kompakta kolonier, varav två är små. Vita, med vitt fluff i mitten.	1 cm	5, glukos
Agar	6 dagar	Tre kolonier. Mestadels mycel men även sporer. Växt längs med plattan. Tätare i mitten av kolonin.	2-3 cm	5, agar
ALLS	7 dagar	Tre kolonier. Vita nätverk, lite fluffiga, med sporer ut från centrum. Grönaktiga i centrum och i ett band 0,5 cm ut från koloniernas centrum.	3 cm	5, ALLS
LiB	7 dagar	Tre kolonier. Vita nätverk, lite fluffiga, med sporer ut från centrum. Grönaktiga i centrum och i ett band 0,5 cm ut från koloniernas centrum.	3 cm	5, LiB
AL	7 dagar	Tre kolonier. Vitt nätverk med sporer ut från centrum. Grönaktiga i centrum och i ett band 0,5 cm ut från koloniernas centrum.	3 cm	5, AL
Renstrykning av barkprovet odlat på AL i rumstemperatur, från gröna sporer				
Glukos	6 dagar	Tre otydliga kolonier, sammanväxta. Mestadels vita sporer men även vissa gula i 1 cm breda band längs koloniernas kanter. Grumlig agar.	5 cm	25, glukos
Agar	6 dagar	Tre kolonier, ljusgröna sporer i yttre kant.	3-4 cm	25, agar
ALLS	7 dagar	Tre kolonier. Tätt nätverk, lite vita prickar mot och i centrum.	3 cm	25, ALLS
LiB	7 dagar	Tre kolonier. Glest nätverk. Lite fluffiga bitar och grönvita klumpar, ganska utspridda.	3 cm	25, LiB
AL	7 dagar	Tre kolonier. Tätt nätverk, mycket vita prickar mot och i centrum.	3-4 cm	25, AL
Renstrykning av träprovet, odlat på AL i rumstemperatur, av gröna sporer				
Glukos	6 dagar	Tre kolonier. Klara vita sporer som inte växt samman. Finns även lite ljusare vita sporer runt cirklarna.	3-4 cm	14, glukos

Fortsättning på tabell O.1				
Medium	Tillväxt	Utseende	Diameter	Namn
Agar	6 dagar	Tre kolonier, otydliga för blotta ögat, endast mycel syns. Enstaka grå sporer syns.	3-4 cm	14, agar
ALLS	11 dagar	Tre kolonier. Väldigt svaga med lite vitt i mitten.	2-3 cm	14, ALLS
LiB	7 dagar	Mycket glesa vita nätverk som till viss del växer uppåt som fluff. Enstaka vita flagor, jämnt utspritt.	5 cm	14, LiB
AL	11 dagar	Tre kolonier. Svårt att se mycel. Lite vita sporer i centrum av kolonierna.	3 cm	14, AL
Renstrykning av svampprov, odlat på AL i rumstemperatur, av mörkgrå sporer				
Glukos	6 dagar	Tre kolonier, tydligt beiga nätverk. Vitt fluff som växer uppåt, tydligast i mitten.	3 cm	16, glukos
Agar	6 dagar	Tre kolonier. Mestadels mycel, lite svårt att se, har växt ihop helt och täcker hela plattan.	Hela plattan	16, agar
ALLS	22 dagar	Väldigt otydliga kolonier. Vitt tunt fluff, jämnt spritt (glest) över hela plattan.	Hela plattan	16, ALLS
LiB	22 dagar	Tre kolonier. Vitt fluff, jämnt spritt (glest) över alla kolonier.	4 cm	16, LiB
AL	22 dagar	Tomt, inget har hänt.	-	16, AL
Renstrykning av jordprov (100x spädning), odlat på ALLS i 30°C, i av vita sporer				
Glukos	6 dagar	Tre klara kolonier. Mycel runt en vit spor-cirkel i mitten (0,5 cm bred).	2-3 cm	6, glukos
Agar	7 dagar	Tre kolonier. Tydliga, täta, platta, genomskinliga nätverk.	5 cm	6, agar
ALLS	11 dagar	Tre klara kolonier med massa mindre runt om. Vitt pulver i centrum och mycel runt.	2-3 cm	6, ALLS
LiB	11 dagar	Tre klara kolonier med massa mindre runtomkring, utspridda över hela plattan. Väldigt klart vitt i centrum med mycel runt.	3 cm	6, LiB

Fortsättning på tabell O.1				
Medium	Tillväxt	Utseende	Diameter	Namn
AL	11 dagar	Sju kolonier, varav tre ursprungliga. Vissa växter ihop och är mindre. Tunt vitt pulver med mycel.	3 cm	6, AL
Renstrykning av rötprovet odlat på ALLS i rumstemperatur, från mycel				
Glukos	6 dagar	Tre kolonier. Vita och fluffiga. Tätare i mitten.	3-4 cm	31, glukos
Agar	6 dagar	Tre kolonier. Väldigt tunna, svåra att se och mestadels mycel.	2-3 cm	31, agar
ALLS	22 dagar	En koloni. Tätt mycel. Växer i kanten av plattan.	4-5 cm	31, ALLS
LiB	22 dagar	Tom, inget har hänt.	-	31, LiB
AL	22 dagar	Tom, inget har hänt.	-	31, AL
Renstrykning av barkprovet odlat på ALLS i 30°C, från vita sporer				
Glukos	6 dagar	Tre kolonier, sammanväxta. Vita och några få gulaktiga sporer längsmed koloniernas kanter, cirka 1 cm breda band.	4 cm	10, glukos
Agar	6 dagar	Tre kolonier, ljusgröna sporer i yttre kant.	cirka. 3 cm	10, agar
ALLS	7 dagar	Tre kolonier. Tätt nätverk, några enstaka vita prickar i centrum.	3-4 cm	10, ALLS
LiB	7 dagar	Tre kolonier. Glesa, vita nätverk med sporer. Lite fluffiga.	3 cm	10, LiB
AL	7 dagar	Tre kolonier. Tätt nätverk, många vita prickar vid och i centrum.	3 cm	10, AL
Renstrykning av träprovet odlat på ALLS i 30°C, från vita sporer				
Glukos	6 dagar	Tre sammanväxta kolonier. Vita och gula sporer, mestadels längs koloniernas kanter. Grumlig agar	5 cm	20, glukos
Agar	6 dagar	Tre kolonier, vita/ljusgröna sporer i yttre kant.	3-4 cm	20, agar
ALLS	7 dagar	Tre kolonier. Glest nätverk.	3-4 cm	20, ALLS

Fortsättning på tabell O.1				
Medium	Tillväxt	Utseende	Diameter	Namn
LiB	7 dagar	Tre otydliga kolonier. Glest nätverk, mycket vitt fluff i mitten. Vissa med lite grönaktig ton. "Klumpar av dessa".	3-4 cm	20, LiB
AL	7 dagar	Tre kolonier. Glest nätverk, mer vitt och fluffigt i centrum.	3 cm	20, AL
Renstrykning av tickprovet odlat på ALLS i 30°C, från vita sporer				
Glukos	6 dagar	Tre kolonier, nästan sammanväxta. Vita (och gula inslag) tydliga sporer. Täcker inte riktigt hela plattan.	4-5 cm	19, glukos
Agar	6 dagar	Tre kolonier, enstaka grönaktiga sporer som bildar en gles ring i kolonins kanter.	5 cm	19, agar
ALLS	7 dagar	Tre kolonier. Svagt vita nätverk, små vita flagor i mitten av kolonierna.	2,5 cm	19, ALLS
LiB	7 dagar	Tre kolonier. Ljusgröna fläckar i en ring.	2 cm	19, LiB
AL	7 dagar	Tre kolonier. Otydliga nätverk med kompakt vit fläck i mitten.	2 cm	19, AL
Renstrykning av jordprovet (100x spädning), odlat på LiB i rumstemperatur, från gröna sporer				
Glukos	6 dagar	Tre otydliga kolonier, övervuxen platta. Vita och fluffiga längs kanterna med tre ringar (cirka 1 cm breda) med vita och några gula kolonier. Grumlig agar.	5 cm	17, glukos
Agar	6 dagar	Tre kolonier, vita/ljusgröna sporer i yttre kant, jämt utspridda.	2-4 cm	17, agar
ALLS	7 dagar	Tre kolonier. Tydliga, täta, platta, genomskinliga nätverk.	4 cm	17, ALLS
LiB	7 dagar	Tre kolonier. Glesa, vita nätverk med vissa delar som växer uppåt som fluff. Stora vita flagor inom 2 cm radie från koloniernas mitt.	4 cm	17, LiB

O Beskrivningar av svampkoloniernas utseende efter renstryk

Fortsättning på tabell O.1				
Medium	Tillväxt	Utseende	Diameter	Namn
AL	7 dagar	Tre kolonier. Otydliga, täta, genomskinliga nätverk. Vita små flagor inom 1 cm radie från koloniernas mitt, främst i mitten.	3 cm	17, AL
Renstrykning av rötprovet odlat på LiB i 30°C, från gröna sporer				
Glukos	6 dagar	Åtta kolonier där tre är de droppar vi placerade och så finns det fem stycken till kanten av plattorna. Tydligt vita med lite gulorange mitten.	2-3 cm (små 1-2 cm)	1, glukos
Agar	7 dagar	Tre kolonier. Tydliga genomskinliga nätverk, med grått fält (0,5 cm) i mitten.	4 cm	1, agar
ALLS	11 dagar	Tre kolonier. Ser ut som tunt vitt pulver med mycket mycel som sticker ut från koloniernas centrum.	3 cm	1, ALLS
LiB	7 dagar	Tre kolonier. Vitt nätverk som till viss del växer som fluff uppåt. Grått fält i mitten (0,5 cm).	1,5 cm	1, LiB
AL	11 dagar	Tre kolonier. Tunt vitt pulver med högt utstickande mycel. Tydligare pulverboll i mitten.	3 cm	1, AL
Renstrykning av barkprovet odlat på LiB i 30°C, från gröna sporer				
Glukos	6 dagar	Tre kolonier med sammanväxta kanter. Vita fluffiga kanter och, cirka 1 cm in, en ring (cirka 0,5 cm bred) med gula och vita sporer. Tom i mitten.	5 cm	13, glukos
ALLS	7 dagar	Tre kolonier. Tätt nätverk. Ganska många vita prickar i och mot centrum.	3-4 cm	13, ALLS
LiB	7 dagar	Tre kolonier. Glesa, vita nätverk. Vita flagor jämnt utspridda.	2 cm	13, LiB
AL	7 dagar	Tre kolonier. Otydliga nätverk. Små flagor inom 1 cm radie från koloniernas mitt.	2 cm	13, AL

Fortsättning på tabell O.1				
Medium	Tillväxt	Utseende	Diameter	Namn
Renstrykning av träprovet odlat på LiB i 30°C, från gröna sporer				
Glukos	6 dagar	Tre kolonier, sammanväxta kanter. Vita och fluffiga med, cirka 1 cm in, en ring (cirka 1,5 cm bred) med vita och gula kolonier.	5 cm	18, glukos
Agar	6 dagar	Tre otydliga kolonier. Få vita sporer, ojämnt utspridda i yttre kant.	1.5-2 cm	18, agar
ALLS	7 dagar	Tre kolonier. Otydliga, täta, platta nätverk.	2 cm	18, ALLS
LiB	7 dagar	Tre kolonier. Glesa vita nätverk med vita flagor inom 1,5 cm radie från koloniernas mitt.	2 cm	18, LiB
AL	7 dagar	Tre kolonier. Otydliga, täta, platta nätverk.	2 cm	18, AL
Renstrykning av barkprovet odlat på AL i 30°C, från gröna sporer				
Glukos	6 dagar	Tre kolonier, stora fläckar med vita/gula sporer i yttre kant. Grumlig agar.	3 cm	4, glukos
Agar	6 dagar	Tre kolonier, ljusgröna sporer i yttre kant.	2 cm	4, agar
ALLS	7 dagar	Tre kolonier. Nätverk med små vita prickar i mitten.	3 cm	4, ALLS
LiB	7 dagar	Tre kolonier. Vita nätverk, vita flagor jämnt utspridda i en ring (cirka 1 cm bred).	2 cm	4, LiB
AL	7 dagar	Tre kolonier. Otydliga nätverk med små vita flagor, främst i mitten men även inom en radie på 1 cm.	3 cm	4, AL
Renstrykning av träprovet odlat på AL i 30°C, från gröna sporer				
Glukos	6 dagar	Tre kolonier, sammanväxta kanter. Vitt fluff längs de yttersta kanterna och, 1 cm in, en ring (1 cm bred) med gula kolonier. Ganska tomma i mitten, bara enstaka vita kolonier.	5-6 cm	28, glukos

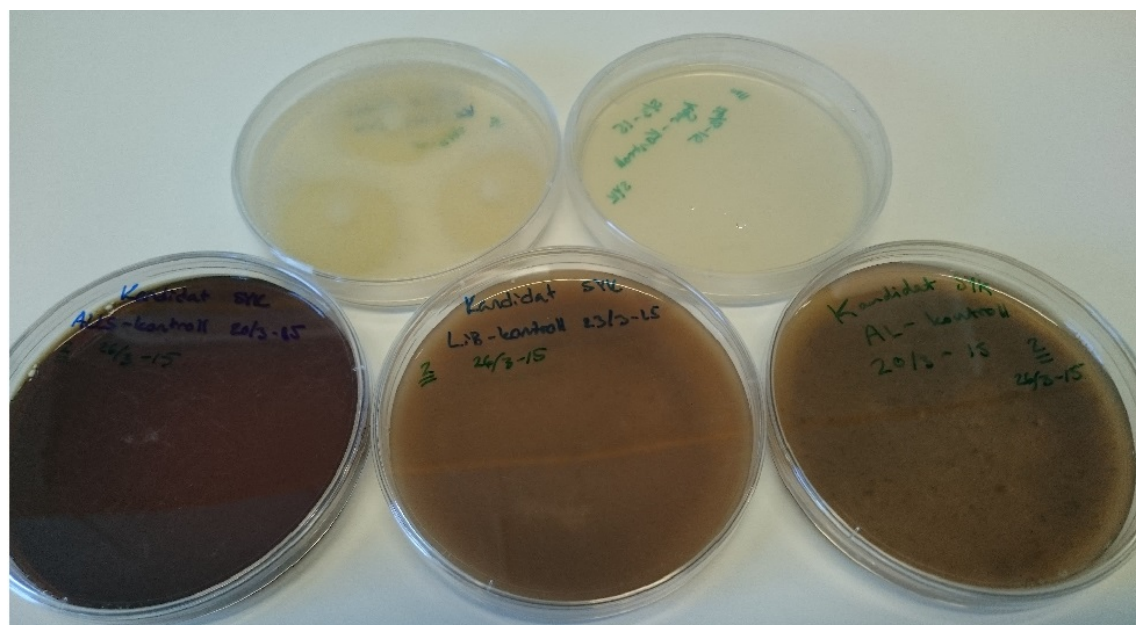
Fortsättning på tabell O.1				
Medium	Tillväxt	Utseende	Diameter	Namn
ALLS	11 dagar	Tre kolonier. Glest nätverk, mer vitt i mitten som är sporer.	3 cm	28, ALLS
LiB	7 dagar	Tre otydliga kolonier. Vitt fluff nära kanterna, vita och grönvita prickar utspridda i kolonierna.	4 cm	28, LiB
AL	11 dagar	Tre otydliga kolonier. Glest nätverk, ganska mycket vita sporer i mitten och ganska centrerat.	3 cm	28, AL
Renstrykning av tickprovet odlat på AL i 30°C, från gröna sporer				
Glukos	6 dagar	Tre otydliga kolonier, sammanväxta. Vita sporer jämnt utspridda i 1,5 cm band runt yttre kant. Grumlig agar.	5 cm	9, glukos
Agar	6 dagar	Tre kolonier. Mestadels mycel, nästan ihopväxta kanter och täcker därmed nästan hela plattan.	5-6 cm	9, agar
ALLS	7 dagar	Tre kolonier. Täta, platta, genomskinliga, tydliga nätverk.	4 cm	9, ALLS
LiB	7 dagar	Tre kolonier. Vita glesa nätverk med viss tendens att växa uppåt som fluff. En koloni har stora vita flagor.	3 cm	9, LiB
AL	7 dagar	Tre kolonier. Täta, platta, genomskinliga, tydliga nätverk, vita fält inom 0,5 cm radie från koloniernas mitt.	3 cm	9, AL

Bilaga P Foton av renstrykta kolonier

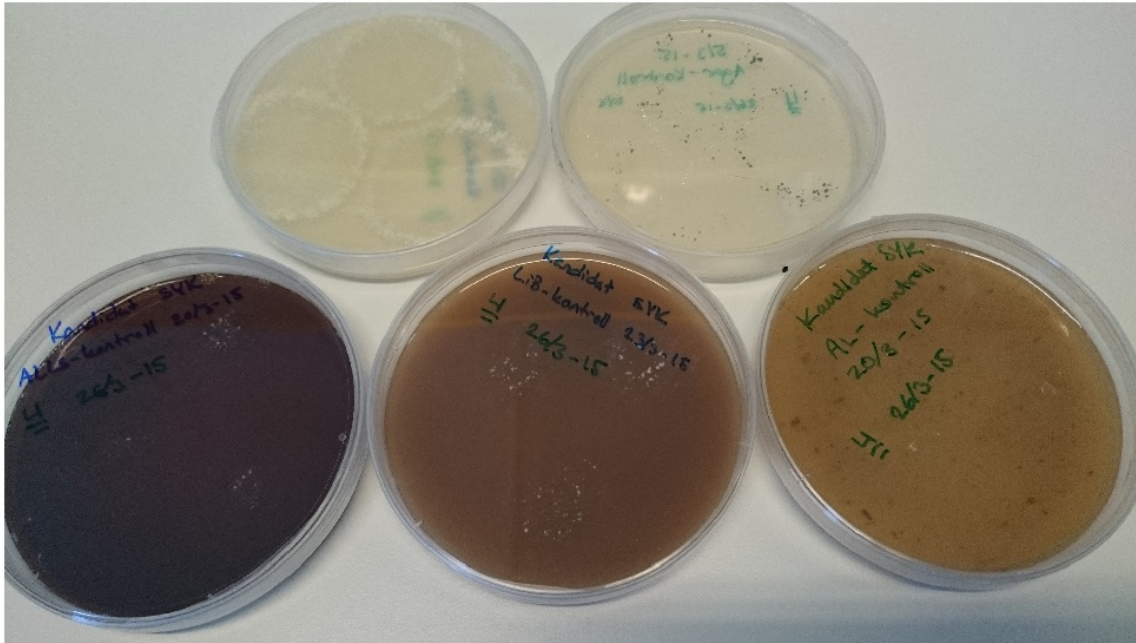
Här presenteras alla bilder på de tre olika ligninplattorna, glukosplattorna och agarplattorna som de svampprover som valdes ut för vidare studering inokulerades på.



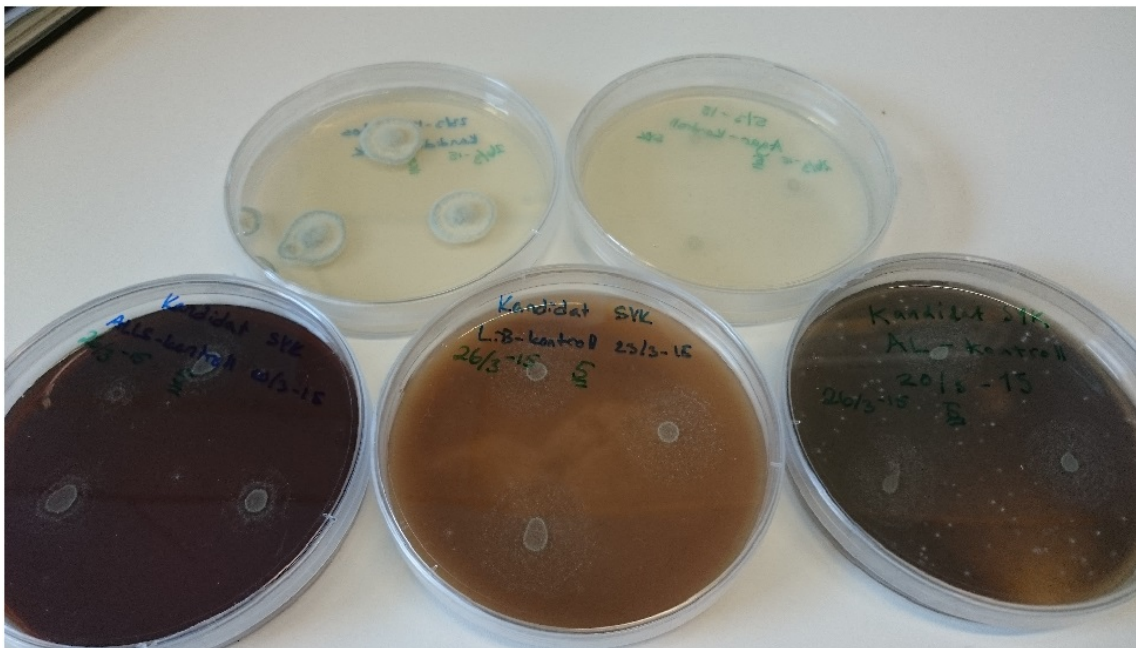
Figur P.1: Svampprov 1 renstruken på de olika plattorna. Från högst upp till vänster: Glukos, agar, ALLS, LiB och AL.



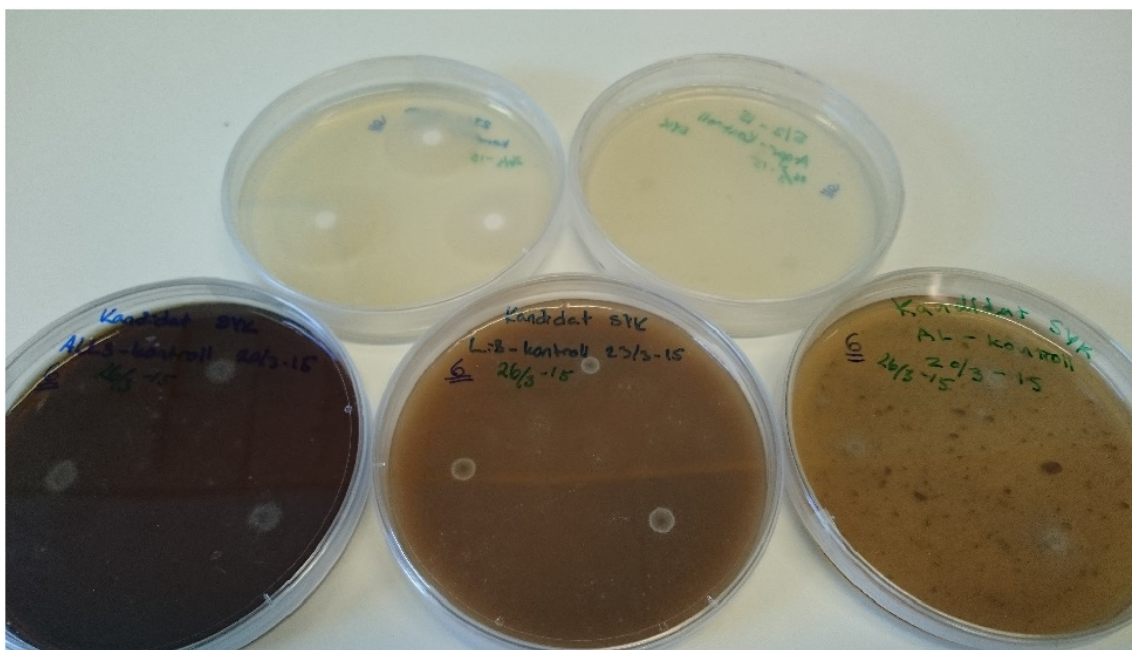
Figur P.2: Svampprov 2 renstruken på de olika plattorna. Från högst upp till vänster: Glukos, agar, ALLS, LiB och AL.



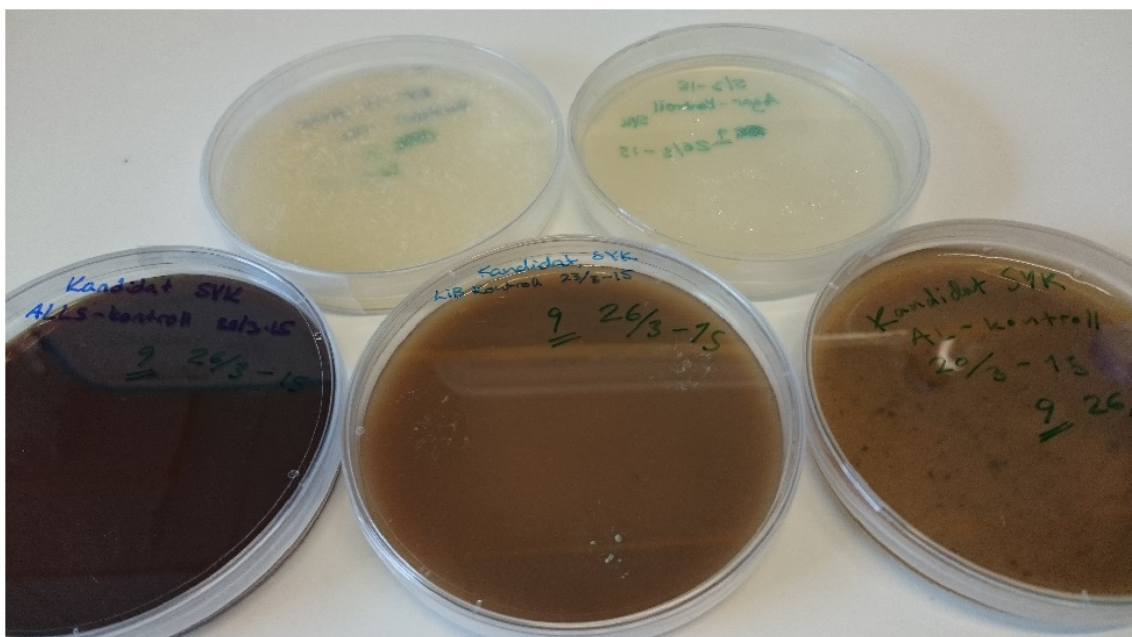
Figur P.3: Svampprov 4 renstruken på de olika plattorna. Från högst upp till vänster: Glukos, agar, ALLS, LiB och AL.



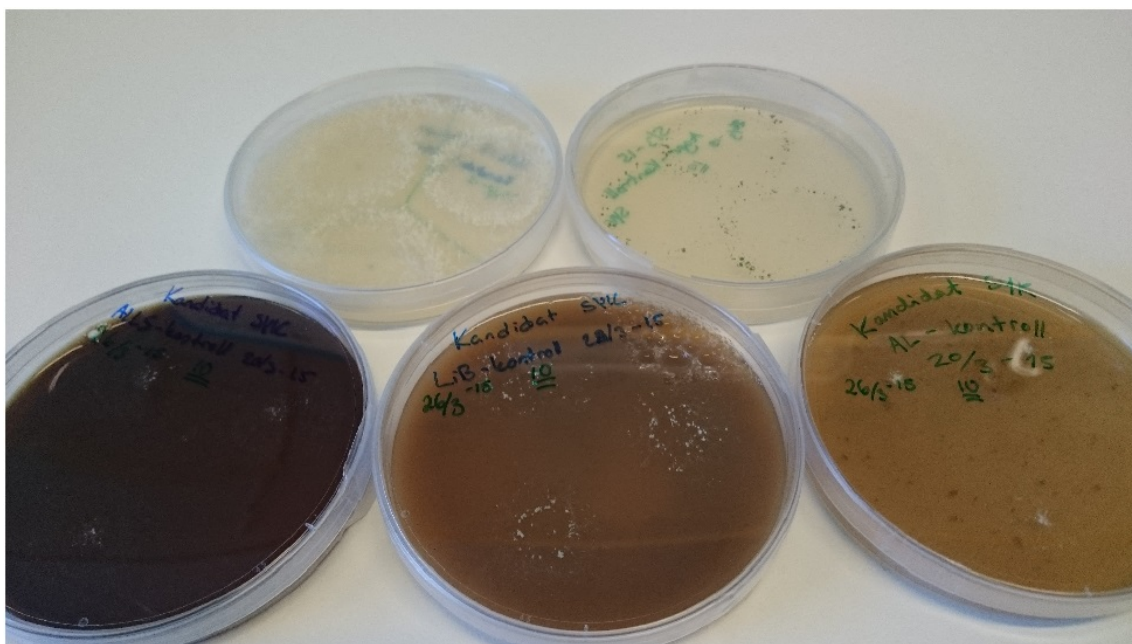
Figur P.4: Svampprov 5 renstruken på de olika plattorna. Från högst upp till vänster: Glukos, agar, ALLS, LiB och AL.



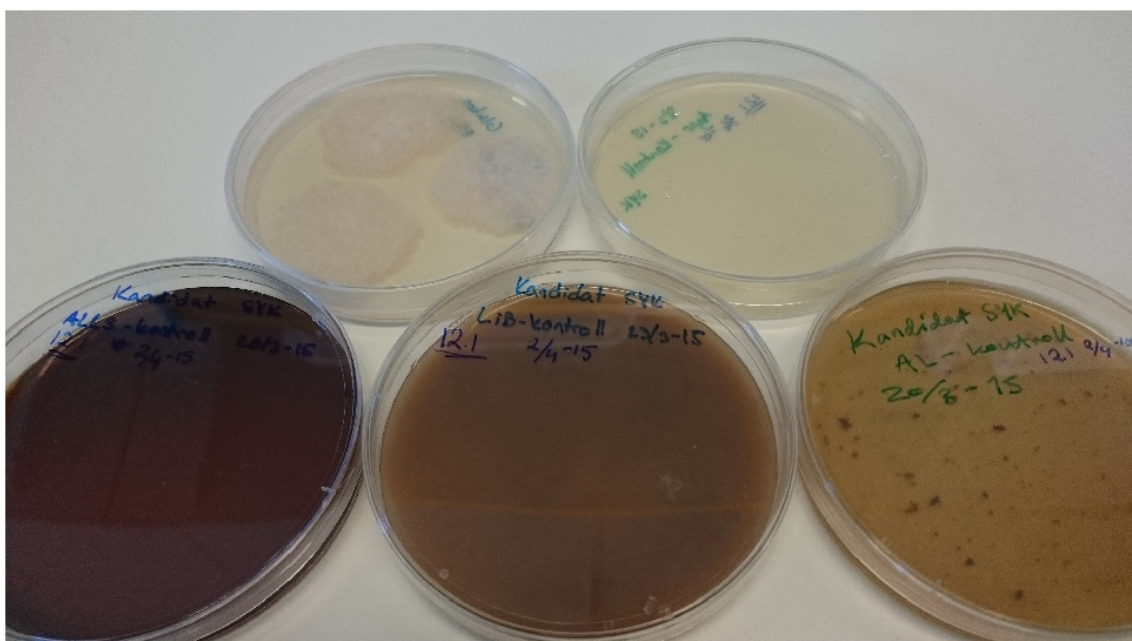
Figur P.5: Svampprov 6 renstruken på de olika plattorna. Från högst upp till vänster: Glukos, agar, ALLS, LiB och AL.



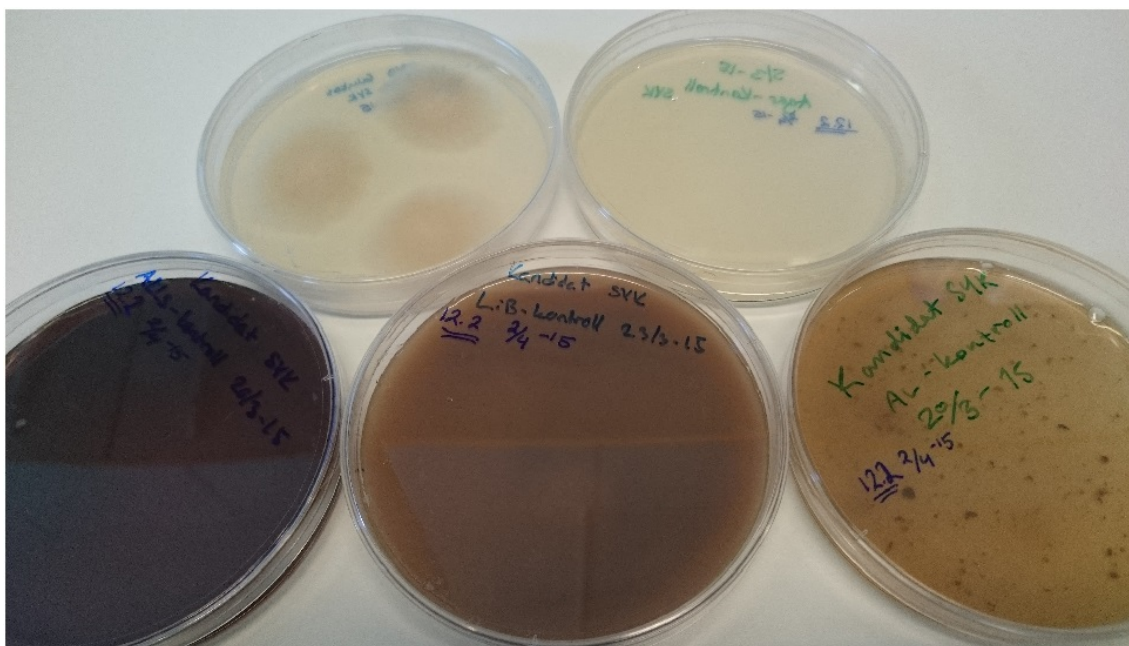
Figur P.6: Svampprov 9 renstruken på de olika plattorna. Från högst upp till vänster: Glukos, agar, ALLS, LiB och AL.



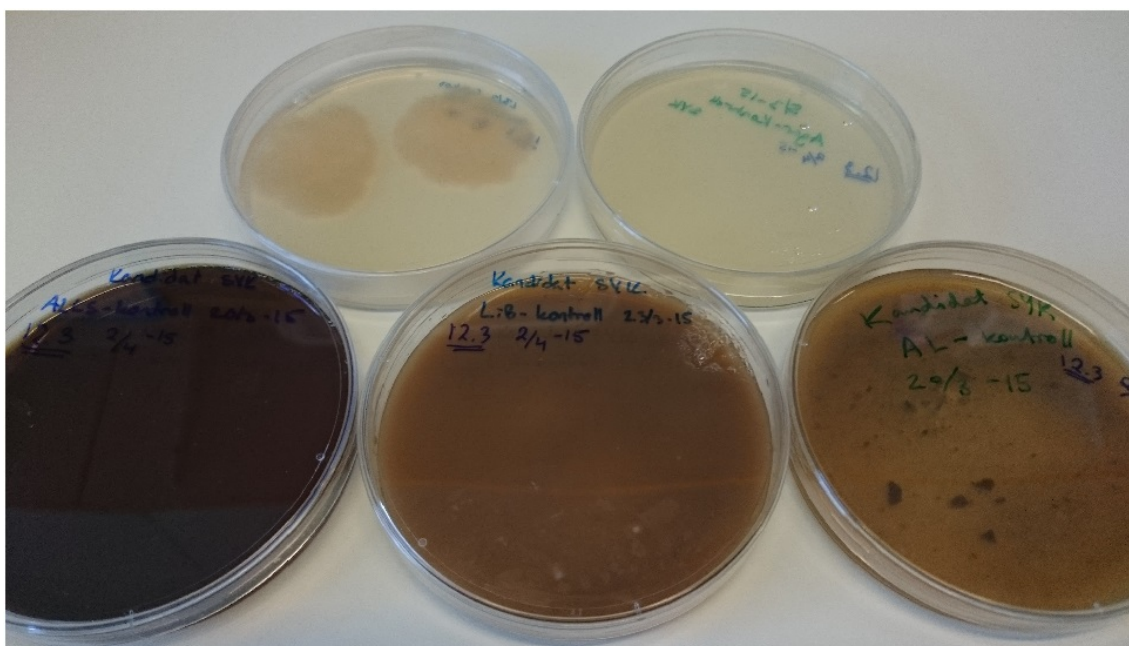
Figur P.7: Svampprov 10 renstruken på de olika plattorna. Från högst upp till vänster: Glukos, agar, ALLS, LiB och AL.



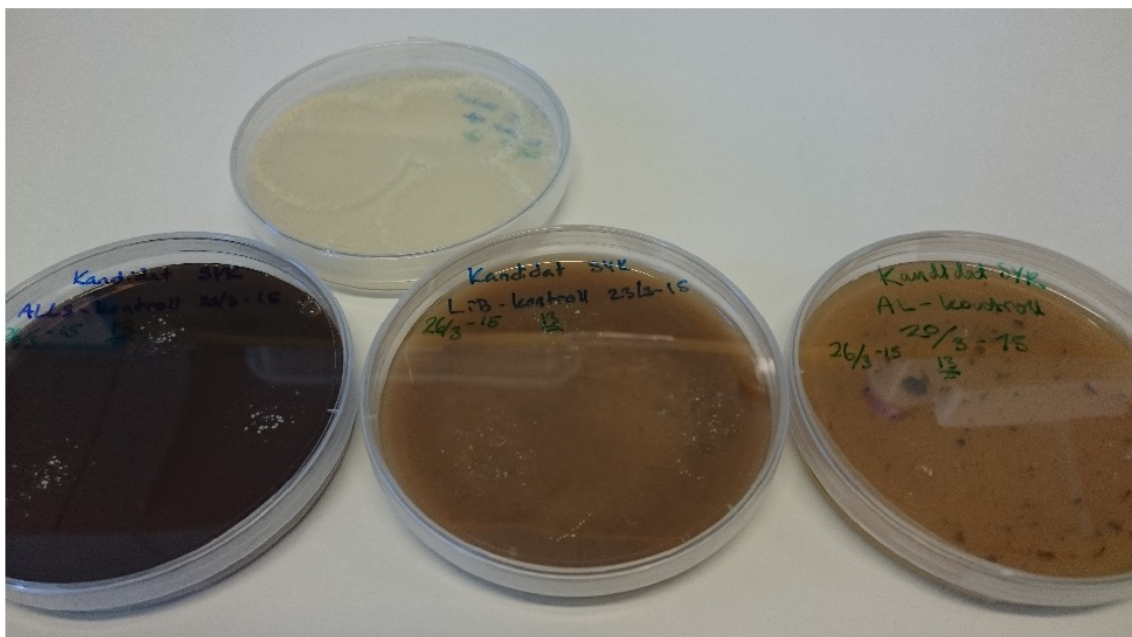
Figur P.8: Svampprov 12.1 renstruken på de olika plattorna. Från högst upp till vänster: Glukos, agar, ALLS, LiB och AL.



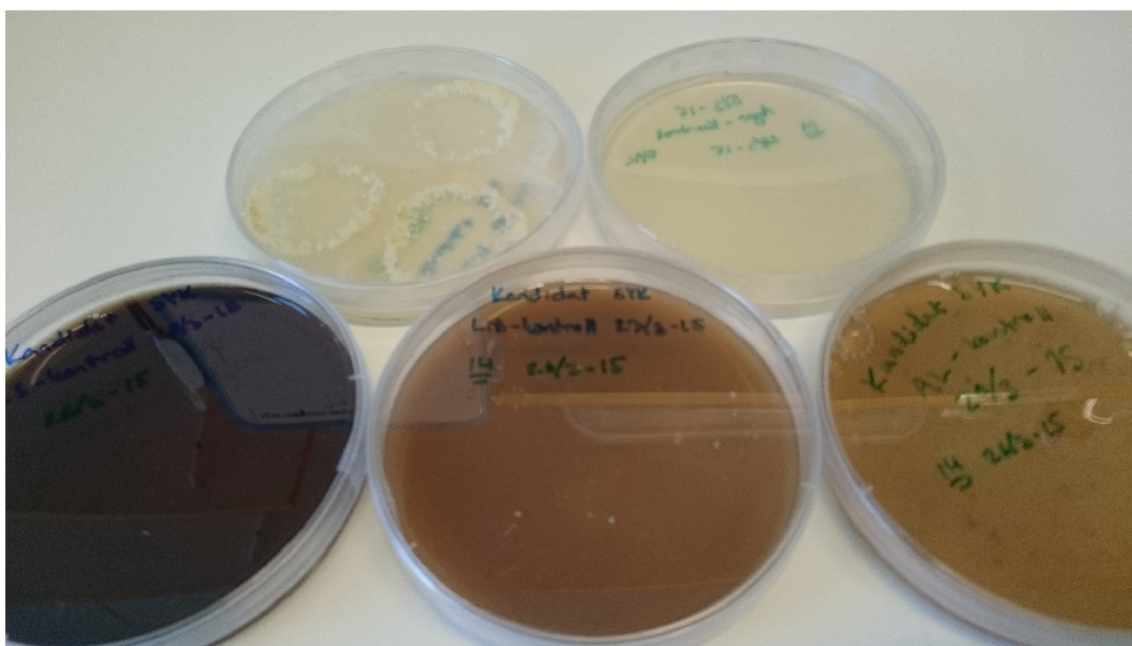
Figur P.9: Svampprov 12.2 renstruken på de olika plattorna. Från högst upp till vänster: Glukos, agar, ALLS, LiB och AL.



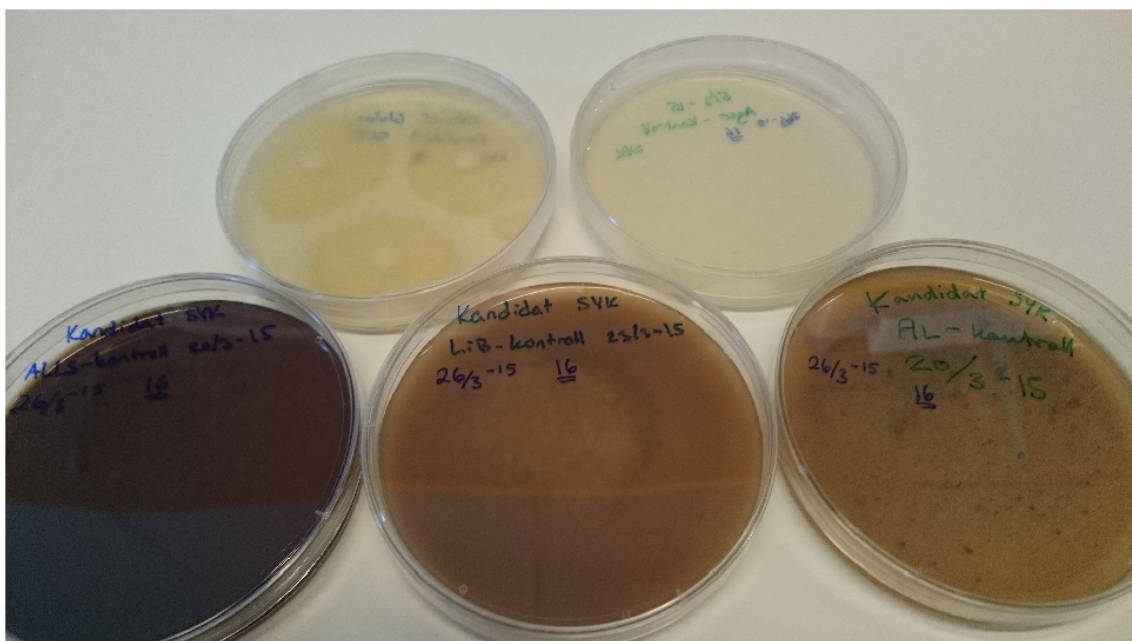
Figur P.10: Svampprov 12.3 renstruken på de olika plattorna. Från högst upp till vänster: Glukos, agar, ALLS, LiB och AL.



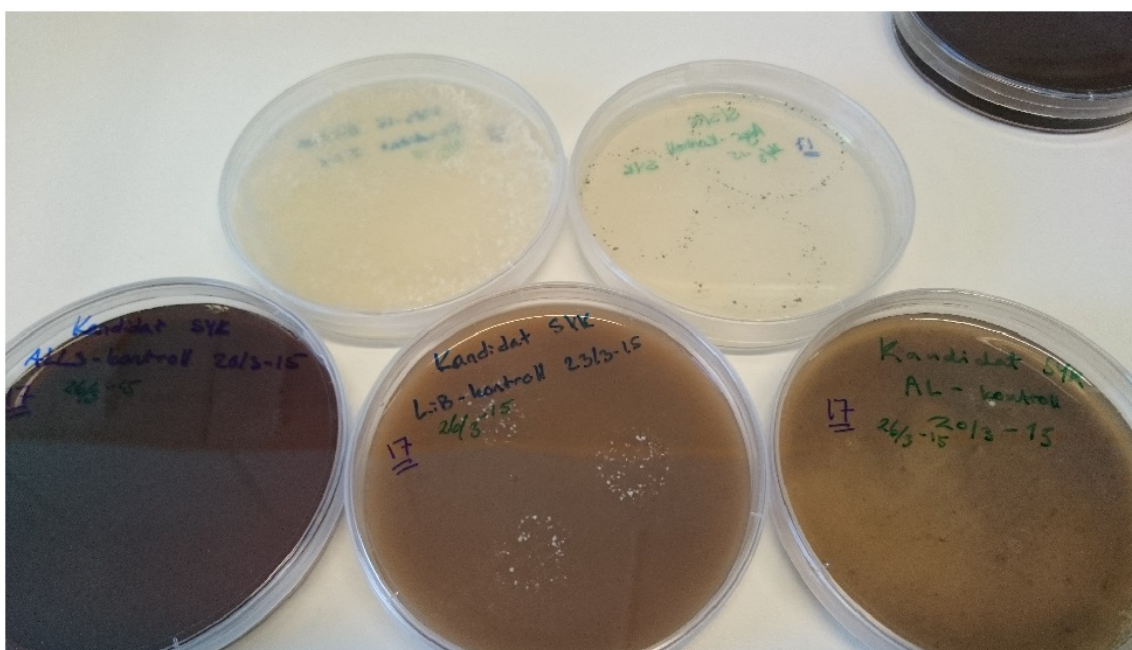
Figur P.11: Svampprov 13 renstruken på de olika plattorna. Från högst upp till vänster: Glukos, ALLS, LiB och AL.



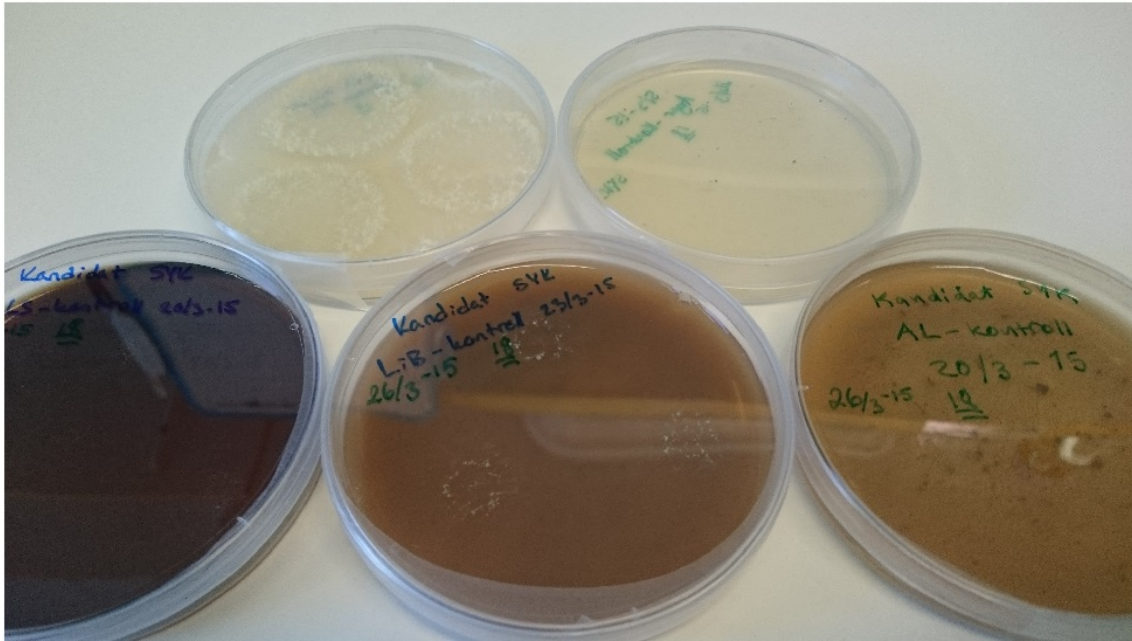
Figur P.12: Svampprov 14 renstruken på de olika plattorna. Från högst upp till vänster: Glukos, agar, ALLS, LiB och AL.



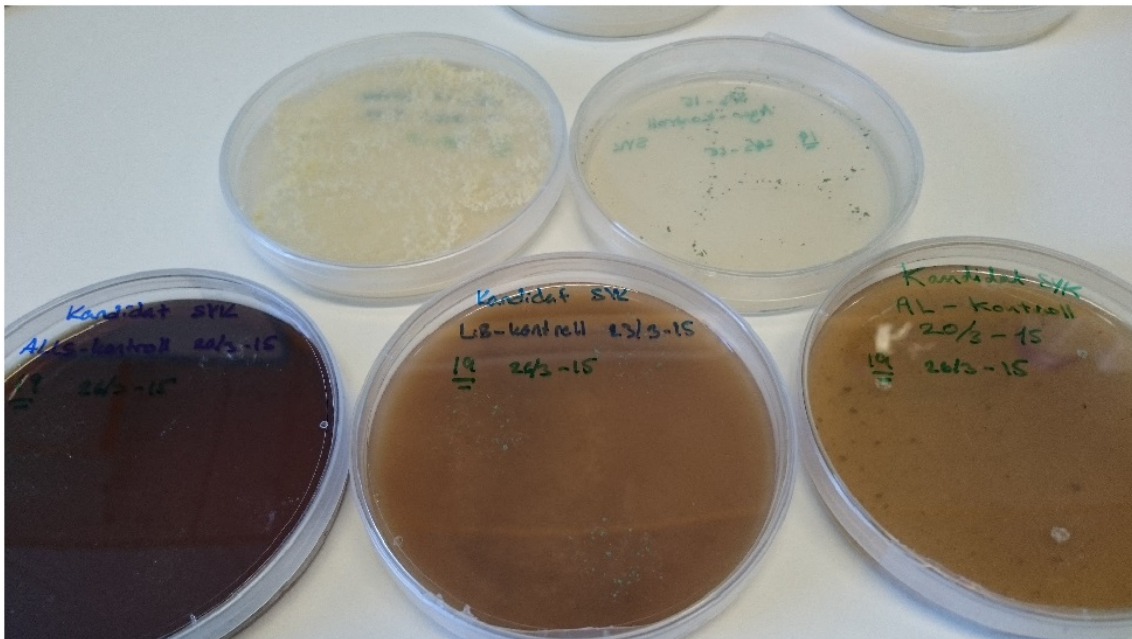
Figur P.13: Svampprov 16 renstruken på de olika plattorna. Från högst upp till vänster: Glukos, agar, ALLS, LiB och AL.



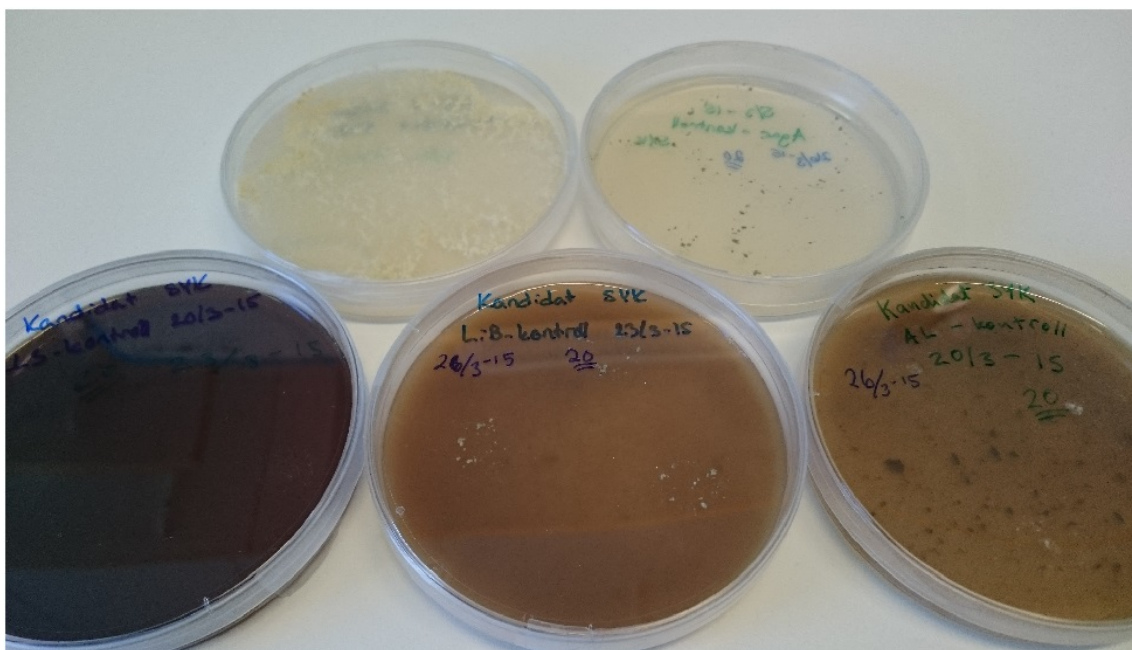
Figur P.14: Svampprov 17 renstruken på de olika plattorna. Från högst upp till vänster: Glukos, tom agar, ALLS, LiB och AL.



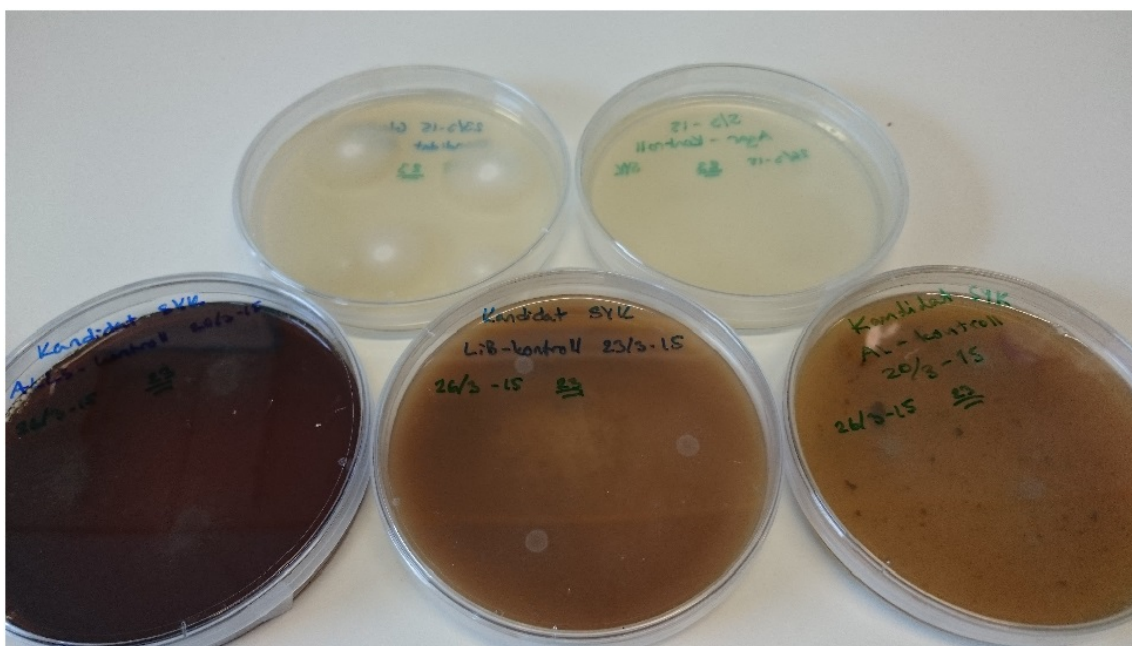
Figur P.15: Svampprov 18 renstruken på de olika plattorna. Från högst upp till vänster: Glukos, agar, ALLS, LiB och AL.



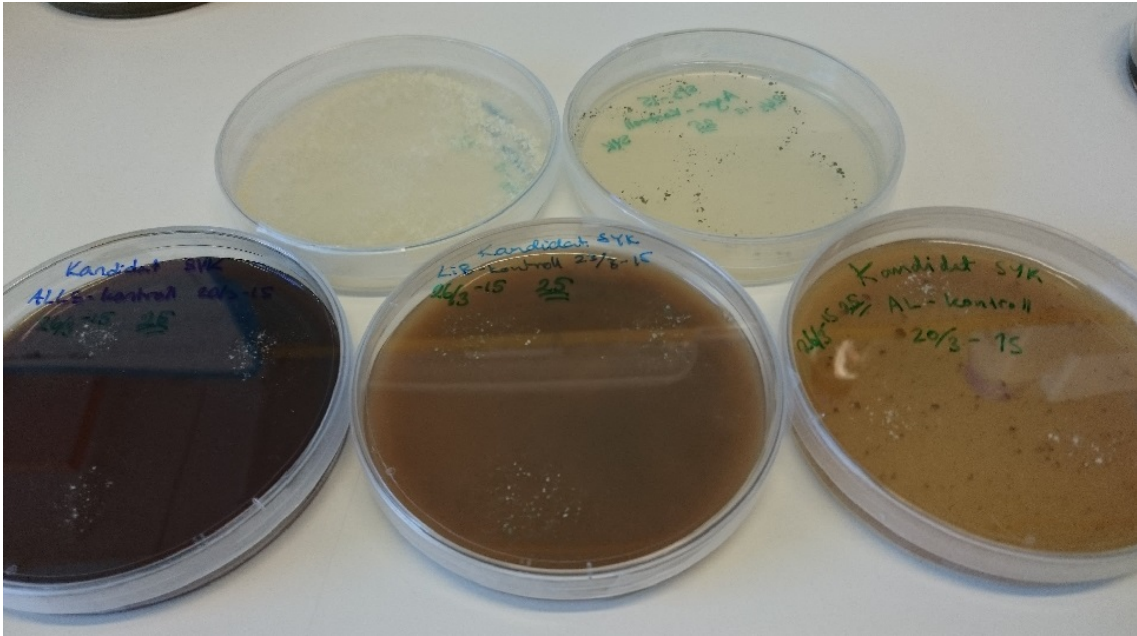
Figur P.16: Svampprov 19 renstruken på de olika plattorna. Från högst upp till vänster: Glukos, agar, ALLS, LiB och AL.



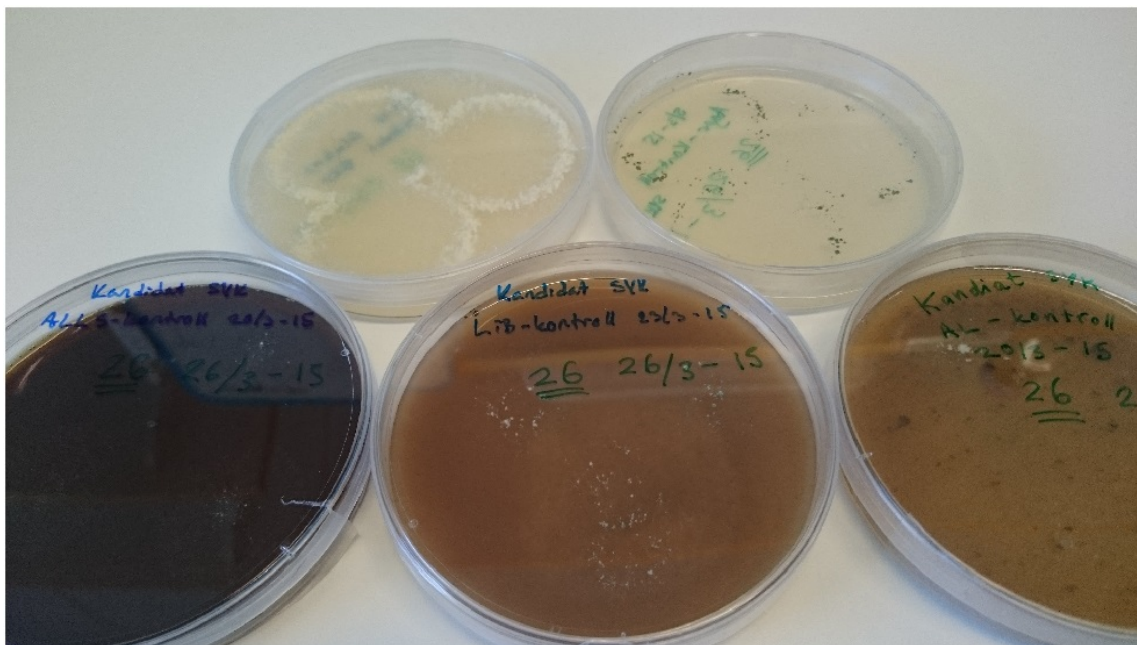
Figur P.17: Svampprov 20 renstruken på de olika plattorna. Från högst upp till vänster: Glukos, agar, ALLS, LiB och AL.



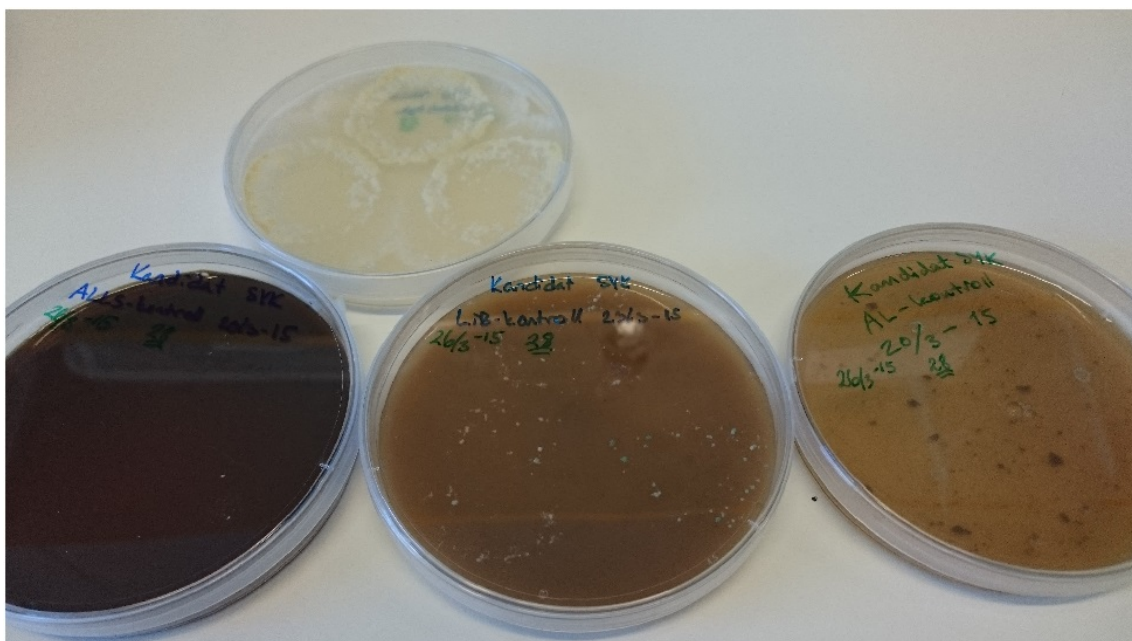
Figur P.18: Svampprov 23 renstruken på de olika plattorna. Från högst upp till vänster: Glukos, agar, ALLS, LiB och AL.



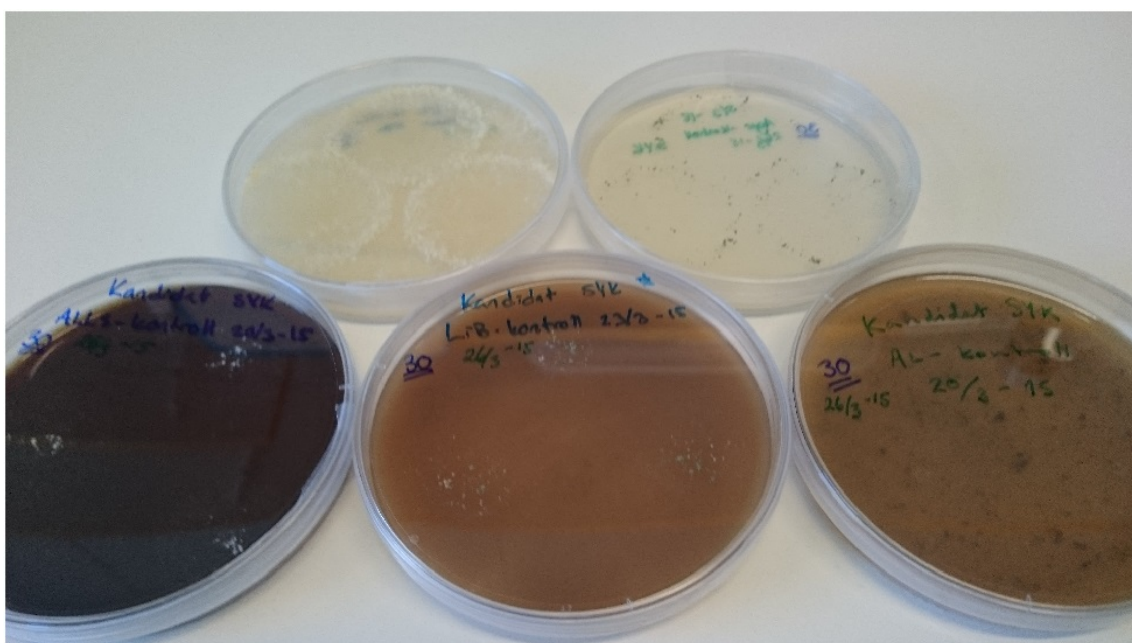
Figur P.19: Svampprov 25 renstruken på de olika plattorna. Från högst upp till vänster: Glukos, agar, ALLS, LiB och AL.



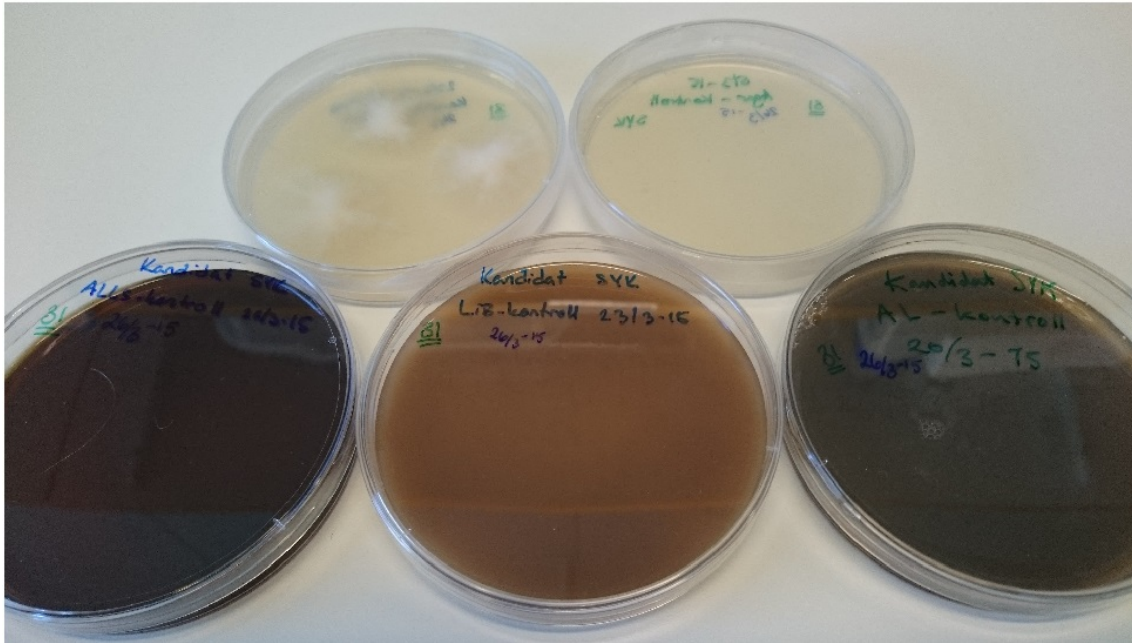
Figur P.20: Svampprov 26 renstruken på de olika plattorna. Från högst upp till vänster: Glukos, agar, ALLS, LiB och AL.



Figur P.21: Svampprov 28 renstruken på de olika plattorna. Från högst upp till vänster: Glukos, ALLS, LiB och AL.



Figur P.22: Svampprov 30 renstruken på de olika plattorna. Från högst upp till vänster: Glukos, agar, ALLS, LiB och AL.



Figur P.23: Svampprov 31 renstruken på de olika plattorna. Från högst upp till vänster: Glukos, agar, ALLS, LiB och AL.

Bilaga Q Plasmidsekvens, aminosyrasekvens och för *E. coli* kodonoptimerad nukleinsyrasekvens för DI-CSQDRAFT_107426

Plasmidsekvens erhållen från Joakim Norbeck, institutionen för biologi och bioteknik på Chalmers tekniska högskola.

CTAAATTGTAAGCGTTAATATTTTGTGTTAAAATTCGCGTTAAATTTTTGTGTTAAA
TCAGCTCATTTTTTAACCAATAGGCCGAAATCGGCAAAATCCCTTATAAATC
AAAAGAATAGACCGAGATAGGGTTGAGTGTGTTCCAGTTTGGAACAAGAG
TCCACTATTAAAGAACGTGGACTCCAACGTCAAAGGGCGAAAAACCGTCTA
TCAGGGCGATGGCCCACTACGTGAACCATCACCTAATCAAGTTTTTTGGGG
TCGAGGTGCCGTAAAGCACTAAATCGGAACCCTAAAGGGAGCCCCCGATTT
AGAGCTTGACGGGGAAAGCCGGCGAACGTGGCGAGAAAGGAAGGGAAGAA
AGCGAAAGGAGCGGGCGCTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCGGTCACGCTGCG
CGTAACCACCACACCCGCCGCGCTTAATGCGCCGCTACAGGGCGCGTCCCAT
TCGCCATTGAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCCTCTT
CGCTATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAGTT
GGGTAACGCCAGGGTTTTCCAGTCACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTG
AGCGCGCGTAATACGACTCACTATAGGGGAATTGTGAGCGGATAACAATTC
CCCGAGCTCGGATCCCTGCAGTCTAGAGAATTCCTCGAGATCCCGGACACCA
TCGAATGGCGCAAAACCTTTCGCGGTATGGCATGATAGCGCCCGGAAGAGA
GTCAATTCAGGGTGGTGAATGTGAAACCAGTAACGTTATACGATGTTCGCAG
AGTATGCCGGTGTCTCTTATCAGACCGTTTCCCGCGTGGTGAACCAGGCCAG
CCACGTTTCTGCGAAAACGCGGGAAAAAGTGGAAGCGGCGATGGCGGAGCT
GAATTACATTCCCAACCGCGTGGCACAACAACCTGGCGGGCAAACAGTCGTT
GCTGATTGGCGTTGCCACCTCCAGTCTGGCCCTGCACGCGCCGTCGCAAATT
GTCGCGGCGATTAAATCTCGCGCCGATCAACTGGGTGCCAGCGTGGTGGTGT
CGATGGTAGAACGAAGCGGCGTCGAAGCCTGTAAAGCGGCGGTGCACAATC
TTCTCGCGCAACGCGTCAGTGGGCTGATCATTAACTATCCGCTGGATGACCA
GGATGCCATTGCTGTGGAAGCTGCCTGCACTAATGTTCCGGCGTTATTTCTT
GATGTCTCTGACCAGACACCCATCAACAGTATTATTTTCTCCCATGAAGACG
GTACGCGACTGGGCGTGGAGCATCTGGTTCGCATTGGGTCACCAGCAAATCG
CGCTGTTAGCGGGCCCATTAAGTTCTGTCTCGGCGCGTCTGCGTCTGGCTGG
CTGGCATAAATATCTCACTCGCAATCAAATTCAGCCGATAGCGGAACGGGA
AGGCGACTGGAGTGCCATGTCCGGTTTTCAACAAACCATGCAAATGCTGAAT
GAGGGCATCGTTCCCACTGCGATGCTGGTTGCCAACGATCAGATGGCGCTGG
GCGCAATGCGCGCCATTACCGAGTCCGGGGCTGCGCGTGTGGTGCGGATATCTC
GGTAGTGGGATACGACGATACCGAAGACAGCTCATGTTATATCCCGCCGTTA
ACCACCATCAAACAGGATTTTCGCCTGCTGGGGCAAACCAGCGTGGACCGC
TTGCTGCAACTCTCTCAGGGCCAGGCGGTGAAGGGCAATCAGCTGTTGCCCG
TCTCACTGGTGAAAAGAAAAACCACCCTGGCGCCCAATACGCAAACCGCCT
CTCCCCGCGCGTTGGCCGATTCATTAATGCAGCTGGCACGACAGGTTTCCCG
ACTGGAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTAAGTTAGCTCACTC

ATTAGGCACCGTCGAGGGGGGGCCCGGTACCCAGCTTTTGTTCCTTTAGTG
AGGGTTAATTGCGCGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGA
AATTGTTATCCGCTCACAATTCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGT
GTAAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCG
CTCACTGCCCCGCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGA
ATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGGCGGTTTGGCGTATTGGGCGCTCTTCCGCTT
CCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCGTTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATC
AGCTCACTCAAAGGCGGTAAACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGC
AGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAA
AGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCCTGACGAGCATCA
CAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAG
ATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCC
TGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCT
TTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTGCTTCGCTCCA
AGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGTTACGCCGACCGCTGCGCCTTATC
CGGTAACATATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTG
GCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCT
ACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTA
TTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTA
GCTCTTGATCCGGCAAACAACACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTGTGTTG
CAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGAT
CTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAACTCACGTAAAGGGATT
TTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTA
AATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAACTTGGTCTGACAG
TTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTT
CATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGG
CTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCG
GCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGA
AGTGGTCCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGA
AGCTAGAGTAAGTAGTTTCGCCAGTTAATAGTTTGGCGAACGTTGTTGCCATT
GCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTTCAGCT
CCGGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAA
AGCGGTTAGCTCCTTCGGTCCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGCA
GTGTTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTCATGCC
ATCCGTAAGATGCTTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGA
GAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCCGGCGTCAATACGGGATA
ATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATATTGGAAAACGTTT
TTCGGGGCGAAAACCTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTTCGATG
TAACCCACTCGTGCACCCAACCTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTACCCAGCGT
TTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAA
GGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCCTTTTTTCAATATTATTG
AAGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATT
TAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCA
C

Aminosyrasekvens DICSQDRAFT_107426

MHFFASVTVAFALLQVALSQEHSPVWGQCGGIEWSGATSCVAGSTCTVVNPYY
SQCLPAVASPTTTSVPTSTPPSVPAACSTPSTVSNFSNSALPDPFLFDDGTPVTTV
DDWSCRRAQILALVQGYEAGALPGKPSSLAGTLTTSNTSTLSITASNNDTSITF
EPTITFSPGDPPAGGWPLVIVYDSPSLPIPSGIATMIYSNSQMAQQNDQSSRGVGL
FYDLFGQNATASAMTAWAWGVSRIIDVLEQTPSANINTQKIAVTGCSRDKGA
LMAGALEPRIALTIPQESGSGGDTCWRLSLFEQEQGSDVQTATEIVQENVWFST
NFANYVDDLNALPYDHLLAALIAPRPMISFENTDVVWLSPMSAFGCMSAAHT
VWEALSIADFHGFEQVGGHQHCAPSSLTPQLNAFFDRFLLGQNVSTDFFATN
DEFNGVTWTPSQWINWTTPTLN

Nukleotidsekvens DICSQDRAFT_107426, kodonoptimerad för *E. coli*

ATGCACTTCTTTGCGTCGGTAACCGTCGCATTCGCACTGCTGCAGGTGGCGT
TAAGCCAGGAACATTCTCCGGTTTGGGGGCAGTGCAGGTGGCATTGAATGGA
GTGGTGCCACCTCCTGTGTCGCAGGAAGCACTTGTACCGTGGTGAACCCGTA
TTATTCTCAGTGTCTGCCAGCTGTGCATCACCAACGACGACCTCTGTTCTTA
CTAGCACCCCGCCGAGCGTGCCTGCCGCATGTAGCACCCCGAGCACCGTGA
GTAACCTCAGTAATTCAGCCCTGCCTGATCCGTTTCTGTTTCGACGATGGCAC
ACCGGTAACACTGTGGACGACTGGAGTTGTTCGCCGCGCGCAGATCCTGGC
ACTCGTTCAGGGCTATGAAGCTGGAGCTCTGCCCCGTAAACCGAGCAGCCTT
GCGGGTACCTTAACGACGTCTGGAAACACGTTCGACTTTGAGCATTACCGCAT
CAAATAATGACACCAGCATTACCTTTGAACCAACGATTACCTTTCCGAGTGG
TGATCCACCTGCGGGAGGTTGGCCGCTGGTTATCGTGTACGATTCCCCGAGC
CTGCCGATTCCGAGTGGTATCGCGACCATGATTTATAGCAACTCACAGATGG
CTCAGCAGAATGACCAGAGTTCGCGTGGAGTCGGCCTGTTTTATGATTTATT
CGGCCAAAACGCTACGGCGTCTGCCATGACCGCGTGGGCCTGGGGCGTTTCT
CGGATCATCGACGTACTGGAGCAAACCCCGTCAGCTAATATCAACACCCAA
AAAATTGCCGTAACGGGTTGCTCCCGTGATGGGAAAGGCGCCTTAATGGCG
GGCGCACTCGAACCCCGCATTGCCCTTACTATCCACAGGAAAGCGGTTCCG
GTGGCGATACGTGTTGGCGCCTGAGCCTTTTTGAGCAGGAGCAAGGATCCG
ATGTCCAGACGGCAACCGAAATTGTGCAGGAGAACGTATGGTTTTCCACAA
ACTTCGCCAATTACGTGGATGACCTGAACGCGCTGCCATACGATCACCCTT
ACTTGCGGCACTGATCGCCCTCGTCCAATGATCTCTTTTGAAAACACAGAC
GTGGTGTGGTTGAGCCCGATGTCCGGCATTGGCTGTATGTCTGCTGCGCATA
CGGTGTGGGAGGCCCTGAGCATTGCGGATTTCCATGGTTTCGAACAGGTCGG
GGGCCATCAGCATTGCGCTTGGCCTTCGAGTCTGACCCCTCAGTTGAATGCG
TTTTTCGATCGTTTCCTGTTAGGCCAAAACGTTAGCACCGATTTTTTTGCGAC
CAATGATGAGTTCAACGGTGTCACCTGGACTCCGTCTCAGTGGATCAACTGG
ACGACCCCGACGCTGAAC