

Biodrivstoff fra tare - Fermentering av alginat til etanol

Ida Maria Evensen

Bioteknologi

Oppgaven levert: Mai 2011

Hovedveileder: Kjetill Østgaard, IBT

Biveileder(e): Inga Marie Aasen, SINTEF

FORORD

Denne oppgaven ble utført ved Institutt for bioteknologi ved Norges Teknisk-Naturvitenskapelige Universitet (NTNU), i samarbeid med SINTEF Materialer og kjemi, avdeling for bioteknologi. Oppgaven er en del av et prosjekt utført for firmaet Seaweed Energy Solutions (SES).

Jeg vil takke min veileder professor Kjetill Østgaard for gode råd og oppmuntring underveis i arbeidet. En stor takk rettes også til min veileder ved SINTEF, Inga Marie Aasen. Takk for at jeg har fått vært med å jobbe på dette prosjektet, og for alt du har lært meg i løpet av året som har gått.

Tusen takk til alle på laboratoriet ved SINTEF bioteknologi, og til dere fra institutt for bioteknologi ved NTNU som har hjulpet meg, for god hjelp med det praktiske arbeidet og uvurderlige råd. En ekstra takk til Kathinka Q. Lystad og Olav Andreas Aarstad, for opplæring på laboratoriet og hjelp med analyser av utallige prøver. Jeg vil også takke gode venner for støtte, og for at dere har gjort studiehverdagen litt lettere. En ekstra takk til Sigurd Hagen Johansen og Kristine Flesche for gode råd til oppgaven.

Jeg vil til slutt takke familien min, mamma og pappa og mine søsken Mari og Torje, for at dere har støttet meg og tatt vare på meg. Takk til bestemor for omsorg når jeg trengte ro. Og sist, men ikke minst, takk til min kjære samboer Jonas, for alt du har gjort og betyr for meg. Takk for at du har holdt ut med meg og hele tiden hatt troen på meg.

SAMMENDRAG

Bioenergi er et viktig alternativ for erstatning av petroleumsbasert drivstoff, men det er fremdeles et stort behov for forskning og utvikling av prosesser som kan bedre dagens teknologi. Bioenergi inkluderer blant annet biogass, biodiesel og bioetanol. Disse kan brukes som drivstoff og kan bidra til å redusere utslippene av drivhusgass fra transportsektoren. Utnyttelse av marin biomasse for bioenergiproduksjon er av særlig interesse, da det ikke avhenger av landareal og ferskvann for dyrking. Brunalger er marine alger med høyt innhold av karbohydrater og høy produktivitet. De akkumulerer karbohydratene mannitol og laminaran som opplagsnæring, og alginat er en svært viktig strukturkomponent i algene. Forskning viser at laminaran og mannitol kan fermenteres til etanol, men lite er gjort for å se på muligheter for også å omdanne alginatet til bioetanol og på den måten øke utbyttet av prosessen. Bioenergi fra marine alger er med dagens teknologi ikke konkurransedyktig på grunn av høye kostnader og lavt utbytte.

Målet med oppgaven var å finne og karakterisere alginatdegraderende bakteriestammer med fermentativ metabolisme, og helst etanolproduksjon. Dette ble gjort ved å velge ut bakteriestammer med stort potensial for vekst på alginat fra isolerte og innkjøpte stammer. Det ble videre utført en rekke vekstforsøk med de utvalgte stammene på alginat, mannitol og glukose, med ulik begrensning av oksygentilførsel. Fermenteringsprodukter og substratkonsentrasjon ble bestemt ved hjelp av høypresisjonsvæskekromatografi (HPLC) og enzymatisk alginatanalyse. Det var også et ønske om å identifisere enzymer og eventuelt gener for alginatdegradering og fermenteringsspor. Alginatdegradering og ekstracellulære enzymer ble karakterisert ved hjelp av høypresisjon anionbytter-kromatografi med pulsamperimetri deteksjon (HPAEC-PAD). Intracellulære enzymer antatt involvert i alginatomsetting ble forsøkt påvist med DNA ekstraksjon og amplifisering med polymerasekjedereaksjon (PCR).

De innledende forsøkene viste at mange av de isolerte stammene kunne utnytte alginat som vekstmedium. Både kråkebolletarm og råtnende tare viste seg å være gode kilder for alginatdegraderende bakteriestammer. Alle bestilte bakteriestammene kunne utnytte alginat. Av de utvalgte stammene som ble analysert videre hadde kun en stamme etanolproduksjon. Denne produserte etanol fra glukose og mannitol, men ikke fra alginat. Fra mannitol økte etanolutbytte når oksygentilførselen ble begrenset, og høyest

oppnådde utbytte uten optimalisering var 0,23 g/g. Årsaken til at stammen ikke produserte etanol fra alginat var mest sannsynlig at redoksreaksjonen fra alginat til etanol ikke er balansert. Ekstracellulære alginat lyaser i de utvalgte stammene ble identifisert, og HPAEC-PAD analysen viste en nedbryting til hovedsakelig di- og trimerer med den umettede uronsyren 4-deoxy-5-ketouronsyre som endegruppe. Videre intracellulært nedbrytningsspor lyktes ikke å identifisere, men nedbryting av umettede uronsyrer og dårlig vekst på andre uronsyrer styrket hypotesen om en direkte omdanning til 2-keto-3-deoxy-D-glukoat.

Resultatene viste at en av hovedutfordringene med produksjon av bioetanol fra tare og alginat er å balansere nedbrytningssporet fra alginat til etanol. Mer detaljerte fermentorforsøk med alginatdegraderende og etanolfermenterende stammer kan gi svar på om det er praktisk og økonomisk mulig med en produksjon av bioetanol fra tare der alginat inkluderes. Det vurderes nå muligheter for utvikling av et bioraffineri, hvor etanolproduksjon fra karbohydratene mannitol og laminaran kan kombineres med at resten av materialet utnyttes, eksempelvis til biogass. Dette kan vise seg å være en bedre mulighet enn fermentering av alginat til etanol.

INNHold

<i>Forord</i>	<i>I</i>
<i>Sammendrag</i>	<i>II</i>
1 Introduksjon	1
1.1 Bakgrunn for oppgaven	1
1.2 Bioenergi fra marin biomasse	2
1.2.1 Bioenergi.....	2
1.2.2 Marin biomasse.....	3
1.2.3 Brunalger.....	4
1.2.4 Fermentering til etanol.....	6
1.2.5 Teoretisk utbytte av biomasse og produkt.....	8
1.3 Alginat	9
1.3.1 Struktur.....	9
1.3.2 Forekomst og bruksområder.....	10
1.4 Bakteriell nedbryting av alginat	11
1.4.1 Alginat lyaser.....	11
1.4.2 Omsetning av alginat.....	12
1.5 Mål og avgrensing	18
2 Materialer og metoder	19
2.1 Forsøksoversikt	19
2.2 Bakteriestammer og dyrking	20
2.2.1 Medier.....	20
2.2.2 Generelle teknikker.....	22
2.2.3 Isolering av bakteriestammer.....	24
2.2.4 Innkjøpte og tilsendte bakteriestammer.....	26
2.3 Screening av bakteriestammer	28

2.4 Forsøk med utvalgte stammer	29
2.5 Karakterisering av enzymer	30
2.5.1 Analyse av nedbrytingsprodukt fra M- og G-blokk	30
2.5.2 Genanalyse	32
2.6 Analyser	34
2.6.1 Enzymatisk alginatanalyse	34
2.6.2 Viskositet	35
2.6.3 Væskekromatografi (HPLC).....	35
2.6.4 Høypresisjon anionbytter-kromatografi med pulsamperimetrisk deteksjon (HPAEC-PAD)	36
3. Resultater og diskusjon	38
3.1 Screening av bakteriestammer	38
3.1.1 Bakteriestammer isolert fra kråkeboller	38
3.1.2 Bakteriestammer isolert fra tare.....	39
3.1.3 Bakteriestammer fra UMB.....	40
3.1.4 Innkjøpte bakteriestammer	45
3.1.5 Bakgrunn for videre valg av bakteriestammer.....	50
3.2 Forsøk med utvalgte stammer	54
3.2.1 Vekst med ulik oksygentilgang.....	54
3.2.2 Vekstutbytte og veksthastighet.....	59
3.2.3 Fermentering av alginat og mannitol.....	61
3.2.4 Nedbryting av alginat.....	71
3.2.5 Vurdering av utvalgte stammer	75
3.3 Karakterisering av enzymer	80
3.3.1 Analyse av nedbrytingsprodukt fra alginat.....	80
3.3.2 Genanalyse	88
3.3.3 Vurdering av enzymkarakterisering	89

3.4 Samlet vurdering.....	92
4 Konklusjon og videre arbeid	94
4.1 Konklusjon.....	94
4.2 Videre forskning.....	94
Referanser.....	96
Vedleggsliste.....	103

1 INTRODUKSJON

1.1 BAKGRUNN FOR OPPGAVEN

Fornybar energi er et svært aktuelt tema med dagens satsning på en bærekraftig utvikling og kutt i klimagassutslippene. Norge har store muligheter for å kunne produsere miljøvennlig energi, fra blant annet vannkraft, vindkraft og bioenergi.

Tare er hurtigvoksende marine alger med høyt innhold av karbohydrater. De kan derfor benyttes som biomasse for fermentering av karbohydrater til blant annet bioetanol. Den største mengden tare langs norskekysten finner vi som brunalger. Brunalger akkumulerer karbohydratene mannitol og laminaran som opplagsnæring, og i tillegg er polysakkaridet alginat en hovedkomponent i algene. Forskning på brunalger viser at karbohydratene laminaran og mannitol kan fermenteres til etanol (Horn, 2000; Adams *et al.*, 2009; Lee & Lee, 2011). For å få større etanolutbytte fra fermentering av brunalger er det også interessant å se på muligheter for fermentering av alginat til etanol.

Firmaet "Seaweed Energy Solutions" (SES) vurderer nå muligheter for dyrking av tare som råstoff for energiproduksjon. Forskningsrådet støtter en rekke prosjekter, flere innen dyrking og ett innen videre konvertering av biomassen. Det siste gjennomført ved SINTEF Materialer og Kjemi, avdeling for bioteknologi. Denne masteroppgaven er en del av dette prosjektet.

Målet med oppgaven var å finne alginatdegraderende bakteriestammer med fermentativ metabolisme, og helst etanolproduksjon. Det var også et ønske om å karakterisere aktuelle fermenteringsspor og produkter, samt identifisere enzymer og eventuelt gener for alginatdegradering og fermenteringsspor. Mye forskning gjenstår for å kunne optimalisere fermenteringsprosessen av tare til bioetanol (Adams *et al.*, 2009). Dette er derfor viktige forskningsoppgaver for å kunne utnytte tare som biomasse for bioetanol, med et optimalt og lønnsomt utbytte.

1.2 BIOENERGI FRA MARIN BIOMASSE

1.2.1 BIOENERGI

Bioenergi har de siste årene fått mye oppmerksomhet verden over da klimaendringer, usikkerhet i forhold til fossilt brennstoff og fremtidig økonomi skaper et behov for alternative fornybare energikilder (Adams *et al.*, 2009). I 2008 sto fossilt brennstoff for 88 % av det globale energiforbruket (Brennan & Owende, 2010), og det globale markedet er svært avhengig av petroleumbasert drivstoff, særlig til transportindustrien (Kraan, 2010; Singh *et al.*, 2011). Det er i dag allment akseptert at bruken av fossilt brennstoff ikke er bærekraftig på grunn av utarming av ressurser og akkumulering av drivhusgasser i atmosfæren, og det er derfor et sterkt behov for å forske på alternativer (Lee & Lee, 2011; Singh *et al.*, 2011). Biodrivstoff er en attraktiv konkurrent til dagens petroleumbaserte drivstoff, da det kan brukes i dagens motorteknologi uten store endringer og er fornybart og CO₂-nøytralt (Singh *et al.*, 2011).

Eksempler på bioenergi er biodiesel, biogass og bioetanol. Biodiesel er metylestere produsert fra lipider, utviklet blant annet fra planteoljer og animalsk olje, og i dag brukt hovedsakelig i transportindustrien (Chisti, 2007). Biogass produseres ved anaerob fermentering av organisk materiale, og består hovedsakelig av metan (CH₄) og karbondioksid (CO₂) (Lilleengen, 2009). Biogass kan utnyttes direkte til produksjon av strøm og varme, eller prosesseres til høyere kvalitet for bruk som drivstoff (Persson & Wellinger, 2006). Bioetanol, hovedfokuset i denne oppgaven, produseres ved etanolvermentering av karbohydrater og er betraktet som det reneste av drivstoffalternativene som kan erstatte petroleumbasert drivstoff (Lin & Tanaka, 2005). Energiutbyttet fra etanol er 68 % lavere enn for petroleumbasert drivstoff, men forbrenningen av etanol er mye renere fordi den inneholder oksygen (Krylova *et al.*, 2008).

Mange stater, som Brasil, Kina, Japan og flere land i Europa, er interessert i å utvikle og etablere sitt interne biodrivstoffmarked. Interessen skyldes blant annet økende oljepriser, framtidig tilgang på olje og bekymringer om utslipp og forpliktelser i forhold til for eksempel Kyotoprotokollen (Mussatto *et al.*, 2010; UNFCC, 2011). I dag er det et krav om at 3,5 % av total mengde omsatt drivstoff i Norge skal være biodrivstoff, og dette er foreslått økt til 5 % (KLIF, 2010). Det stilles strenge krav til produksjon av

1 Introduksjon

biodrivstoff. Spesielt begrenses produksjon på arealer som kan medføre skade på biologisk mangfold eller som er viktige karbonlagre. I dag blir nesten all bioetanol produsert fra planter som korn og sukkerrør (Mussatto *et al.*, 2010), vekster som krever mye landareal og ferskvann for dyrking og er essensielle matplanter. Dette er et av de største problemene med biodrivstoff; bruken av dyrkbar mark til biodrivstoffproduksjon som ellers kunne vært brukt til dyrking av matplanter (Singh *et al.*, 2011). Det stilles spørsmål om hvorvidt førstegenerasjons biodrivstoff som korn og sukkerrør er samfunnsmessig og økonomisk bærekraftig. Oppmerksomheten rettes derfor mot andre typer biodrivstoff basert på bærekraftig biologisk materiale som for eksempel biologisk avfall eller marine arter (Kraan, 2010; Singh *et al.*, 2011).

1.2.2 MARIN BIOMASSE

Marin biomasse er interessant for bioenergiproduksjon blant annet fordi den ikke avhenger av landareal for dyrking. Det er antatt at 50 % av global biomasse genereres i havet, og marin biomasse har gjennomsnittlig høyere fotosyntetisk effektivitet enn landplanter (Carlsson *et al.*, 2007; Kraan, 2010).

Plantebiomassen i havet finnes i hovedsak i form av ulike alger. De fleste marine alger er mikroskopiske encellede organismer, som varierer fra 1 til 10 μm i diameter. Slike mikroalger er fotosyntetiserende organismer som konverterer CO_2 til karbohydrater og potensielle biodrivstoff som lipider. Det gjøres mye forskning for å se på muligheter for produksjon av biodiesel fra mikroalger (Chisti, 2007; Brennan & Owende, 2010; Singh *et al.*, 2011). I tillegg til disse mikroalgene finnes det store mengder makroalger som bidrar til biodiversiteten av alger i havet. Disse er bedre kjent som tang og tare, og dominerer plantelivet i strandsonen og grunne kystlinjer (Horn, 2000; Indergaard & Jensen, 1991), se Figur 1.1. Den største mengden makroalger i Europa og langs norskekysten finnes som brunalger (*Phaeophyta*). I tillegg er makroalger av typen grønnalger (*Chlorophyta*) og rødalger (*Rhodophyta*) vanlige. Etersom makroalger er omsluttet av vann, trenger de ikke en indre transport av vann og næringsstoffer (Moen, 1997; Horn, 2000). Mange alger har derfor en svært høy produktivitet på grunn av energien de sparer på transport av næringsstoffer, noe som gjør dem godt egnet for biomasseproduksjon til biodrivstoff.



Figur 1.1: Naturlig tareskog i Trondheimsfjorden ved lavvann.

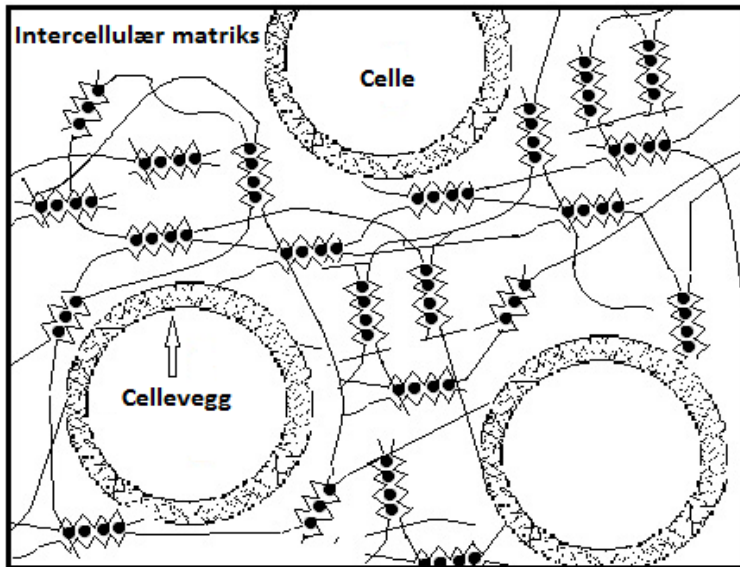
1.2.3 BRUNALGER

Brunalger, som er svært utbredt langs norskekysten, er rik på karbohydrater og derfor attraktiv for biologisk nedbryting (Horn, 2000; Adams *et al.*, 2009; Kraan, 2010). Under aerobe forhold vil biologisk nedbryting gi biomasse, CO₂ og H₂O, mens anaerobe forhold vil kunne gi metangass eller etanol (Horn, 2000). For å åpne for en industri med produksjon av bioetanol fra brunalger er det nødvendig å utvikle fermenteringsprosessen, i tillegg til utvikling av selve produksjonen. Brunalger har en svært sterk celleveggstruktur, noe som gjør det vanskelig for bakterier å vokse på ubehandlet algemateriale. Det er derfor nødvendig å finne bakteriestammer som er i stand til å nyttegjøre seg av karbohydratene i råstoffet og gi høyt etanolutbytte.

Brunalgene er en heterogen gruppe planter med høy variasjon og kompleksitet i struktur og oppbygging (Rødde, 1997). De vokser i tidevannssonen og i grunne deler av havbunnen under tidevannssonen på atlantehavskysten (Guiry & Blunden, 1991) og foretrekker relativt lave vanntemperaturer sammenlignet med andre vanlige grupper av makroalger. Hovedkomponenten i brunalger er ulik den som finns i høyere arter som landplanter. Landplanter har cellevegger som hovedsakelig består av cellulose (30-50 %), hemicellulose/pektin (30-50 %) og lignin (0-15 %), mens alginat er den

1 Introduksjon

dominerende strukturelle komponenten hos brunalger (Moen, 1997). Celleveggen i brunalger består i tillegg av cellulose, fucoidan og protein. Brunalgeceller er omgitt av et tredimensjonalt nettverk av alginat som holder cellene tett sammen (Figur 1.2). Alginat utgjør som regel rundt 30 % av det organiske materialet i algen (Haug, 1964; Draget *et al.*, 2006; Moen, 1997; Horn, 2000).



Figur 1.2: Forenklet illustrasjon av brunalgevev, med celler omgitt av et intercellulært alginatnettverk. Alginatmolekylene med kalsiumbundet G-blokker er veldig forstørret sammenlignet med cellene (Tegnet selv med mal fra Moen (1997)).

Den kjemiske sammensetningen i brunalger varierer med årstidene, og mellom de ulike artene (Haug & Jensen, 1954; Jensen & Haug, 1956). Når brunalger utsettes for årstidsvariasjoner, som ved norskekysten, akkumuleres laminaran og mannitol i planten i løpet av lyssesongen, slik at disse molekylene kan brukes som opplagsnæring i mørketiden når fotosyntesen avtar (Haug & Jensen, 1954; Horn, 2000). Alginatinnholdet og kjedesammensetning i alginatet i algene varierer mellom de ulike artene. Brunalger som stortare (*Laminaria hyberborea*), som vokser på utsatte steder langs kysten, har et høyt innhold av guluronsyrerik alginat i stilken som gir algen en veldig sterk struktur. Arter som vokser på mindre værutsatte områder har en alginatsammensetning som gir en mer bevegelig struktur (Draget *et al.*, 2006). Dette er viktige faktorer som må tas hensyn til ved utnyttelse av brunalger til bioenergi, for å få høyest mulig utbytte.

I Norge høstes enkelte brunalger som stortare kommersielt til produksjon av alginat, men det er ingen dyrking av disse makroalgene. I Kina og enkelte andre land i Asia er det lang tradisjon for dyrking av blant annet brunalgen *Laminaria japonica*, og nye dyrkingsteknikker er etablert de siste tiårene (Kraan, 2010; Lüning & Pang, 2003).

1.2.4 FERMENTERING TIL ETANOL

Anaerob fermentering av tare kan som nevnt gi metangass eller etanol. Vellykkede pilotstudier med fermentering av tare til metan har blitt utført, men enkelte utfordringer må løses før prosessen kan eskaleres. Resultatene viser at det kan være vanskelig å få omsatt alt av karbohydrater, særlig alginatet, i tillegg til at polyfenoler i algematerialet kan virke hemmende på metanogene bakterier (Hansen *et al*, 1987; Østgaard *et al*, 1993; Moen, 1997; Horn, 2000). Erfaringer fra slike studier kan komme til nytte for etanolfermentering, da en av utfordringene er nedbrytingen av alginatnettverket i algeveggen. Enkelte studier på fermentering av brunalger til bioetanol er gjort (Horn, 2000; Adams *et al*, 2009; Lee & Lee, 2011), men mye gjenstår for å kunne fermentere en høy andel av karbohydratene i algene med et høyt etanolutbytte.

Redoksreaksjoner (reduksjon-oksidasjon) spiller en avgjørende rolle i fermenteringen av karbohydrater, og det vil være umulig å opprettholde etanolproduksjon hvis ikke redoksreaksjonen fra substratet er balansert. Fra glukose produseres etanol via degradering av glukose til pyruvat, hvor det genereres to nikotinamid adenin dinukleotid (reduisert form, NADH + H⁺, videre omtalt som NADH₂), og videre reduksjon av pyruvat til etanol med opptak av to NADH₂ (Moat *et al.*, 2002). Redoksreaksjonen fra glukose til etanol er derfor balansert. De vanligste mikroorganismene brukt til etanolfermentering er gjæren *Saccharomyces cerevisiae* og bakterien *Zymomonas mobilis* (Horn, 2000). Gjærfermentering av glukose til etanol kan oppsummeres med følgende reaksjonslikning (Moat *et al*, 2002):



Som forklart i avsnitt 1.2.3 lagrer brunalger laminaran og mannitol som opplagsnæring i lyssesongen. Laminaran er et relativt kort polysakkarid bygd opp av glukosemonomerer (Smidsrød & Moe, 2008). Laminaran kan hydrolyseres relativt lett til glukose av enzymer eller andre hydrolyserende kjemikalier, og mange mikroorganismer har slike enzymer (Horn, 2000). Videre kan glukosemonomerene fermenteres til etanol av gjær eller bakterier, via glykolyesen eller Entner-Doudorof sporet (Moat *et al.*, 2002). Tidligere studie har vist at flere mikroorganismer er i stand til å bryte ned og fermentere laminaran til etanol (Horn *et al*, 2000b).

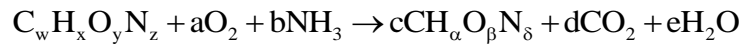
1 Introduksjon

Mannitol ($C_6H_{14}O_6$) er en sukkeralkohol som kan omsettes via glykolysen ved oksidasjon til fruktose, som generer $NADH_2$ (Horn, 2000; Moat *et al*, 2002). Sammenlignet med glukose dannes det dermed en ekstra $NADH_2$ i nedbrytingen til pyruvat, og redoksreaksjonen ved fermentering til etanol vil ikke være balansert. Mikrobiell produksjon av etanol fra mannitol forutsetter derfor regenerering av alle NAD^+ . Dette kan blant annet oppnås med oksygen tilgjengelig (Horn, 2000). Studier med *S. cerevisiae* viser at flere stammer innenfor denne arten er i stand til å fermentere mannitol, men veksthastigheten og etanolutbyttet er lavt (Quain & Boulton, 1987). Horn *et al.* (2000a) har senere vist at enkelte gjær- og bakteriestammer, ved begrenset oksygentilgang, kan fermentere mannitol til etanol både fra et syntetisk mannitolmedium og fra brunalgeekstrakt.

Sammen med laminaran og mannitol utgjør som nevnt alginat hovedkomponenten av karbohydrater i brunalger. Det lave innholdet av cellulose og fraværet av lignin gjør brunalgene åpenlyst attraktive for fermentering til bioetanol, men alginatet i algene kompliserer prosessen. Oppløsning av alginat før fermentering er viktig både på grunn av den fysiske diffusjonsbarrieren dannet av gelstrukturen, men også fordi den høye forekomsten av stoffet kan være et viktig potensielt substrat for etanolproduksjon. Mange mikroorganismer er ikke i stand til å bryte gjennom den intercellulære matriksen for å nå inn til opplagsnæringen inne i cellene. For å få et høyt utbytte av fermenteringen må derfor strukturkomponentene svekkes og brytes ned (Moen *et al.*, 1997). Flere mikroorganismer er i stand til å bryte ned og nyttegjøre seg av alginat, men lite er gjort for å se på muligheter for å inkludere alginat i fermenteringen av tare for å øke utbyttet av bioetanol. Dette er forklart nærmere i Avsnitt 1.4. Lee & Lee (2011) har nylig publisert en artikkel hvor de viser til fermentering av algen *L. japonica*. De har funnet mikroorganismer som vokser både på laminaran, mannitol og alginat, og produserer etanol ved fermentering av algeekstrakt. Studien viser imidlertid at det kun er mannitol som gir etanolproduksjon.

1.2.5 TEORETISK UTBYTTE AV BIOMASSE OG PRODUKT

For aerob omsetning av substrat, uten produktdannelse, kan maksimalt teoretisk biomasseutbytte beregnes ut fra likningen



Der $C_w H_x O_y N_z$ er substrat, $CH_\alpha O_\beta N_\delta$ er biomasse og nitrogenkilden basert på NH_3 . Hvis det antas en gjennomsnittlig grunnstoffsammensetning for biomasse på $CH_{1,79}O_{0,50}N_{0,20}$ (Doran, 1995), vil da utbytte fra substratene glukose, alginat og mannitol være som vist i Tabell 1.1, der alginat er basert på monomersammensetningen $C_6H_8O_6$ (Avsnitt 1.3.1). Anaerob omsetning av substrat med produktdannelse, kan beskrives av likningen



Der $fC_j H_k O_l N_m$ er produkt. Maksimum produktdannelse vil da skje når $c=0$, og kan beregnes teoretisk for kjente produkt. Teoretisk maksimalt utbytte for fermenteringsproduktene etanol og acetat er vist i Tabell 1.1, og er basert på at det dannes kun ett produkt.

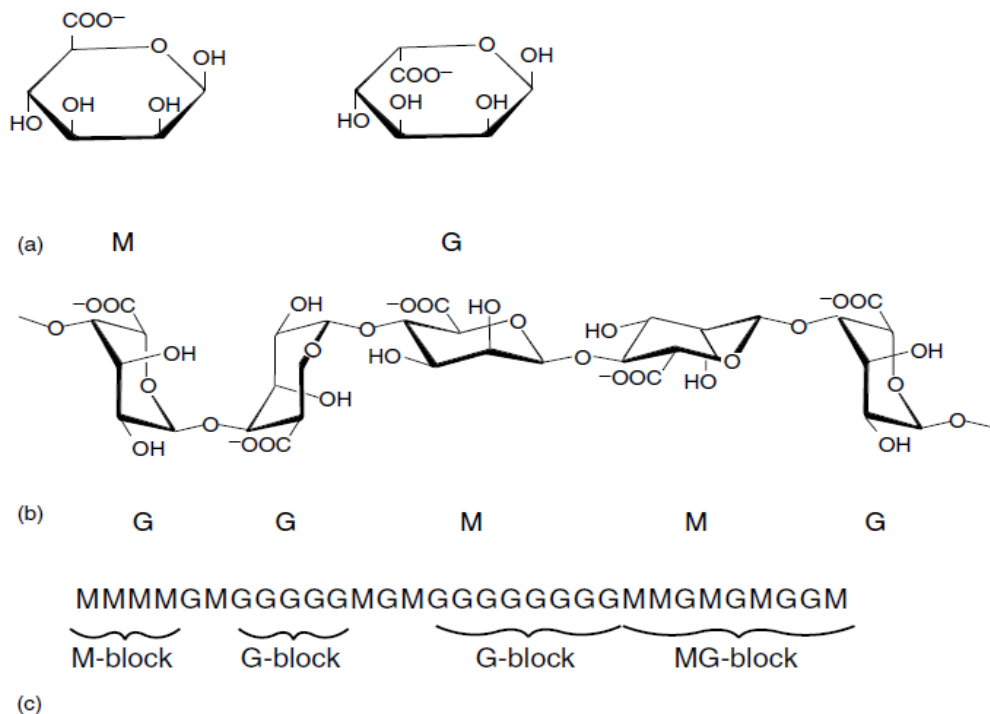
Tabell 1.1: Teoretisk utbytte av biomasse og produkt fra substratene glukose, mannitol og alginat. Y står for utbytte, X for biomasse, S for substrat og P for produkt. For eksempel angir da Y_{XS} biomasseutbytte fra substrat.

Substrat	Y_{XS} (mol biomasse/ mol substrat)	Y_{XS} (g biomasse/ g substrat)	Y_{PS} (g etanol/ g substrat)	Y_{PS} (g acetat/ g substrat)
Glukose ($C_6H_{12}O_6$)	5,73	0,78	0,51	1,00
Mannitol ($C_6H_{14}O_6$)	6,20	0,84	0,55	1,07
Alginat ($C_6H_8O_6$)	4,77	0,67	0,44	0,85

1.3 ALGINAT

1.3.1 STRUKTUR

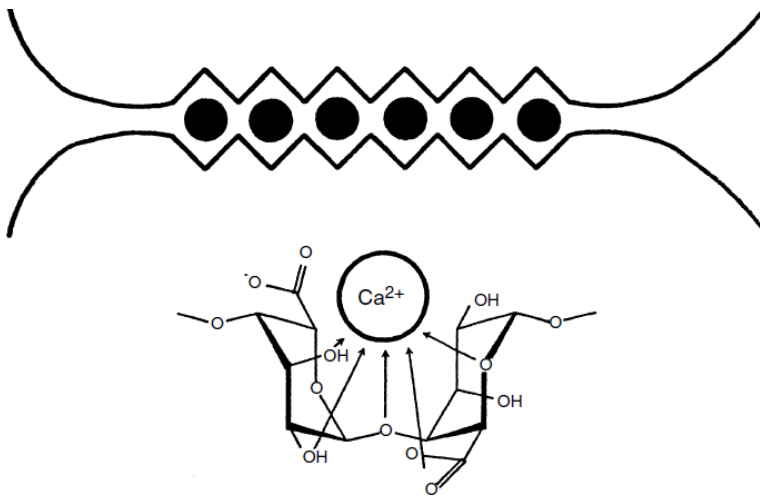
Alginater er polymerer som består av uronsyrer hvor den primære hydroksylgruppen (OH-6) i heksoseringen er oksidert til en karboksylgruppe. Alginat er bygd opp av to monomerer, (1→4)-bundet β -D-mannuronsyre (M) og α -L-guluronsyre (G). Disse er bundet sammen i blokker av M, G eller MG, og danner en lineær polymer (Haug *et al.*, 1967; Smidsrød & Moe, 2008), se Figur 1.3. Bindingen mellom monomerene kalles glykosidbindinger, og kan være aksial eller ekvatorial, avhengig av konformasjonen på monomerene, se Figur 1.3 b (Smidsrød & Moe, 2008). Innholdet av M-, G- og MG-blokker i ulike alginater varierer fra alginat til alginat, og det finnes både enkelte bakterielle alginater som mangler G-blokker totalt (Skjåk-Bræk *et al.*, 1986), og alginat som har G-rike alginatkjeder med mange og lange G-blokker, som for eksempel alginat fra stortarestilk (*L. hyperborea*) (Haug *et al.*, 1974; Guiry & Blunden, 1991). Guluronsyreenhetene i alginat introduseres i kjeden etter polymerisering ved hjelp av ekstracellulære C5-epimeraser (Kristiansen *et al.*, 2009).



Figur 1.3: Struktur og oppbygging av alginat. (a) Monomerene mannuronat (M) og guluronat (G). (b) Konformasjonen av monomerer i kjede, og bindingene mellom monomerene. (c) Sammensetting av M og G i alginatkjeder, med blokker av M, G og MG. (Draget *et al.*, 2006)

1 Introduksjon

G-blokker i alginatkjeden danner en "grop" i kjeden på grunn av den di-aksiale bindingen mellom to G-monomerer, se Figur 1.3b. Dette bidrar til å danne et bindingssete for ioner, som gjør at alginatet kan binde divalente kationer som for eksempel Ca^{2+} (Draget *et al.*, 2006). Denne bindingen av ioner kalles "eggeboksmodellen", som illustrert i Figur 1.4. G-blokker fra ulike alginatkjeder kan assosieres ved binding av divalente ioner, som danner grunnlaget for geldanning av alginatløsninger (Draget & Taylor, 2011). Binding av kationer og assosiasjon av G-blokker danner fundamentet i det intercellulære nettverket i brunalger, og er grunnen til at alginat kan fungere som en strukturkomponent i algeveggen (Moen, 1997).



Figur 1.4: Eggeboksmodell for binding av divalente ioner til G-blokker i alginatkjeder. Det øverste bildet viser to alginatkjeder bundet sammen av ioner, og det nederste bildet viser det molekylære grunnlaget for bindingen.

1.3.2 FOREKOMST OG BRUKSOMRÅDER

I tillegg til å være strukturkomponent i brunalger forekommer også alginat som ekstracellulære polysakkarider i noen bakterier. Det er antatt at bakteriene produserer alginatet for å danne en beskyttende kappe som blant annet kan hindre uttørking (Draget *et al.*, 2006). Kommersiell alginater er på nåværende tidspunkt kun produsert fra alger, selv om det er teknisk mulig å produsere alginat fra mikroorganismer (Draget & Taylor, 2011).

Alginat utnyttes mye i industriell sammenheng på grunn av evnen til å gi viskositet, gelstyrke og stabilitet til løsninger. Alginatmolekylers evne til å danne en unik nærmest temperaturuavhengig gelstruktur i kombinasjon med divalente kationer gjør at stoffet er svært attraktivt, blant annet som immobiliseringsmatriks for biokatalysatorer som

levende celler (Draget & Taylor, 2011). Alginat brukes i en rekke produkter, som i matindustrien, til tekstiltrykk og i farmasøytisk industri. Det produseres om lag 30 000 tonn alginat årlig på verdensbasis, noe som er antatt å utgjøre under 10 % av det materialet som biosyntetiseres hvert år (Draget *et al.*, 2006).

1.4 BAKTERIELL NEDBRYTING AV ALGINAT

Glykosidbindingene i alginat er mottakelige både for syre- og basedegradering, og oksidering av frie radikaler (Draget *et al.*, 2006). Ettersom alginat forekommer naturlig i naturen, kan mange mikroorganismer og enkelte andre høyere marine organismer fordøye alginat. Ekstracellulære lyaser har blitt isolert fra flere organismer og disse er i stand til å bryte glykosidbindingen og degradere alginat (Michaud *et al.*, 2003; Draget *et al.*, 2006).

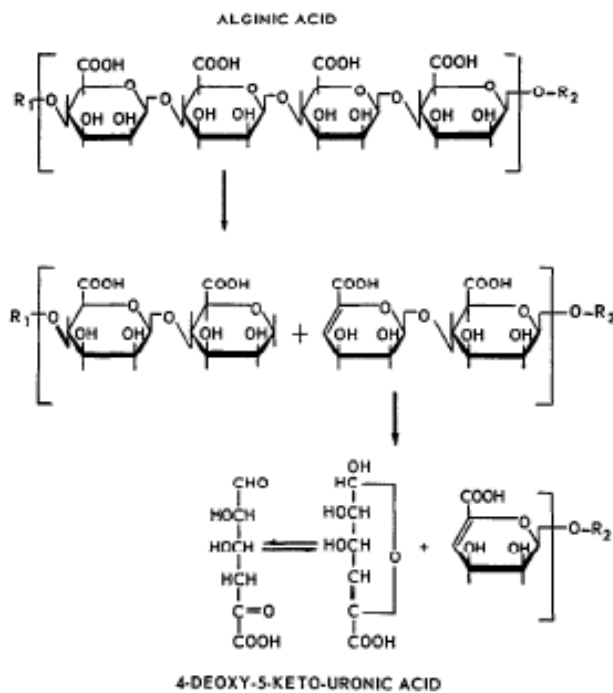
1.4.1 ALGINAT LYASER

Alginat lyaser er polysakkarid lyaser som depolymeriserer alginat via en β -eliminasjonsreaksjon (Michaud *et al.*, 2003). Disse enzymene ble først beskrevet av Preiss & Ashwell (1962a), og det er siden funnet alginat lyaseaktivitet i en rekke organismer, både bakterier og høyere marine organismer (Haugen *et al.*, 1990). Ulike alginat lyaser defineres ut fra sin preferanse for glykosidbindingen mellom de ulike monomerene. Mange alginat lyaser er substratspesifikk, og kutter kun glykosidbindinger mellom to bestemte monomerer, som M-M eller G-G, men det finnes også alginat lyaser som kan kutte flere ulike glykosidbindinger (Haugen *et al.*, 1990; Wong *et al.*, 2000; Michaud *et al.*, 2003).

Når alginat lyaser kutter alginatkjeden dannes det en umettet uronsyre på den ikke-reducerende enden. Når kjedene brytes helt ned til monomerer dannes dermed monosakkaridet 4-deoxy-L-erythro-5-hexoseuloseuronsyre (også kjent som 4-deoxy-5-ketouronsyre), se Figur 1.5 (Preiss & Ashwell, 1962a; Gacesa, 1992). Dette produktet dannes både fra M og G, og det er derfor ikke mulig å identifisere hvilken uronsyre sluttproduktet stammer fra. Mange av mikroorganismene som produserer alginat lyaser er også i stand til å nyttegjøre seg av det nedbrutte alginatet som karbon- og energikilde (Wong *et al.*, 2000). Det er noe usikkert om alginatet brytes helt ned til monomerer av ekstracellulære lyaser, eller til korte oligomerer med flere uronsyrer, før det tas opp av

1 Introduksjon

cellen. Studier tyder på at endeproduktene fra alginat lyaser er en blanding av korte oligomerer med ulik lengde (Boyd & Turvey, 1978; Haugen *et al.*, 1990), men det har blitt vist at alginat lyaser kan bryte alginatkjeder helt ned til umettede monomerer (Preiss & Ashwell, 1962a). Mest sannsynlig vil dette variere fra organisme til organisme avhengig av hvilke ekstracellulære lyaser cellen produserer, da ulike lyaser vil kutte alginatkjeden forskjellig og produsere ulike endeprodukt (Boyd & Turvey, 1978; Haugen *et al.*, 1990).



Figur 1.5: Enzymatisk degradering av alginat til monomeren 4-deoxy-5-ketouronsyre (Preiss & Ashwell, 1962a).

1.4.2 OMSETNING AV ALGINAT

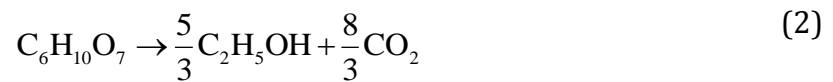
Mange marine organismer kan omsette alginat aerobt (Doubet & Quatrano, 1982; Tang *et al.* 2009). For å bryte ned tare og tilgjengeliggjøre næringsstoffene inne i cellene må alginatnettverket i celleveggen svekkes og degraderes. Det er derfor sannsynlig at mikroorganismer assosiert med nedbryting av tare er i stand til å degradere og nyttegjøre seg av alginat. Kråkeboller beiter på tareskogen langs kysten, og alginat er derfor en stor del av næringen. Ved hjelp av bakterier i fordøyelsessystemet er kråkebollen i stand til å bryte ned alginat og benytte seg av det som næringskilde (Sawabe *et al.*, 1995). Bakterier i fordøyelsessystemet til høyere organismer har ofte anaerob metabolisme. Stammen *Clostridium grantii*, isolert fra tarmsystemet til fisken

1 Introduksjon

mulle (*Mullus surmuletus*), har tidligere vist å kunne fermentere alginat til acetat, etanol, format og CO₂ (Mountfort *et al.*, 1994). Flere andre bakteriestammer isolert fra marine organismer har også vist seg å kunne degradere og nyttegjøre seg av alginat anaerobt (Sawabe *et al.*, 1995; Sawabe *et al.*, 2003). Det er gjort flere vellykkede forsøk med aerob og anaerob degradering av tare, i hovedsak med blandede bakteriekulturer, men også med enkeltstammer (Moen, 1997; Horn, 2000; Tang *et al.*, 2008; Lee & Lee, 2011). Videre vil kun anaerob omsetting bli behandlet.

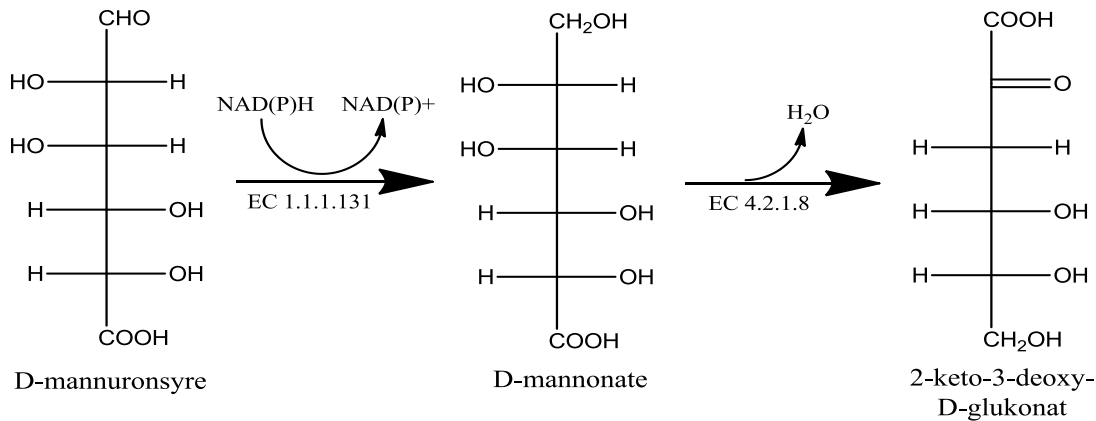
Lite er kjent om hvordan nedbrytingsproduktene fra alginat omsettes i cellen for energiproduksjon. For andre uronsyrer er nedbrytingssporene bedre kjent, eksempelvis for glukuronsyre og galakturonsyrenedbryting er mellomprodukt og enzymapparat for flere ulike stammer kjent (Ashwell *et al.*, 1958; Wahaba *et al.*, 1958; Kilgore & Starr, 1959; Ashwell *et al.*, 1960; Hickman & Ashwell, 1960; Smiley & Ashwell, 1960).

For å kartlegge uronsyrenedbrytingen fra alginat var det å se på nedbrytingen av disse uronsyrene et naturlig sted å starte. En teoretisk reaksjonslikning for anaerob omsetning av alginat til etanol, basert på monomerene mannuronsyre og guluronsyre (C₆H₁₀O₇), kan balanseres som i likning (2) kun ut fra atomene:



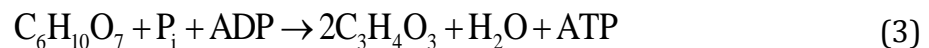
Dersom enkelte monomerer forekommer i mannuronsyreform, som opprinnelig i alginatkjeden, er det antatt at de vil kunne gå inn i samme nedbrytingsspor som glukuronsyre via D-mannonat, og brytes ned fra 2-keto-3-deoxy-D-glukonat. Dette er beskrevet av Farmer & Eagon (1969). De første stegene i nedbrytingen er illustrert i Figur 1.6.

1 Introduksjon



Figur 1.6: Nedbryting av D-mannuronsyre til 2-keto-3-deoxy-D-glukonat som inngår i nedbrytingen av glukuronsyre. Enzymene som katalyserer reaksjonene er vist med EC nummer.

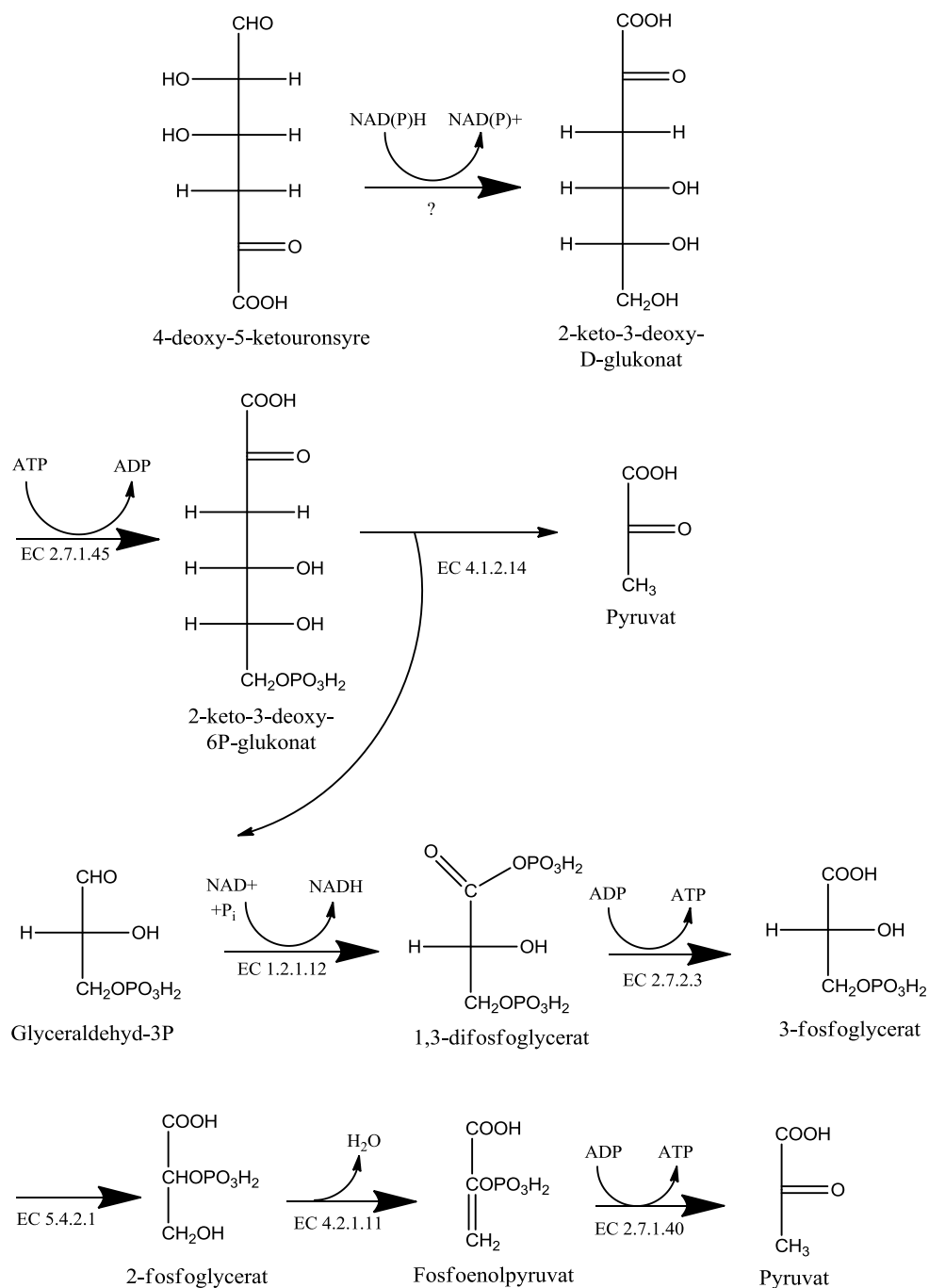
Videre vil 2-keto-3-deoxy-D-glukonat kunne brytes ned til pyruvat og glyceraldehyd-3P som en del av Entner-Doudoroff sporet, og glyceraldehyd-3P går inn i Embden-Meyerhof sporet og brytes ned til pyruvat. Dette gir totalreaksjon til pyruvat:



For guluronsyre er kandidaten ikke kjent med at et tilsvarende bakterielt nedbrytingsspor er publisert.

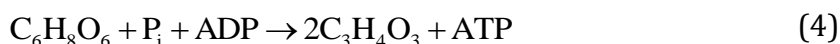
Preiss & Ashwell (1962a) beskrev hvordan alginat lyaser kutter alginatkjedene ned til umettede uronsyrer, og at både M og G monomerer omdannes til 4-deoxy-5-ketouronsyre. Det er derfor sannsynlig at de fleste enhetene som tas opp av cellen forekommer i denne formen. Det eneste som skiller denne monomeren fra mellomproduktet 2-keto-3-deoxy-D-glukonat er det ene endekarbonet som i den ene formen er en aldehydgruppe og i den andre en alkohol, se Figur 1.7, struktur 1 og 2. Aldehyder kan reduseres til alkoholer, og i metabolisme reduseres ofte slike grupper av enzymer som er NADH_2 avhengige. Dette er likt det første steget i nedbrytingen av D-mannuronsyre vist i Figur 1.6. Det er derfor sannsynlig å anta at 4-deoxy-5-ketouronsyre brytes ned på en lignende måte som D-mannuronsyre. Et foreslått spor for nedbryting av dette molekylet til pyruvat er vist i Figur 1.7.

1 Introduksjon



Figur 1.7: Mulig nedbrytningsspor til pyruvat for 4-deoxy-5-ketouronsyre. Enzymene som katalyserer reaksjonene er vist med EC nummer.

Dette gir følgende totalreaksjon for nedbryting av 4-deoxy-5-ketouronsyre til pyruvat:



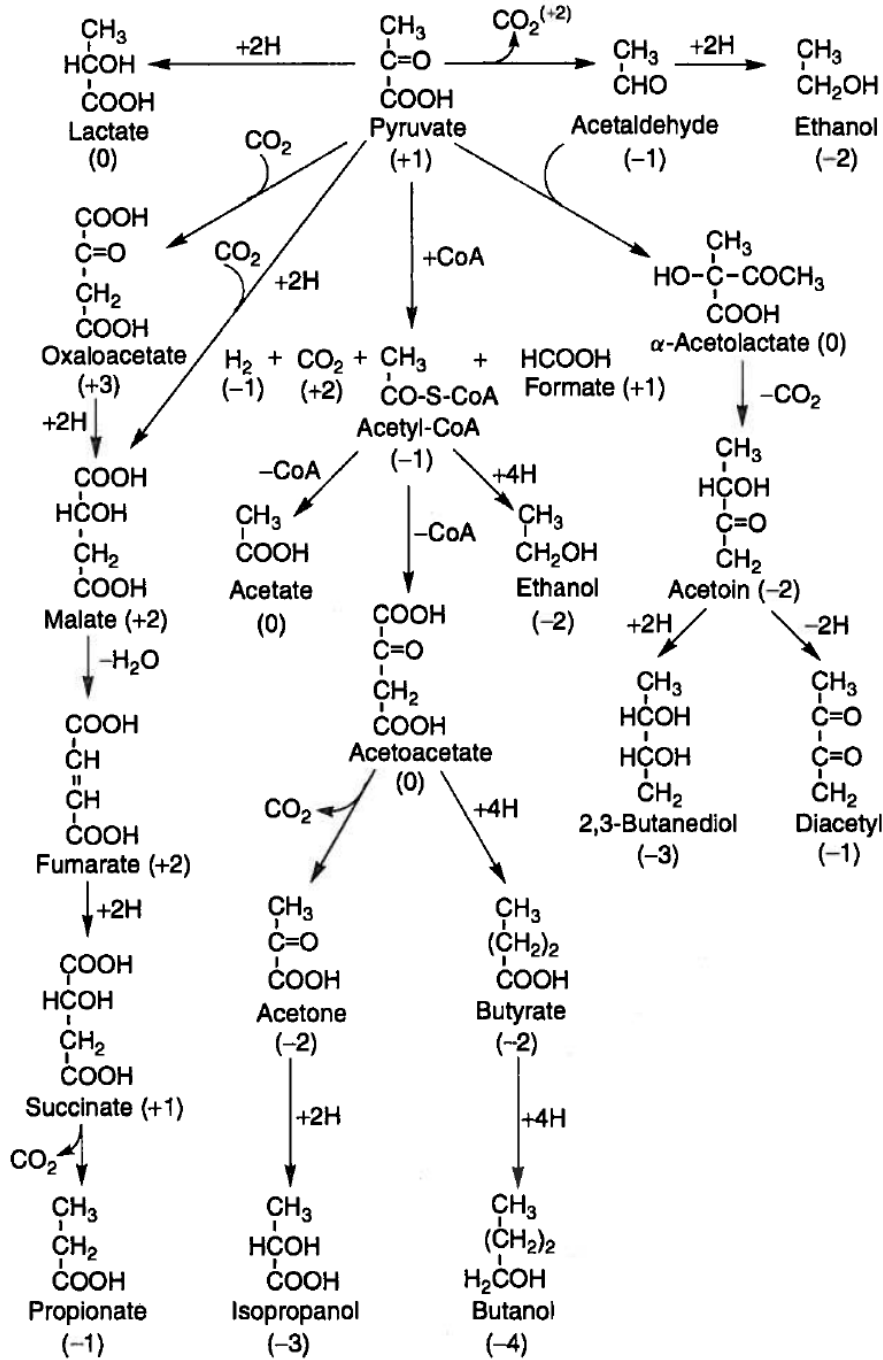
En slik nedbryting er i samsvar med det som ble foreslått av Preiss & Ashwell (1962b) og Forro (1987). Nedbrytingen av glyceraldehyd-3-fosfat er her vist gjennom Embden-

1 Introduksjon

Meyerhof sporet, men andre alternativ er mulig. De fleste sporene vil likevel gi den samme totalreaksjonen (Moat *et al.*, 2002).

Avhengig av enzymapparatet i organismen, kan ulike produkt dannes fra pyruvat, men det er viktig at den totale redoksreaksjonen er balansert. De vanligste mikrobielle fermenteringsproduktene er vist i Figur 1.8, blant annet to mulige spor for produksjon av etanol. Ved fermentering av etanol dekarboksyleres vanligvis pyruvat først til acetaldehyd ved produksjon av CO₂, som vist i sporet øverst til høyre i figuren. Videre reduseres acetaldehyd av NADH₂, og det dannes etanol og NAD⁺. I nedbryting fra alginat til pyruvat dannes det ingen NADH₂ eller NAD⁺ totalt (likning 4), og redoksreaksjonen fra alginat til etanol er derfor ikke balansert. Dette betyr at etanol ikke kan være eneste fermenteringsprodukt fra alginat. For at etanol skal kunne dannes fra alginat må en annen reaksjon som genererer NADH₂ utføres samtidig. I en studie gjort av Mountfort *et al.* (1994) ble det produsert acetat, etanol, format og CO₂ ved anaerobe betingelser fra alginat. Dette kan forklares med at det fra pyruvat kan dannes acetyl-CoA og format, hvor acetyl-CoA videre kan omsettes til acetat ved reduksjon av NAD⁺ til NADH₂. Dette kan også generere ATP som gir økt vekstutbytte. For å regenerere NAD⁺ kan samtidig halvparten av pyruvatet gå til produksjon av etanol, som oksiderer NADH₂ til NAD⁺. Redoksreaksjonen vil da være balansert. Selv om ikke alle bakteriestammer gjør dette naturlig, kan det ved hjelp av metabolsk ingeniørkunst være mulig å påvirke nedbrytingen av alginat. Eksempelvis ved at uønskede spor blokkeres, eller gener for manglende enzym settes inn. Dette kan øke utbyttet av etanol og eventuelt andre ønskede produkt. Lignende forskning er gjort for mikroalger, hvor det både er forsøkt å øke lipidakkumuleringen og senke lipidkatabolismen for å øke biodieselproduksjonen (Radakovits *et al.*, 2010). Kartlegging av metabolske spor for alginatomsetning vil derfor være grunnleggende for videre arbeid på dette området, og forskning innenfor felt som systembiologi vil kunne fremskynde mulighetene for slik genmanipulering (Picataggio, 2009).

1 Introduksjon



Figur 1.8: De viktigste reaksjonsgangene for dannelse av fermenteringsprodukt fra pyruvat. Tallene i parentes viser oksidasjonsverdien for hvert produkt beregnet ut fra antall oksygenatom mindre enn halvparten antall hydrogenatom. Denne oksidasjonsbalansen fra substrat til produkt må være balansert totalt (Moat *et al.*, 2002).

1.5 MÅL OG AVGRENŚING

Som forklart i avsnitt 1.1 ble dette mastergradsarbeidet utført som en del av et prosjekt ved SINTEF bioteknologi, og oppgaven ble begrenset deretter.

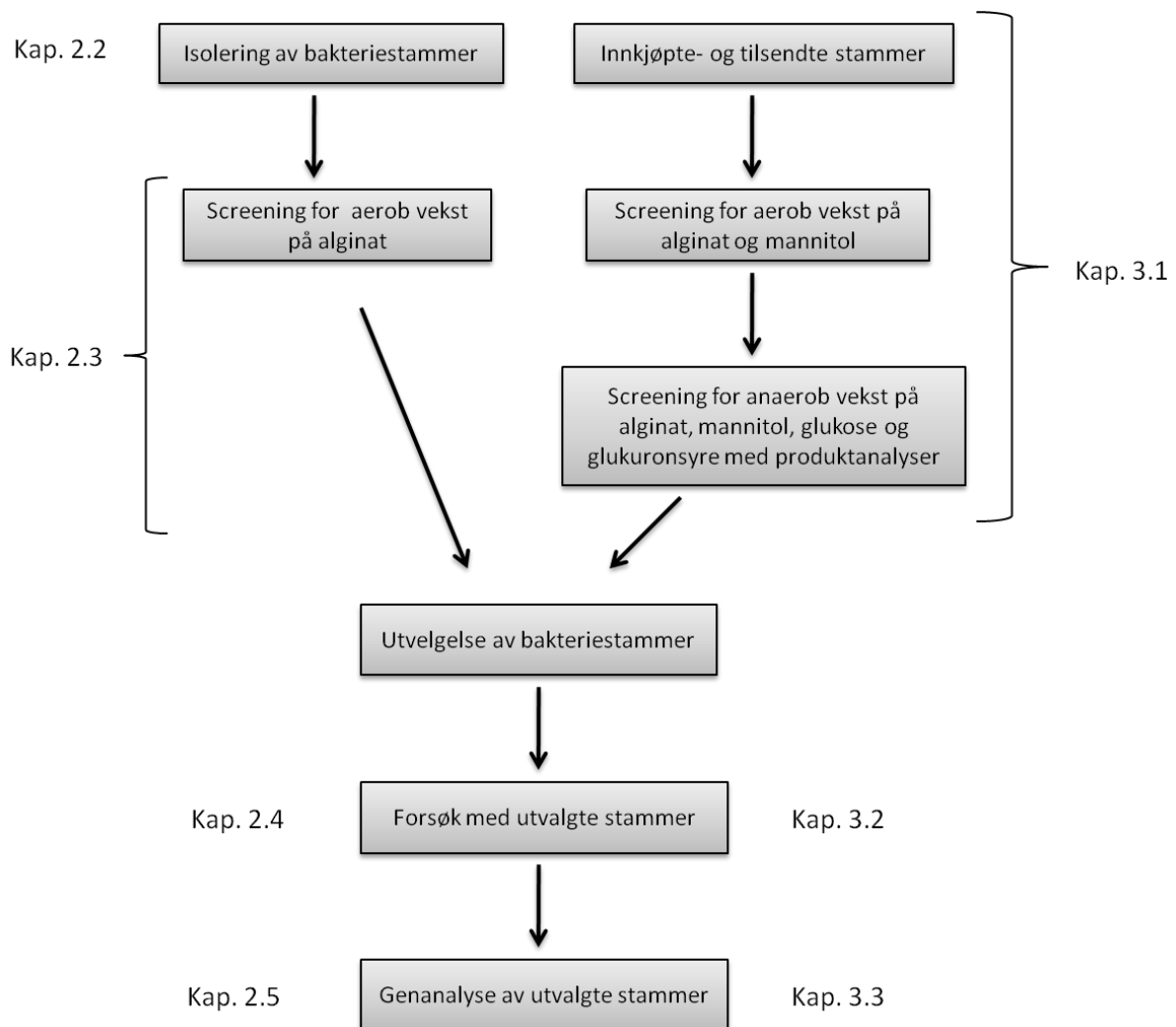
Innenfor denne rammen, var målet å finne og karakterisere alginatdegraderende mikroorganismer med fermentativ metabolisme, og helst etanolproduksjon. Arbeidet ble begrenset til bakterier, og identifisering av utvalgte bakteriestammers fermenteringsprodukt og alginatnedbryting. Bakteriestammer til forsøket ble enten bestilt inn fra bakteriekultursamlinger eller isolert selv fra potensielle kilder for alginatdegraderende mikroorganismer. Det ble i utvelgelsen av bakteriestammer lagt vekt på evnen til å bryte ned alginat og hvilke fermenteringsprodukt som ble produsert fra ulike substrat. Arbeidet ble utført i tre faser:

1. Screening av bakteriestammer for vekst på alginat med vekstmålinger og produktanalyser utført med væskekromatografi (HPLC).
2. Mer omfattende studier av utvalgte stammer. Analyser av alginatdegradering, substratomsetting og produktutbytte ved hjelp av enzymatiske alginatanalyser, viskositetsmålinger og HPLC.
3. Karakterisering og identifisering av lyaser og lyaseprodukt, intracellulære enzymer og fermenteringsspor med HPLC, anionbytterkromatografi med pulsamperimetrisk deteksjon (HPAEC-PAD) og genanalyser ved polymerasekjedereaksjon (PCR).

2 MATERIALER OG METODER

2.1 FORSØKSOVERSIKT

Som forklart i Avsnitt 1.5, ble forsøket delt i tre. Bakteriestammer ble isolert eller bestilt inn, og det ble utført et screeningforsøk for å finne stammer med god vekst på alginat. Enkelte stammer ble også dyrket anaerobt med produktanalyse for å undersøke for etanolproduksjon. Noen stammer ble på bakgrunn av resultatene i disse forsøkene valgt ut til nærmere undersøkelse. I fase to ble det gjort en rekke vekstforsøk for å kartlegge fermenteringsprodukt, utbytte og alginatdegradering. Til slutt ble det gjort en analyse for å karakterisere og identifisere sentrale enzymer i alginatdegraderingen. Figur 2.1 viser et flytskjema med oversikt over prosessen relatert til tilhørende kapitler i Materialer og metodedelen og Resultat og diskusjonsdelen av oppgaven.



Figur 2.1: Flytskjema med oversikt over forsøk gjort med bakteriestammene. Tilhørende kapitler i Materialer og metoder er vist til venstre, og i Resultater og diskusjon til høyre.

2.2 BAKTERIESTAMMER OG DYRKING

2.2.1 MEDIER

Medium benyttet til dyrking ble tilpasset bakteriestammene og er angitt for hvert forsøk. Sammensetning og produktbeskrivelse av medier brukt i vekstforsøk er vist i Tabell 2.1 og Tabell 2.2. Tabell 2.3 viser spormetalløsning tilsatt marine medier. I tillegg ble et ferdigkomponert medium, Marine Broth (MB-medium, Difco 2216, USA), tilsatt 5 g/L karbonkilde benyttet til isolering av bakteriestammer fra tare og kråkeboller, og til oppdyrking av ampuller for marine stammer. For ikke-marine stammer ble et næringsmedium bestående av 5 g/L gjærekstrakt, 10 g/L pepton og 5 g/L glukose benyttet ved oppdyrking til ampuller. pH i alle medier ble justert til 7,5. Karbonkildene tilsatt mediene er vist i Tabell 2.4, og hvilken karbonkilde benyttet er angitt for hvert forsøk. Ved dyrking på agarplater ble mediene tilsatt 15 g/L bakteriologisk agar (Oxoid, kat.nr. LP0011) og 2 g/L karbonkilde, og overført til plater etter autoklaving når temperaturen var sunket til 50-60 °C. Karbonkildene ble sammen med fosfat, spormetalløsning og vitaminblanding tilsatt etter autoklaving, med unntak av alginat som ble løst direkte i mediet før autoklaving. Fosfatløsning og karbonkilder ble autoklavert separat, mens spormetalløsningene og vitaminblandingen ble sterilfiltrert.

Tabell 2.1: Ferskvannsmedium (FM) til ikke-marine innkjøpte stammer. Mediet ble laget i MilliQ-vann. Spormetall og vitaminblanding er beskrevet i Vedlegg V1.

Komponent	Merke	Katalognr.	Mengde (g/L)
Pepton	Oxoid	LP0037	2,00
Gjærekstrakt	Oxoid	LP0021	1,00
Ammoniumsulfat ((NH ₄) ₂ SO ₄)	Sigma	31119	2,00
Magnesiumsulfat (MgSO ₄ ·7H ₂ O)	Sigma	13142	0,50
Kalsiumklorid (CaCl ₂ · 2H ₂ O)	Sigma	12022	0,10
Kaliumklorid (KCl)	Riedel d.H.	31248	0,20
Kaliumfosfat (K ₂ HPO ₄)	Sigma	4248	1,00
MOPS-buffer	Sigma	M1254	5,00
Karbonkilde	Se Tabell 2.4		10,00
Spormetalløsning	TMS-6		1 mL/L
Vitaminblanding*			2 mL/L

*Kun for *Paenibacillus*-stammer

2 Materialer og metoder

Tabell 2.2: Marint medium type 1 (MM1), 2 (MM2) og 3 (MM3). MM1 er et redusert medium benyttet for isolering av alginatdegraderende bakteriestammer, MM2 et rikere medium benyttet til *Vibrio splendidus*-stammer, og MM3 er tilpasset de marine innkjøpte stammene. Mediet ble laget i MilliQ-vann.

Komponent	Merke	Katalognr.	MM1 (g/L)	MM2 (g/L)	MM3 (g/L)
Pepton	Oxoid	LP0037	1,00	2,00	2,00
Gjærekstrakt	Oxoid	LP0021	0,50	1,00	1,00
Ammoniumnitrat (NH ₄ NO ₃)	Riedel d.H.	11217	2,00	0,50	2,00
Jerncitrat (FeC ₆ H ₆ O ₇)	Sigma	F6129	-	0,10	-
Natriumklorid (NaCl)	Apotekprod.	314153	20,00	20,00	20,00
Magnesiumklorid (MgCl ₂ ·6H ₂ O)	Riedel d.H.	31413	-	5,90	-
Magnesiumsulfat (MgSO ₄ ·7H ₂ O)	Sigma-Aldrich	13142	0,50	3,24	0,50
Kalsiumklorid (CaCl ₂ · 2H ₂ O)	Sigma-Aldrich	12022	0,10	0,10	0,10
Kaliumklorid (KCl)	Riedel d.H.	31248	0,20	0,55	0,10
Kaliumfosfat (K ₂ HPO ₄)	Sigma-Aldrich	4248	1,00	1,00	1,00
MOPS-buffer	Sigma	M1254	-	-	5,00
Karbonkilde	Se Tabell 2.4		5,00	10,00	10,00
Spormetalløsning	Se Tabell 2.3			10 mL/L	10 mL/L

Tabell 2.3: Spormetalløsning til MM2 og MM3 medium, 10 mL/L ble tilsatt mediene.

Komponent	Merke	Katalog nr.	Mengde (g/L)
Kaliumbromid (KBr)	Fluka	60089	0,080
Strontiumklorid (SrCl ₂ · 6H ₂ O)	Aldrich	25,552-1	0,034
Borsyre (H ₃ BO ₃)	Merck	Art. 165	0,022
Natrium-metasilikat (Na ₂ O ₃ Si·9H ₂ O)	Sigma	S-4392	0,004
Natriumfluorid (FNa)	Fluka	71518	0,002

Tabell 2.4: Karbonkilder brukt i vekstforsøk.

Karbonkilde	Merke	Katalog nr.
Glukose	Apotekproduksjon	309229
D-Mannitol	Sigma-Aldrich	M4125
Glukuronsyre	Sigma-Aldrich	G5269
Alginat	GP3350	SLP 4038

2.2.2 GENERELLE TEKNIKKER

OPPBEVARING OG FORKULTURER

Alle stammer ble frosset ned i ampuller ved $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ for lagring under prosjektperioden. Dette ble gjort ved å dyrke stammene aerobt i ristekolber på glukose da de ble mottatt eller isolert, til de nådde eksponentiell vekst. Medium er angitt i Avsnitt 2.2.1. Det ble så tilsatt glyserol (80 %) til 20 % konsentrasjon i kolbene, og løsningen ble fordelt på ampuller etter at glyserolen var trukket godt inn i kulturen. Det ble frosset ned 15 ampuller av hver stamme, hver ampulle med 1 mL kultur. Alle stammer ble kontrollert for kontaminasjon ved utstrykning på agarplater og mikroskopering, før de ble lagret på ampuller.

Før hvert vekstforsøk i ristekolber ble det laget forkulturer på samme medium som i selve forsøket. Disse ble dyrket aerobt i ristekolber og tilsatt 2 % inokulum fra ampuller. Det ble videre tatt ut 2 % inokulum til vekstforsøkene når forkulturene var i eksponentiell vekst. For screeningforsøkene (Avsnitt 2.3), ble forkulturene dyrket på glukose. I forsøk med utvalgte stammer (Avsnitt 2.4), ble inokulumet fra ampullene først dyrket på glukose. Deretter ble det videreført inokulum fra forkulturen til nye forkulturer med den karbonkilden som skulle benyttes i selve vekstforsøket.

VEKSTMÅLING

Vekst i kulturene ble bestemt ved hjelp av turbiditetsmålinger av cellemassen. En lysstråle sendt gjennom en cellesuspensjon svekkes både av lysspredning og absorpsjonstap, som forklart av Madigan & Matinko (2006). Et spektrofotometer kan detektere hvor mye av en lysstråle som skinner gjennom løsningen, og dette måles i optisk tetthet-enheter (OD). En tett suspensjon med høy cellekonsentrasjon vil gi en høyere OD enn en suspensjon med lav celletetthet. Under alle vekstforsøk ble OD målt ved 600 nm med et UV-1700 PharmaSpec spektrofotometer (Shimadzu Europa GmbH, Tyskland). For å gi sikre verdier bør OD ligge innenfor 0,1-0,3. Prøver over 0,3 ble derfor fortynnet før absorbansen ble målt.

For encellede organismer er OD proporsjonal med celletall innenfor visse grenser, og kan derfor benyttes som et indirekte mål på cellemasse. For å bestemme celleutbytte fra ulike substrat i ulike forsøk ble det derfor laget en standardkurve for OD relatert til

2 Materialer og metoder

tørrvekt av cellemassen for utvalgte stammer. Dette ble gjort ved at stammene ble dyrket aerobt i 500 mL ristekolber med 100 mL medium, og det ble tatt ut prøver på 25 mL flere ganger i løpet av veksten. OD ble målt av kulturen ved prøveuttak, og prøven ble sentrifugert i en 5810 R sentrifuge (Eppendorf, Tyskland) ved maks hastighet, 4000 rpm, til all cellemassen hadde trukket ned og supernatanten fargeløs. Supernatanten ble så helt av, erstattet med MilliQ-vann og sentrifugert på nytt. Supernatanten ble igjen helt av og cellemassen overført til en forhåndsveid aluminiumskål, for så å bli tørket til konstant vekt ved 105 °C.

DYRKINGSBETINGELSER

Alle kulturene ble dyrket i Minitron inkuberingsristeskap (Infors AG, Bottmingen) ved kontrollert temperatur og risting, 180 rpm. Innkjøpte og tilsendte stammer ble dyrket ved temperaturer tilpasset stammene som angitt i Tabell 2.5. Kråkebolleisolat ble dyrket ved 13 °C og tareisolat ved 17 °C. Det ble brukt ristekolber eller 50 mL sentrifugerør til aerobe forsøk og hungaterør for anaerob vekst, som angitt for hvert forsøk i Avsnitt 2.3 og 2.4. Dyrking og sjekk av renkultur ble gjort med mikroskopering av flytende kulturer og ved utstrykning på agarplater.

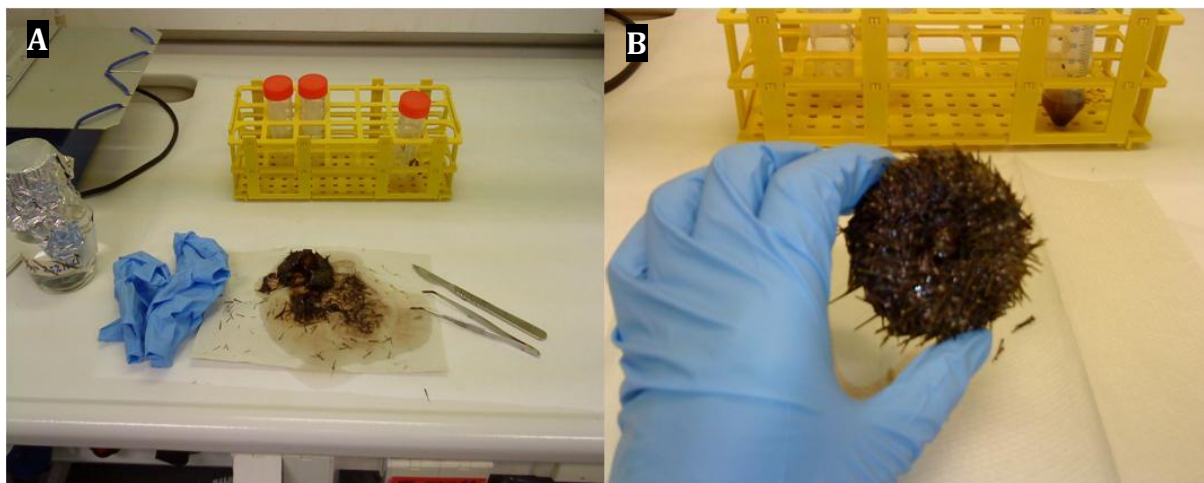
Ved dyrking i sentrifugerør ble rørene åpnet med jevne mellomrom for å sikre aerobt miljø. Klargjøring av utstyr og kulturer ble gjort i sterilbenk for å unngå kontaminering. Medium og annet utstyr, brukt under forsøk med bakteriekulturer, ble autoklavert (121 °C, 20 min) eller sterilfiltrert med Stericup Express™ PLUS 0,22 µm (Millipore Corp., Massachusetts) før bruk for å sikre sterilt miljø før inokulering med bakteriestammene. Medium ble i hovedsak autoklavert, med unntak av for MB-medium og medium til de innkjøpte *Paenibacillus*-stammene (Avsnitt 2.2.4), da disse ikke vokser hvis gjærekstraktet varmebehandles (Ruijssenaars, 1999).

2.2.3 ISOLERING AV BAKTERIESTAMMER

KRÅKEBOLLER

Ti eksemplarer av grønn kråkebolle (Drøbakkråkebolle, *Strongylocentrotus droebachiensis*) ble hentet fra kysten utenfor Tromsø (69° N, 18° E), med hjelp fra seniorforsker Sten Siikavuopio ved Nofima (Tromsø). Disse ble sendt som kjølepakke til laboratoriet i Trondheim i løpet av dagen 03.03.10. Kråkebollene ble satt på kjøling over natten og bakteriestammer ble isolert fra tarmen neste morgen.

Kråkebollene ble åpnet med skalpell og pinsett, og tarmene ble samlet i et sterilt 50 mL sentrifugerør fylt med 15 mL saltvann (NaCl, 2,5 %), som beskrevet av Unkles (1977). Prøven ble så blandet med whirlmixer i 2 minutter, for så å bli veid for å finne vekten av materialet tatt ut fra kråkebollene. Figur 2.2 viser noen av eksemplarene som ble dissekert.



Figur 2.2: Grønn kråkebolle (*Strongylocentrotus droebachiensis*) hentet fra kysten utenfor Tromsø for isolering av bakterier fra fordøyelsessystemet. A viser disseksjon av en kråkebolle og B viser en kråkebolle før disseksjon.

TARE

Fersk sukkertare (*Saccharina latissima*) ble tilsendt fra SINTEF Fiskeri og havbruk, og satt til inkubasjon ved 20 °C i tre uker. Da oppløsning av plantet startet ble prøver tatt ut for isolering av bakterier. Til sammen ble 4 prøver fra ulike steder tatt ut; fra skallet på stilken, inni stilken, fra roten og fra et blad. Prøvene ble overført til sterile 50 mL sentrifugerør tilsatt 10 mL saltvann (NaCl, 2,5 %), veid og blandet ved hjelp av whirlmixer. Figur 2.3 viser naturlige bestander av sukkertare i Trondheimsfjorden.



Figur 2.3: Fersk sukkertare i Trondheimsfjorden. Bildet er tatt ved en senere anledning og gjengir ikke det aktuelle prøvematerialet.

ANRIKNING OG ISOLERING AV RENKULTURER

Videre ble prøvene fra kråkebollene og taren behandlet likt. Av hver prøve ble det overført 4 x 1 mL til flytende medium i 50 mL sentrifugerør. To rør tilsatt MM1- og to tilsatt MB-medium, begge med alginat som karbonkilde (se Avsnitt 2.2.1 for beskrivelse av medier). Disse ble satt til inkubering på resting i 4 døgn, ved 13 °C for kråkebolleisolat og 17 °C for tareisolat. Etter endt inkubering ble det tatt ut en prøve fra hvert rør og fordelt på to agarplater, en med MM1- og en med MB-medium med alginat. Til slutt ble enkeltkolonier valgt ut fra platene og strøket videre på MM1 plater med alginat for å få renkulturer.

Fortynningsserie ble laget av de opprinnelige prøvene, fra 10^{-1} til 10^{-8} . Fortynningene 10^{-4} , 10^{-6} og 10^{-8} ble strøket ut på MB plater for kimtallanalyse, med tre paralleller av hver fortynning. Dette ble gjort for å få et bilde av mengden mikroorganismer tilstede i prøvene. Antall kolonier på platene ble da talt og konsentrasjonen av bakterieceller i den opprinnelige prøven ble beregnet. Fortynningene 10^{-2} – 10^{-6} ble strøket ut på MM1- og MB-plater med alginat. Alle platene ble inkubert i 4 døgn, ved 13 °C for kråkebolleisolat

2 Materialer og metoder

og ved 17 °C for tareisolat. Etter inkuberingen ble det plukket ut tilfeldige enkeltkolonier fra MM1- og MB-plater til videre utstryking på nye MM1-plater med alginat. Dette ga renkulturer som ble tatt med videre til vekstforsøk med flytende medium (Avsnitt 2.3).

2.2.4 INNKJØPTE OG TILSENDTE BAKTERIESTAMMER

STAMMER FRA UMB

Åtte fiskepatogene stammer av arten *Vibrio splendidus*, isolert fra fisk ved Veterinærinstituttet for Universitetet for miljø- og biovitenskap (UMB) ble sendt til laboratoriet i Trondheim med hjelp fra forsker Svein Jarle Horn ved UMB (Ås) (se oversikt i Tabell 2.5). Fra vekstforsøk på alginat ved UMB var anbefalingen å se videre på stammene 71, 78, 173, 4286 og 4361, da stammene 60 og 4294 vokste dårlig på alginat. Stamme nummer 78 hadde vokst best (Horn, 2010).

INNKJØPTE STAMMER

Bakteriestammer antatt å være alginatdegraderende ble bestilt inn fra bakteriekultursamlingene Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) og The National Collection of Industrial, Food and Marine Bacteria (NCIMB).

En oversikt over stammene som ble bestilt inn eller tilsendt fra UMB er vist i Tabell 2.5. Tabellen viser informasjon om stammene og henvisning til litteratur som var bakgrunn for at stammene ble valgt ut.

2 Materialer og metoder

Tabell 2.5: Innkjøpte og tilsendte stammer brukt i prosjektet. Informasjon om egenskaper til de ulike artene er hentet fra Madigan & Martinko (2006) og kultursamlingene stammene ble kjøpt inn fra. Enkelte av de innkjøpte stammene ble bestilt på bakgrunn av andres lovende resultater, som angitt i tabellen. Referanser: 1: Horn, 2010, 2: Sawabe *et al.*, 1998, 3: Nakamura, 1987, 3: Shida *et al.*, 1997, 5: Ruijssenaars, 1999, 6: opplyst om å være alginatdegraderende fra NCIMB.

Stamme	Familie	Mottatt fra	Isolert fra	Gram +/-	Habitat	Metabolisme	Dyrkings-temperatur	Ref.
<i>Vibrio splendidus</i> 60	Vibrionaceae	UMB	Fisk	-	Marint	Fakultativ aerob	17 °C	1
<i>Vibrio splendidus</i> 71	Vibrionaceae	UMB	Fisk	-	Marint	Fakultativ aerob	17 °C	1
<i>Vibrio splendidus</i> 78	Vibrionaceae	UMB	Fisk	-	Marint	Fakultativ aerob	17 °C	1
<i>Vibrio splendidus</i> 173	Vibrionaceae	UMB	Fisk	-	Marint	Fakultativ aerob	17 °C	1
<i>Vibrio splendidus</i> 1217	Vibrionaceae	UMB	Fisk	-	Marint	Fakultativ aerob	17 °C	1
<i>Vibrio splendidus</i> 4286	Vibrionaceae	UMB	Fisk	-	Marint	Fakultativ aerob	17 °C	1
<i>Vibrio splendidus</i> 4294	Vibrionaceae	UMB	Fisk	-	Marint	Fakultativ aerob	17 °C	1
<i>Vibrio splendidus</i> 4361	Vibrionaceae	UMB	Fisk	-	Marint	Fakultativ aerob	17 °C	1
<i>Vibrio haliotocoli</i> 21474	Vibrionaceae	DSMZ	Abalone	-	Marint	Fakultativ aerob	28 °C	2
<i>Paenibacillus chondroitinus</i> 5051	Paenibacillaceae	DSMZ	Jord	+	Ikke-marint	Fakultativ aerob	28 °C	3, 4
<i>Paenibacillus alginolyticus</i> 12517	Paenibacillaceae	NCIMB	Jord	+	Ikke-marint	Fakultativ aerob	28 °C	3, 4, 5
<i>Vibrio alginolyticus</i> 1187	Vibrionaceae	NCIMB	?	-	Marint	Fakultativ aerob	28 °C	6
<i>Vibrio alginolyticus</i> 1318	Vibrionaceae	NCIMB	?	-	Marint	Fakultativ aerob	28 °C	6
<i>Vibrio alginolyticus</i> 2047	Vibrionaceae	NCIMB	?	-	Marint	Fakultativ aerob	28 °C	6
<i>Enterobacteriaceae</i> 1994	Enterobacteriaceae	NCIMB	?	-	Ikke-marint	Fakultativ aerob	28 °C	6
<i>Enterobacteriaceae</i> 1999	Enterobacteriaceae	NCIMB	?	-	Ikke-marint	Fakultativ aerob	28 °C	6

2.3 SCREENING AV BAKTERIESTAMMER

De renkulturene isolert fra kråkebolletarm og tare som viste god vekst på agarplater med alginat ble tatt med til screeningforsøket. Disse ble dyrket frem som vist i Vedlegg V4. Isolerte, tilsendte og innkjøpte stammer ble alle undersøkt for aerob vekst på alginat. De innkjøpte- og tilsendte stammene ble i tillegg dyrket aerobt på mannitol og anaerobt på alginat, mannitol, glukose og glukuronsyre. Aerob vekst ble her utført i 50 mL sentrifugerør med 15 mL medium for å kunne teste et stort antall stammer samtidig. Isolerte stammer ble dyrket på MM1-medium, tilsendte stammer fra UMB på MM2-medium, og innkjøpte marine stammer på MM3-medium og ikke-marine stammer på FM-medium. Ved anaerob dyrking ble sluttprøver tatt ut fra kulturene for analyse av fermenteringsprodukt med HPLC (Avsnitt 2.6.3). Tabell 2.6 viser en oversikt over hvilke stammer som ble dyrket ved hvilke betingelser.

Tabell 2.6: Bakteriestammer undersøkt i screeningforsøket. Tabellen viser hvilke betingelser de ulike stammene ble dyrket ved og bakgrunn for videre utvelgelse av stammer.

Kilde	Bakteriestammer	Forsøk	Bakgrunn for utvelgelse
Kråkeboller	K1-K16	Aerob alginat	Aerob vekst på alginat
Tare	T1-T12	Aerob alginat	Aerob vekst på alginat.
UMB	<i>Vibrio Splendidus</i> 78 <i>Vibrio Splendidus</i> 1217 <i>Vibrio Splendidus</i> 71 <i>Vibrio Splendidus</i> 4361 <i>Vibrio Splendidus</i> 4286 <i>Vibrio Splendidus</i> 173 <i>Vibrio Splendidus</i> 4294 <i>Vibrio Splendidus</i> 60.	Aerob alginat og mannitol. Anaerob alginat, mannitol, glukose og glukuronsyre.	Aerob og anaerob vekst på alginat. Fermenteringsprodukt fra alle substrat ved anaerob vekst.
Innkjøpt	<i>Vibrio alginolyticus</i> 1318 "gul" <i>Vibrio alginolyticus</i> 1318 "hvit" <i>Vibrio alginolyticus</i> 2047 <i>Paenibacillus alginolyticus</i> 12517 <i>Paenibacillus chondroitinus</i> 5051 <i>Enterobacteriaceae</i> 1994 <i>Enterobacteriaceae</i> 1999	Aerob alginat og mannitol. Anaerob alginat, mannitol, glukose og glukuronsyre.	Aerob og anaerob vekst på alginat. Fermenteringsprodukt fra alle substrat ved anaerob vekst.

2.4 FORSØK MED UTVALGTE STAMMER

På bakgrunn av resultatene fra screeningforsøkene ble stammene *Vibrio alginolyticus* 2047, *Paenibacillus alginolyticus* 12517, *Paenibacillus chondroitinus* 5051 og *Enterobacteriaceae* 1994 valgt ut til forsøk med analyse av vekst og omsetting i fase to av oppgaven. Analysene er beskrevet i Avsnitt 2.6. Først ble det satt opp et dyrkingsforsøk med ulikt volum av medium i ristekolber for å gi ulik oksygentilgang under vekst. Dette ble gjort med substratene glukose, alginat og alginat og mannitol kombinert. Det ble benyttet 250 mL ristekolber med medievolume 100 mL, 160 mL og 225 mL. FM-medium ble brukt for ikke-marine stammer, og MM3-medium for marine stammer. Sluttprøver fra kulturene ble analysert med HPLC. Ved kombinasjon av mannitol og alginat ble substratene satt sammen basert på stammens tidligere vekst på mannitol og alginat, samt forventet celleutbytte fra de to substratene. Forholdet ble bestemt til 7 g/L alginat og 3 g/L mannitol for stammen *Vibrio alginolyticus* 2047, og 6 g/L alginat og 4 g/L mannitol for resten.

For stammene *Vibrio alginolyticus* 2047 og *Enterobacteriaceae* 1994 ble det videre funnet en standardkurve for OD og cellemasse, som forklart i Avsnitt 2.2.2 under vekstmålinger. Dette ble gjort med samme medium som i forsøket med ulik oksygentilgang. Substratene glukose, mannitol og alginat ble brukt. Videre ble disse stammene undersøkt med en utvidet analyse av fermenteringsutbytte ved vekst på alginat og mannitol med ulik oksygentilgang, her med volumene 100 mL, 160 mL, 225 mL og 250 mL i 250 mL ristekolber. Stammen *Vibrio haliotocoli* 21474 ble også dyrket på alginat i dette forsøket. Det ble benyttet MM3-medium for *Vibriostammene* og FM-medium for *Enterobacteriaceae* 1994. For kulturene dyrket på alginat ble det tatt ut prøver til HPLC, enzymatisk alginatanalyse og viskositetsmåling. For mannitol ble det tatt ut prøver til HPLC underveis i vekstforsøket.

Videre ble stammene *Vibrio Splendidus* 78, *Vibrio alginolyticus* 2047 og *Enterobacteriaceae* 1994 dyrket aerobt på alginat med 50 mL medium i 250 mL ristekolber for kartlegging av alginatdegraderingen. MM3-medium ble benyttet for marine stammer og FM-medium for ikke-marine stammer. Det ble tatt ut prøver jevnlig til enzymatisk alginatanalyse og viskositetsmåling, og oligomersammensetning ble analysert ved hjelp av HPAEC-PAD.

2.5 KARAKTERISERING AV ENZYMER

2.5.1 ANALYSE AV NEDBRYTINGSPRODUKT FRA M- OG G-BLOKK

Syrenedbrutt polymannuronat (M-blokk, \overline{DP}_n ca 30) og polyguluronat (G-blokk, \overline{DP}_n 18) ble skaffet med hjelp fra avdelingsingeniør Wenche Iren Strand ved institutt for bioteknologi. Disse ble brukt som substrat, og nedbrytingsproduktene ble analysert for å karakterisere alginat lyaser fra stammene. Forsøket ble utført i to deler. I første del ble supernatantprøver fra de aktuelle stammene tilsatt M- og G-blokk, og nedbrytingsproduktene ble analysert etter inkubering ved hjelp av HPAEC-PAD, se Avsnitt 2.6.4. I det andre forsøket ble M- og G-blokk tilsatt prøver med både supernatant og cellelysat fra aktive kulturer, for å identifisere cellulære metabolitter i nedbrytningssporet hele veien fra alginat til produkt, ved hjelp av HPLC, Avsnitt 2.6.3, og HPAEC-PAD. Fremgangsmåte for nedbryting av M- og G- blokk var lik for begge substrat og stammer, og forsøket ble satt opp slik at begge stammer ble testet på både M-blokk og G-blokk.

OPPARBEIDING AV PRØVEMATERIALE

Stammene *Enterobacteriaceae* 1994 og *Vibrio alginolyticus* 2047 ble dyrket aerobt på alginat for å opparbeide en aktiv cellekultur. Medier som ble benyttet var MM3 for *Vibrio alginolyticus* 2047, og FM for *Enterobacteriaceae* 1994. OD ble målt under dyrkingen av kulturene. Prøve til cellelysering ble tatt når veksten var i eksponentiell fase for å sikre celler med en aktiv metabolisme, og supernatantprøver ble tatt ut ved maks OD før stasjonærfase for å gi en løsning med aktivt ekstracellulært enzym og lite alginat.

Prøver til supernatant ble tatt ut og sentrifugert i en 5810 R sentrifuge (Eppendorf, Tyskland) ved 4000 rpm og supernatanten med ekstracellulære alginat lyaser ble tatt med til forsøket. Prøver til cellelysering ble sentrifugert som supernatantprøvene og supernatanten fjernet. Cellepelletsen ble så resuspendert i samme volum enzymbuffer (50 mM Tris-HCl, 1,5 % NaCl, pH 7,5) og lysert med en Branson Sonifier S-250 (Branson Ultrasonics Corp., Danbury) i 10 minutt med 20 % driftssyklus og en utlesekontroll på 5. Cellevegg og annet fast material ble fjernet fra cellelysatet ved at prøvene ble sentrifugert på ny. Til inkubering av supernatant og cellelysat med G- og M- blokk ble det benyttet en U96 DeepWell plate (Nunc, Thermo Fisher Scientific, Waltham) med 2 mL brønner og varmeskap ved 28 °C.

ENZYMATISK NEDBRYTING MED SUPERNATANT FOR IDENTIFISERING AV LYASEPRODUKT

M- og G- blokk ble tilsatt supernatant med ekstracellulære alginat lyaser for å få en nedbryting av polymerene uten cellulært opptak av endeprodukt. Det ble veid ut 15 mg substrat i et 15 mL sentrifugerør og tilsatt 3 mL supernatant. Løsningen ble blandet godt på whirlmixer før det ble tatt ut 3 prøver på 1 mL hver. En prøve ble satt direkte på 90 °C vannbad for reaksjonstopp, de andre to til inkubering i brønnplate. Den ene prøven satt til inkubering ble stoppet etter 3 timer, den andre etter 6 timer. Etter at reaksjonen i prøvene var stoppet på varmebad ble løsningene filtrert med et 0,2 µm GHP Acrodisc 13 mm sprøytefilter (Pall Life Science, Ann Arbor) og frosset ned ved -20 °C. Prøvene ble fortynnet 5 ganger før analysering med HPAEC-PAD.

ENZYMATISK NEDBRYTING MED SUPERNATANT OG CELLELYSAT FOR IDENTIFISERING AV CELLULÆRE METABOLITTER

M- og G-blokk ble tilsatt supernatant og cellelysat, og det ble gjort analyser over en bestemt tidsserie for å spore mellomprodukt underveis i nedbrytingen av polymerene. Det ble veid ut 45 mg substrat i et 15 mL sentrifugerør og tilsatt 4,5 mL supernatant og 4,5 mL cellelysat fra samme stamme. Etter blanding på whirlmixer ble det tatt ut en prøve på 1 mL og satt direkte på 90 °C varmebad for stopp av enzymreaksjonen. Åtte prøver på 1 mL hver ble overført til brønner på brønnplaten. En prøve ble stoppet etter 15 minutter og en etter 30 minutter. Av de resterende 6 prøvene ble 4 prøver tilsatt 20 µL NAD⁺/NADH₂ løsning og 20 µL ATP/ADP løsning etter 30 minutter, slik at konsentrasjonen i brønnene ble 1 mM NAD⁺/NADH₂ og 5 mM ATP/ADP. Disse 4 prøvene ble avsluttet ved 45 minutter, 1 time, 2 timer og 3 timer etter forsøksstart. De to brønnene uten tilsats av kofaktorer ble avsluttet etter 1 og 3 timer. Etter reaksjonstopp på varmebad ble prøvene filtrert med 0,2 µm GHP Acrodisc 13 mm sprøytefilter (Pall Life Science, Ann Arbor) og frosset ned til senere analyse. Prøvene ble fortynnet 5 ganger før analyse på HPAEC-PAD.

2.5.2 GENANALYSE

På bakgrunn av de foreslåtte biokjemiske sporene presentert i Avsnitt 1.4.2 ble det gjort et forsøk på å påvise enkelte av de sentrale enzymene i nedbrytingen fra uronsyrer til pyruvat. Dette ble gjort for stammen *Vibrio alginolyticus* 2047 og *Enterobacteriaceae* 1994. Gensekvenser for enzymene 2-dehydro-3-deoksyglukonokinase (EC 2.7.1.45), mannonat dehydratase (EC 4.2.1.8) og 2-dehydro-3-deoksyfosfoglukonat aldolase (EC 4.1.2.14) ble sammenlignet for flere bakteriestammer innenfor samme familie som de utvalgte. Det ble funnet områder i genene som var relativt konserverte og like i de ulike stammene ved hjelp av dataprogrammet Clone, og primersett til polymerasekjedereaksjon (PCR) ble designet for hvert av enzymene til hver av de to stammene i forsøket. Det designede primersettet kan ses i Vedlegg V2. PCR ble benyttet for å amplifisere primerproduktene, og produktene ble identifisert etter størrelse ved hjelp av standarder. Størrelsen på de ønskede primerproduktene var kjent slik at det kunne bestemmes om de oppnådde DNA produktene var fra de aktuelle enzymene. For enkelte av gensekvensene var det vanskelig å finne bevarte sekvenser som egnet seg til primere. Enkelte av primerne var derfor ikke optimale med tanke på basesammensetning og smeltetemperatur.

DNA EKSTRAKSJON OG PCR

Bakteriestammene som ble valgt ut til analysen ble dyrket aerobt på alginat for opparbeidelse av prøvemateriale. Et volum på 3 mL kultur ble tatt ut og sentrifugert i en 5810 R sentrifuge (Eppendorf, Tyskland), supernatanten helt av og cellepelletten brukt til DNA ekstraksjon. DNA ekstraksjon ble utført med DNeasy Blood & Tissue kit (Qiagen, Tyskland), med noen modifikasjoner (se Vedlegg V3 for detaljert protokoll). Mengde DNA ble målt med NanoDrop® ND-1000 spektrofotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham) ved 230 nm, og ved hjelp av konsentrasjonen som ble funnet ble DNAet fortynnet til 100 µg/µL.

PCR reaksjonen ble kjørt med 37 sykluser ved temperaturgradient fra 45 til 55 °C. Det ble opparbeidet tre paralleller av hver løsning, slik at alle prøver ble kjørt på PCR ved tre temperaturer. Disse var 45, 50 og 55 °C. PCR programmet kan ses i Tabell 2.7. Bufferløsningen ble laget som beskrevet av Bakke *et al.* (2010), med 2 mM MgCl₂, 0,2 mM av hver dNTP, 0,3 µM av hver primer, Taq polymerase (VWR, USA) og

2 Materialer og metoder

reaksjonsbuffer (Qiagen, Tyskland). Det ble tilsatt 1 μL DNA til hvert rør med 24 μL buffer.

Tabell 2.7: PCR program benyttet til amplifisering av primerprodukt.

Runde	Temperatur ($^{\circ}\text{C}$)	Tid	Forløp
1	95	3 min	Denaturering
2*	95	30 sek	Denaturering
3*	45-55	30 sek	Primer binding ("annealing")
4*	72	60 sek	DNA syntese ("elongation")
5	72	30 min	DNA syntese ("elongation")
6	10	∞	Oppbevaring

*Runde 2-4 ble gjentatt 37 ganger

PCR produkt ble påvist og visualisert på agarosegel. Gelen ble laget med tilsats av 1 % agarose i TAE buffer (2M Tris-HCl, 1M eddiksyre, 50mM EDTA), og bufferen ble varmet til all agarosen var løst. Det ble så tilsatt 5 μL Gelred (Biotium, Hayward, CA, Kat.nr. 41003) per 100 mL buffer, og gelen ble støpt i form og avkjølt. For hver prøve ble 5 μL PCR produkt blandet med 1 μL 6x DNA loading dye (Fermentas, USA, kat.nr. #R0611), og 5 μL av denne løsningen ble tilsatt brønnen i agarosegelen. Standarden 1kb Plus DNA ladder (Fermentas, USA, kat.nr. #SM1331) ble tilsatt i de ytterste brønnene på gelen og brukt for å bestemme lengde på båndene. Det ble satt en spenning på 140 V på gelen i 1 time, og båndene på gelen ble så visualisert med UV-lys ved hjelp av en G:Boks (SynGene, UK) og programvaren GeneSnap.

2.6 ANALYSER

2.6.1 ENZYMATISK ALGINATANALYSE

Alginatkonsentrasjon i fermenteringsprøver ble målt enzymatisk ved tilsats av lyaser og absorbansmåling ved 230 nm over tid, som beskrevet av Østgaard (1992). Prøver ble tatt ut fra kulturer dyrket på alginat og sentrifugert ved 13 000 rpm i en Minispinn sentrifuge (Eppendorf, Tyskland). Supernatanten ble tatt av og fortynnet 15 ganger for å unngå bakgrunnsabsorbans i analysen, 5x i MilliQ-vann og 3x i enzymbuffer. Det ble benyttet en Costar UV-mikroplate (A. Daigger & Company, Illinois) ved absorbansmåling og brønnene ble tilsatt 150 µL enzymbuffer (50 mM Tris-HCl, 1,5 % NaCl, pH 7,5), 75 µL ferdig fortynnet prøve og 20 µL lyase (10µL G-lyase, stock 1U/mL, og 10 µL M-lyase, stock 1U/mL, begge produsert i *Escherichia coli* ved SINTEF). Se Tabell 2.8 for prøveoppsett på brønnplate. Det ble laget standarder der prøvevolumet i brønnene ble erstattet med 75 µL LF-10/60 alginatstandard i ulike konsentrasjoner og blindprøver med prøvevolum erstattet med MilliQ-vann. Det ble kjørt tre paralleller av hver prøve. Absorbans ble målt ved 230 nm før lyasetilsats og så hvert tiende minutt i tre timer etter lyasetilsats ved hjelp av et FLUOstar Omega spektrofotometer (BMG labtech, Tyskland). Resultatene ble analysert med programvaren Omega, versjon 1.30.

Tabell 2.8: Oppsett på brønnplate for enzymatisk alginatanalyse. OE indikerer brønner med blindprøver, P1-P24 er prøveoppsettet med tre paralleller av hver prøve, og 0,1-0,5g/L er brønner med alginatstandarder.

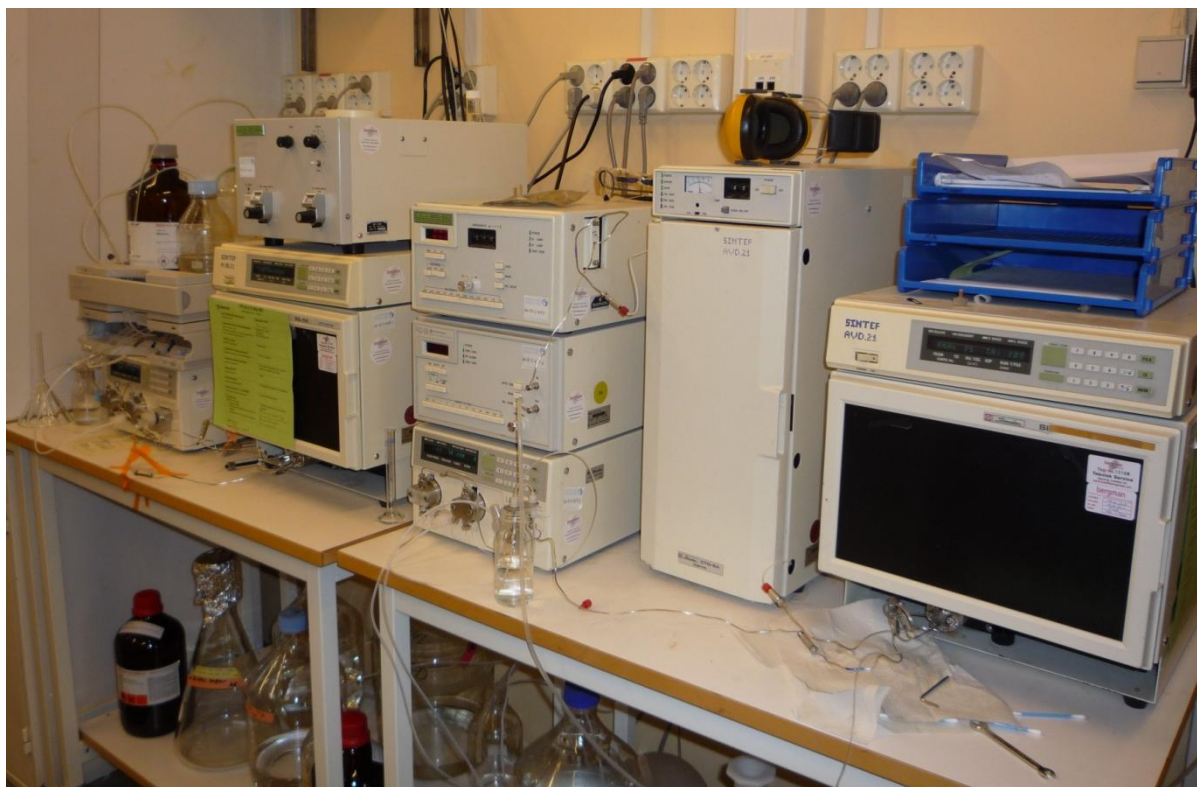
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
a	OE	OE	P1	P1	P1	P9	P9	P9	P17	P17	P17	OE
b	OE	OE	P2	P2	P2	P10	P10	P10	P18	P18	P18	OE
c	OE	0,1g/l	P3	P3	P3	P11	P11	P11	P19	P19	P19	OE
d	OE	0,2g/l	P4	P4	P4	P12	P12	P12	P20	P20	P20	OE
e	OE	0,3g/l	P5	P5	P5	P13	P13	P13	P21	P21	P21	OE
f	OE	0,4g/l	P6	P6	P6	P14	P14	P14	P22	P22	P22	OE
g	OE	0,5g/l	P7	P7	P7	P15	P15	P15	P23	P23	P23	OE
h	OE	OE	P8	P8	P8	P16	P16	P16	P24	P24	P24	OE

2.6.2 VISKOSITET

For å analysere alginatdegraderingen under fermenteringsforsøkene ble det benyttet viskositetsmålinger. Viskositetsmålinger kan benyttes som et indirekte mål på nedbrytingen av alginat i en prøve da viskositeten til en løsning avhenger av størrelsen og formen til makromolekylene i løsningen (Smidsrød & Moe, 2008). Prøver tatt ut underveis i dyrkingsforsøkene ble sentrifugert i en 5810 R sentrifuge (Eppendorf, Tyskland) ved maks hastighet, 4000 rpm. For å fjerne store partikler fra løsningen ble supernatanten filtrert med 0,2 µm Whatman FP 30 mm CA-S cellulose-acetat sprøytefilter (Whatman GmbH, Tyskland). Løsningen ble overført til en mikroubelode viskometer type 53610/I (Schott-Geräte GmbH, Tyskland) og gjennomstrømningstiden målt ved hjelp av en styringsboks AVS 310 (Schott-Geräte GmbH, Tyskland).

2.6.3 VÆSKEKROMATOGRAFI (HPLC)

Kvalitativ og kvantitativ analyse av fermenteringsprodukt og sukkerinnhold i fermenteringsprøver ble gjort ved hjelp av høypresisjonsvæskeskromatografi (HPLC, High Performanse Liquid Chromatography). Prøver ble tatt ut fra kulturene og cellematerialet ble sentrifugert ned ved 13000 rpm i en Minispin sentrifuge (Eppendorf, Tyskland). Supernatanten ble så tatt av og filtrert med 0,2 µm GHP Acrodisc 13 mm sprøytefilter (Pall Life Science, Ann Arbor) før analyse. Prøvene ble overført til 1,5 mL Eppendorfrør for prøver på over 0,5 mL, og til 32 x 11,6 mm Shimadzurør (Holger teknologi, Norge) med innsats for prøvemateriale under 0,5 mL. Prøvene ble analysert av ingeniør Kathinka Qvenild Lystad ved SINTEF Materialer og Kjemi på en Aminex HPX-87-C kolonne (BioRad, Hercules, CA) eluert med 5 mM svovelsyrebuffer, 0,6 mL/min, ved 45 °C. Det ble benyttet RI-detektor RID-6A (Shimadzu, Japan) og UV-detektor SPD-6AV (Shimadzu, Japan) ved 210 nm for detektering av komponenter i prøvene. Konsentrasjonen av sukker og fermenteringsprodukt ble bestemt ved å sammenligne med kjente standarder. Se Figur 2.4 for bilde av instrumentet.



Figur 2.4: HPLC instrument benyttet i analyser av fermenteringsprodukt og sukkerinnhold.

2.6.4 HØYPRESISJON ANIONBYTTER-KROMATOGRAFI MED PULSAMPERIOMETRISK DETEKSJON (HPAEC-PAD)

Høypresisjon anionbytter-kromatografi (HPAEC) med pulsamperimetrisk deteksjon (PAD) ble benyttet til å analysere oligomersammensetningen i prøver med nedbrutt alginat. HPAEC-PAD er en metode for å bestemme distribusjonen av oligosakkarider fra polysakkarider som alginat, og er vist å kunne separere oligomerer med polymeriseringsgrad (DP) på opptil 50 under forholdene beskrevet nedenfor (Campa *et al.*, 2004; Ballance *et al.*, 2005). Analysen ble utført ved hjelp av en Dionex BioLC (Dionex Corp, Sunnyvale, CA), bestående av en AS50 autosampler, en ED40 elektrokjemisk detektor med en gjenbrukbar gullelektrode og en GP50 gradientpumpe, se Figur 2.5.

Fermenteringsprøvene ble sentrifugert ved 13000 rpm i en Minispin sentrifuge (Eppendorf, Tyskland) for å fjerne cellematerialet, og supernatanten ble tatt av og filtrert med et 0,2 μm GHP Acrodisc 13 mm sprøytefilter (Pall Life Science, Ann Arbor). Preparatene ble videre analysert av stipendiat Olav Andreas Aarstad ved Institutt for bioteknologi ved NTNU. 25 μL prøve ble injisert via en 100 μL loop. Oligosakkaridene ble separert ved romtemperatur av en gradienteluering med 0-700 mM natriumacetat i 100

2 Materialer og metoder

mM natriumhydroksid (NaOH) i 80 minutter på en Dionex IonPac AS4A (4 x 250 mm) ionebytterkolonne koblet til en IonPac AG4A (4 x 50 mm) vaktkolonne. Strømningshastigheten ble satt til 1 mL/min med kurveform A for deteksjon. Datatilgang og analyse ble gjort ved hjelp av Chromeleon 6.7 programvare.



Figur 2.5: HPAEC-PAD-instrument benyttet for analyse av oligomersammensetning.

3. RESULTATER OG DISKUSJON

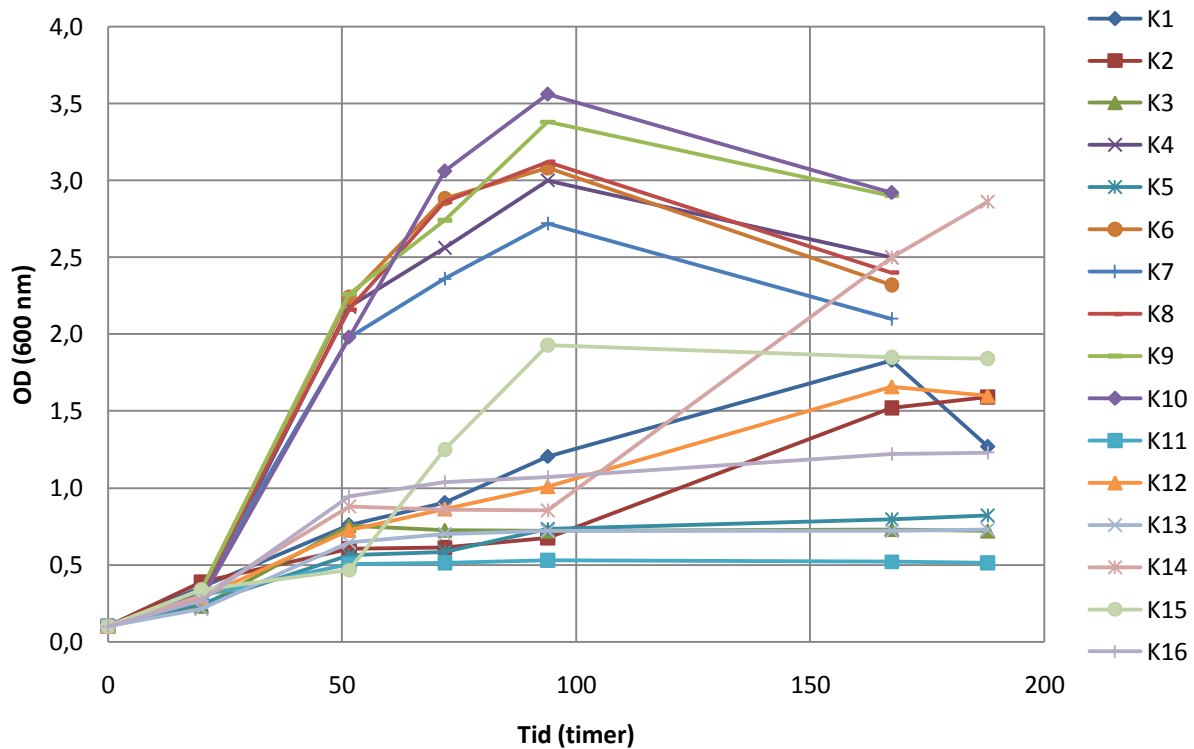
3.1 SCREENING AV BAKTERIESTAMMER

Et screeningforsøk ble utført som forklart i Avsnitt 2.3 for å finne alginatdegraderende bakteriestammer. Resultatene er presentert i Avsnitt 3.1.1-3.1.4 under, fulgt av diskusjon og vurdering av bakteriestammene i Avsnitt 3.1.5.

3.1.1 BAKTERIESTAMMER ISOLERT FRA KRÅKEBOLLER

Gjennomsnittlig kimtall for prøven isolert fra kråkebolletarm ble bestemt til $2,1 \times 10^8$ celler per gram kråkebolletarm. Isolerte renkulturer fra kråkebolletarm ble tatt med i screeningforsøket for å finne de stammene som vokste best på alginat, og disse ble nummerert K1-K16. Ved aerob dyrking på alginat skilte enkelte stammer seg ut og vokste raskere enn resten (nr. K4, K6, K7, K8, K9 og K10). I tillegg begynte flere andre stammer å vokse etter en noe lengre lagfase (Figur 3.1). Da alle stammene var isolert fra samme prøve, og tilfeldig valgt, var det ingen garanti for at ikke enkelte av de 16 utvalgte koloniene var samme bakteriestamme. For eksempel kan en se at stamme 6 og 8 vokste identisk. De stammene som vokste godt ble alle tatt vare på og laget ampuller av (stamme nr. K1, K2, K4, K6, K7, K8, K9, K10, K11, K12, K14, K15 og K16). Stamme K11 ble valgt ut på grunn av at kulturen var lite viskøs ved avslutning sammenlignet med de andre kulturene, noe som kan indikere god alginatdegradering.

3. Resultater og diskusjon



Figur 3.1: Vekst av 16 bakteriestammer isolert fra kråkebolletarm dyrket aerobt på alginat. Alle stammene var renkulturer strøket ut fra enkeltkolonier på agarplater.

3.1.2 BAKTERIESTAMMER ISOLERT FRA TARE

Resultater fra kintallanalysen gjort av prøver isolert fra tare er vist i Tabell 3.1. Resultatene viste en relativt jevn fordeling av bakterier i de ulike prøvene, men prøven tatt fra massen inni stilken viste et noe lavere kintall enn resten.

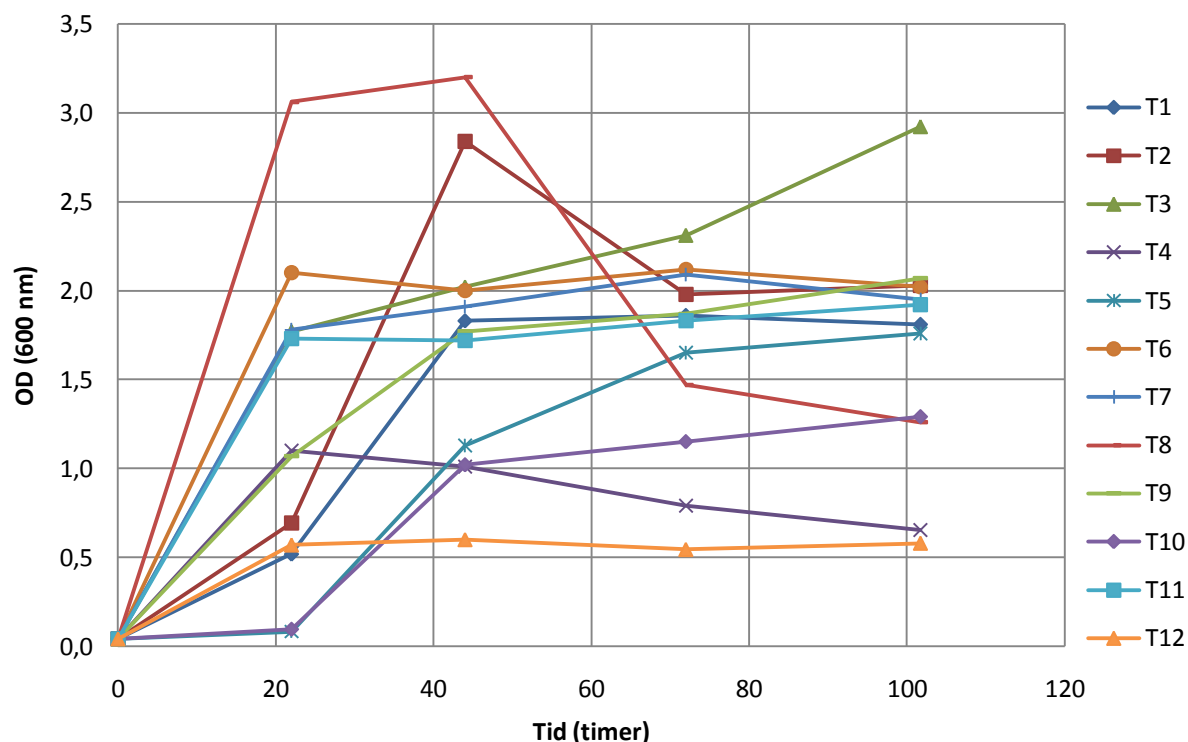
Tabell 3.1: Kintall av prøver fra råtnende tare. Tabellen viser de ulike prøvene og antall dyrkbare bakterieceller funnet for hver prøve. Vekt på prøven før tilsats av saltvann er oppgitt i parentes.

Prøve (g)	Celler per mL	Celler per gram
Skall på stilk (0,8)	$4,4 \times 10^7$	$5,5 \times 10^8$
Masse inni stilk (1,4)	$1,81 \times 10^6$	$1,29 \times 10^7$
Rot (0,2)	1×10^7	5×10^8
Blad (0,3)	9×10^6	3×10^8

Isolerte renkulturer tatt med til vekstforsøket for undersøkelse av vekst på alginat ble nummerert T1 – T12. Heller ikke for disse isolatene var det noen garanti for at ikke noen av de utvalgte koloniene var samme stamme. Isolatene viste relativt stor variasjon i vekstforløp på alginat. Stammer som ble tatt vare på og frosset ned i ampuller var nr. T1, T2, T3, T4, T5, T6, T7, T8, T9 og T11 (Figur 3.2). Stamme T4 ble i likhet med stamme K11

3. Resultater og diskusjon

fra kråkebollene valgt ut fordi sluttprøven av kulturen var veldig lite viskøs. Alginatdegraderingen kan derfor ha vært god selv om veksten var lavere enn for de andre stammene.



Figur 3.2: Aerob vekst av 12 bakteriestammer isolert fra råttent tare på medium med alginat som karbonkilde. Alle de 12 stammene var renkulturer strøket ut fra enkeltkolonier på agarplater.

3.1.3 BAKTERIESTAMMER FRA UMB

Vibrio splendidus-stammene fra UMB ble i vekstforsøkene navngitt med følgende stamnummer; 78, 1217, 71, 4361, 4286, 173, 4294 og 60. Det ble satt opp et enkelt aerobt forsøk med MM1 medium med glukose før vekstforsøket, hvor inokulum ble tatt direkte fra ampuller for å kartlegge veksten i store trekk. Dette ble gjort for at inokulum til vekstforsøket senere kunne tas ut ved riktig tidspunkt fra forkulturene. Det ble da observert at stammene 1217, 71 og 78 flatet ut på mediet som ble brukt i vekstforsøket, og oppnådde en mye lavere OD ved aerob vekst på glukose enn når MB medium med glukose ble bruk ved tillaging av ampuller. Da begrensning i mediet ble antatt som forklaring på veksthemmingen, ble det komponert et nytt og rikere medium, MM2 (Avsnitt 2.2.1). OD ved start ble satt til 0 for alle stammer på alle substrat. Dette er ikke

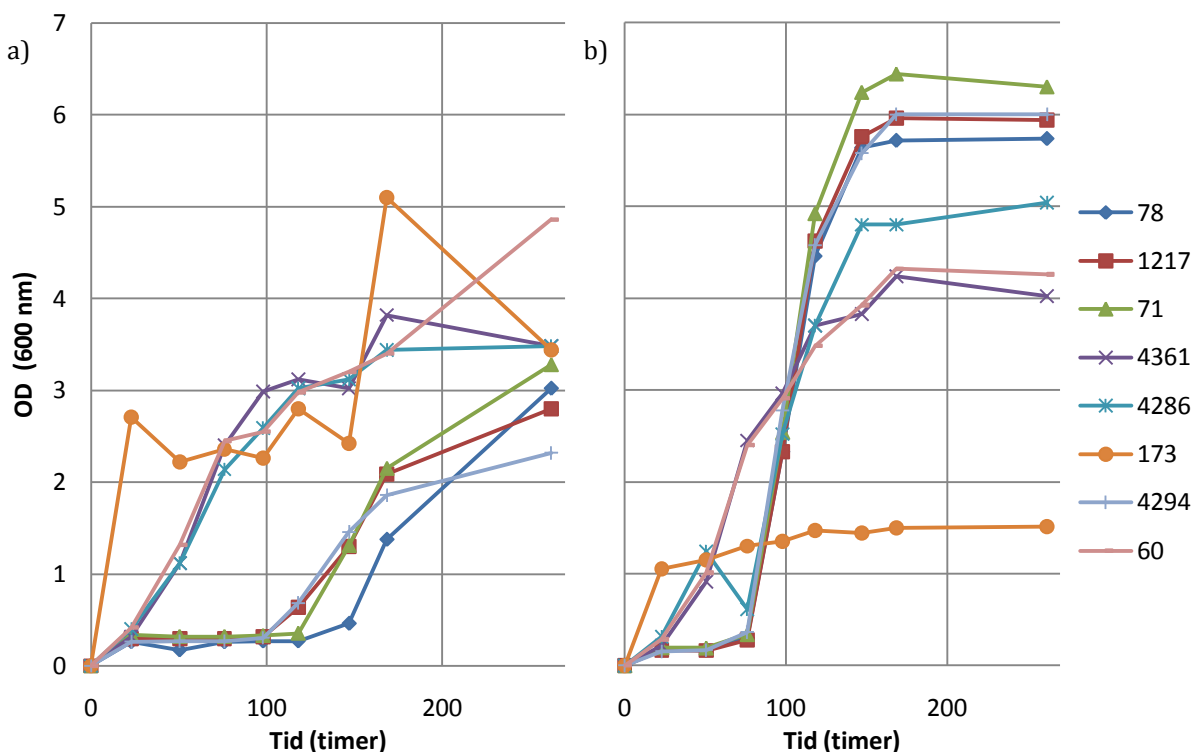
3. Resultater og diskusjon

helt riktig, da inokulum fra forkulturer var tilsatt, og OD mest sannsynlig ligger mellom 0,1 og 0,2.

AEROB VEKST

Under aerobe forhold vokste alle stammene på alginat, og flere av stammene vokste svært godt på mannitol (Figur 3.3). Det var kun stamme 173 som tidlig flatet ut og ikke viste særlig god vekst på mannitol. Denne stammen så også ut til å danne aggregat når den vokste aerobt på alginat, da det ble observert flere små klumper i sentrifugerøret. Aggregater vil gi en ujevn fordeling av celler i prøven, som kan påvirke OD-målingen og resultere i ujevne vekstkurver.

På begge substratene, med unntak av stamme 173, så det ut til å danne seg to grupperinger. Den ene med stammene 4361, 4286 og 60 som kom tidlig i gang med veksten, og den andre med stammene 78, 1217, 71 og 4294 som hadde en noe lengre lagfase. En mulig forklaring kan være inokulumet tilført de ulike kulturene, men OD i forkulturene var stort sett lik og det var ingen stor forskjell mellom gruppene.



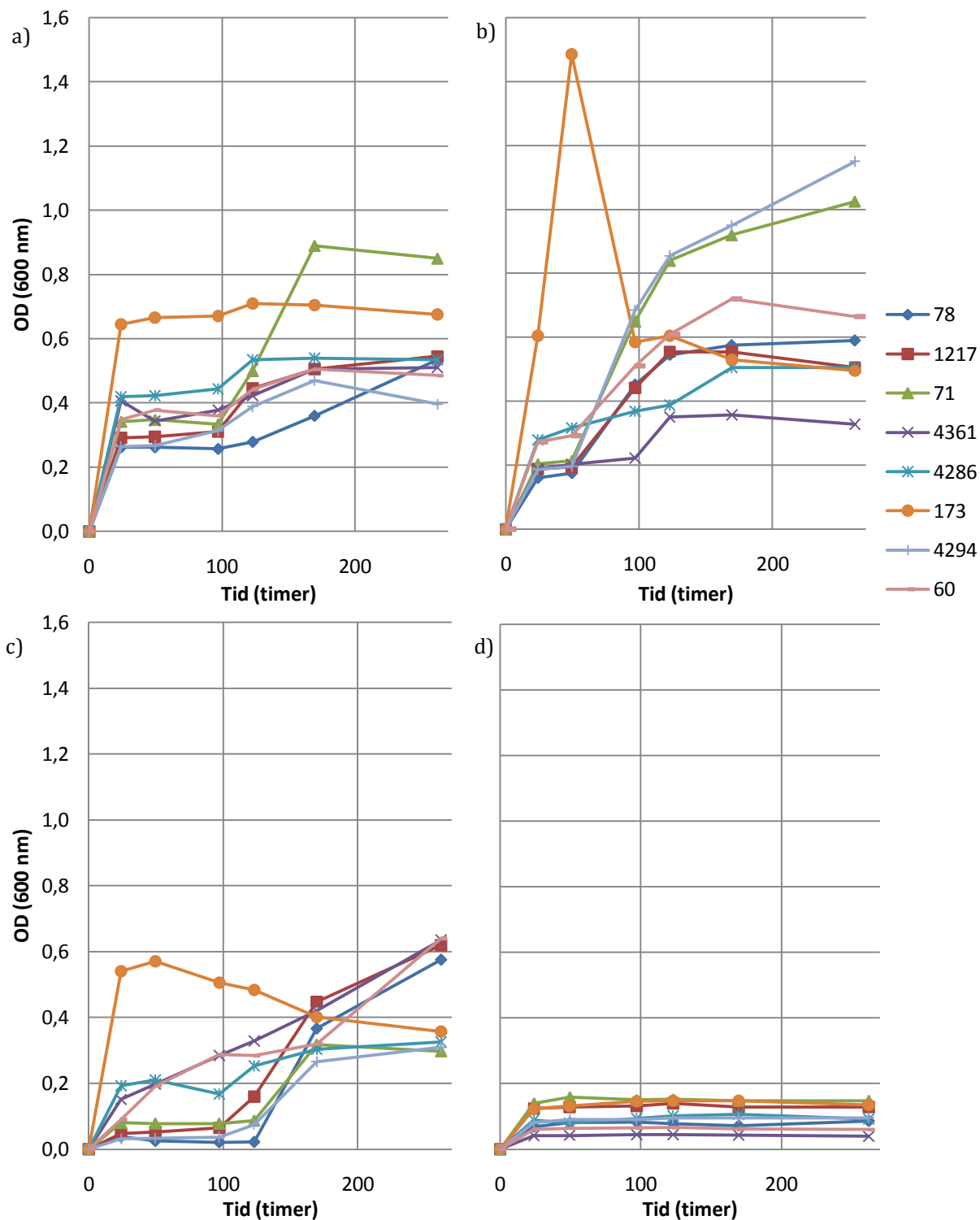
Figur 3.3: Aerob vekst av åtte *Vibrio splendidus* stammer. a) viser vekstforløp på alginat, og b) viser vekstforløp på mannitol. Aksene er lik for begge grafene, og stammene er angitt til høyre.

ANAEROB VEKST

De anaerobe forsøkene ble satt opp for å undersøke om stammene hadde fermentativ metabolisme, og hvilke fermenteringsprodukt som ble produsert fra de ulike substratene. Hensikten med å undersøke for vekst på glukuronsyre var at det muligens omsettes av det samme eller liknende enzymkompleks som uronsyrene i alginat (Avsnitt 1.4.2). Dersom enkelte stammer selv ikke var i stand til å bryte ned alginat, var det likevel en mulighet for at de kunne omsette lyaseproduktene. Mannuronsyre og guluronsyre er ikke tilgjengelig kommersielt, og stammene kunne derfor ikke bli dyrket direkte på disse.

Den anaerobe veksten var noe variert for de ulike substratene (Figur 3.4). Ingen av stammene vokste på glukuronsyre, men alle viste tegn til vekst på alginat, mannitol og glukose. I de første timene kan noe oksygen ha vært tilgjengelig i mediet, noe som kan være årsaken til at enkelte stammer viste noe vekst i starten og flatet tidlig ut.

3. Resultater og diskusjon

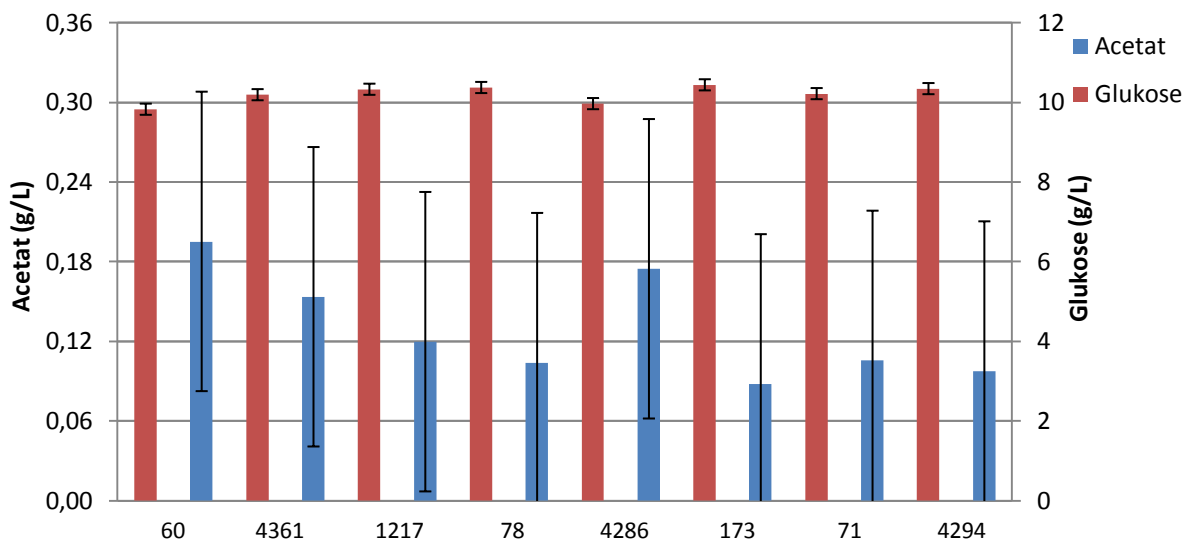


Figur 3.4: Anaerob vekst av *Vibrio splendidus*. a) viser vekstforløp på alginat, b) på mannitol, c) på glukose og d) på glukuronsyre. Aksene er lik for alle grafene, og stammene er angitt med nummer til høyre. Noen av stammene ble avsluttet da de ennå var i vekst på grunn av at det var lite prøve igjen i rørene, og sluttprøvene skulle tas videre til analyse.

SUBSTRATOMSETNING OG PRODUKTDANNELSE

HPLC-analyser av sluttprøver fra anaerob fermentering på glukose viste at samtlige av stammene produserte acetat. I tillegg viste alle stammene en topp ved retensjonstiden 13,7, som var omlag 100 ganger større enn toppen for acetat. I stamme *Vibrio splendidus* 60 ble det observert en topp med retensjonstid 18,49, noe som ikke ble sett i de andre stammene. Toppene med retensjonstid 18,49 stemte ikke med noen av standardene som ble analysert under dette forsøket, og er derfor ikke identifisert og kvantifisert. Toppene med retensjonstid 13,7 kommer ut likt med format, men arealet under toppen var så stort at det umulig kan skyldes format alene. På substratene alginat og mannitol ble det ikke observert noe acetat. Her ble det imidlertid observert topper ved retensjonstidene 13,3 og 18,5. Disse toppene stemte heller ikke overens med noen standarder. Det ble ikke analysert sluttprøver fra glukuronsyre da ingen av stammene vokste på dette substratet.

Figur 3.5 viser konsentrasjonen av acetat og glukose i kulturer dyrket anaerobt på glukose. Resten av HPLC resultatene er vist i Vedlegg V5. Den lave konsentrasjonen av acetat gjør at det blir stor usikkerhet i beregningene, noe som gjør det vanskelig å si noe sikkert om forskjellen mellom stammene. Mediet ble laget med 10 g/L glukose, men det ble ikke målt nøyaktig konsentrasjon i det ferdige mediet. Startkonsentrasjonen er derfor ikke kjent, men var lik i alle kulturer.



Figur 3.5: Konsentrasjon av acetat og glukose i sluttprøver fra *Vibrio Splendidus*-stammer dyrket anaerobt på glukose. Feilfelt angir standardavvik for standarder av samme stoff med kjent konsentrasjon analysert fem ganger (Vedlegg V5).

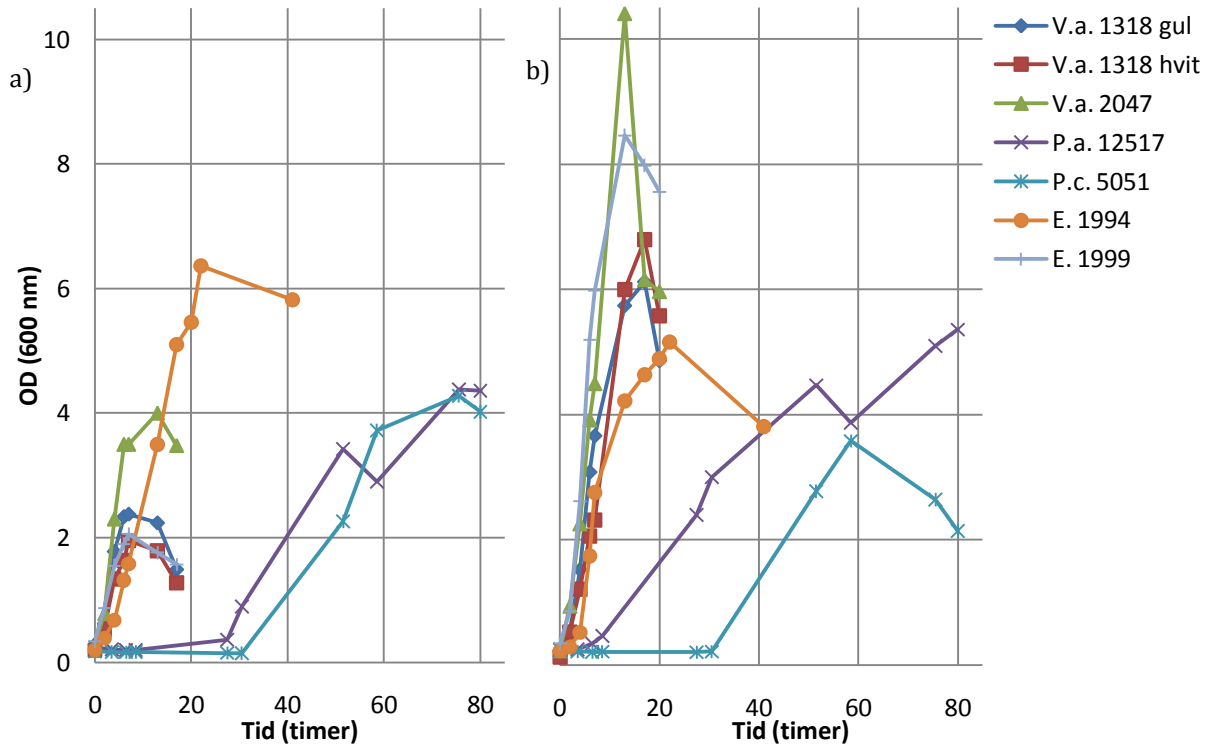
3.1.4 INNKJØPTE BAKTERIESTAMMER

De innkjøpte stammene ble i likhet med UMB-stammene dyrket både aerobt og anaerobt. Før forsøket ble det komponert medium for de ulike stammene for å sørge for optimal vekst. Stammen *Vibrio alginolyticus* 1187 vokste ikke på noen av mediene som ble prøvd ut, og ble derfor ikke tatt med videre til selve forsøket. *Vibrio halioticoli* 21474 ble mottatt på marin agar, men det var ikke mulig å få noen vekst fra prøven. Stammen ble bestilt inn på nytt, men ble ikke med i screeningforsøkene. Alle stammene ble strøket ut på agarplater for å sjekke renkultur før det ble laget ampuller, og det viste seg at stammen *Vibrio alginolyticus* 1318 ikke var ren, men besto av to ulike stammer. Disse ble derfor dyrket opp hver for seg og kalt *Vibrio alginolyticus* 1318 "gul" og *Vibrio alginolyticus* 1318 "hvit" etter utseende på koloniene. Stammene ble i vekstforsøkene angitt med forkortet stammenavn og nummer. De undersøkte stammene var *Vibrio alginolyticus* (V.a.) 1318 gul, V.a. 1318 hvit, V.a. 2047, *Paenibacillus alginolyticus* (P.a.) 12517, *Paenibacillus chondroitinus* (P.c.) 5051, *Enterobacteriaceae* (E.). 1994 og E. 1999.

AEROB VEKST

Alle de innkjøpte stammene vokste aerobt på alginat og mannitol, men veksthastigheten varierte (Figur 3.6). Stammene *Paenibacillus alginolyticus* 12517 og *P. chondroitinus* 5051 skilte seg fra resten med at de hadde en lengre lagfase før de kom opp i god vekst. Stammen *Enterobacteriaceae* 1994 oppnådde høyest OD på substratet alginat, og stammen *Vibrio alginolyticus* 2047 oppnådde høyest OD på mannitol.

3. Resultater og diskusjon

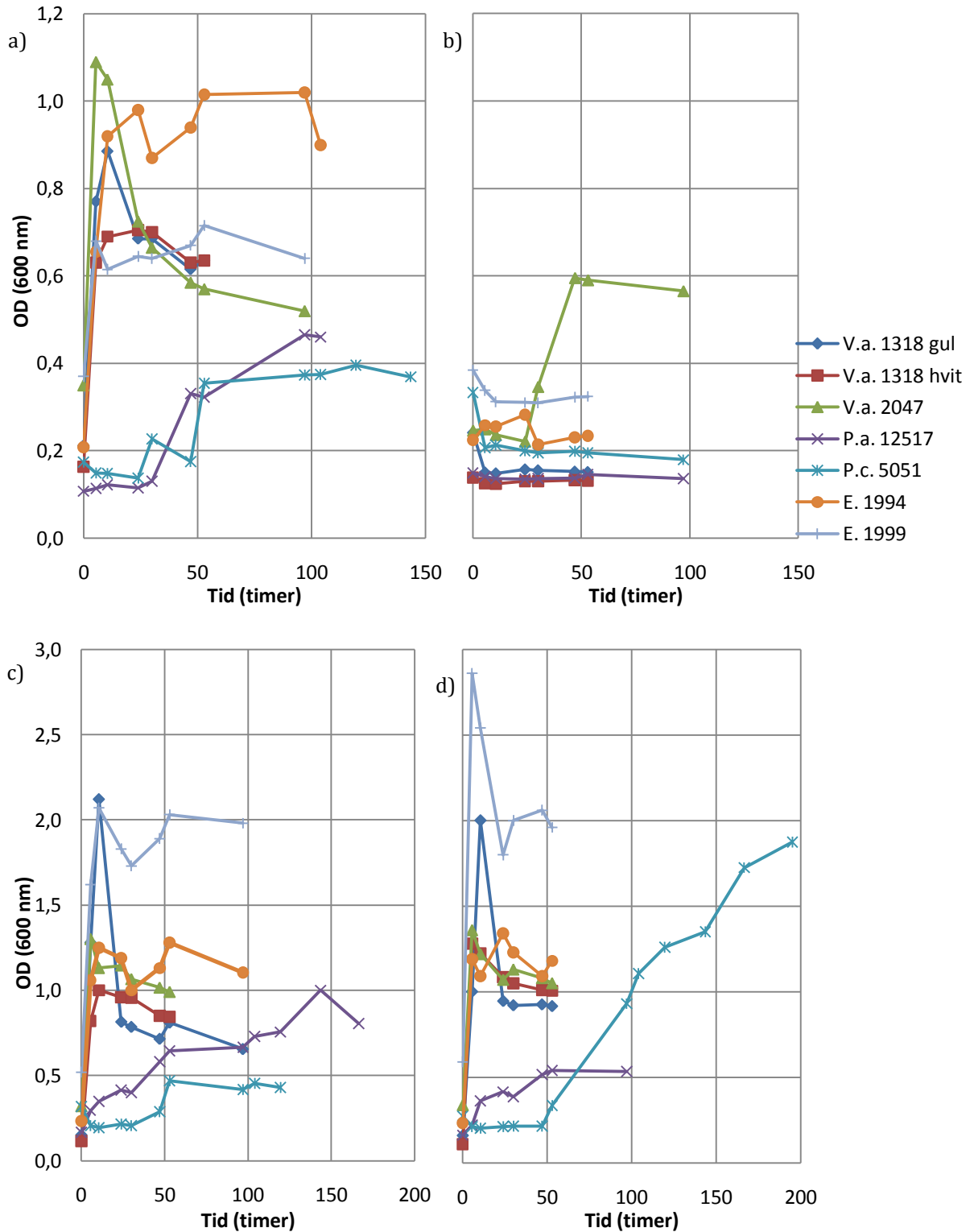


Figur 3.6: Vekstforløp for aerob vekst på a) alginat og b) mannitol for innkjøpte stammer. Stammene er angitt til høyre i figuren, og har samme farge og symbol på kurven i begge grafene.

ANAEROB VEKST

Vekstforløp for de innkjøpte stammene dyrket anaerobt på de ulike substratene er vist i Figur 3.7. Alle stammene vokste anaerobt på de fleste substratene, men kun stammen *Vibrio alginolyticus* 2047 viste tegn til å vokse på glukuronsyre. På alginat var det stammene *Vibrio alginolyticus* 2047 og *Enterobacteriaceae* 1994 som oppnådde høyest OD. Også for anaerob vekst skilte stammene *Paenibacillus alginolyticus* 12517 og *Paenibacillus chondroitinus* 5051 seg fra resten, ved at de hadde en lengre lagfase før de kom opp i god vekst.

3. Resultater og diskusjon



Figur 3.7: Vekstforløp for anaerob vekst på a) alginat, b) glukuronsyre, c) mannitol og d) glukose for innkjøpte stammer. Veksten på de ulike substratene var så ulik at ikke alle grafene har like akser, men aksene er lik for de a) og b) og for c) og d).

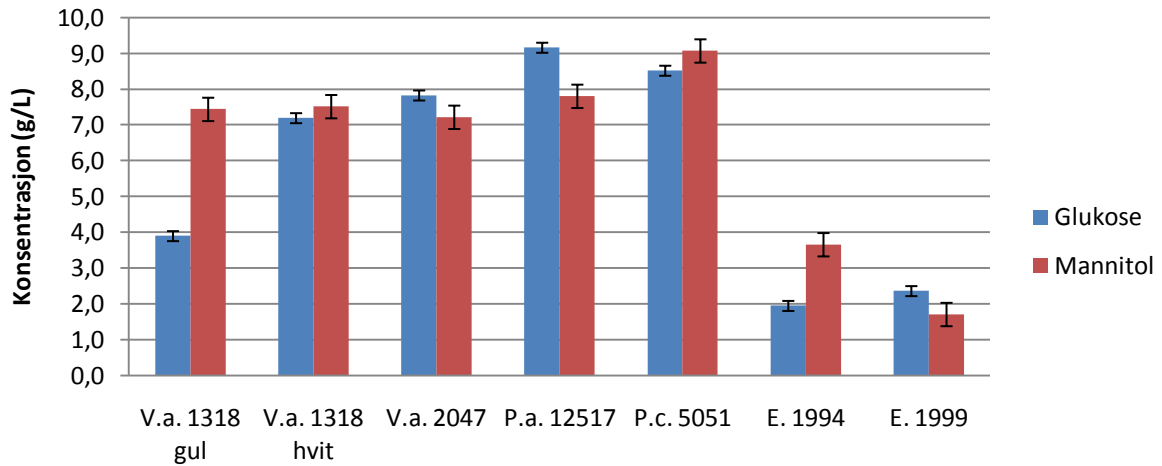
SUBSTRATOMSETNING OG PRODUKTDANNELSE

Det ble tatt ut sluttprøver fra alle anaerobe stammer på alle substrat til HPLC analyse. Standarder for acetat og etanol ble analysert sammen med prøvene, mens standarder for succinat, laktat og format ble analysert ved et senere tidspunkt. Identifikasjonen av disse stoffene er derfor noe usikker.

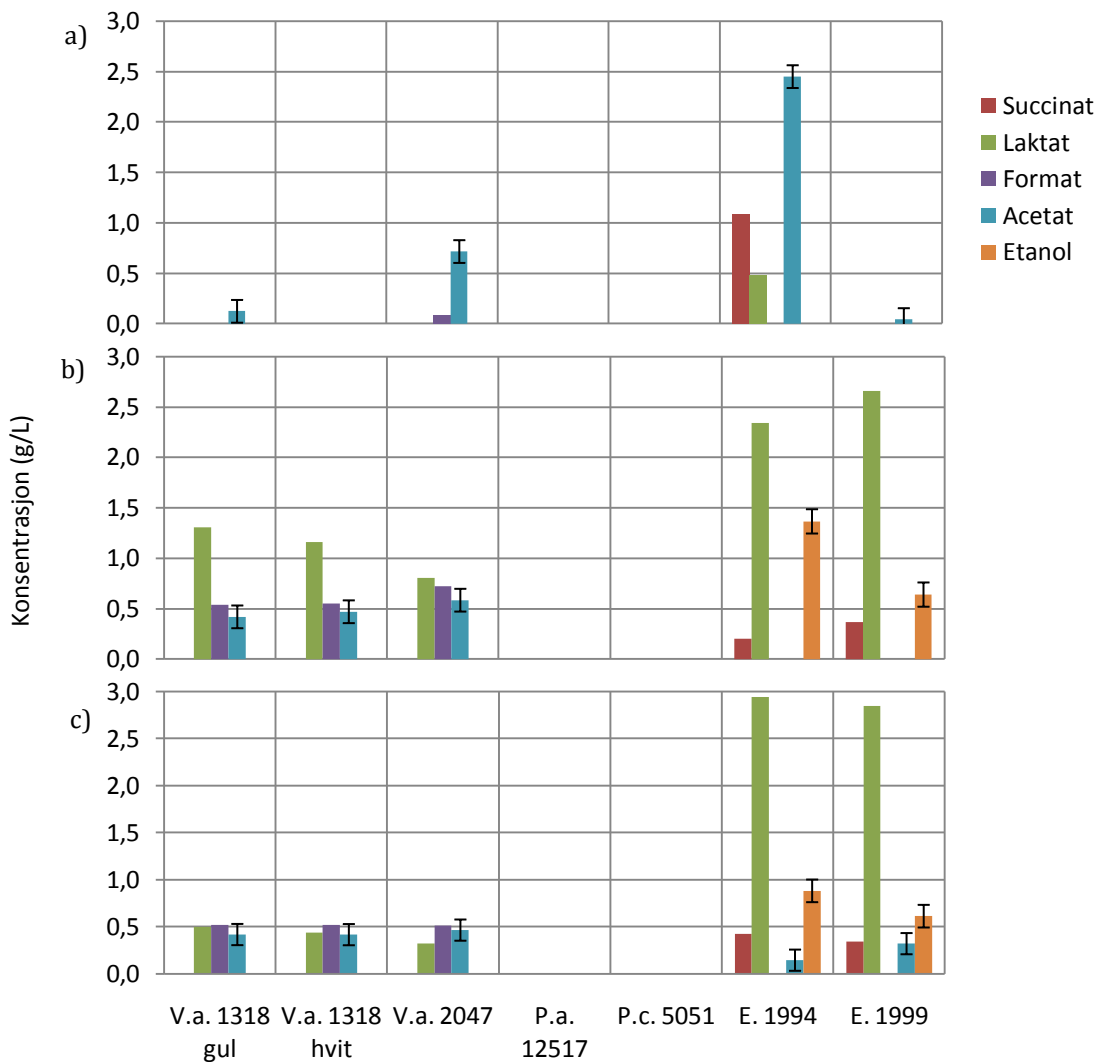
For glukuronsyre var det kun stammen *Vibrio alginolyticus* 2047 som viste tegn på omsetning av substratet, og det ble registrert i underkant av 0,12 g/L acetat i sluttprøven. Ingen andre produkt ble påvist. Fra vekst på glukose og mannitol ble det registrert produktdannelse i sluttprøvene for alle stammene, unntatt *Paenibacillus alginolyticus* 12517 og *P. chondroitinus* 5051 (Figur 3.9). Som det kommer frem av figurene produserte begge *Enterobacteriaceae*-stammene etanol fra mannitol og glukose. Det ble i tillegg registrert succinat, laktat, format og acetat i prøvene. Stammene *Enterobacteriaceae* 1994 og 1999 hadde høyest omsetning av substratene (Figur 3.8), og høyest konsentrasjon av fermenteringsprodukt.

Fra vekst på alginat var det i hovedsak stammene *Vibrio alginolyticus* 2047 og *Enterobacteriaceae* 1994 som viste produktdannelse. Det ble ikke målt nøyaktig startkonsentrasjon av substrat i mediene, men alle medier ble laget med 10 g/L substrat. *Enterobacteriaceae*-stammene ble dyrket på samme medium, og hadde derfor samme startkonsentrasjon av substrat. I sluttprøvene fra kulturene dyrket på mannitol ble det registrert 3,7 g/L mannitol og 1,4 g/L etanol i *Enterobacteriaceae* 1994 kulturen, og 1,7 g/L mannitol og 0,6 g/L etanol for *Enterobacteriaceae* 1999. *Enterobacteriaceae* 1994 produserte mer etanol fra en mindre mengde mannitol og hadde derfor høyest etanolutbytte. Ingen av stammene produserte etanol fra alginat.

3. Resultater og diskusjon



Figur 3.8: Substratkonsentrasjon i sluttprøver av stammer dyrket anaerobt på glukose og mannitol. Feilfelt angir standardavvik for prøver med kjent konsentrasjon analysert tre-fem ganger (Vedlegg V5).



Figur 3.9: Produktdannelse i de ulike kulturene dyrket anaerobt på a) alginat, b) mannitol og c) glukose. Feilfelt angitt for acetat og etanol er standardavvik i paralleller av standarder av samme stoff analysert fem ganger (Vedlegg V5).

3.1.5 BAKGRUNN FOR VIDERE VALG AV BAKTERIESTAMMER

Bakteriestammer ble isolert fra kråkeboller fordi det tidligere har vært rapportert om funn av alginatdegraderende fermentative bakteriestammer isolert fra kråkebolletarm. Sawabe et al. (1995) rapporterte at av bakteriestammer isolert fra kråkebollene *Strongylocentrotus intermedius* og *S. nudus* var 70-100 % alginatdegraderende, og at de fleste omsatte glukose fermentativt. Av de 16 bakteriestammene isolert fra *Strongylocentrotus droebachiensis* i denne oppgaven viste minst 12 (75 %) vekst på alginat. En stamme viste i tillegg tydelig degradering av alginat på tross av dårlig vekst (Figur 3.1). Antall dyrkbare kolonier fra kråkebolletarmene var $2,1 \times 10^8$ per gram tarm, noe som er i overkant av tidligere funn (Sawabe et al., 1995).

Det er tidligere vist at alginatdegraderende bakterier er assosiert med nedbryting av tare (Ivanova et al., 2002) og bakteriestammer ble derfor isolert fra råtnende tare. Det ble funnet rundt $10^7 - 10^8$ dyrkbare kolonier per gram prøve, noe som samsvarer med hva som tidligere er rapportert (Ivanova et al., 2002; Tang et al., 2008). Det er antatt at alginatdegraderende bakterier er involvert i den tidlige prosessen for nedbrytingen av tare, og at andre bakteriestammer vil komme til etter hvert (Ivanova et al., 2002). Stammene ble isolert etter tre ukers inkuberingstid ved romtemperatur, og 11 av 12 isolerte stammer viste da ulik grad av vekst på alginat (Figur 3.2).

Det ble ved isolering av bakteriestammer både fra kråkebolletarm og tare benyttet agarplater med alginat. Andel alginatdegraderende bakteriestammer er derfor ikke nødvendigvis representativ for hele utvalget av dyrkbare kolonier i prøven, da disse vil være favorisert allerede fra prøveuttak. Grunnen til at de isolerte stammene i første omgang kun ble dyrket aerobt på alginat, var at det var svært tidkrevende å sette opp dyrkingsforsøk med så mange stammer. Hensikten var, allerede etter dyrking på alginat, å kunne velge bort de stammene som ikke viste god vekst.

Alle *Vibrio splendidus*-stammer fra UMB og innkjøpte stammer vokste aerobt på alginat (Figur 3.3 og Figur 3.6). For disse stammene ble veksten på flere andre substrat også undersøkt. Dette var substrat som er aktuelle i forhold til omsetting av tare, som forklart i Avsnitt 1.2.3. Hvis det kun skal benyttes én organisme til å fermentere tare for produksjon av bioetanol, burde denne være i stand til å fermentere både alginat, mannitol og glukose. Ettersom målet med oppgaven var å finne bakteriestammer som

3. Resultater og diskusjon

kunne omsette disse substratene med en fermentativ metabolisme, ble de hovedsakelig dyrket anaerobt. Det ble ikke benyttet anaerobt medium ved anaerob dyrking, og det vil derfor være litt oksygen tilgjengelig ved start.

På mannitol ble stammene dyrket både aerobt og anaerobt. De fleste stammene viste god vekst aerobt, og vokste også anaerobt selv om celleutbyttet da var kraftig redusert, se Figur 3.4 og Figur 3.7. Horn *et al* (2000a) gjorde et lignende forsøk hvor en etanolfermenterende stamme ble dyrket aerobt og anaerobt på medium med mannitol. Her ble det rapportert om ingen vekst ved anaerobe forhold, som følge av forstyrrelse av redoksbalansen. Som forklart i Avsnitt 1.2.4 kan det være vanskelig å produsere etanol fra mannitol anaerobt, fordi redoksreaksjonen ikke er balansert. I forsøkene utført med innkjøpte stammer, viser produktanalysen at etanol har blitt produsert fra mannitol i de anaerobe rørene, samt andre produkt som laktat og format. Dette kan skyldes at noe oksygen var tilstede i rørene, eller at stammene har andre metoder for å regenerere NAD⁺.

Det viste seg at *Vibrio alginolyticus* 2047 var den eneste stammen som viste tegn til å vokse på glukuronsyre (Figur 3.7), mens alle stammene dyrket på glukuronsyre viste vekst på alginat. Det ser derfor ut til at uronsyrene i alginat kan omsettes uten essensielle enzym for omsetting av glukuronsyre. Farmer & Eagon (1969) fant det uventede resultatet at ingen av de alginatdegraderende bakteriene de hadde isolert vokste på mannuronat, som antas å gå inn i nedbrytingssporet til glukuronsyre. Dette styrker teorien om at alginat brytes ned til umettede uronsyrer, som videre reduseres til 2-keto-3-deoxy-D-glukonat og går direkte inn i for eksempel Entner-Doudoroff sporet (Avsnitt 1.4.2).

Fra *Vibrio splendidus*-stammene var det i hovedsak produktet acetat som ble funnet ved anaerob vekst, se Figur 3.5. Acetat kan også produseres ved aerob omsetting fra acetyl-CoA (Berg *et al.*, 2007), og er derfor ikke et sikkert tegn på fermentativ metabolisme. Enkelte av stammene vokste likevel over en lengre periode anaerobt på substratene, og selv om ikke mediene var anaerobe ved start, vil ikke tilgjengelig oksygenet ha vart lenge nok til at observert vekst kun var aerob. Det ble også observert andre topper i kromatogrammet som ikke ble identifisert. Disse kan ha vært andre fermenteringsprodukt.

3. Resultater og diskusjon

For de innkjøpte stammene ble det registrert sikre fermenteringsprodukt som laktat og etanol (Figur 3.9). Det er tidligere rapportert om produksjon av både laktat, acetat og format fra fermentering av alginat (Sawabe *et al.*, 2003). I tillegg har den obligat anaerobe stammen *Clostridium grantii* i en studie vist å kunne omsette alginat til acetat, etanol, format og CO₂ (Mountfort *et al.*, 1994). I screeningforsøkene gjort i denne oppgaven ble hovedsakelig acetat produsert fra alginat, og noe laktat og format. Dette viser at det er mulig å omsette alginat fermentativt. I tillegg ble succinat observert i prøvene, men dette er ikke et endeprodukt i noe fermenteringsspor. Som forklart i Avsnitt 1.4.2, kan acetat produseres fra pyruvat ved reduksjon av NAD⁺ til NADH₂. I likhet med ved produksjon av etanol, oksideres NADH₂ til NAD⁺ ved fermentering av laktat fra pyruvat (Maicas *et al.*, 2002). Hvis halvparten av pyruvatet danner acetat, og andre halvdel laktat, vil redoksreaksjonen være balansert. Det kan se ut til at dette skjer i stammen *Enterobacteriaceae* 1994 ved fermentering av alginat, hvor det ble observert acetat og laktat. Det vil i så fall bety at stammen foretrekker å regenerere NAD⁺ ved laktatfermentering i stedet for ved etanolfermentering. Blant de innkjøpte stammene var det *Vibrio alginolyticus* 2047 og *Enterobacteriaceae* 1994 som viste tydelig produktdannelse ved vekst på alginat. To av de innkjøpte stammene produserte etanol ved vekst på mannitol og glukose, men av disse var det kun *Enterobacteriaceae* 1994 som vokste godt på alginat. Lee & Lee (2011) har også vist at stammer innenfor denne familien har etanolproduksjon og vokser på alginat.

Det var store forskjeller i veksthastighet mellom de ulike gruppene av analyserte bakteriestammer, noe som delvis kan forklares av ulike dyrkingstemperaturer. Det er en sammenheng mellom hvor fort en stamme vokser og hvor høy temperatur den er dyrket på. Høyere temperatur gir høyere veksthastighet opp til et visst punkt (Ratkowsky, 1982). Grunnen til at stammene ble dyrket ved ulike temperaturer var at de kommer fra ulike habitat. Marine bakteriestammer fra for eksempel fordøyelsessystemet til kråkeboller er tilpasset de temperaturene man finner i havet langs norskekysten, mens stammer fra mer eksotiske havområder eller andre ikke-marine miljøer er tilpasset høyere temperaturer. Samtidig som temperatur er en viktig faktor for veksthastighet, er det tydelig at det også er forskjell mellom stammene. Bakteriestammer isolert fra tare vokste opp omtrent fem ganger raskere enn UMB-stammene dyrket ved samme temperatur (Figur 3.2 og Figur 3.3). Det var også store forskjeller individuelt innenfor hver gruppe. For eksempel brukte to av de innkjøpte stammene 80 timer på å nå samme

3. Resultater og diskusjon

OD som andre brukte i underkant av 15 timer på (Figur 3.6). Noe av forklaringen kan være stammenes evne til å bryte ned og tilgjengeliggjøre alginatet for omsetning, eller deres evne til å tilpasse seg vekst på nye substrat. Utforsking av om enkelte av bakteriestammene dyrket ved lave temperaturer kan ha evne til å tilpasse seg høyere dyrkingstemperaturer ville krevd flere dyrkingsforsøk, noe som ligger utenfor rammene av dette arbeidet.

Totalt sett viste screeningforsøkene at mange av de undersøkte bakteriestammene kunne utnytte alginat, og at både kråkebolletarm og nedbrutt tare er gode kilder for alginatdegraderende bakteriestammer. Det ble påvist fermentering av alginat, men ikke med etanolproduksjon. På grunn av de store forskjellene i veksthastighet, var det kun innkjøpte stammer som ble valgt ut til videre arbeid i denne studien. Høy veksthastighet henger som regel sammen med en høy produktivitet, og er derfor ønskelig i en industriell prosess. Dette på tross av at flere stammer i de andre gruppene viste god vekst på alginat, og at i alle fall bakteriestammer fra kråkebolletarm med stor sannsynlighet hadde en fermentativ metabolisme. Ettersom det kun ble funnet en stamme som kunne produsere etanol, *Enterobacteriaceae* 1994, ble det besluttet å gå videre med de beste alginatdegraderende stammene. Dette var *Paenibacillus alginolyticus* 12517, *Paenibacillus chondroitinus* 5051 og *Vibrio alginolyticus* 2047. Selv om metabolismen ikke var av ønsket karakter, kan det være interessant å finne stammer som kan degradere alginat godt. Dette fordi det er mulig å benytte genteknologi og kombinere gener fra ulike stammer for å få de produktene man ønsker.

3.2 FORSØK MED UTVALGTE STAMMER

Som forklart i Avsnitt 2.4 ble stammene valgt ut i screeningforsøket undersøkt videre i flere forsøk, for å kartlegge omsetning av og produktdannelse fra ulike substrat. Stammene ble vurdert fortløpende, og hvilke stammer som er undersøkt er oppgitt i hvert forsøk. En vurdering av forsøkene med utvalgte stammer er gitt i Avsnitt 3.2.5.

3.2.1 VEKST MED ULIK OKSYGENTILGANG

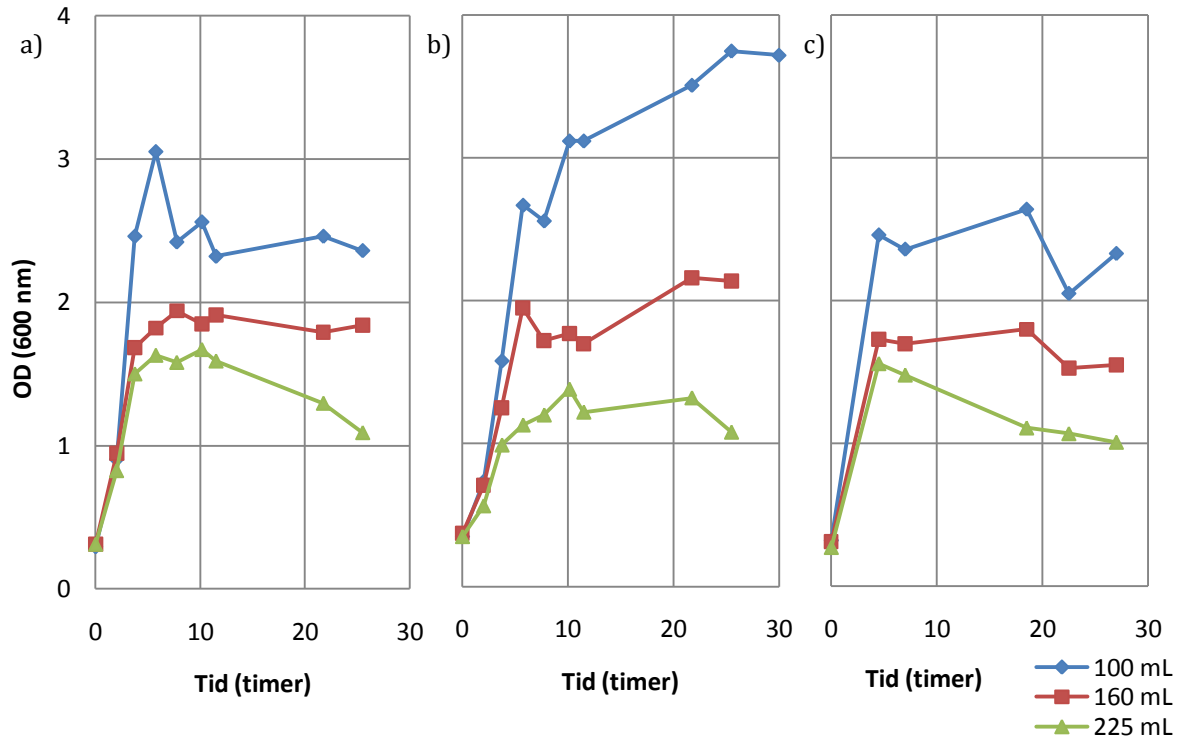
Produktutbyttet ved ulik grad av oksygentilgang under vekst ble analysert for stammene *Enterobacteriaceae* 1994, *Paenibacillus alginolyticus* 12517, *Paenibacillus chondroitinus* 5051 og *Vibrio alginolyticus* 2047. For å variere oksygentilgangen ble det tilsatt ulikt volum av medium i kolbene. Dette vil kunne gi en indikasjon både på når stammene vokser best, og hvordan produktsammensetning endrer seg når oksygentilførselen begrenses.

Stammene ble dyrket på glukose, i tillegg til alginat, da ulike substrat kan brytes ned gjennom ulike fermenteringsspor. Selv om ikke stammene produserte etanol fra alginat, var det interessant å undersøke hvilke fermenteringsspor de brukte fra andre substrat. Hensikten med å kombinere mannitol og alginat var å se hvordan kombinasjonen av disse substratene påvirket veksten og produktutbyttet ved ulik grad av oksygentilgang, da begge forekommer naturlig i tare.

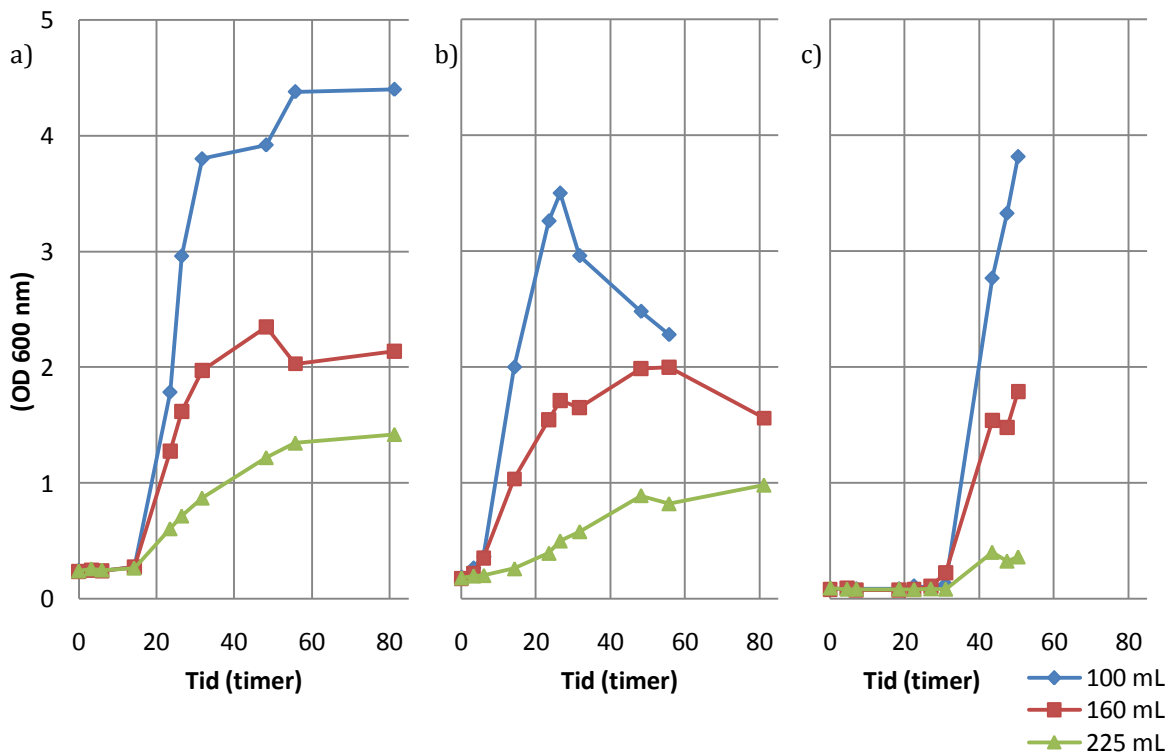
VEKSTFORLØP

Vekstkurvene viser tydelig at stammene generelt vokser minst like godt på alginat som glukose. Alle stammene oppnådde høyest OD på substratene når volumet av medium i kolben var 100 mL. *Enterobacteriaceae* 1994 oppnådde en mye høyere OD verdi enn resten av stammene (Figur 3.13), særlig på mediet med alginat og mannitol i kombinasjon. *Paenibacillus*-stammene brukte lengst tid på å vokse opp (Figur 3.11 og Figur 3.12), og *Paenibacillus alginolyticus* 12517 ble avsluttet for tidlig ved vekst på alginat og mannitol kombinert. Det kommer derfor ikke frem av vekstkurven når denne flatet ut. *Vibrio alginolyticus* 2047 flatet tidlig ut på alle substratene, og nådde en mye lavere OD enn det som tidligere hadde vært observert. Særlig var veksten på alginat og mannitol i kombinasjon lav (Figur 3.10).

3. Resultater og diskusjon

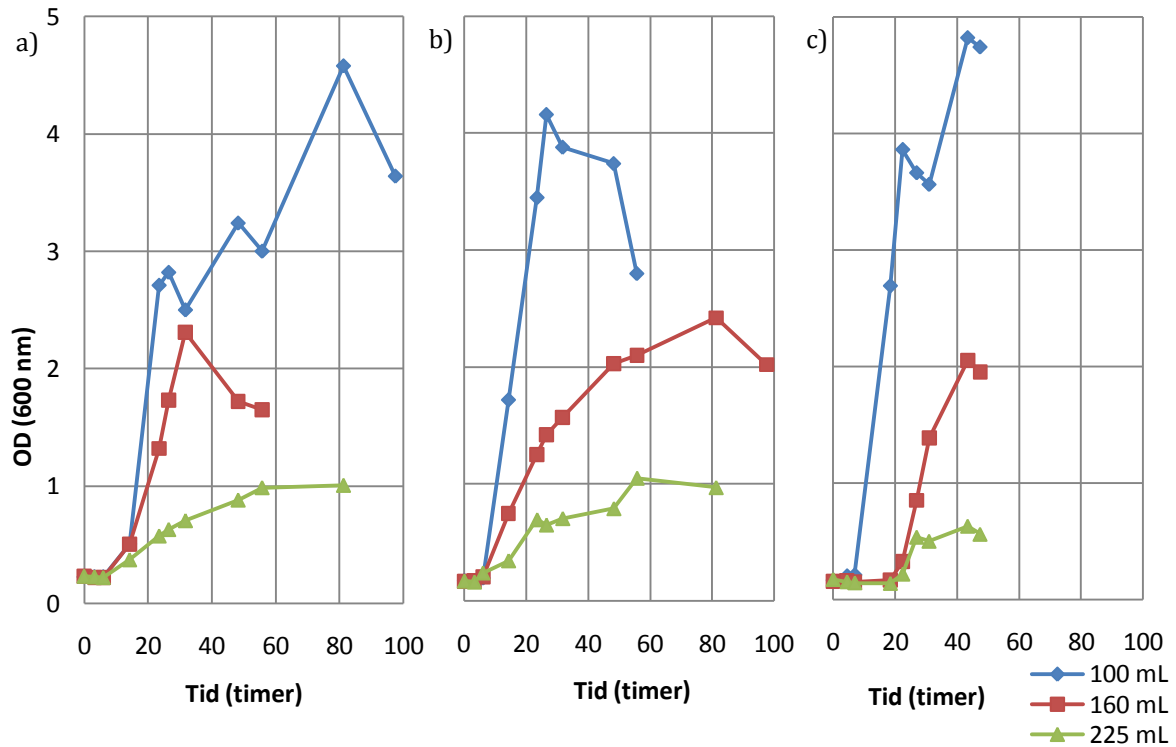


Figur 3.10: *Vibrio alginolyticus* 2047 vekst på a) glukose, b) alginat og c) alginat og mannitol kombinert. Stammen ble dyrket på hvert substrat med tre ulike volum av medium i kolben. Blå kurve viser vekst med 100 mL medium, rød kurve med 160 mL medium og grønn kurve med 225 mL medium

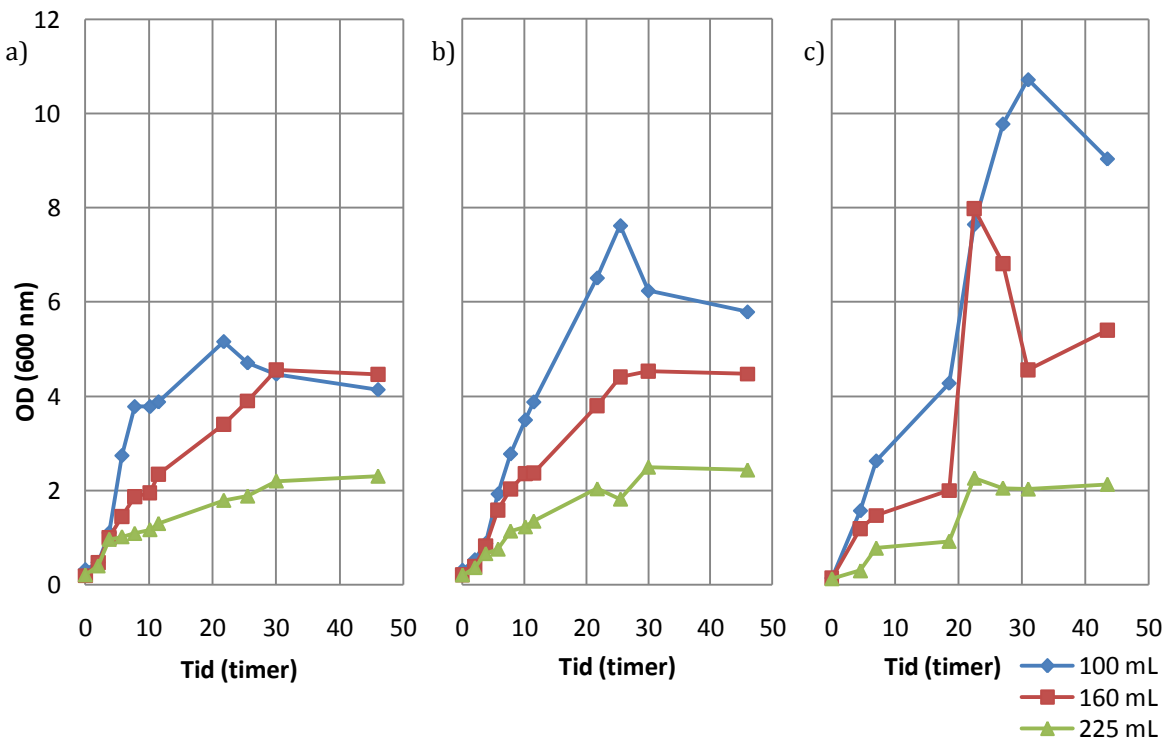


Figur 3.11: *Paenibacillus alginolyticus* 12517 vekst på a) glukose, b) alginat og c) alginat og mannitol kombinert. Stammen ble dyrket på hvert substrat med tre ulike volum av medium i kolben. Blå kurve viser vekst med 100 mL medium, rød kurve med 160 mL medium og grønn kurve med 225 mL medium.

3. Resultater og diskusjon



Figur 3.12: *Paenibacillus chondroitinus* 5051 vekst på a) glukose, b) alginat og c) alginat og mannitol kombinert. Stammen ble dyrket på hvert substrat med tre ulike volum av medium i kolben. Blå kurve viser vekst med 100 mL medium, rød kurve med 160 mL medium og grønn kurve med 225 mL medium.

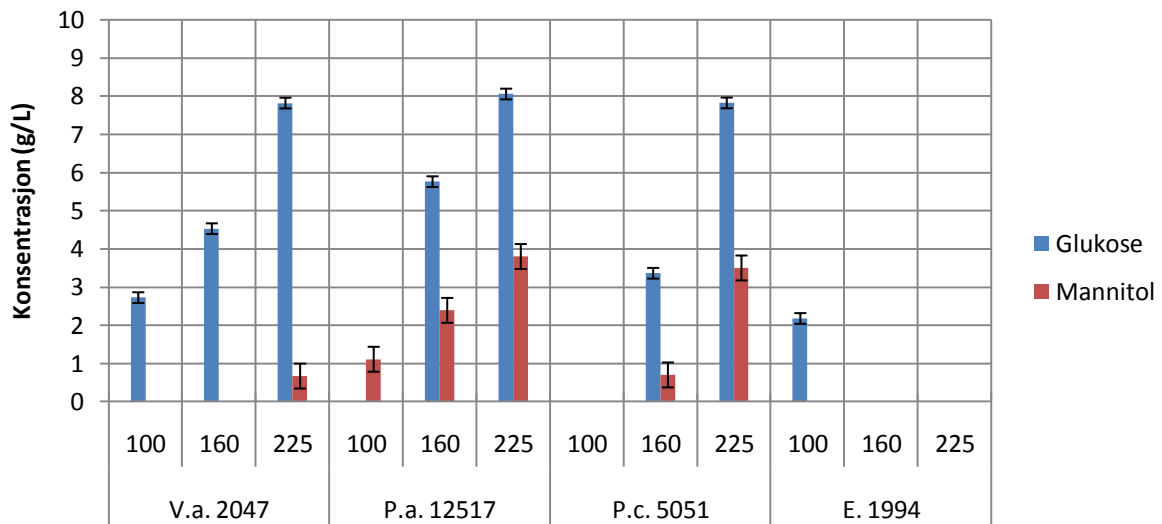


Figur 3.13: *Enterobacteriaceae* 1994 vekst på a) glukose, b) alginat og c) alginat og mannitol kombinert. Stammen ble dyrket på hvert substrat med tre ulike volum av medium i kolben. Blå kurve viser vekst med 100 mL medium, rød kurve med 160 mL medium og grønn kurve med 225 mL medium.

SUBSTRATOMSETNING OG PRODUKTDANNELSE

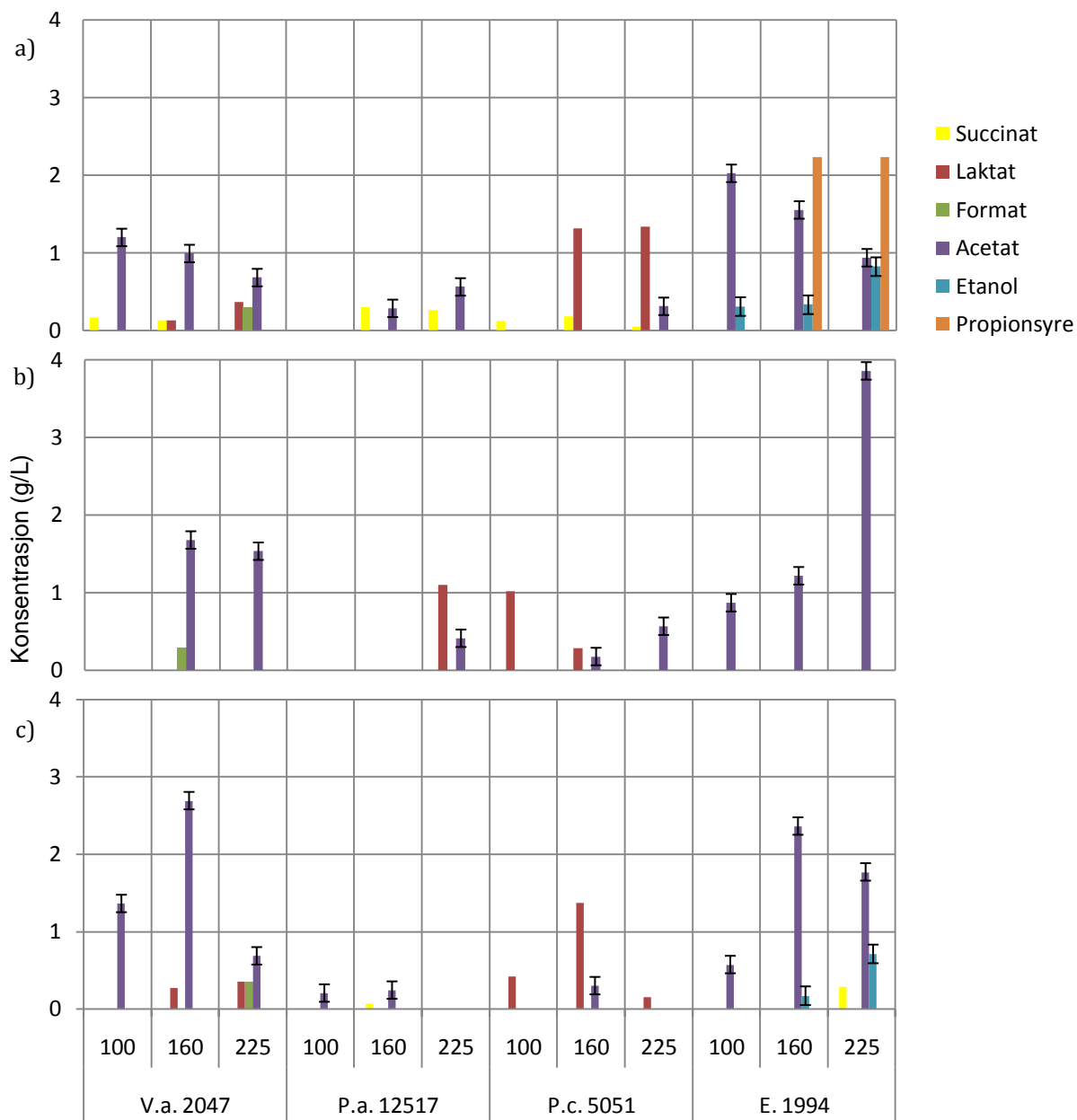
Analyse av sluttprøver fra kulturene viste produksjon av flere ulike fermenteringsprodukt, der acetat dominerte i flere av prøvene (Figur 3.15). Det var også store forskjeller mellom substratkonsentrasjon i prøvene, noe som kommer frem av Figur 3.14. Da alginat ikke kan detekteres av HPLC-metoden, er kun konsentrasjoner for glukose og mannitol vist. *Paenibacillus*-stammene og *Vibrio alginolyticus* 2047 viste en klar trend for høyere substratomsetning i et mer aerobt miljø, både for glukose og mannitol. For *Enterobacteriaceae* 1994 var det kun kulturen med 100 mL glukosemedium som ikke hadde omsatt alt substratet.

Identifikasjonen av succinat, laktat og format er noe usikker da retensjonstidene varierer mye innen samme kjøring, og standardene ikke ble analysert samtidig som prøvene. Etanol ble kun funnet i prøver fra stammen *Enterobacteriaceae* 1994, i kulturene dyrket på glukose og mannitol og alginat i kombinasjon. Stammen ga en økende etanolproduksjon jo lavere oksygentilførsel kulturen ble dyrket ved. For *Vibrio alginolyticus* 2047 var konsentrasjonen av produktene høyest i kolbene med 100 eller 160 mL medium, men selv når det tas hensyn til mengde omsatt substrat er produktutbytte høyere ved anaerobe forhold. *Paenibacillus*-stammene ga i mange av prøvene lite eller ingen produkt, mens laktat eller acetat dominerte der produkt ble påvist.



Figur 3.14: Substratkonsentrasjon i sluttprøver fra de ulike kulturene delt inn etter stamme og medievolum. De blå søylene viser konsentrasjon av glukose i sluttprøver fra kulturer dyrket på glukose. De røde søylene viser konsentrasjon av mannitol i sluttprøver av kulturer dyrket på alginat og mannitol kombinert. Feilfeltene angitt viser standardavvik for standarder med kjent konsentrasjon av samme stoff analysert minst fem ganger (Vedlegg V5).

3. Resultater og diskusjon

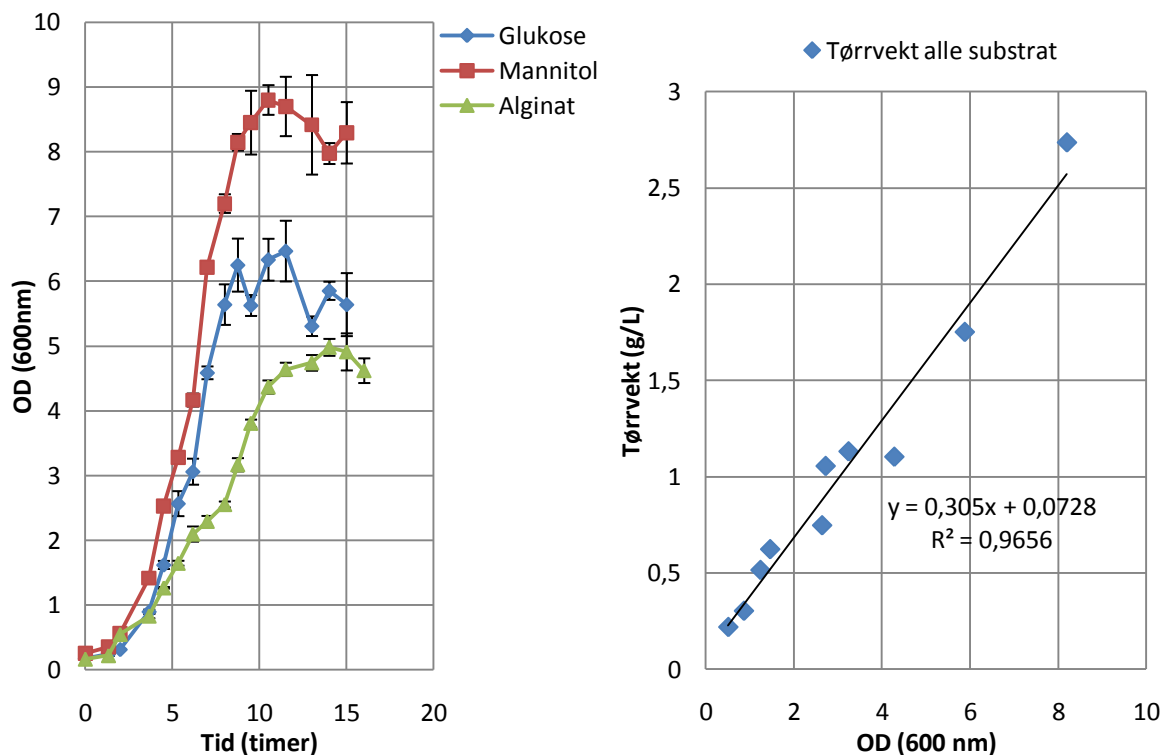


Figur 3.15: Produkt fra vekst på a) glukose, b) alginat og c) alginat og mannitol kombinert. Feilfeltene angitt for acetat og etanol viser standardavvik for standarder med kjent konsentrasjon av samme stoff analysert fem ganger (Vedlegg V5).

3.2.2 VEKSTUTBYTTE OG VEKSTHASTIGHET

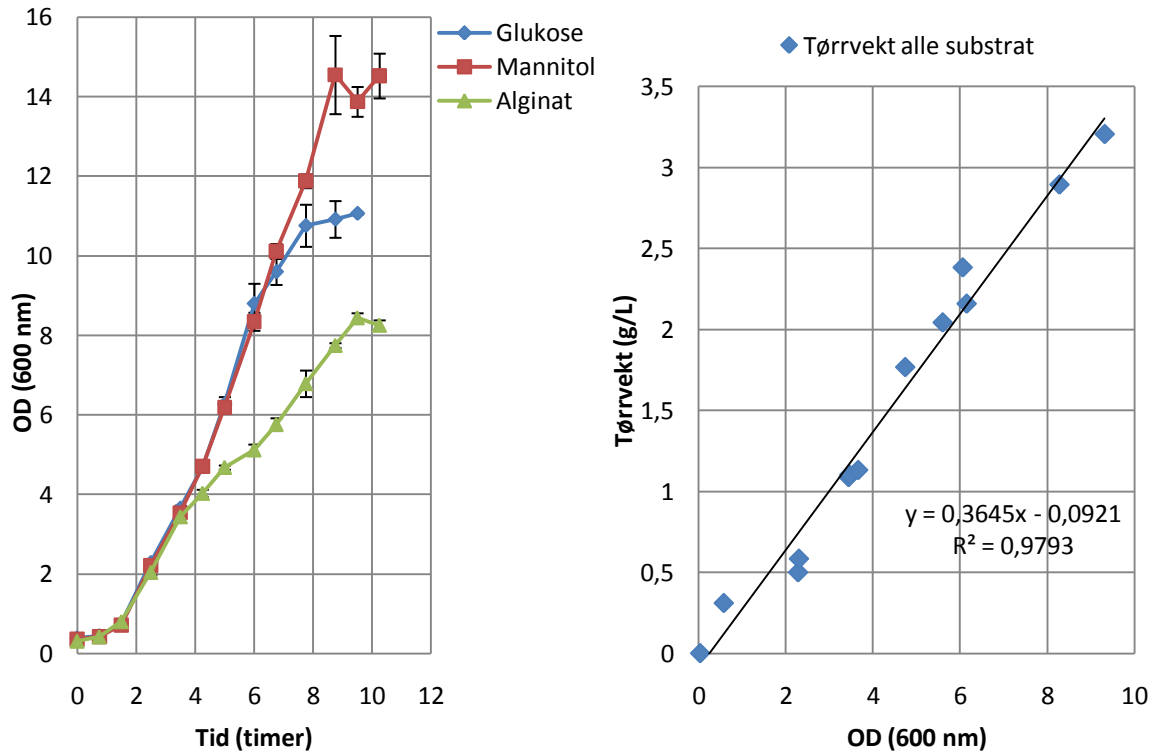
Basert på forsøk med redusert oksygentilførsel ble stammene *Enterobacteriaceae* 1994 og *Vibrio alginolyticus* 2047 valgt ut som de mest interessante stammene. Maksimal veksthastighet og celleutbytte fra substratene glukose, mannitol og alginat ble derfor funnet for de to stammene ved opparbeidelse av en standardkurve for OD og tørrvekt.

Vekstforløp på de tre substratene og forholdet mellom OD og tørrvekt for de to stammene er vist i Figur 3.16 og Figur 3.17. Begge stammene oppnådde høyest OD på mannitol, og lavest på alginat. Generelt nådde *Vibrio alginolyticus* 2047 en høyere OD enn *Enterobacteriaceae* 1994 på alle substrat.. For begge stammene ga veksten på de ulike substratene tilnærmet like forhold mellom OD og tørrvekt. Det er derfor beregnet en felles likning som angir forholdet mellom OD og tørrvekt for hver stamme, uavhengig av substrat. Forholdet mellom OD og tørrvekt ble senere brukt til å beregne celleutbytte i kulturer.



Figur 3.16: Til venstre: *Enterobacteriaceae* 1994 vekst på glukose, mannitol og alginat. Feilfelt viser standardavvik mellom tre paralleller. Til høyre: Forhold mellom OD og tørrvekt for alle substrat. I likningen angir y tørrvekt målt i g/L, og x OD målt ved 600 nm.

3. Resultater og diskusjon



Figur 3.17: Til venstre: *Vibrio alginolyticus* 2047 vekst på glukose, mannitol og alginat. Feilfelt viser standardavvik mellom tre paralleller. Til høyre: Forhold mellom OD verdier og tørrvekt for alle substrat. I likningen angir y tørrvekt målt i g/L, og x OD målt ved 600 nm.

Den eksponentielle delen av hver vekstkurve ble brukt til å beregne maksimal veksthastighet (μ). Utrekninger av veksthastighet ble gjort som forklart i Vedlegg V6. Tabell 3.2 viser veksthastighetene for stammene på de ulike substratene. Generelt hadde *Vibrio alginolyticus* 2047 en høyere veksthastighet enn *Enterobacteriaceae* 1994, men få punkt i det eksponentielle området gjorde resultatene usikre. Veksthastigheten på alginat var lavere enn for de andre substratene, og forskjellen var større for *Enterobacteriaceae* 1994 enn for *Vibrio alginolyticus* 2047.

Tabell 3.2: Maksimal veksthastighet (μ) for *Enterobacteriaceae* 1994 og *Vibrio alginolyticus* 2047 ved vekst på glukose, mannitol og alginat.

Stamme	Substrat	Veksthastighet μ (h ⁻¹)
<i>Enterobacteriaceae</i> 1994	Glukose	0,64
	Mannitol	0,61
	Alginat	0,51
<i>Vibrio alginolyticus</i> 2047	Glukose	0,95
	Mannitol	0,96
	Alginat	0,90

3.2.3 FERMENTERING AV ALGINAT OG MANNITOL

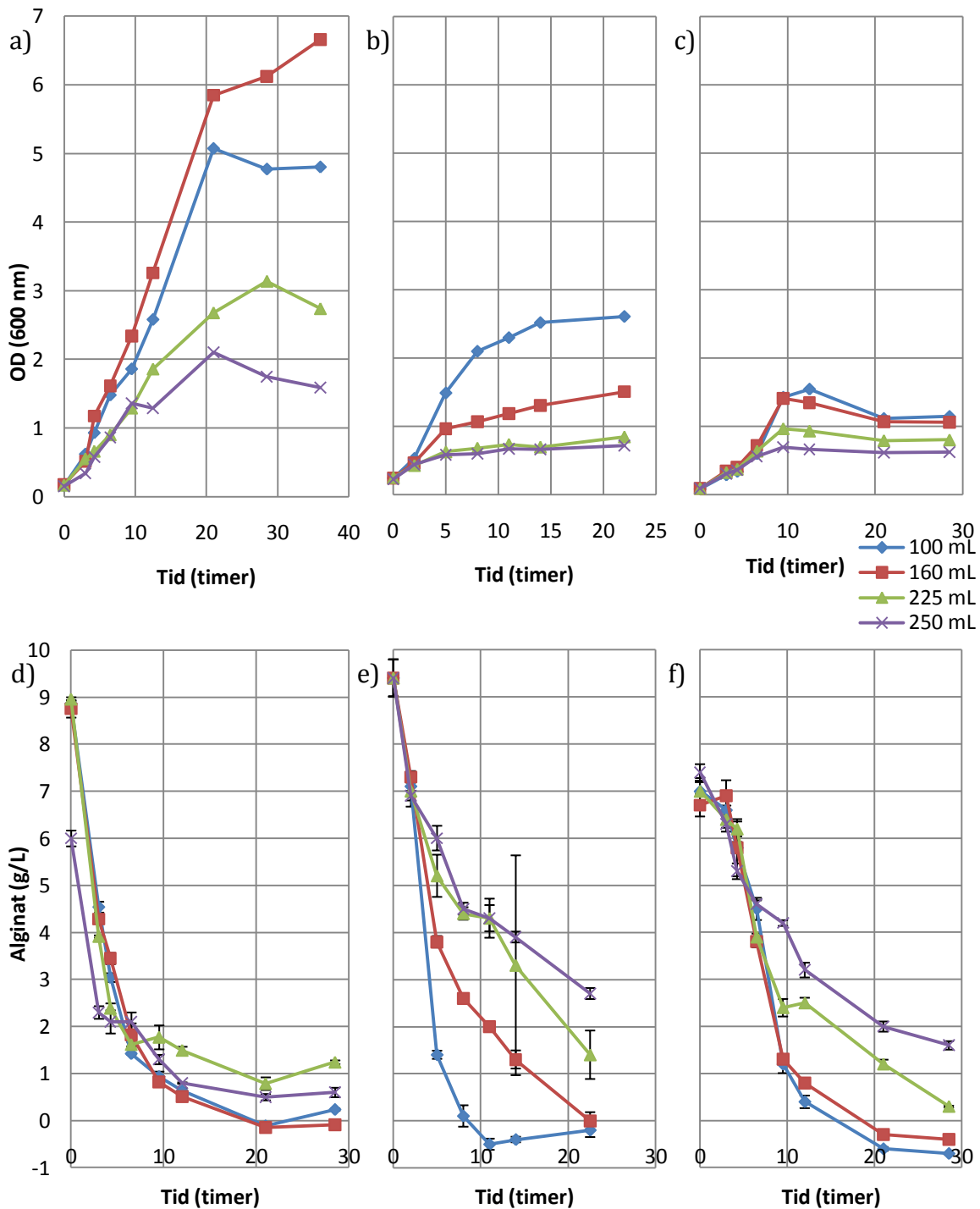
Det ble gjort et utvidet forsøk med vekst på alginat og mannitol med ulik oksygentilgang for stammene *Vibrio alginolyticus* 2047 og *Enterobacteriaceae* 1994. Det ble tatt ut prøver underveis i dyrkingen for analyse av substratomsetting og produktutbytte, for å få et mer detaljert bilde av fermenteringen av substratene. I tillegg til de utvalgte stammene ble *Vibrio haliotocoli* 21474 tatt med i dyrkingen på alginat. Den virket lovende med tanke på alginatdegradering fra litteratursøk (Avsnitt 2.2.4), og ble derfor etterbestilt og dyrket.

Alle mediene ble laget med 10 g/L substrat, men resultatene viste likevel at den faktiske substratkonsentrasjonen varierte noe mellom stammene. Det er noe usikkert hva dette skyldes, men det kan komme av feil i analysen. Ved hjelp av likningen som angir forholdet mellom OD og cellemasse, ble det beregnet celleutbytte (Y_{XS}) og spesifikk produktivitet (q_p) for stammene *Enterobacteriaceae* 1994 og *Vibrio alginolyticus* 2047. Produktutbytte og veksthastigheten under eksponentiell vekst ble også beregnet for de ulike kulturene. Formler for utregninger er vist i Vedlegg V6. Veksten var ikke eksponentiell i et særlig stort område, noe som gjør resultatene usikre.

FERMENTERING AV ALGINAT

Figur 3.18 viser vekstforløp for de tre stammene på alginat og alginatkonsentrasjon i kulturene under vekst. Stammen *Enterobacteriaceae* 1994 kom opp i høyest OD for alle medievolumentene, mens *Vibrio haliotocoli* 21474 vokste dårligst. *Enterobacteriaceae* 1994 viste bedre vekst på substratet når forholdene var litt mer anaerobe, og oppnådde høyere OD i kolben med 160 mL enn i kolben med 100 mL medium. De andre stammene foretrakk begge et aerobt miljø. Selv om celleutbyttet av *Vibrio alginolyticus* 2047 var lavere enn veksten av *Enterobacteriaceae* 1994 omsatte den alginatet i den mest aerobe kolben raskere. Metoden for å beregne alginatkonsentrasjon, enzymatisk alginatanalyse, er noe usikker når konsentrasjon av alginat nærmer seg 0. Dette forklarer at noen av prøvene viser negative verdier i Figur 3.18. Usikkerheten kommer av at alginat er en gruppe polymerer med stor heterogenitet, og standarden er ikke helt lik substratet i prøvene. Startkonsentrasjonen for *Enterobacteriaceae* 1994 250 mL avvek mye fra resten, og er mest sannsynlig feil. Dette vil mest sannsynlig ha innvirkning på produktutbyttet da beregning baseres på et underestimert substratopptak.

3. Resultater og diskusjon

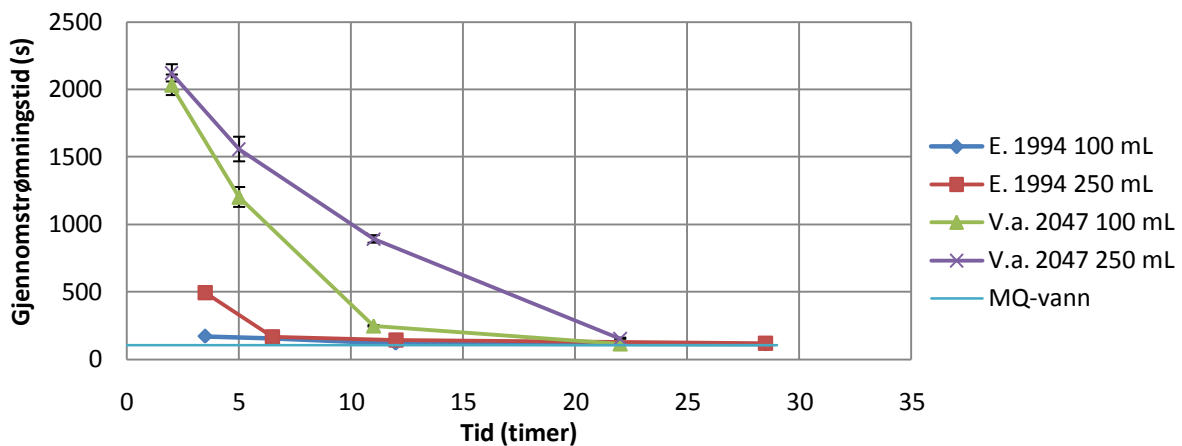


Figur 3.18: De tre øverste grafene viser vekst på alginat og de tre nederste grafene viser alginatkonsentrasjonen for (a/d) *Enterobacteriaceae* 1994, (b/e) *Vibrio alginolyticus* 2047 og (c/f) *Vibrio haliotocoli* 21474. Feilfelt viser standardavvik mellom tre paralleller.

Viskositetsmålinger ble også utført for å gi et bilde av alginatkonsentrasjonen i prøvene (Figur 3.19). Det viste seg å ikke alltid være samsvar mellom viskositetsmålingene for de ulike stammene og alginatkonsentrasjonen i prøvene målt med enzymatisk alginatanalyse. Viskositetsmålingene ble utført som en ekstra kontroll, og da kun på prøver fra stammene *Enterobacteriaceae* 1994 og *Vibrio alginolyticus* 2047, og kolbene

3. Resultater og diskusjon

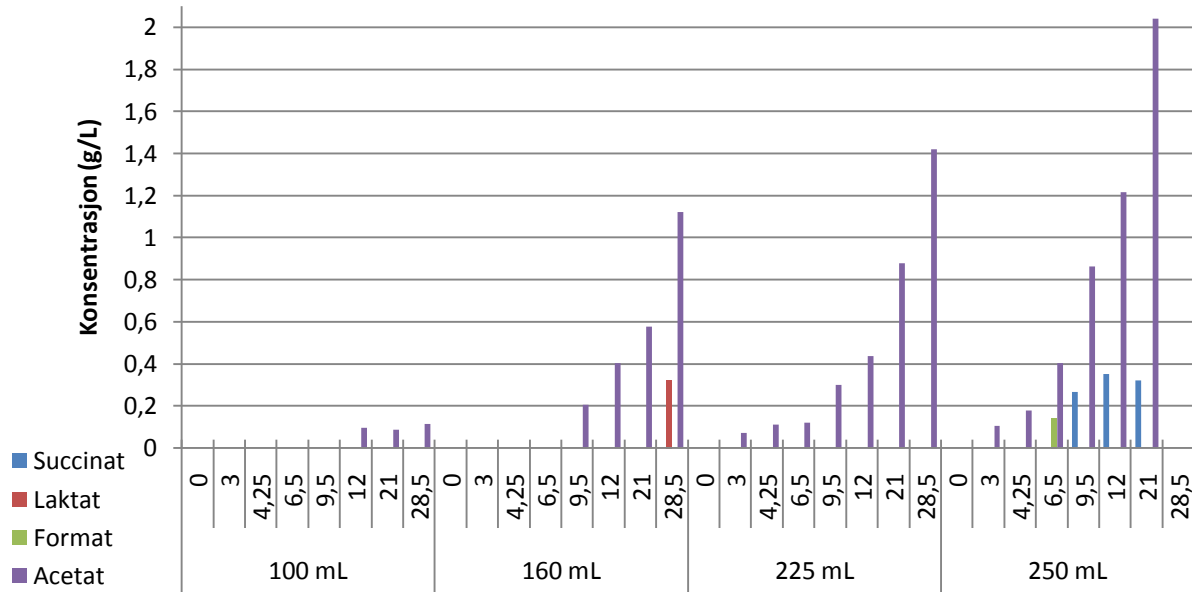
med volum 100 mL og 250 mL. Forholdet mellom kolbene med ulikt volum var som forventet, der viskositeten gikk raskere ned i kolben med 100 mL enn i kolben med 250 mL. Mellom stammene var det, noe uventet, stor forskjell i viskositet. *Vibrio alginolyticus* 2047 ga mye høyere viskositet enn *Enterobacteriaceae* 1994. Alle sluttprøvene hadde en viskositet litt høyere enn MilliQ-vann, som var utgangspunktet for mediene før tilsetning av alginat. For å unngå at volumet av medium i kolbene skulle endres for mye ble antall prøveuttak begrenset. Det ble blant annet ikke tatt ut prøve til viskositet ved start.



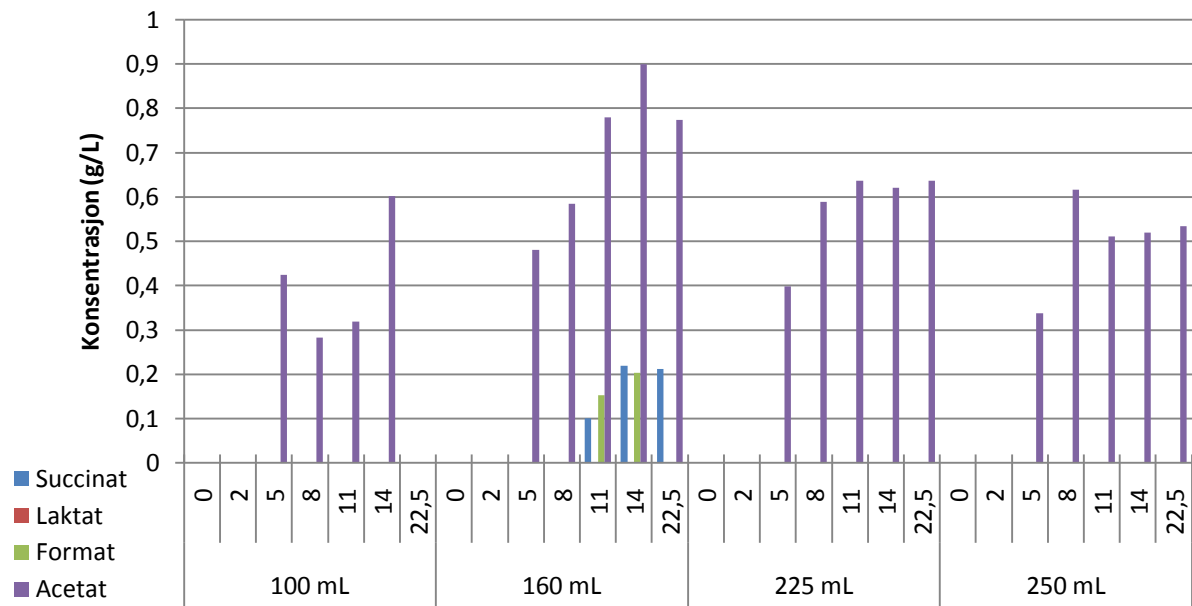
Figur 3.19: Viskositet i prøver fra *Enterobacteriaceae* 1994 og *Vibrio alginolyticus* 2047, fra kolber med 100 mL og 250 mL medium. Feilfelt viser standardavvik mellom tre paralleller.

Analyse av fermenteringsprodukt viste at acetat dominerte som produkt i alle kulturene (Figur 3.20, Figur 3.21 og Figur 3.22). Analysene i forsøket ble benyttet til å beregne veksthastighet, celleutbytte og produktutbytte fra substrat (Tabell 3.3). Beregningene viste at produktutbyttet fra substrat var høyest for *Enterobacteriaceae* 1994, og da i kolben med 250 mL medium. Dette ser ut til å stemme på tross av underestimert av substratopptak, da konsentrasjonen av acetat i prøven var veldig høy (Figur 3.20). For de to andre stammene var produktutbyttet fra substrat størst i kolbene med 160 mL medium. Celleutbyttet fra substrat var høyere for *Enterobacteriaceae* 1994 enn for *Vibrio alginolyticus* 2047. Dette ble ikke beregnet for *Vibrio halioticoli* 21474, da forholdet mellom OD og cellemasse ikke var funnet for denne stammen. Maksimal veksthastighet ble funnet for stammene, men det eksponentielle området var svært lite, og beregningene er derfor noe usikre. *Vibrio alginolyticus* 2047 hadde lavest veksthastighet.

3. Resultater og diskusjon

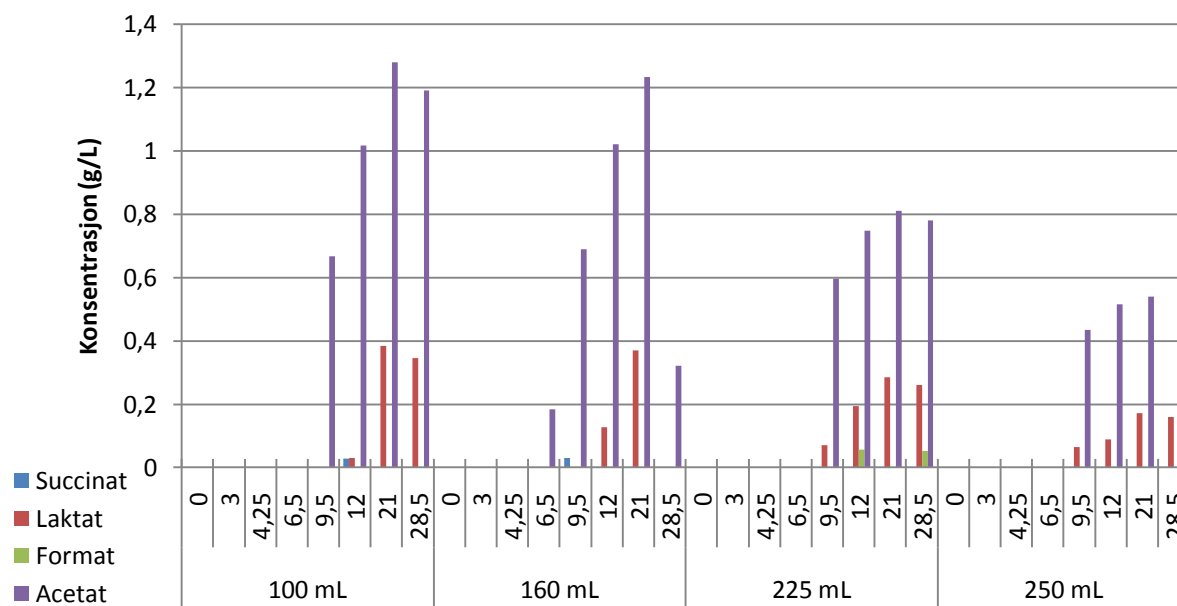


Figur 3.20: Produkt fra *Enterobacteriaceae* 1994 dyrket på alginat. Produktkonsentrasjon i kulturene er vist ved timer etter inokulering, og for fire kolber med ulikt volum av medium. Kromatogrammet for prøven ved 28,5 timer i kolben med 250 mL medium var ikke lesbart. Usikkerhet i konsentrasjon er utelatt for å øke lesbarheten, men for acetat er standardavviket for prøver med kjent konsentrasjon $\pm 0,11$ g/L.



Figur 3.21: Produkt fra *Vibrio alginolyticus* 2047 dyrket på alginat. Produktkonsentrasjon i kulturene er vist ved timer etter inokulering, og for fire kolber med ulikt volum av medium. Usikkerhet i konsentrasjon er utelatt for å øke lesbarheten, men for acetat er standardavviket for prøver med kjent konsentrasjon $\pm 0,11$ g/L (Vedlegg V5).

3. Resultater og diskusjon



Figur 3.22: Produkt fra *Vibrio haliotocoli* 21474 dyrket på alginat. Produktkonsentrasjon i kulturene er vist ved timer etter inokulering, og for fire kolber med ulikt volum av medium. Usikkerhet i konsentrasjon er utelatt for å øke lesbarheten, men for acetat er standardavviket for prøver med kjent konsentrasjon $\pm 0,11$ g/L (Vedlegg V5).

Tabell 3.3: Beregning av veksthastighet (μ), biomasseutbytte (Y_{XS}) og produktutbytte fra substrat (Y_{PS}) ved vekst på alginat. Veksthastighet er beregnet fra OD. Produktutbytte er kun beregnet for acetat, da dette var hovedproduktet i alle kulturer. utbytte fra alginat er basert på monomervekten, $C_6H_8O_6$.

Stamme	Medium i kolbe (mL)	Veksthastighet μ (h^{-1})	Y_{XS} (g celler/ g alginat)	Y_{PS} (acetat/ alginat)	
				g/g	mol/ mol
E. 1994	100	0,42	0,17	0,01	0,04
	160	0,43	0,24	0,13	0,37
	225	0,40	0,12	0,17	0,51
	250	0,30	0,13	0,37	1,09
V.a. 2047	100	0,36	0,09	0,06	0,19
	160	0,27	0,05	0,10	0,28
	225	0,18	0,03	0,08	0,23
	250	0,18	0,02	0,08	0,23
V.h. 21474	100	0,40	-	0,15	0,44
	160	0,43	-	0,18	0,52
	225	0,40	-	0,12	0,35
	250	0,30	-	0,09	0,27

3. Resultater og diskusjon

For de kulturene av *Enterobacteriaceae* 1994 og *Vibrio alginolyticus* 2047 med høyest produktutbytte ble det beregnet spesifikk acetatproduktivitet (q_p) (Tabell 3.4). Beregningene viste at *Enterobacteriaceae* 1994 hadde høyest produktivitet i vekstfasen, mens *Vibrio alginolyticus* 2047 hadde klart høyest produktivitet i den eksponentielle vekstfasen. *Vibrio alginolyticus* 2047 oppnådde høyest q_p av de to stammene, men i et lite område av vekstkurven. *Enterobacteriaceae* 1994 opprettholdt en høyere produktivitet over et større område av vekstkurven.

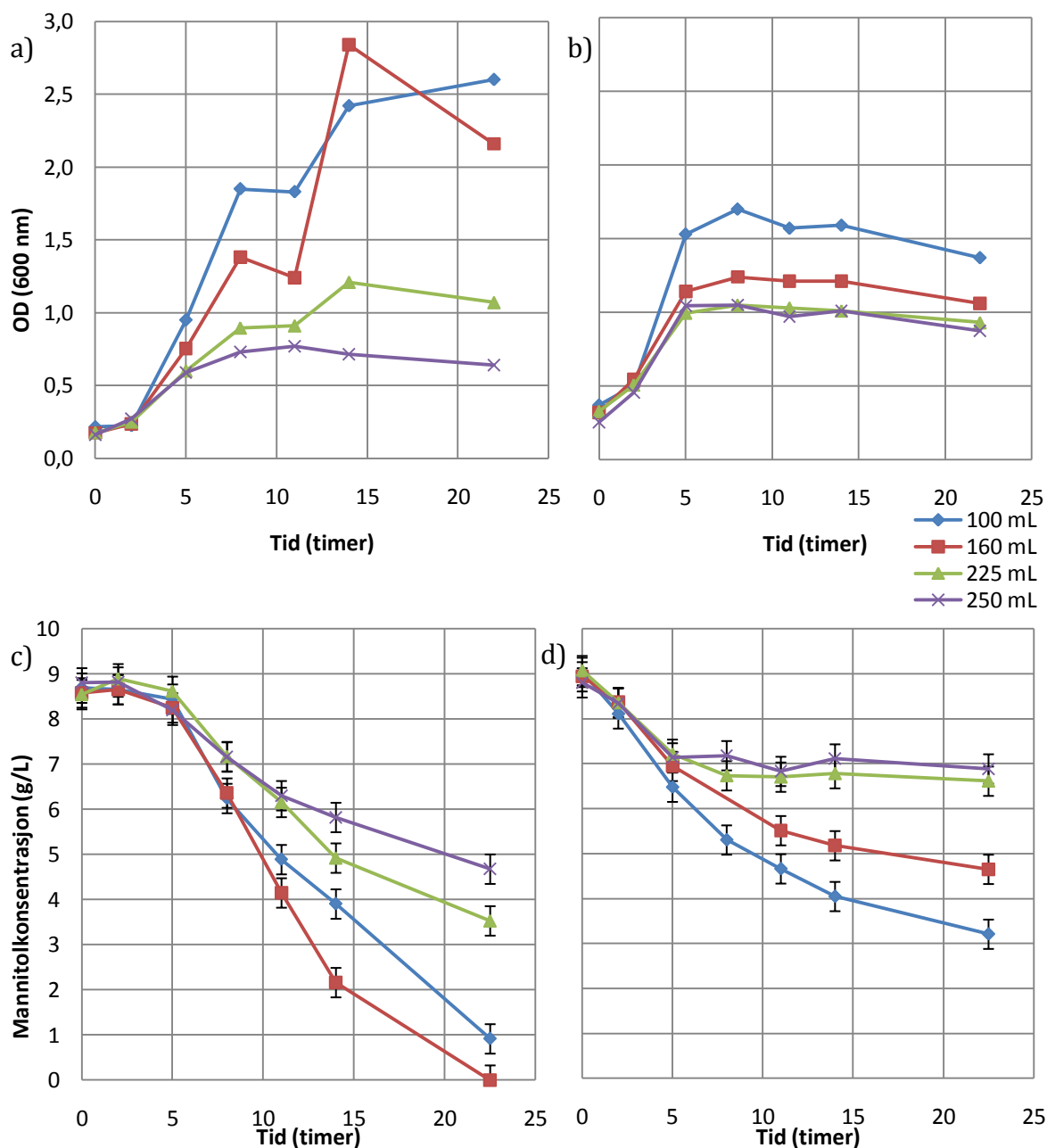
Tabell 3.4: Spesifikk acetatproduktivitet (q_p) for kolbene av *Enterobacteriaceae* 1994 og *Vibrio alginolyticus* 2047 med høyest produktutbytte.

Tid (timer)	<i>Enterobacteriaceae</i> 1994 250 mL q_p (g/g-h)	<i>Vibrio alginolyticus</i> 2047 160 mL q_p (g/g-h)
0-3	0,24	0,95
3-5	0,30	0,70
5-9,5	0,35	0,15
9,5-14	0,24	0,14
14-21	0,15	0,00

FERMENTERING AV MANNITOL

Fra kulturer dyrket på mannitol ble det utført analyser av substratomsetting og produktdannelse. Stammen *Enterobacteriaceae* 1994 oppnådde høyest cellemasse i kolben med 160 mL medium, og det var også omsatt mer substrat i denne kolben sammenlignet med de andre (Figur 3.23). Mannitolomsettingen og veksten for *Vibrio alginolyticus* 2047 var lavere enn for *Enterobacteriaceae* 1994, og veksten flatet tidlig ut for begge stammene.

3. Resultater og diskusjon

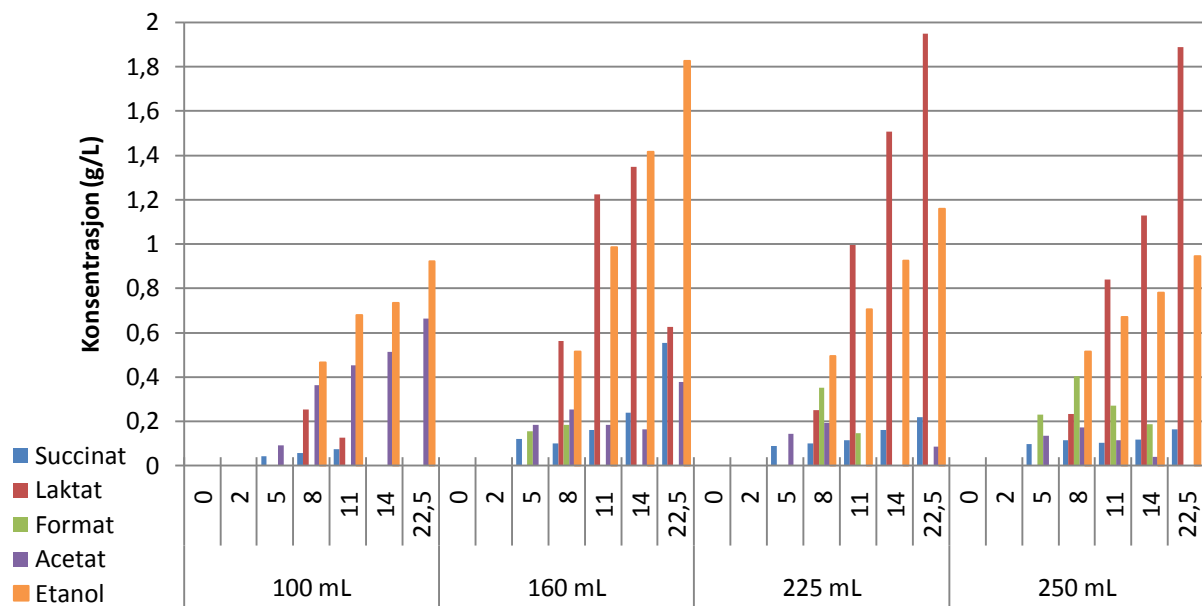


Figur 3.23: De to øverste grafene viser vekst på mannitol, og de to nederste omsetning av mannitol for a)/c) *Enterobacteriaceae* 1994 og b)/d) *Vibrio alginolyticus* 2047. Feilfelt viser standardavvik for prøver med kjent konsentrasjon.

3. Resultater og diskusjon

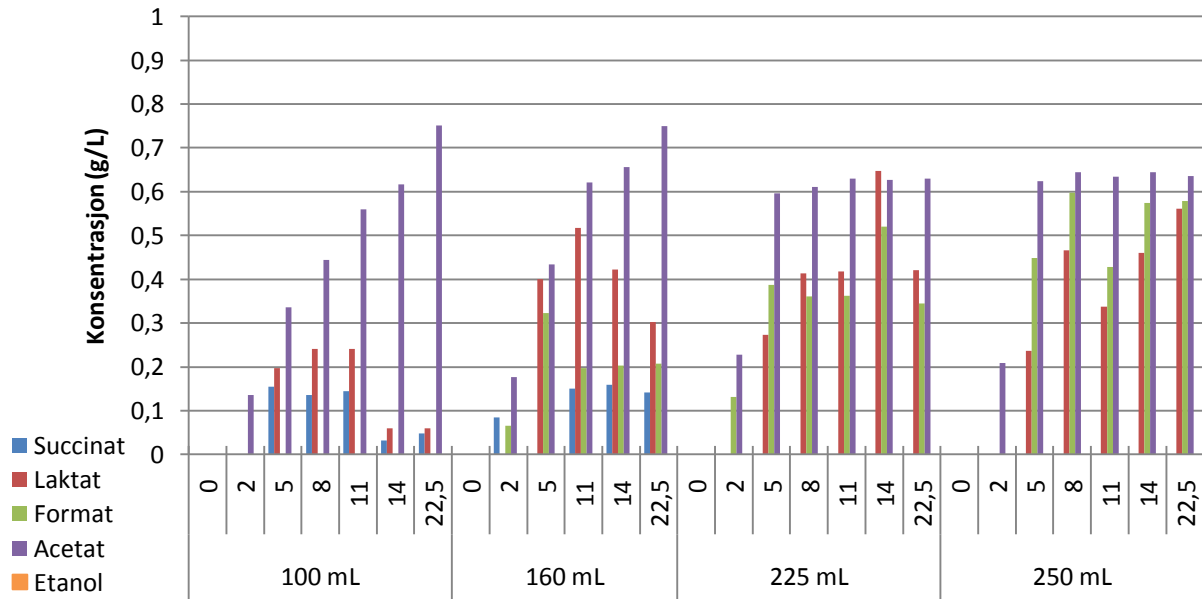
Produktanalyser av kulturene viste at begge stammene produserte flere ulike produkt i alle kolbene. For *Enterobacteriaceae* 1994 dominerte etanol og laktat, og etanolkonsentrasjonen var høyest i kolben med 160 mL (Figur 3.24). For *Vibrio alginolyticus* 2047 dominerte acetat i alle kulturene, men konsentrasjonen av laktat og format var nesten like høy som acetat i de mer anaerobe kolbene (Figur 3.25). Også i disse analysene var det kun standarder for acetat og etanol som ble kjørt sammen med prøvene. Identifisering av de andre produktene er derfor noe usikker.

Selv om det var tydelig at *Enterobacteriaceae* 1994 oppnådde høyest cellemasse på mannitol (Figur 3.23), var den maksimale veksthastigheten høyere for *Vibrio alginolyticus* 2047 (Tabell 3.5). Produktutbyttet fra *Enterobacteriaceae* 1994 ble beregnet for etanol, og fra *Vibrio alginolyticus* 2047 for acetat. For *Enterobacteriaceae* 1994 var produktutbyttet per gram celler høyest i kolben med 250 mL medium, og fra substrat høyest i de to mest anaerobe kolbene. For *Vibrio alginolyticus* 2047 var produktutbyttet per gram celler høyest i kolben med 160 mL medium. Utbyttet fra substrat var høyest i kolben med 250 mL medium.



Figur 3.24: Produkt fra *Enterobacteriaceae* 1994 dyrket på mannitol. Usikkerheten i konsentrasjon er utelatt for å øke lesbarheten, men for etanol er standardavviket for prøver med kjent konsentrasjon $\pm 0,12$ g/L (Vedlegg V5).

3. Resultater og diskusjon



Figur 3.25: Produkt fra *Vibrio alginolyticus* 2047 dyrket på mannitol. Kromatogrammet for prøven ved 8 timer i kolben med 160 mL medium var ikke lesbart. Usikkerheten i konsentrasjon er utelatt for å øke lesbarheten, men for acetat er standardavviket for prøver med kjent konsentrasjon $\pm 0,11$ g/L (Vedlegg V5).

Tabell 3.5: Beregning av veksthastighet (μ), biomasseutbytte (Y_{XS}) og produktutbytte fra substrat (Y_{PX}) ved vekst på mannitol. Veksthastighet er beregnet fra OD. Produktutbytte er for stammen *Enterobacteriaceae* 1994 beregnet for etanol, og for stammen *Vibrio alginolyticus* 2047 beregnet for acetat.

Stamme	Medium i kolbe (mL)	Veksthastighet μ (h^{-1})	Y_{XS} (g celler/ g mannitol)	Y_{PS} (produkt/ mannitol)	
				g/g	mol/ mol
E. 1994	100	0,48	0,11	0,12	0,46
	160	0,39	0,11	0,21	0,82
	225	0,25	0,09	0,23	0,90
	250	0,26	0,08	0,23	0,89
V.a. 2047	100	0,37	0,09	0,13	0,39
	160	0,25	0,08	0,17	0,53
	225	0,22	0,12	0,25	0,76
	250	0,28	0,16	0,34	1,02

3. Resultater og diskusjon

Spesifikk produktproduktivitet (q_p) ble beregnet for den kolben av hver stamme med høyest produktutbytte (Tabell 3.6). *Vibrio alginolyticus* 2047 viste en svært høy produktivitet i den eksponentielle fasen, men flatet så helt ut. *Enterobacteriaceae* 1994 viste, som på alginat, en jevnere produktivitet over hele vekstfasen.

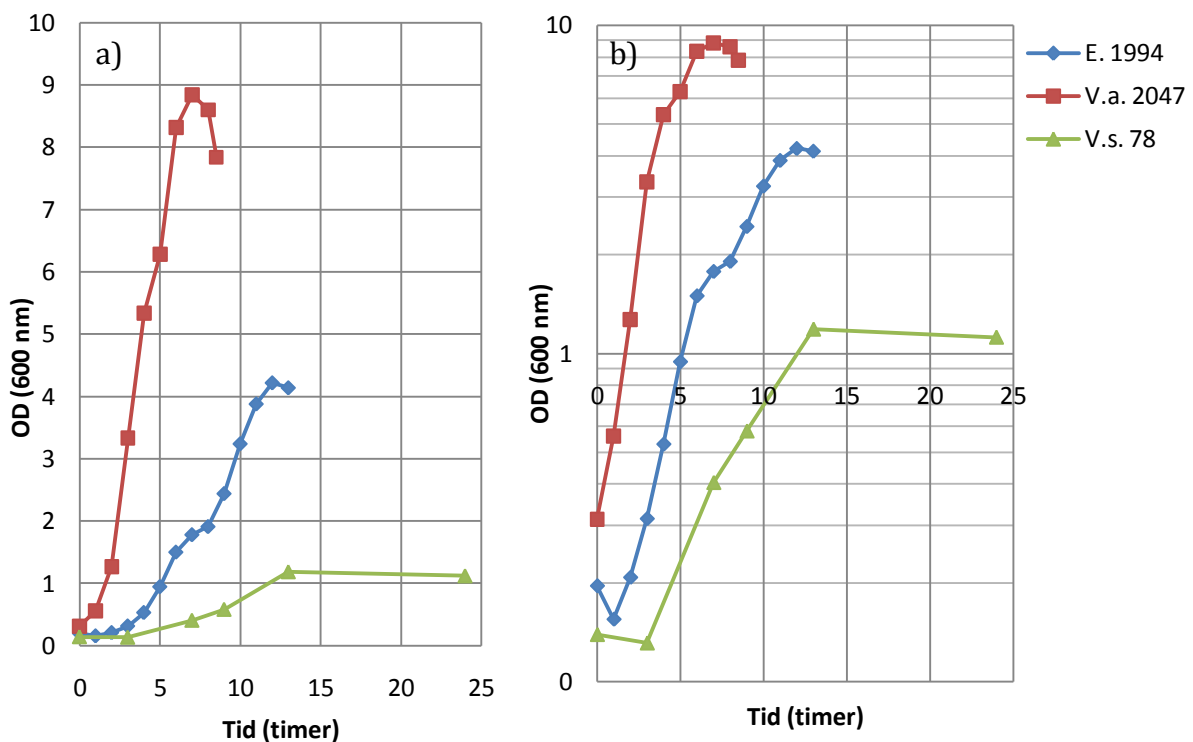
Tabell 3.6: Spesifikk etanolproduktivitet (q_p) for kolben av *Enterobacteriaceae* 1994 med høyest produktutbytte, og spesifikk acetatproduktivitet for kolben av *Vibrio alginolyticus* 2047 med høyest produktutbytte.

Tid (timer)	<i>Enterobacteriaceae</i> 1994 250 mL q_p (g/g-h)	<i>Vibrio alginolyticus</i> 2047 160 mL q_p (g/g-h)
0-2	0,00	3,00
2-5	0,26	0,01
5-8	0,36	0,00
8-11	0,21	0,00
11-14	0,18	0,00
14-22	0,08	0,00

3.2.4 NEDBRYTING AV ALGINAT

For å analysere og kartlegge nedbrytingen av alginat for de utvalgte stammene ble *Enterobacteriaceae* 1994 og *Vibrio alginolyticus* 2047 dyrket aerobt på alginat med prøveuttak underveis i inkuberingen til en rekke alginatanalyser. I tillegg ble en UMB stamme tatt med, *Vibrio splendidus* 78, både fordi denne stammen viste interessante trekk, og for å kunne sammenlikne de utvalgte stammene med et større utvalgt.

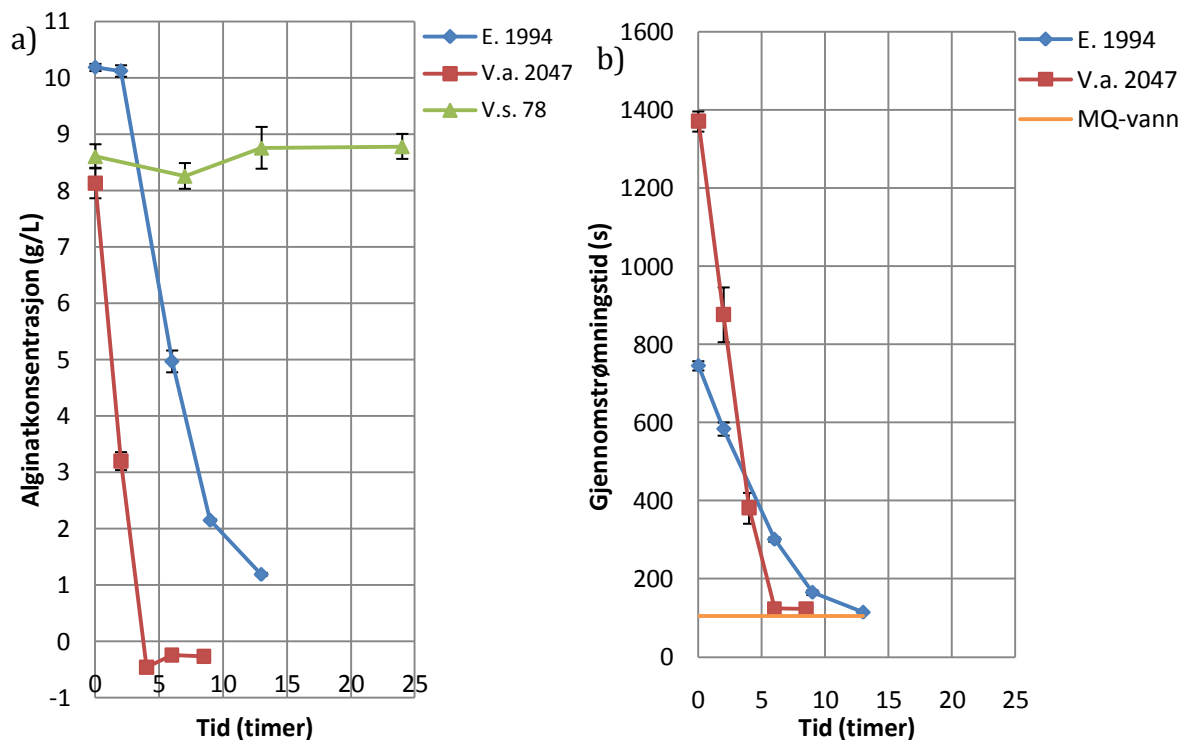
Enterobacteriaceae 1994 og *Vibrio alginolyticus* 2047 vokste begge temmelig likt som ved tidligere aerob dyrking i ristekolber (Avsnitt 3.2.2). *Vibrio alginolyticus* 2047 oppnådde høyest OD av alle de tre stammene (Figur 3.26). *Vibrio splendidus* 78 flatet tidlig ut, og vokste både saktere og oppnådde lavere cellemasse enn de to andre stammene. Det ble beregnet veksthastighet for det eksponentielle området av vekstkurven (Tabell 3.7). Veksthastigheten for *Vibrio alginolyticus* 2047 var betydelig høyere enn for de andre stammene.



Figur 3.26: a) Vekst av stammene *Enterobacteriaceae* 1994, *Vibrio alginolyticus* 2047 og *Vibrio splendidus* 78 aerob på alginat. b) Viser den samme grafen men med logaritmisk y-akse for å fremheve det eksponentielle området av vekstkurvene hvor stigningstallet tilsvare veksthastigheten.

3. Resultater og diskusjon

Også i dette forsøket var det noen forskjeller mellom startkonsentrasjonen i mediene, selv om alle medier ble laget til en konsentrasjon på 10 g/L alginat. Det var også lite samsvar mellom den enzymatiske alginatanalysen og viskositetsmålinger av prøvene, som i Avsnitt 3.2.3 (Figur 3.27). Det ble ikke funnet en forklaring på hvorfor kulturene ga så ulik viskositet, men fenomenet virket å være reproducerbart. Enzymatisk alginatanalyse av kulturene viste at *Vibrio splendidus* 78 ikke hadde degradert noe av alginatet, og det ble derfor ikke målt viskositet av denne stammen. Utbytte av biomasse ble funnet basert på maksimal oppnådd OD og omsatt alginat. Utbyttet var høyest for stammen *Vibrio alginolyticus* 2047 (Tabell 3.7).



Figur 3.27: a) Alginatkonsentrasjon i prøver av stammene *Enterobacteriaceae* 1994, *Vibrio alginolyticus* 2047 og *Vibrio splendidus* 78 dyrket aerobt på alginat. b) Viskositet målt av *Enterobacteriaceae* 1994 og *Vibrio alginolyticus* 2047. Feilfelt viser standardavvik mellom parallellene analysert.

Tabell 3.7: Maksimal veksthastighet og biomasseutbytte (Y_{XS}) for stammene *Enterobacteriaceae* 1994, *Vibrio alginolyticus* 2047 og *Vibrio splendidus* 78.

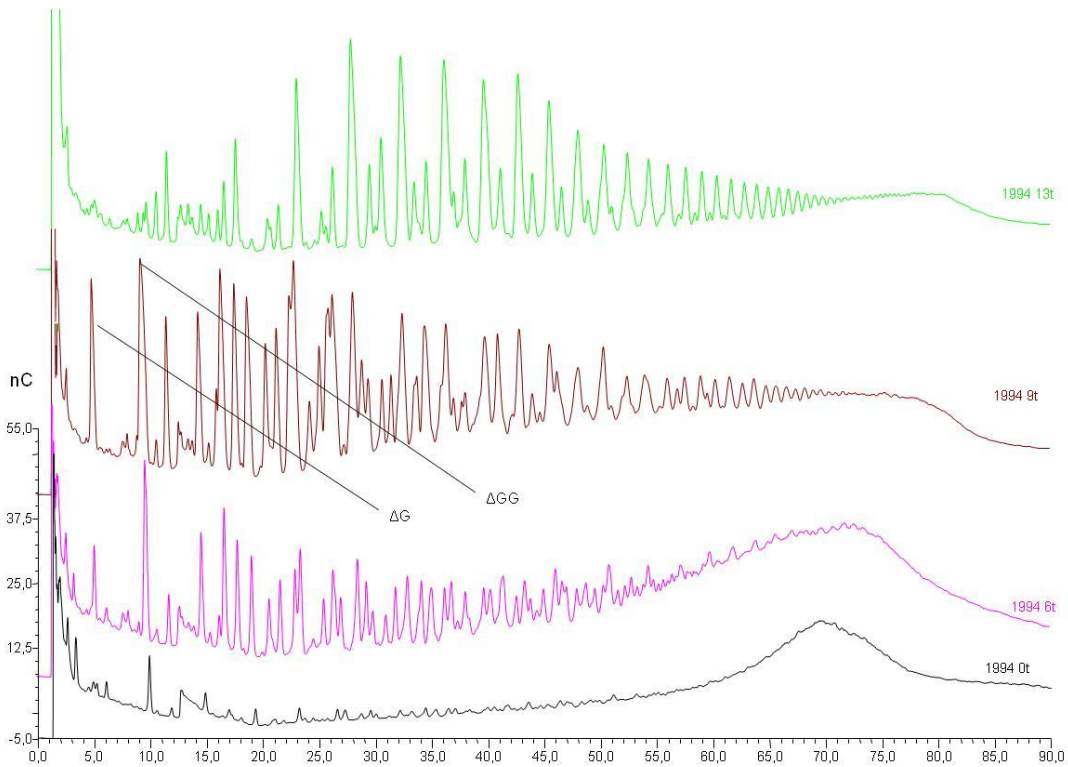
Stamme	Veksthastighet μ (h^{-1})	Omsatt alginat (g)	Y_{XS} (g celler/g alginat)
<i>Enterobacteriaceae</i> 1994	0,51	9	0,15
<i>Vibrio alginolyticus</i> 2047	0,89	8,1	0,38
<i>Vibrio splendidus</i>	0,28	0	-

3. Resultater og diskusjon

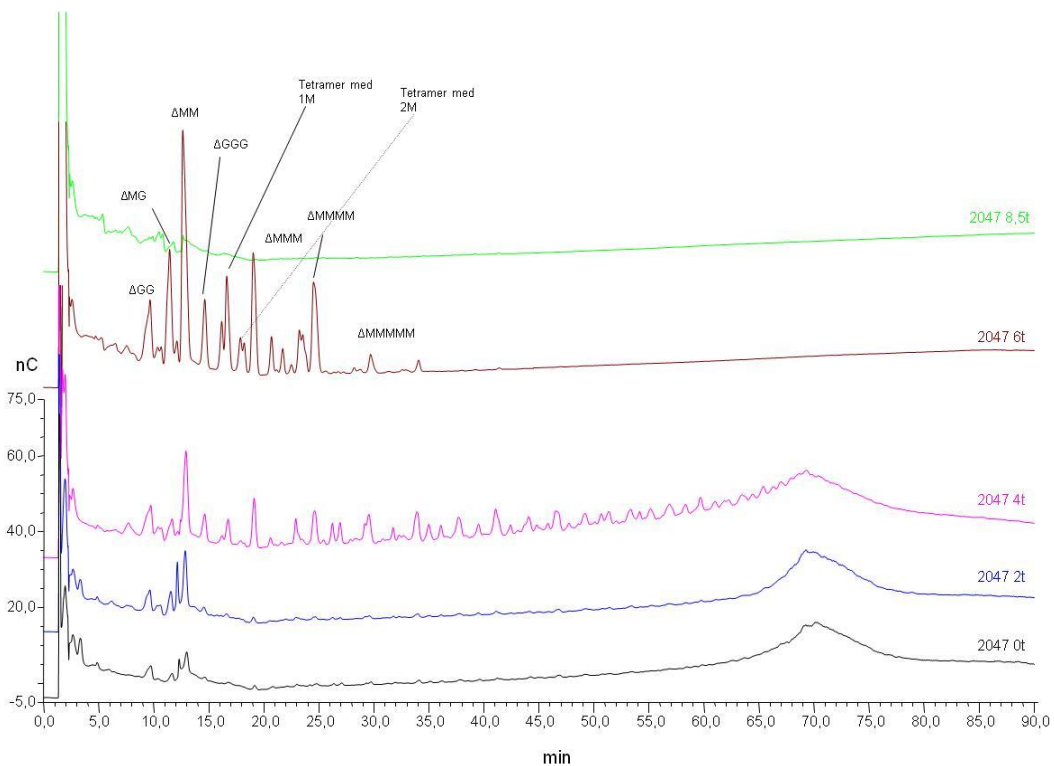
Det ble tatt ut prøver underveis i fermenteringen til HPAEC-PAD for å få et bilde av hvordan kjedelengden og oligomersammensetningen i prøvene endret seg over tid. Toppene ble identifisert ved hjelp av standarder (Vedlegg V7), og er merket i kromatogrammene med sekvenser av monomerene M og G, eller Δ som angir en umettet ende. Grunnen til at det også kan forekomme noen tidlige topper i prøven som ble tatt ved 0 timer, skyldes at inokulumet ble tatt fra forkulturer i eksponentiell vekst, og deretter dyrket på alginat. Ettersom salttoppen som kommer ut etter litt over ett minutt var så stor, var det ikke mulig å identifisere noen monosakkarider i prøvene. Monosakkarider kommer vanligvis ut etter omtrent 2 minutt, og vil derfor være skjult av denne salttoppen. HPAEC-PAD er i prinsippet en kvantitativ metode, men oppnådde resultater er i hovedsak av kvalitativ karakter da mangel på rene uronsyrestandarder begrenser analysen. Resultatene er derfor behandlet kvalitativt for å kunne følge størrelsesordenen av oligosakkarider, og det er kun sett på endring av areal i topper over tid for å kunne si noe om endringen i konsentrasjon. For *Vibrio splendidus* 78 viste vekstkurven lite vekst, samtidig som den enzymatiske analysen ikke viste nedgang i alginatkonsentrasjon. Også HPAEC-PAD analysen bekreftet at alginatet ikke ble brutt ned. Kromatogrammet er gitt i Vedlegg V7.

Enterobacteriaceae 1994 viste store forskjeller i alginatsammensetning mellom starprøve og etter 13 timer inkubering (Figur 3.28). Som en kan lese ut fra antall topper i figuren var det mye materiale i prøvene, noe som gjør det vanskelig å identifisere toppene. Hvis en følger toppene merket ΔG og ΔGG er det tydelig at arealet under toppene blir større fra starten av fermenteringen og frem til prøven tatt ut etter 9 timer. Deretter forsvinner toppene helt i prøven tatt ut etter 13 timer. Ved 13 timer var det fortsatt mye alginat igjen i prøven, uten at det lyktes å identifisere de toppene som stod igjen. For stammen *Vibrio alginolyticus* 2047 gir HPAEC-PAD kromatogrammet et godt bilde av nedbrytingen av alginat (Figur 3.29). Det var tydelig at alle de lange kjedene blir brutt helt ned, da toppen rundt 70 minutter var forsvunnet helt etter ca 6 timer. En kan følge nedbrytingen ved å se på prøven tatt etter 4 timer, som viser et stort intervall av kjeder med ulik lengde. Etter 6 timer gjensto kun korte oligomerer, og den lengste som ble identifisert består av 6 monomerer ($\Delta M M M M M$). Ved avslutning av forsøket var alle oligomerer tatt opp av organsimen.

3. Resultater og diskusjon



Figur 3.28: HPAEC-PAD analyse av hydrolysat fra fermentering med stammen *Enterobacteriaceae* 1994. Prøver ble tatt ut ved start (svart kurve), etter 6 timer (rosa kurve), etter 9 timer (brun kurve) og ved avslutning da vekstkurven flatet ut (grønn kurve). Korte kjeder sees som topper tidlig i analysen, og lange kjeder ved et senere tidspunkt.



Figur 3.29: Resultat fra HPAEC-PAD analyse av hydrolysat fra fermentering med stammen *Vibrio alginolyticus* 2047. Prøver ble tatt ut ved start (svart kurve), etter 2 timer (blå kurve), 4 timer (rosa kurve), etter 6 timer (brun kurve) og ved avslutning da vekstkurven flatet ut (grønn kurve). Korte kjeder sees som topper tidlig i analysen, og lange kjeder ved et senere tidspunkt.

3.2.5 VURDERING AV UTVALGTE STAMMER

Målet med forsøkene med utvalgte stammer var å kartlegge produktsammensetning, utbytte og alginatdegradering. Substrat og produktkonsentrasjon ble målt ved hjelp av HPLC. Usikkerheten i HPLC resultatene var ikke kjent, noe det må tas hensyn til ved tolkning av resultatene. Bakgrunn for usikkerheten er vist i Vedlegg V5. På grunn av noe dårlig separasjon og usikkerhet i standarder er det sannsynlig at denne var relativt stor. For å undersøke hvordan produktsammensetning og utbytte avhenger av oksygentilgang ble stammene dyrket med ulikt volum av medium i kolbene på ulike substrat. Et større volum av medium i kolben vil redusere forholdet mellom volum og overflateareal, og dermed oksygenoverføringen til væsken. Dette er ikke en god kontroll på oksygenopptak, men resultatene viste klare forskjeller i konsentrasjon av ulike produkt i sluttprøvene og celleutbytte mellom de ulike kolbene. For hvert substrat kunne det observeres en økning i celleutbytte med minkende volum av medium, noe som tyder på at oksygenbegrensningen har påvirket veksten. Dette er i samsvar med hva som ble rapportert av Horn *et al.* (2000a), som utførte lignende forsøk med fermentering av mannitol. Metoden egner seg derfor til å skaffe oversikt over hvordan dyrkingen kan optimaliseres. Dersom det skulle blitt gjort forsøk for å se på omsetningen i detalj, med støkiometribalanser og totalutbytte, burde stammene vært dyrket i fermentorer. Dette ville gitt mulighet til å kontrollere konsentrasjon av oksygen og karbondioksid, samt kontroll av pH i vekstmedium.

AEROB OMSETNING AV ALGINAT

Ved aerob vekst (Avsnitt 3.2.2), stemte celleutbyttet med det som var forventet ut fra teoretiske verdier for de ulike substratene, med størst celleutbytte fra mannitol, og lavest fra alginat (Avsnitt 1.2.5). Aerob vekst på alginat ble kartlagt for *Enterobacteriaceae* 1994 og *Vibrio alginolyticus* 2047. *Vibrio splendidus* 78 ble tatt med for sammenligning, men stammen viste svært dårlig omsetning av substratet, og var derfor uegnet til alginatdegradering.

Vibrio alginolyticus 2047 vokste svært godt aerobt på alginat, og viste både høyest veksthastighet og biomasseutbytte ved aerob vekst på alginat. Analyse av oligomersammensetningen ved alginatnedbryting viste at alt alginatet var brutt ned og tatt opp (Figur 3.29). Alle identifiserte topper hadde en umettet ende, noe som bekrefter

3. Resultater og diskusjon

nedbryting av lyaser til umettede uronsyrer (Avsnitt 1.4.1). Både veksthastigheten og celleutbyttet av *Enterobacteriaceae* 1994 var mye lavere enn for *Vibrio alginolyticus* 2047 ved aerob vekst (Tabell 3.7). Dette kan tyde på at *Enterobacteriaceae* 1994 ikke kunne utnytte alginatet i like stor grad. Analyse av oligomersammensetningen viste at det var mye alginat igjen i kolben, noe som bekrefter at stammen ikke hadde utnyttet alt substratet. Det gjenstående alginatet fra *Enterobacteriaceae* 1994 så ut til å danne et mønster i kromatogrammet, med en jevn fordeling av toppene (Figur 3.28). Da alle korte oligomerer bestod kun av G-monomerer, var det en mistanke om redusert omsetning av M-sekvenser, uten at dette ble bekreftet.

ULIK OKSYGENTILFØRSEL

De to *Paenibacillus*-stammene, *P. alginolyticus* 12517 og *P. chondroitinus* 5051, vokste begge på alginat (Figur 3.11 og Figur 3.12). Veksten ble kraftig redusert med økende medievolume i kolbene, noe som tyder på dårlig vekst og omsetning av substrat ved anaerobe forhold. Det ble funnet noe produkt i kulturene fra alle substrat, men konsentrasjonen var lav sammenlignet med de to andre stammene. Fra fermenteringen av mannitol og alginat kombinert var det også mye mannitol igjen ved avslutning (Figur 3.14). Resultater fra Nakamura (1987) viser at isolater av *P. alginolyticus* og *P. chondroitinus* kan degradere alginat og fermentere mannitol med syreproduksjon, men også her ble det rapportert om negative resultater ved anaerob vekst. Det ble derfor besluttet å ikke gjøre flere forsøk med disse stammene.

Vibrio haliotocoli 21474 ble tatt med i fermenteringen av alginat fordi den ikke ble testet i screeningforsøkene. Veksten så ut til å avta tidlig, noe som kan skyldes begrensinger i mediet. Aktiviteten ble også redusert etter omtrent ti timer da veksten flatet ut. Stammen produserte acetat og laktat, og i tillegg format i kolben med lavest oksygentilgang. Produktutbyttet økte med økende oksygentilgang, noe som samsvarer med tidligere forsøk med *Vibrio haliotocoli* (Sawabe *et al.*, 2003). Sammenlignet med de andre stammene var veksten anaerobt ganske lik som *Vibrio alginolyticus* 2047, men dårligere aerobt. Det ble ikke gjort noen videre forsøk med denne stammen.

Ved fermentering av alginat med stammene *Enterobacteriaceae* 1994 og *Vibrio alginolyticus* 2047, var acetat hovedprodukt fra begge stammer uavhengig av oksygentilgang, men ingen produserte etanol. Dette kan trolig forklares med at

3. Resultater og diskusjon

etanolvermentering fra alginat er vanskelig fordi redoksreaksjonen ikke er balansert, og andre produkt derfor foretrekkes (Avsnitt 1.4.2). For acetatproduksjon viste *Vibrio alginolyticus* 2047 høyest spesifikk acetatproduksjon tidlig i den eksponentielle veksten, mens *Enterobacteriaceae* 1994 viste en mer jevn produktivitet over hele vekstfasen. Det samme ble observert for vekst på mannitol. Ved en eventuell fermenteringsprosess for produksjon av produktet er dette viktige observasjoner for å vite hvilket vekststadig cellene burde holdes i for å oppnå høyest produktivitet og produktutbytte.

Oppnådd celledensitet for *Vibrio alginolyticus* 2047 ved vekst på alginat sank med en gang oksygenivået ble begrenset, og også substratomsetningen ble kraftig redusert ved lavere oksygentilførsel. Produktutbyttet var størst ved 160 mL medium i kolben, 0,10 g acetat/ g alginat, noe som tilsvarer et relativt oksygenrikt miljø. Dette var også den eneste kolben hvor andre produkt enn acetat ble observert. Utbyttet var lavt sammenlignet med teoretisk maksimalt utbytte på 0,85 g/g (Avsnitt 1.2.5). Normalt forventes det at fermenteringsutbyttet øker og biomasseutbyttet synker når forholdene blir mer anaerobe. Selv om sistnevnte kunne observeres (Tabell 3.3), hadde altså produktutbyttet en topp ved 160 mL. Ettersom det ble observert store begrensninger i vekstutbytte for stammen ved begrenset oksygentilgang, både på alginat og mannitol, indikerer dette at stammen fungerer dårlig i et anaerobt miljø. Dette samsvarer ikke med hva som tidligere er rapportert om *Vibrio alginolyticus* (Graevenitz & Currington, 1973). Det er kjent at organiske syrer som acetat kan ha en inhiberende effekt på mikrobiell vekst (Blom & Mørtvedt, 1991). Dette kan være en årsak til at veksthastigheten ble kraftig redusert etter få timer, men konsentrasjonen var lavere enn for flere andre stammer, så det er lite sannsynlig.

For *Enterobacteriaceae* 1994 dyrket på alginat økte produktkonsentrasjonen jo større volumet av medium var i kolben (Figur 3.15 og Figur 3.20). Resultatene for biomasseutbytte var noe avvikende mellom forsøkene beskrevet i Avsnitt 3.2.1 og Avsnitt 3.2.3. I det første forsøket viste stammen de samme tendenser som de andre stammene, med høyest celledensitet i den mest aerobe kolben (Figur 3.13). I det siste forsøket derimot oppnådde stammen en høyere celledensitet og et større biomasseutbytte i kolben med 160 mL enn i kolben med 100 mL (Figur 3.18). Denne tendensen bekreftes av forsøkene hvor stammen ble dyrket helt aerobt på alginat, og kom opp i en OD i underkant av 5 (Figur 3.16 og Figur 3.26). Dette er lavere enn for både

3. Resultater og diskusjon

kolben med 100 mL og kolben med 160 mL i forsøket med fermentering av alginat, enda alginatkonsentrasjonen ved start var lavere i sistnevnte forsøk enn ved aerob dyrking. Dette tyder på at stammen foretrekker et miljø med begrenset oksygentilførsel. Ved mer begrenset oksygentilførsel så det ut til at nesten alt alginatet var omsatt ved stasjonærfase for kolbene med 100 og 160 mL medium (Figur 3.18), noe det ikke ble ved helt aerob dyrking.

Ved fermentering av mannitol med ulik oksygentilførsel viste både *Enterobacteriaceae* 1994 og *Vibrio alginolyticus* 2047 lav omsetning av mannitol, og kun kulturen med 100 mL medium for *Enterobacteriaceae* 1994 omsatte alt mannitolet (Figur 3.18). Veksten flatet tidlig ut for *Vibrio alginolyticus* 2047, og substratomsetning og produktdannelse ble da også redusert. Også produktutbyttet var lavt sammenlignet med teoretiske verdier (Avsnitt 1.2.5), og verdier oppnådd med andre stammer ved etanolfermentering av mannitol (Horn *et al.*, 2000a; Horn *et al.*, 2000b). Etanol var hovedproduktet fra *Enterobacteriaceae* 1994 i de to mest oksygenrike kolbene, og laktat var hovedprodukt når oksygentilgangen ble mer begrenset. Produktutbyttet av etanol fra substrat var høyest i den mest oksygenbegrensede kolben. Reduksjon av vekst på mannitol ved mer oksygenbegrensede miljøer kan skyldes forstyrrelse av redoksbalansen (Avsnitt 1.2.4). Ved fermentering av pyruvat til både laktat og etanol genereres det ett mol NAD⁺ per mol produkt. Redoksreaksjonen er derfor ikke balansert, da det dannes to mol pyruvat og tre mol NADH₂ fra ett mol mannitol. Ved tilgang på oksygen kan alle NAD⁺ regenereres, men uten oksygen må dette gjøres på en annen måte.

Kombinasjonen av alginat og mannitol ble gjort for å undersøke hvordan veksten og produktannelsen ble påvirket ved kombinasjon av substratene. I likhet med vekst på alginat var acetat hovedproduktet for både *Vibrio alginolyticus* 2047 og *Enterobacteriaceae* 1994, men etanol ble i tillegg produsert fra *Enterobacteriaceae* 1994. Etanolproduksjon så ut til å være favorisert ved mer oksygenbegrensede betingelser, som vist ved omsetning av glukose. Stammen hadde omsatt alt mannitol i kolben med 225 mL, ca 4 g/L, og produserte ca 0,7 g/L etanol. Dette gir et produktutbytte på 0,18 g etanol/ g alginat. Utbyttet var en del lavere enn ved vekst på kun mannitol som ga 0,23 g/g i de senere forsøkene (Tabell 3.5). Det så derfor ikke ut til at alginat og mannitol kombinert ga et høyere etanolutbytte. Det var noe uventet at *Vibrio alginolyticus* 2047 viste redusert vekst når mannitol ble tilsatt (Figur 3.10), ettersom det teoretiske

3. Resultater og diskusjon

celleutbyttet fra mannitol er høyere enn fra alginat (Avsnitt 1.2.5). I de siste forsøkene med begrenset oksygentilgang hvor stammen ble dyrket på alginat og mannitol separat var biomasseutbyttet høyere fra mannitol. Dette kan bety at stammen foretrekker mannitol, og når både mannitol og alginat er tilgjengelig vokser den kun på mannitol. Ettersom det var 3 g/L mannitol i mediet med mannitol og alginat, vil dette gi lav vekst sammenlignet med andre forsøk hvor substratkonsentrasjonen var 10 g/L.

OPPSUMMERING

Totalt sett var det viktigste funnet fra forsøkene med utvalgte stammer at bakteriestammer med etanolfermentering, som kan degradere og utnytte alginat, ikke produserer etanol fra alginat. I denne oppgaven er dette vist med stammen *Enterobacteriaceae* 1994, noe som samsvarer med andre studier (Lee & Lee, 2011). Dette viser at en av hovedutfordringene med produksjon av bioetanol fra tare og alginat er å balansere nedbrytingssporet fra alginat til etanol, og ikke å finne bakteriestammer med ønskede enzym. Studien viste også at etanolproduksjon fra glukose og mannitol øker når oksygentilførselen begrenses, og at det varierte fra stamme til stamme hvilke forhold alginatomsetningen var mest effektiv ved.

3.3 KARAKTERISERING AV ENZYMER

En karakterisering av enzymaktivitet i stammene *Vibrio alginolyticus* 2047 og *Enterobacteriaceae* 1994 ble gjort som forklart i Avsnitt 2.5, for å få økt forståelse av nedbrytingen av alginat. Resultatene er vist i Avsnitt 3.3.1 og 3.3.2, etterfulgt av diskusjon i Avsnitt 3.3.3.

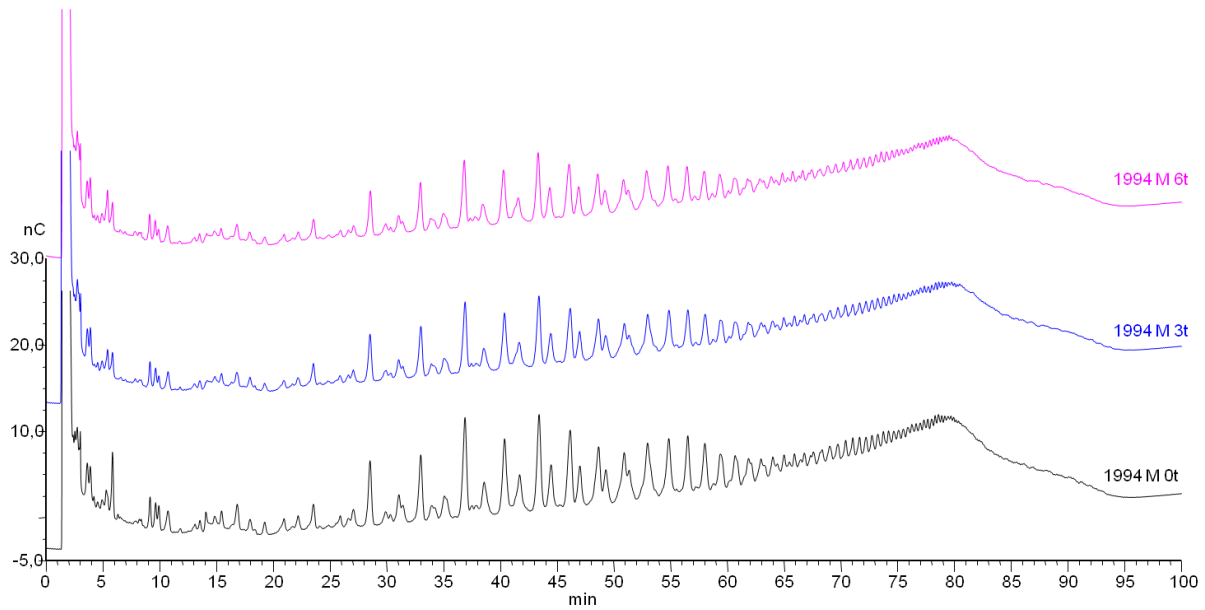
3.3.1 ANALYSE AV NEDBRYTINGSPRODUKT FRA ALGINAT

IDENTIFISERING AV LYASEPRODUKT

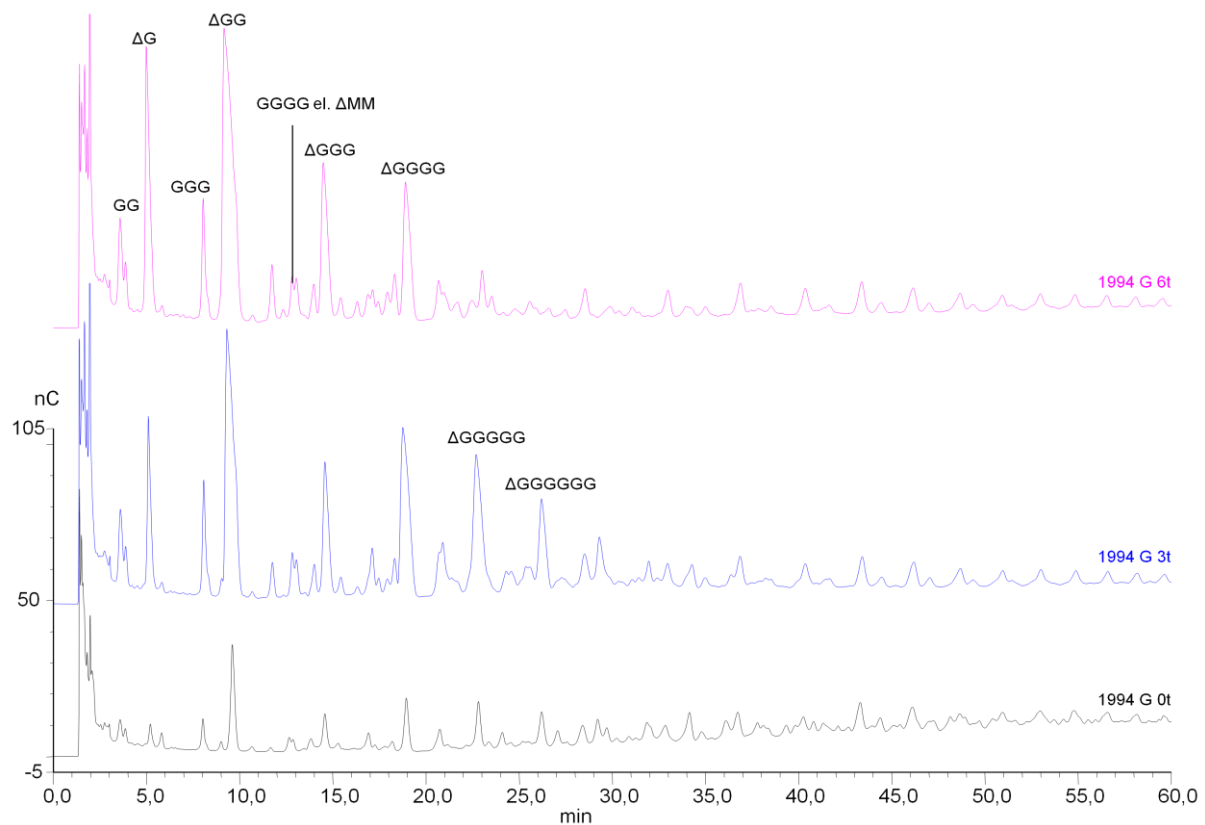
For å finne ut hvilke sekvenser av nedbrutt alginat som ble tatt opp av cellen ble alt cellematerialet fjernet fra en kultur dyrket på alginat, slik at kun ekstracellulære enzym gjenstod (Avsnitt 2.5.1). Ved tilsats av alginat vil dette i teorien kunne gi en nedbryting til de monomerene/oligomerene som normalt tas opp av cellen. Ettersom alt av cellemateriale og intracellulære enzymer er fjernet skal man kunne se en oppsamling av disse produktene i et HPAEC-PAD-kromatogram. Identifiserte topper er merket i kromatogrammene med monomersekvensen, og de samme betingelsene gjelder her som i Avsnitt 3.2.4.

Da supernatant fra *Enterobacteriaceae* 1994 ble tilsatt M-blokk skjedde det lite eller ingen endring i løpet av de 6 timene prøven ble inkubert (Figur 3.30). For G-blokk derimot ble det observert en tydelig endring av oligomersammensetning over tid. Det ble observert både umettede og mettede kjeder, og en økning av alt fra dimerer til heptamerer de første tre timene. De siste tre timene ble det hovedsakelig observert en økning av di-, tri- og tetramerer (Figur 3.31). Ettersom det ble benyttet supernatant fra kulturer dyrket på alginat som lyasekilde, vil det kunne være noe alginat fra supernatanten i prøvene ved start, og ikke bare ren M- eller G-blokk.

3. Resultater og diskusjon



Figur 3.30: *Enterobacteriaceae* 1994 supernatant tilsatt M-blokk. Det nederste kromatogrammet (blå) viser startprøve før inkubering, det midterste (svart) viser prøven etter 3 timer og det øverste (rosa) viser prøven etter 6 timer.

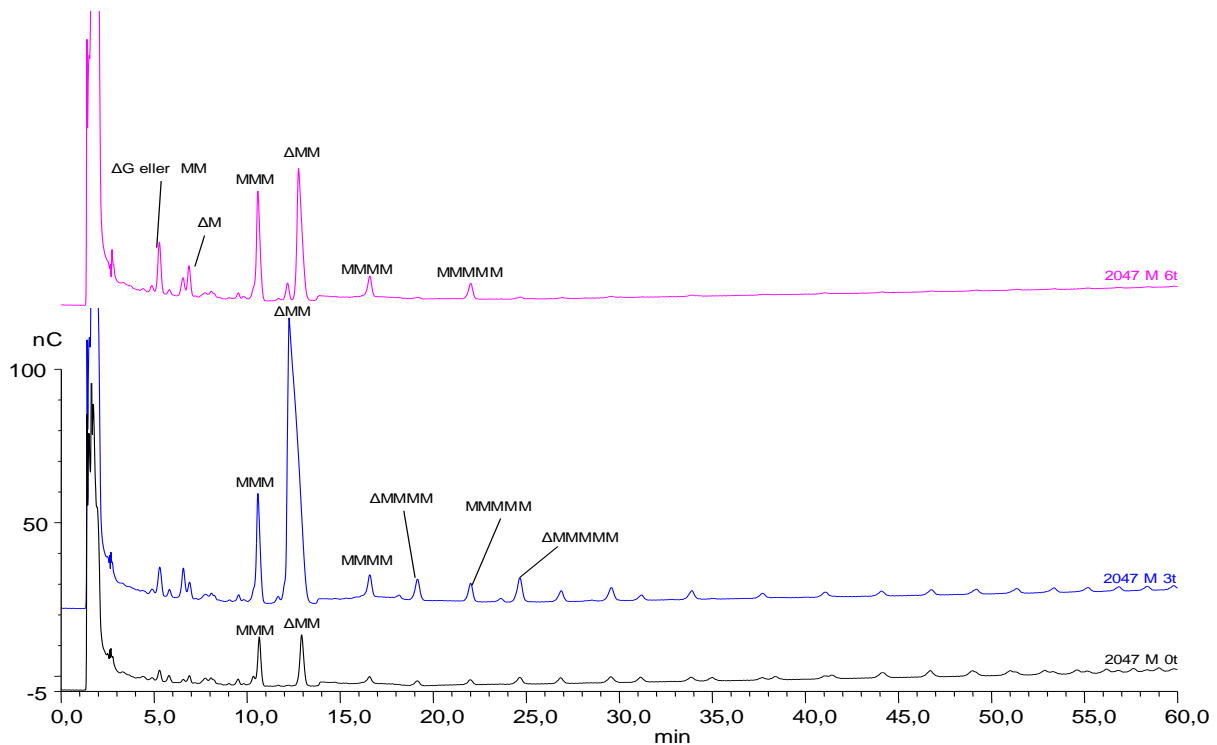


Figur 3.31: *Enterobacteriaceae* 1994 supernatant tilsatt G-blokk. Det nederste kromatogrammet (svart) viser prøven ved start, det midterste (blå) viser prøven etter 3 timer og det øverste (rosa) viser prøven etter 6 timer.

3. Resultater og diskusjon

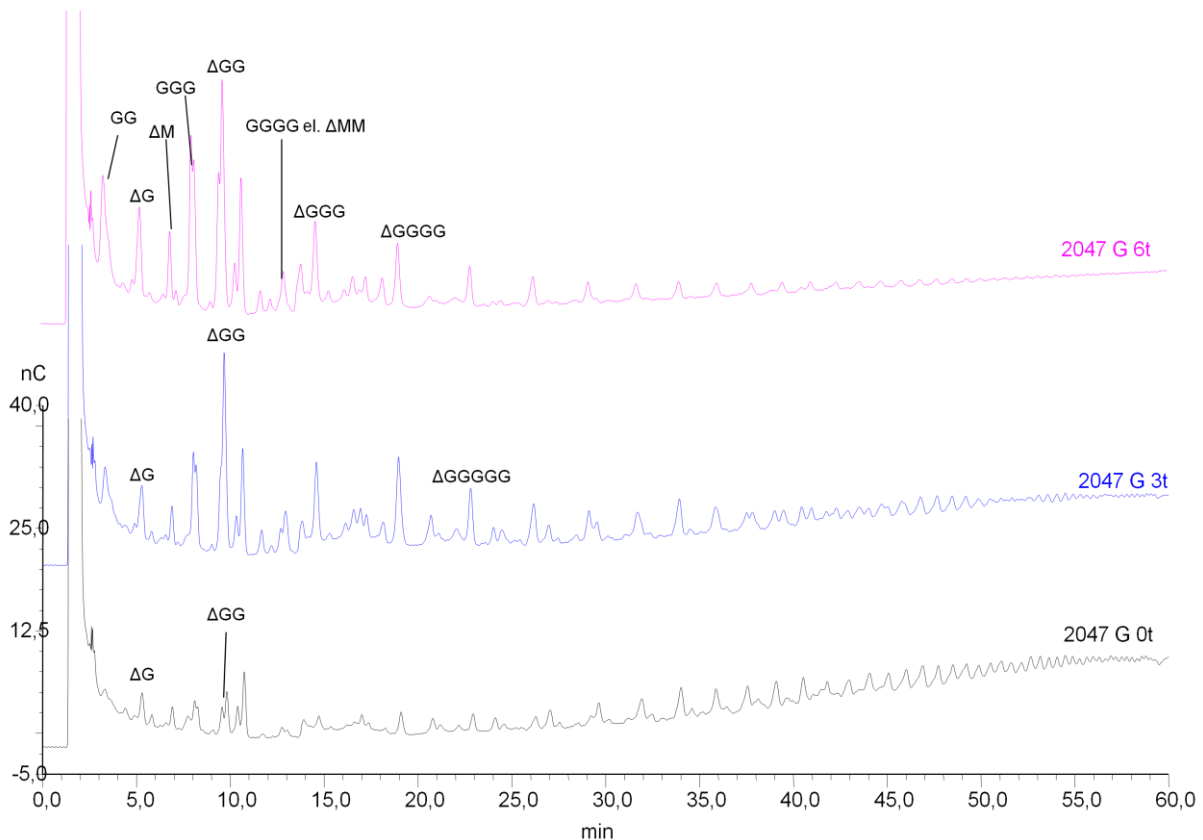
Supernatant fra *Vibrio alginolyticus* 2047 ga store endringer i oligomersammensetningen for både M- og G-blokk. Det ble også for disse prøvene observert både mettede og umettede kjeder. For prøven tilsatt M-blokk økte mengden trimerer svært mye de første 3 timene (Figur 3.32). På grunn av den store toppen for Δ MM etter 13 minutter kan det være vanskelig å se endringer i de andre toppene, da disse blir veldig små. Etter 6 timer ble den store toppen for Δ MM betydelig redusert, men det ble ikke observert en vesentlig økning i dimerer.

I prøven tilsatt G-blokk var det en mye jevnere størrelse på toppene, og derfor lettere å følge flere kjedelengder (Figur 3.33). Også her ble det de første tre timene observert størst økning i de noe lengre oligomerene, fra trimerer og opp. I de siste tre timene økte mengden dimerer tydeligere, og det ble observert stor variasjon i antall sekvenser.



Figur 3.32: *Vibrio alginolyticus* 2047 supernatant tilsatt M-blokk. Det nederste kromatogrammet (svart) viser prøven ved start, det midterste (blå) viser prøven etter 3 timer og det øverste (rosa) viser prøven etter 6 timer.

3. Resultater og diskusjon



Figur 3.33: *Vibrio alginolyticus* 2047 supernatant tilsatt G-blokk. Det nederste kromatogrammet (svart) viser prøven ved start, det midterste (blå) viser prøven etter 30 minutt og det øverste (rosa) viser prøven etter 3 timer.

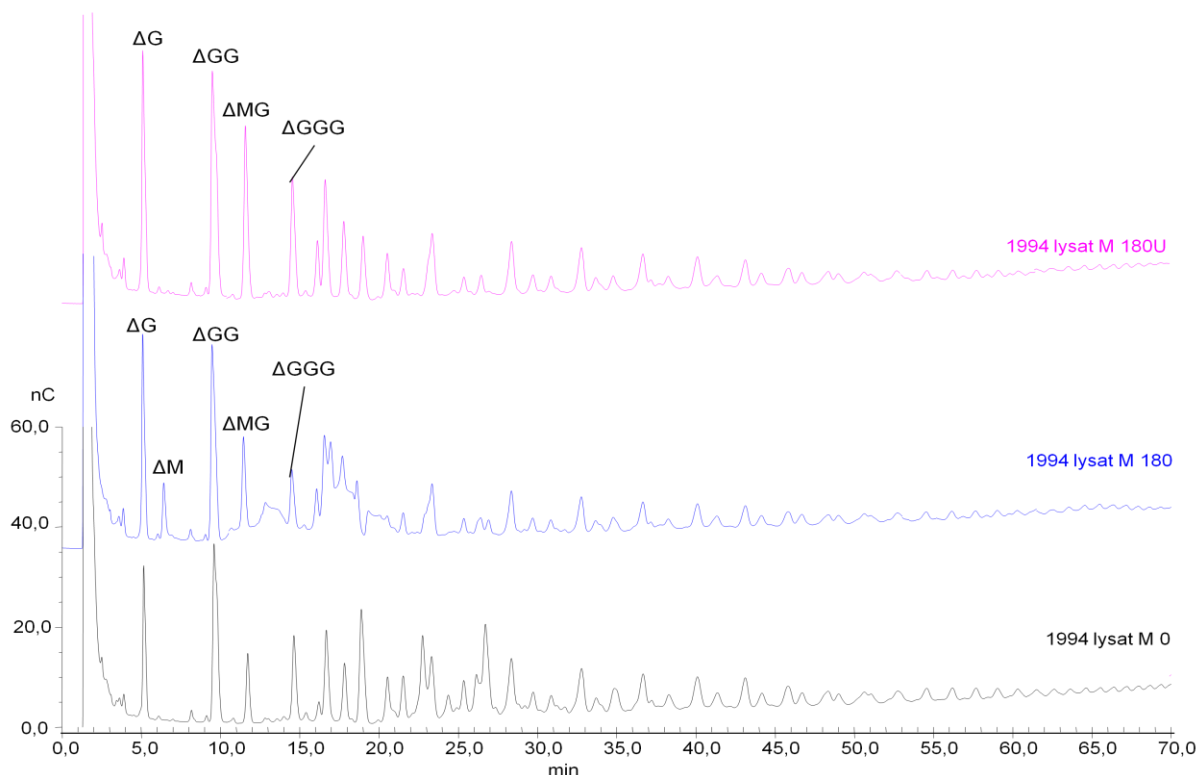
IDENTIFISERING AV MONOSAKKARIDER OG CELLULÆRE METABOLITTER

I tillegg til identifikasjon av lyaseprodukter var det også av interesse å følge nedbrytingen av oligomerene videre. M- og G-blokk ble derfor tilsatt en prøve med både ekstracellulære og intracellulære enzymer (Avsnitt 2.5.1). Noen prøver ble også tilsatt NAD⁺/NADH og ATP/ADP i et forsøk på å øke enzymaktiviteten. Det viste seg å være en del alginat igjen i prøvene fra kulturene, og det kan derfor være vanskelig å skille prøvene med M- og G-blokk. Dette kom av at enzymprøver ble tatt fra kulturen ved eksponentiell vekst, før alt alginatet var omsatt, for å være sikker på å få med celler med en aktiv metabolisme.

For stammen *Enterobacteriaceae* 1994 tilsatt G-blokk ble det ikke observert noen vesentlig endring over tid i kromatogrammene fra HPLC analysen. I prøven tilsatt M-blokk ble det observert en ny topp etter 3 timer ved 19,3 minutter på kromatogrammet, både i prøven tilsatt NAD⁺/NADH og ATP/ADP og i prøven uten tilsats. Det er usikkert om denne toppen kun er en "hale" etter toppen ved 18,3 minutter som skyldes komponenter i mediet, eller om dette er et produkt av en enzymreaksjon i løsningen.

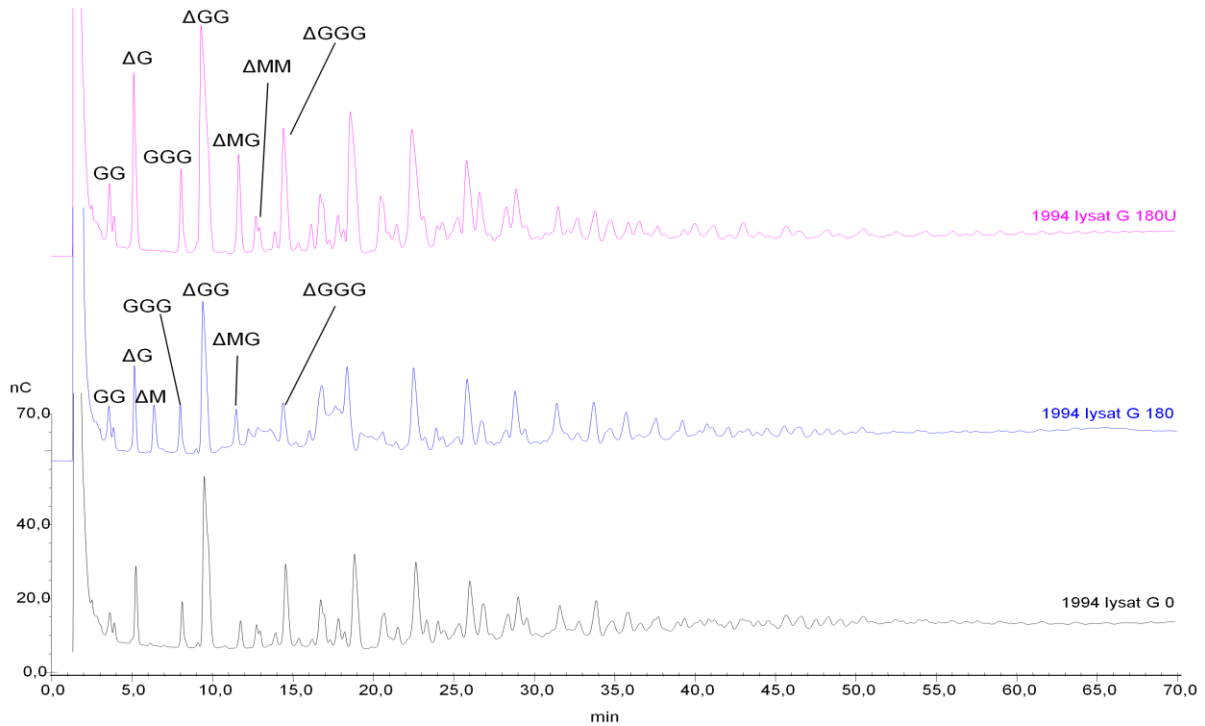
3. Resultater og diskusjon

Retensjonstiden samsvarer ikke med noen standarder analysert i forsøket, og toppen ble derfor ikke identifisert og kvantifisert. Resultat fra analysen kan ses i Vedlegg V5. Fra HPAEC-PAD analysen ble det observert noe endring i oligomersammensetning i prøvene over tid. Også her er resultatene i hovedsak av kvalitativ karakter da mangel på standarder gjorde det vanskelig å bestemme kvantitet av komponentene, men en økning av areal under en topp over tid indikerer også en økning i konsentrasjon av komponenten i prøven. For begge prøvene ble det observert en økning av ΔM ved tilsats av kofaktorer, men ikke uten (Figur 3.34 og Figur 3.35). Det var liten endring i oligomersammensetning i prøven tilsatt M-blokk over tid. For prøven tilsatt G-blokk ble det observert en økning i korte oligomerer både i prøven med og uten tilsats av kofaktorer. Kjeder med to til fire monomerer økte mest over tid. Både for prøven tilsatt M-blokk og prøven tilsatt G-blokk så det ut til at tilsats av kofaktorer påvirket separasjonen av toppene. For å undersøke om dette skjedde med en gang ble i tillegg en prøve tatt ut ved 45 minutter analysert. Også denne viste dårlig separasjon av toppene mellom 10 og 20 minutter.



Figur 3.34: HPAEC-PAD kromatogram for *Enterobacteriaceae* 1994 supernatant og cellelysate tilsatt M-blokk. Den nederste kurven (svart) viser prøven ved start, den midterste kurven (blå) viser prøven tilsatt NAD⁺/NADH og ATP/ADP etter 3 timers inkubering, og den øverste kurven (rosa) viser prøven uten tilsatt NAD⁺/NADH og ATP/ADP etter 3 timers inkubering.

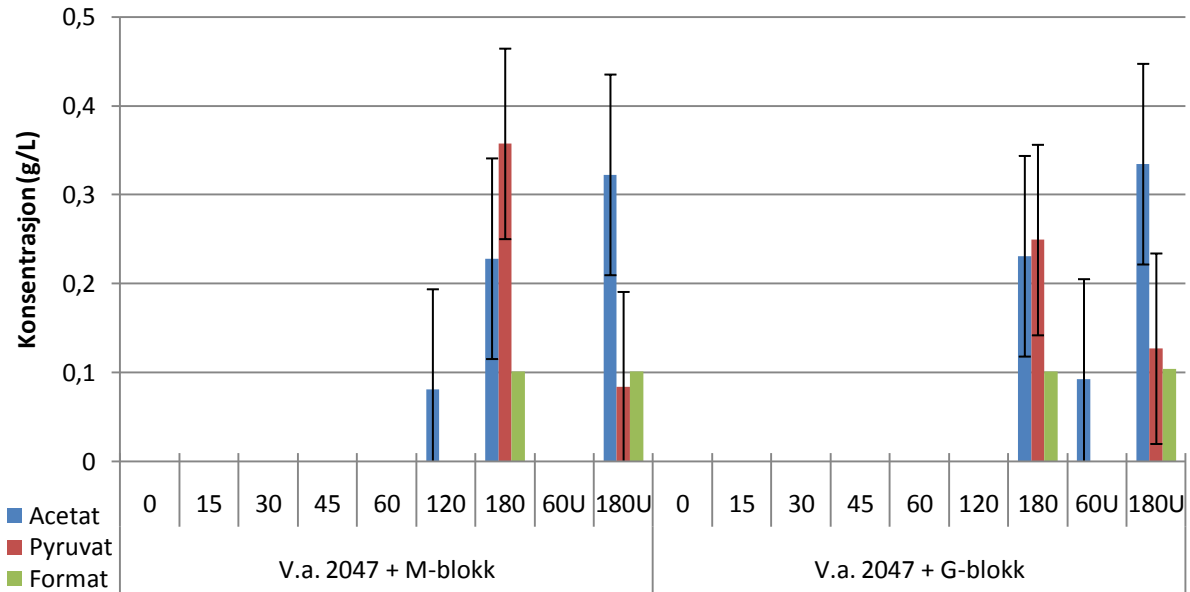
3. Resultater og diskusjon



Figur 3.35: HPAEC-PAD kromatogram for *Enterobacteriaceae* 1994 supernatant og cellelysat tilsatt G-blokk. Den nederste kurven (svart) viser prøven ved start, den midterste kurven (blå) viser prøven tilsatt NAD⁺/NADH og ATP/ADP etter 3 timers inkubering, og den øverste kurven (rosa) viser prøven uten tilsatt NAD⁺/NADH og ATP/ADP etter 3 timers inkubering.

For stammen *Vibrio alginolyticus* 2047 ble det funnet en økning av både pyruvat, format og acetat i HPLC kromatogrammene. Dette viste at substratet var omsatt videre til endeprodukt som for en normal aktiv celle. Figur 3.36 viser konsentrasjonen av stoffene i prøvene over tid. Både i prøven med M-blokk og prøven med G-blokk ble det funnet mer pyruvat i prøvene tilsatt NAD⁺/NADH og ATP/ADP enn i prøvene uten tilsatt, mens det ble funnet mindre acetat. Mengden av de ulike stoffene i prøvene var så liten at usikkerheten i den beregnede konsentrasjonen blir stor. Som vist i Figur 3.36 var det ikke signifikant forskjell av acetat i prøvene etter 180 minutt.

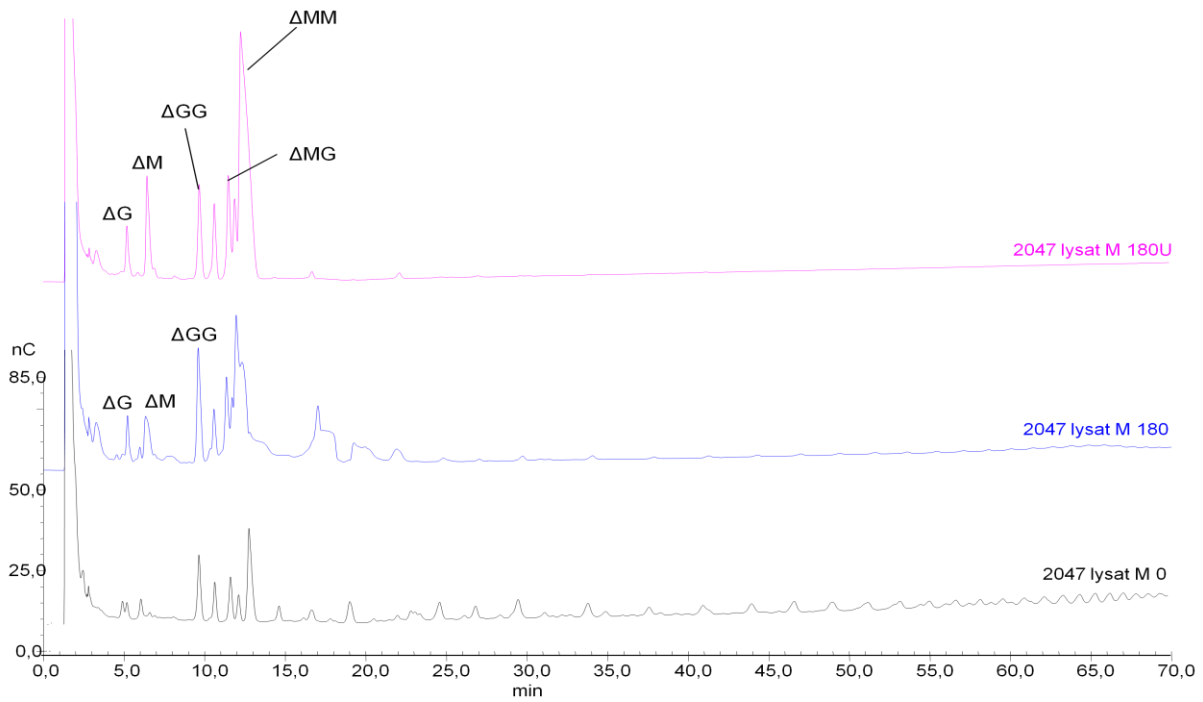
3. Resultater og diskusjon



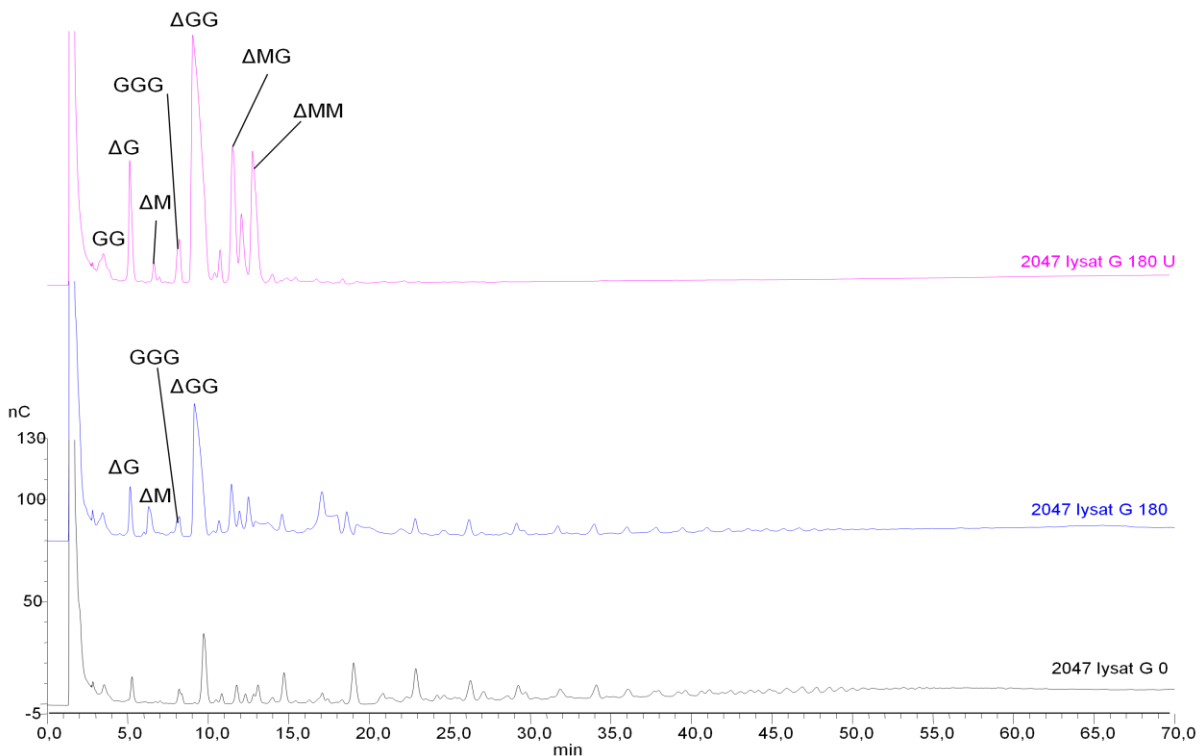
Figur 3.36: Produkt fra *Vibrio alginolyticus* 2047 supernatant og cellelysat tilsatt M-blokk og G-blokk. Figuren viser konsentrasjon av produkt ved mintutter etter inokulering, med og uten tilsats av NAD⁺/NADH og ATP/ADP (vist med U). Feilfelt angir standardavvik av prøver med kjent konsentrasjon (Vedlegg V5).

Fra HPAEC-PAD analysen av *Vibrio alginolyticus* 2047 var det tydelig at alt langkjedet alginat var brutt ned under inkuberingen. Begge prøvene viste en blanding av M og G oligomerer, som følge av alginatet i prøven før tilsats av M- og G-blokk. I prøven tilsatt G-blokk ble det observert en betydelig økning av trimeren ΔGG , særlig i prøven uten tilsatt kofaktor (Figur 3.38). Kromatogrammene tyder også på at alginatet ble mer nedbrutt i prøvene uten tilsats etter 3 timer, enn i prøvene med tilsats. For prøven tilsatt M-blokk ble det observert størst økning av korte oligomerer i prøven uten tilsats av kofaktorer, og da mest av trimeren ΔMM (Figur 3.37). Også her var toppene i prøven med tilsats dårligere separert, som for *Enterobacteriaceae* 1994.

3. Resultater og diskusjon



Figur 3.37: HPAEC-PAD kromatogram for *Vibrio alginolyticus* 2047 supernatant og cellelysat tilsatt M-blokk. Den nederste kurven (svart) viser prøven ved start, den midterste kurven (blå) viser prøven tilsatt NAD⁺/NADH og ATP/ADP etter 3 timers inkubering, og den øverste kurven (rosa) viser prøven uten tilsatt NAD⁺/NADH og ATP/ADP etter 3 timers inkubering.



Figur 3.38: HPAEC-PAD kromatogram for *Vibrio alginolyticus* 2047 supernatant og cellelysat tilsatt G-blokk. Den nederste kurven (svart) viser prøven ved start, den midterste kurven (blå) viser prøven tilsatt NAD⁺/NADH og ATP/ADP etter 3 timer inkubasjon, og den øverste kurven (rosa) viser prøven uten tilsatt NAD⁺/NADH og ATP/ADP etter 3 timer inkubasjon.

3.3.2 GENANALYSE

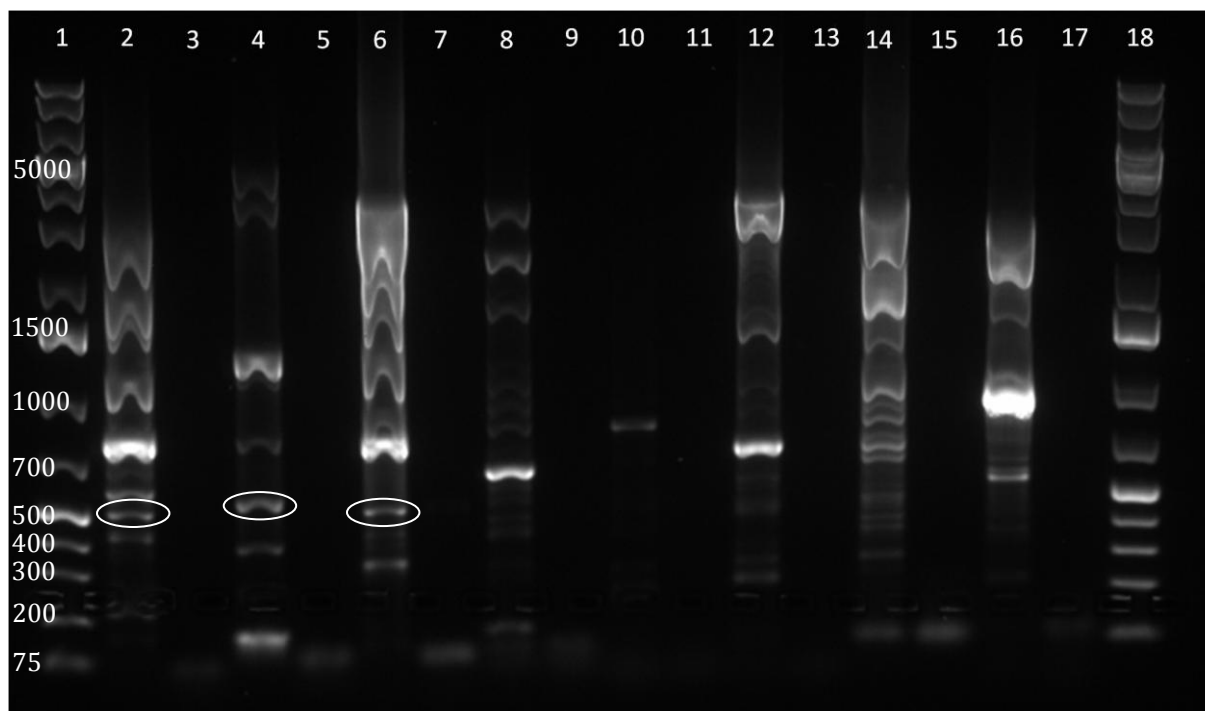
Ut fra fermenteringssporet foreslått i Avsnitt 1.4.2, Figur 1.7, ble det gjort en genanalyse for å forsøke å påvise tre av de essensielle enzymene i fermenteringssporet, mannonate dehydratase (E.C. 4.2.1.8), 2-dehydro-3-deoksyglukonokinase (E.C. 2.7.1.45) og 2-dehydro-3-deoksyfosfoglukonat aldolase (E.C. 4.1.2.14). Ettersom genomet til de to aktuelle stammene ikke var kjent, ble primere designet basert på enzymsekvenser for enzymene fra andre stammer i nær slekt. Det ble derfor laget flere alternative primere. Prøvene som ble analysert, samt lengde på ønsket primerprodukt kan ses i Tabell 3.8.

Tabell 3.8: Prøver til PCR reaksjon for de tre enzymene og stammene *Enterobacteriaceae* 1994 og *Vibrio alginolyticus* 2047, angitt med henholdsvis E og V. Tabellen viser hvilken brønn på gelen som hører til prøven og lengden på det forventede primerproduktet.

Brønnnummer	Prøve	Lengde på primerprodukt
1	Standard	
2	4.2.1.8 E	522
3	4.2.1.8 E Negativ	
4	4.2.1.8 V	534
5	4.2.1.8 V Negativ	
6	2.7.1.45 E alt.1	496
7	2.7.1.45 E alt.1 Negativ	
8	2.7.1.45 E alt.2	496
9	2.7.1.45 E alt.2 Negativ	
10	2.7.1.45 V	221
11	2.7.1.45 V Negativ	
12	4.1.2.14 E alt.1	297
13	4.1.2.14 E alt.1 Negativ	
14	4.1.2.14 E alt.2	297
15	4.1.2.14 E alt.2 Negativ	
16	4.1.2.14 V	198
17	4.1.2.14 V Negativ	
18	Standard	

Hvis primerne hadde fungert og bundet kun til det ønskede genet, ville hver prøve vist ett bånd på agarosegelen. Det viste seg at PCR-reaksjonen ga en rekke produkt, med bånd i mange ulike lengder (Figur 3.39). Noen av båndene stemte med den lengden som var forventet for det ønskede produktet (avmerket i figuren), eksempelvis E.C. 4.2.1.8 for begge stammene. Disse båndene kan komme fra genene i det aktuelle fermenteringssporet, men dette kan ikke bekreftes uten en sekvensering av produktet og sammenligning med en kjent sekvens. Det ble besluttet å ikke sende båndene inn til sekvensering for identifisering av produktene, da resultatet var såpass usikkert. Ingen av negativene ga utslag på agarosegelen.

3. Resultater og diskusjon



Figur 3.39: Agarosegel med PCR-produkt fra 55 °C reaksjon og 37 sykluser. Prøvene er nummerert etter primersett øverst, som kan ses i Tabell 3.8. Merkede bånd har riktig båndlengde i forhold til forventet produkt, og lengde på standardbånd (rad 1 og 18) er merket til venstre.

3.3.3 VURDERING AV ENZYMKARAKTERISERING

Supernatantprøver fra *Vibrio alginolyticus* 2047 viste god nedbryting av både M- og G-blokk (Figur 3.32 og Figur 3.33). Som forklart i Avsnitt 1.4.1 er de fleste lyaser spesifikke for M- eller G-blokker i alginatkjeden. Dette bekrefter at stammen har ekstracellulære alginat lyaser som kan bryte ned både M- og G-kjeder. Det ble identifisert kjeder så korte som dimerer, men etter 6 timers inkubering var det fortsatt stor variasjon av oligomerer i prøvene, særlig for prøven tilsatt G-blokk. M-blokkprøven hadde opprinnelig større gjennomsnittlig lengde på kjedene enn G-blokken, likevel så denne prøven ut til å være mer nedbrutt etter 6 timer enn G-blokkprøven. En mulighet kan være høyere aktivitet av M-lyaser i supernatanten. En annen uventet endring av M-blokkprøven var at toppen for Δ MM først vokste svært mye de tre første timene, for deretter å reduseres kraftig etter 6 timer, uten at noen stor økning av dimerer ble observert. Den store veksten av trimeren kan tyde på at de ekstracellulære lyasene hovedsakelig kuttet kjedene ned til trimerer, og kortere kjeder da kun var biprodukt. Reduksjonen av toppen kan bety at det kan ha vært noe celleaktivitet i prøven, på tross av at alle celler ble forsøkt fjernet fra supernatanten. Dette kan også forklare hvorfor enzymaktiviteten var høyere i M-

3. Resultater og diskusjon

blokkprøven enn G-blokkprøven, da nye lyaser vil ha blitt produsert av de aktive cellene. Også i prøven tilsatt supernatant og cellelysat ble det observert kjeder ned til dimerer for *Vibrio alginolyticus* 2047 (Figur 3.37 og Figur 3.38). Det var noe overraskende at det var brutt ned mer alginat i prøvene uten tilsats av kofaktorer enn i prøvene med tilsats, da det ikke var forventet at kofaktorene skulle ha noen påvirkning på lyasene. Det kan derfor se ut til at kofaktorene enten direkte eller indirekte har hemmet eller redusert aktiviteten til lyasene, for eksempel ved å ha økt aktiviteten til andre enzym som kan ha påvirket alginatet eller lyasene. Ved HPLC-analyse av de samme prøvene ble det observert både pyruvat og acetat, noe som viste at nedbrytingsproduktene fra M- og G-blokk var omsatt. Det ble observert mer pyruvat i prøvene tilsatt kofaktor, noe som kan tyde på økt enzymaktivitet av intracellulære enzym. Det var dessverre ikke mulig å identifisere andre mellomprodukt med denne metoden på grunn av mangel på standarder. Det ble opprinnelig planlagt å analysere prøvene med massespektrometri for å identifisere flere intracellulære metabolitter, men dette ble ikke gjennomført på grunn av dårlig tid.

For *Enterobacteriaceae* 1994 var det større forskjeller mellom supernatantprøvene. For supernatant tilsatt M-blokk ble det ikke observert noen endring av verken konsentrasjon eller sammensetning av oligomerer i prøven (Figur 3.30). For den samme supernatanten tilsatt G-blokk, ble det derimot observert en tydelig nedbryting til korte oligomerer av ulik lengde, og da i hovedsak di- og trimerer (Figur 3.31). Dette viser at *Enterobacteriaceae* 1994 ikke har aktive ekstracellulære M-lyaser, noe som også kan forklare mønsteret observert i HPAEC-PAD-kromatogrammet av stammen ved aerob dyrking på alginat. Også i prøvene tilsatt cellelysat ble det i hovedsak observert korte oligomerer av G, og kun noen korte oligomerer med M. Dette kan enten bety at cellene produserer M-lyaser, men at disse er assosiert med cellen, eventuelt at G-lyase er i stand til å kutte mellom M og G, GM og/eller MG. Intracellulær lyaseaktivitet har tidligere blitt rapportert for stammer i denne familien (Lange *et al.*, 1989), og som forklart i Avsnitt 1.4.1 har det blitt isolert lyaser som kan kutte flere ulike monomersammensetninger. Ved begrenset oksygentilførsel ble det i Avsnitt 3.2. observert fullstendig omsetning av alginat ved måling av alginatkonsentrasjon med enzymatisk alginatanalyse. Dette kan skyldes usikre resultater fra metoden ved lav alginatkonsentrasjon, og det er mulig at det også her var M-blokker igjen ved avslutning. En interessant observasjon var at for begge prøvene ble det observert ΔM ved tilsats av kofaktorer, men ikke uten tilsats.

3. Resultater og diskusjon

Genanalysen av de to stammene viste at primerne var for uspesifikke til å gi et entydig resultat. Dette var ikke uventet da primerne ble designet basert på gener fra andre stammer. I tillegg var flere av basene uspesifikke, og kodet for mer enn ett nukleotid. Selv om enkelte av båndene på gelen kunne passet med de ønskede produktene ved sammenligning med standarder, var resultatene så avvikende fra det optimale at det ble besluttet å ikke bruke tid og ressurser på å følge opp disse. For at resultatene skulle blitt mer entydige kunne for eksempel primerne blitt designet på nytt ut fra sammenligning av flere og nærmere beslektede stammer. Selve PCR reaksjonen kunne også blitt optimalisert med tilsats av for eksempel dimetyl sulfoksid (DMSO), som tidligere har vist å gjøre primere mer spesifikke (Bachmann *et al*, 1990).

Enzymet EC 4.2.1.8 ble valgt fordi det inngår i nedbrytingen av mannuronsyre, og EC 1.1.1.131 er ikke sekvensert og kunne derfor ikke analyseres (Avsnitt 1.4.2). EC 2.7.1.45 inngår i det foreslåtte sporet fra 4-deoxy-5-ketouronsyre og ble valgt siden det første steget ikke er kjent, og EC 4.1.2.14 inngår i Entner-Doudoroff sporet som svært mange bakterier har. Tanken med analysen var å se om stammene hadde essensielle enzym i nedbrytingen fra mannuronsyre og 4-deoxy-5-ketouronsyre. Et negativt resultat ville tyde på at sporet ikke var i bruk, mens et positivt resultat kunne styrket teorien. EC 4.1.2.14 skulle fungere som en kontroll, slik at et negativt resultat for denne ville gjøre sikkerheten i resultatene lav. *Vibrio alginolyticus* 2047 viste i screeningforsøkene å kunne utnytte glukuronsyre. Alle enzymene undersøkt i genanalysen inngår i nedbrytingen av glukuronsyre (Ashwell *et al.*, 1958). Det er derfor sannsynlig at stammen har enzymene, uavhengig av om det er aktivt under alginatdegradering. Dette gjør at analysen uansett ikke vil kunne gi svar på om disse enzymene var tilknyttet alginatdegradering for denne stammen.

Totalt sett viste resultatene at stammen *Vibrio alginolyticus* 2047 produserte både ekstracellulære G- og M-lyaser, mens *Enterobacteriaceae* 1994 produserte kun ekstracellulær G-lyase. Begge stammene viste hovedsakelig en oppsamling av di- og trimerer, som tyder på at det er i denne formen cellene tar opp nedbrytingsproduktene. Dette ligner resultater fra tidligere rapporter, der alginatkjedene kuttet ned til trimerer, noe som igjen har en inhiberende effekt på lyasene (Boyd & Turvey, 1978; Lange *et al*, 1989). Videre intracellulære nedbrytningsspor ble ikke identifisert.

3.4 SAMLET VURDERING

Målet med oppgaven var å finne alginatdegraderende bakteriestammer, og karakterisere fermenteringsspor og alginatnedbryting i utvalgte stammer. Screeningforsøk av en rekke bakteriestammer viste at mange av stammene kunne utnytte alginat, men med svært ulik veksthastighet. Både kråkebolletarm og råtnende tare var gode kilder til alginatdegraderende bakteriestammer, og potensialet for stammer som kan fermentere alginat ser ut til å være stort, også utenfor de stammene som ble valgt ut i denne oppgaven. Flere stammer ble valgt ut for å undersøke utbytte og vekst på alginat, samt noen forsøk med glukose og mannitol. Av disse ble to interessante bakteriestammer funnet. Den ene, *Vibrio alginolyticus* 2047, hadde høy veksthastighet og degraderte alginat svært godt aerobt. Den andre, *Enterobacteriaceae* 1994, degraderte alginat og produserte etanol fra glukose og mannitol. For begge stammene var hovedproduktet fra alginat acetat.

Isolater av *Vibrio alginolyticus* har tidligere vist å kunne fermentere både mannitol og glukose (Schmidt, 1979), og det har blitt isolert flere alginat lyaser fra arten (Tseng *et al.*, 1992). Stammen som ble undersøkt i denne oppgaven, *Vibrio alginolyticus* 2047, kunne både degradere og nyttegjøre seg av alginat. Stammen vokste generelt dårlig når oksygentilførselen ble begrenset. Stammen viste likevel en fermentativ metabolisme, men hadde ikke etanolproduksjon. Det ble påvist både M og G spesifikke alginat lyaser i supernatant fra aerob kultur, og veksthastigheten aerobt på alginat var svært høy sammenlignet med andre stammer. Den gode degraderingen og utnyttelsen av alginat gjør stammen interessant, selv om den ikke har etanolfermentering. En mulighet for utnyttelse av tare kan være kombinasjon av flere stammer, og eventuelt å utnytte alginat til andre formål. For eksempel metanproduksjon fra alginat nedbrutt til acetat.

Det har tidligere vært rapportert at få stammer innenfor familien *Enterobacteriaceae* kan degradere alginat (Davies & Ewing, 1964). I senere tid har derimot alginat lyaser blitt isolert og påvist fra flere stammer innenfor familien, blant annet innenfor slektene *Klebsiella* og *Enterobacter* (Lange *et al.*, 1989; Lee & Lee, 2011). Stammen som ble undersøkt i denne oppgaven, *Enterobacteriaceae* 1994, vokste godt på alginat, og hadde etanolproduksjon fra glukose og mannitol, men ikke alginat. Etanolutbyttet økte ved mer begrenset oksygentilførsel. Maksimalt etanolutbytte oppnådd fra mannitol var 0,23 g/g uten optimalisering, som er lavere enn tidligere rapportert fra andre stammer, 0,38 g/g

3. Resultater og diskusjon

(Horn *et al.*, 2000a). Analyser av alginatdegradering viser at stammen produserte ekstracellulære G-lyaser, men ikke M-lyaser. Dette er det samme resultatet som tidligere er rapportert om *Klebsiella*-stammer (Boyd & Turvey, 1977; Lange *et al.*, 1989).

Nedbrytingsspor fra alginat ble forsøkt karakterisert, både i forhold til hvilke momomerer/oligomerer som ble tatt opp av cellen, og hvordan disse videre ble brutt ned. Supernatantprøver med aktivt ekstracellulært enzym fra stammene ble inkubert med polymannuronat og polyguluronat, og i flere av prøvene ble det observert en oppsamling av trimerer ved endt inkubering. Det har tidligere blitt rapportert om lyaser som blir inhibert av triguluronat og ikke bryter ned oligomeren lengre (Boyd & Turvey, 1978; Lange *et al.*, 1989), noe som så ut til å gjelde også for enzymene undersøkt i denne oppgaven. Videre intracellulært nedbrytingsspor ble ikke identifisert, men ved nedbryting av langkjedet alginat hadde toppene identifisert en umettet ende. Dette bekrefter en nedbryting til umettede uronsyrer, som forklart i Avsnitt 1.4.1, og styrker hypotesen om alginatdegradering til den umettede uronsyren 4-deoxy-5-ketouronsyre og videre omdannelse til 2-keto-3-deoxy-D-glukonat (Avsnitt 1.4.2). Stammen som produserte etanol fra både mannitol og glukose, og degraderte og vokste godt på alginat, kunne likevel ikke produsere etanol fra alginat. Dette tyder på at det ligger en utfordring i å fullføre sporet alginat-pyruvat-etanol. Årsaken til at det er vanskelig å få produsert etanol fra alginat er mest sannsynlig at redoksbalansen ikke går opp, som forklart i Avsnitt 1.4.2.

Screeningforsøkene resulterte i flere interessante bakteriestammer som en kunne gå videre med, men forsøket kunne gitt mer informasjon dersom flere stammer hadde blitt undersøkt for fermentativ metabolisme og fermenteringsprodukt. Et forsøksoppsett med en mer effektiv testing av flere stammer burde derfor vært utviklet. HPLC metoden som ble benyttet ga resultater med en ukjent og sannsynligvis stor usikkerhet i konsentrasjon, men er en enkel metode for å påvise ulike fermenteringsprodukt, som beskrevet av Ehrlich *et al.* (1981). Vekstforsøkene med ulik oksygentilførsel i kulturene ga indikasjoner på hvordan vekst og produktutbytte kunne optimaliseres, men resultatene var noe usikre og tvetydige. For å få mer detaljert informasjon om fermentering av alginat, kunne det vært interessant å utføre vekstforsøk i fermentorer. Identifiseringen av nedbrytingsproduktene fra alginat fungerte svært godt med HPAEC-PAD metoden, og denne metoden anbefales til videre forskning innenfor feltet.

4 KONKLUSJON OG VIDERE ARBEID

4.1 KONKLUSJON

To interessante alginatdegraderende stammer ble funnet i denne oppgaven. Den ene, *Vibrio alginolyticus* 2047, hadde høy veksthastighet og degraderte alginat svært godt aerobt, men hadde ikke etanolfermentering. Den andre, *Enterobacteriaceae* 1994, produserte ekstracellulære G-lyaser og kunne utnytte alginat. Den vokste bedre når oksygentilførselen ble begrenset og produserte etanol fra mannitol og glukose. Begge stammene er interessante, men til ulike formål.

Det ble vist at alginatdegraderende bakteriestammer, med etanolproduksjon fra glukose og mannitol, ikke produserte etanol fra alginat. Dette viser at en av hovedutfordringene ved fermentering av alginat vil være å få balansert og gjennomført det biokjemiske sporet fra alginat til etanol, ikke å finne bakteriestammer som har de involverte enzymene.

4.2 VIDERE FORSKNING

For aktuelle stammer vil det, som tidligere nevnt, være av interesse med mer kontrollerte fermentorforsøk, med analyser av kulturene underveis. Dette vil kunne gi bedre innsikt i hvordan det nedbrutte alginatet tas opp og omsettes av cellene. Nedbrytingsspor burde kartlegges bedre og standarder lages for lettere å kunne identifisere intracellulære metabolitter. Andre metoder enn HPLC bør også vurderes. For eksempel kan massespektrometri være en mer egnet metode for sikrere resultat. En bedre forståelse av alginatdegraderingen og de ulike fermenteringssporene kan gi grunnlag for utvikling av fermenteringsprosessen og muligheter innenfor genetisk manipulering.

Det lyktes ikke å produsere etanol fra alginat i denne studien, og resultatene tyder på at dette vil være en utfordring. Det er tidligere rapportert om etanol som et av flere produkt fra alginat ved anaerobe betingelser fra stammen *Clostridium grantii* (Mountfort et al., 1994). Denne stammen ble bestilt inn, men på grunn av studiens tidsramme ikke analysert. En kartlegging av stammens metabolisme, som forklart over, kan gi viktige svar for videre arbeid med etanolproduksjon fra tare.

4 Konklusjon og videre arbeid

Selv om de undersøkte stammene vokste godt i et alginatmedium, vil det være av interesse å undersøke om de kan utnytte alginat direkte fra tare. Som forklart i Avsnitt 1.2.3 er det intercellulære nettverket i tareveggen svært sterkt, og det kan være vanskelig for mikrober å vokse på ubehandlet materiale. Noen studier har blitt gjort på fermentering av tare, med ulik forbehandling (Horn *et al.*, 2000b; Adams *et al.*, 2009). I motsetning til disse studiene, er stammene undersøkt i denne oppgaven valgt ut på bakgrunn av evnen til å degradere alginat, noe som kan gjøre dem bedre egnet til dette formålet.

Hvis det viser seg å være for vanskelig eller lite lønnsomt å utnytte alginat til etanolfermentering, vil det likevel være en fordel ved fermentering av tare at de involverte stammene kan degradere alginat for å gjøre næringsstoffene laminaran og mannitol tilgjengelige for etanolfermentering. En mulighet er å se på alternativer for å kombinere kulturer av alginatdegraderende og etanolfermenterende stammer, for å kunne senke kostnadene forbundet med forbehandling og ekstrahering, og øke etanolutbytte. En attraktiv mulighet er også utvikling av et bioraffineri, hvor etanolproduksjon fra tilgjengelige karbohydrater kan foregå i kombinasjon med at resten av materialet utnyttes på andre måter, som ved produksjon av biogass.

REFERANSER

- Adams, J., Gallagher, J. & Donnison, I. (2009) Fermentation study on *Saccharina latissima* for bioethanol production considering variable pre-treatments. *Journal of Applied Phycology*, **21**, 569-574.
- Ashwell, G., Wahba, A. J. & Hickman, J. (1958) A new pathway of uronic acid metabolism. *Biochim Biophys Acta*, **30**, 186-7.
- Ashwell, G., Wahba, A. J. & Hickman, J. (1960) Uronic acid metabolism in bacteria. I. Purification and properties of uronic acid isomerase in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, **235**, 1559-65.
- Bachmann, B., Luke, W. & Hunsmann, G. (1990) Improvement of PCR amplified DNA sequencing with the aid of detergents. *Nucleic Acids Res*, **18**, 1309.
- Bakke, I., De Schryver, P., Boon, N. & Vadstein, O. (2011) PCR-based community structure studies of bacteria associated with eukaryotic organisms: a simple PCR strategy to avoid co-amplification of eukaryotic DNA. *J Microbiol Methods*, **84**, 349-51.
- Ballance, S., Holtan, S., Aarstad, O. A., Sikorski, P., Skjåk-Bræk, G. & Christensen, B. E. (2005) Application of high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection and statistical analysis to study oligosaccharide distributions - a complementary method to investigate the structure and some properties of alginates. *Journal of Chromatography A*, **1093**, 59-68.
- Berg, J. M., Tymoczko, J., L. & Stryer, L. (2007) *Biochemistry*, New York, W.H. Freeman and Company.
- Blom, H. & Mortvedt, C. (1991) Anti-microbial substances produced by food associated micro-organisms. *Biochem Soc Trans*, **19**, 694-8.
- Boyd, J. & Turvey, J. R. (1978) Structural Studies of Alginic acid, using a bacterial poly-[alpha]-L-gulonate lyase. *Carbohydrate Research*, **66**, 187-194.
- Brennan, L. & Owende, P. (2010) Biofuels from microalgae--A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **14**, 557-577.
- Campa, C., Oust, A., Skjåk-Bræk, G., Paulsen, B. S., Paoletti, S., Christensen, B. E. & Ballance, S. (2004) Determination of average degree of polymerisation and distribution of oligosaccharides in a partially acid-hydrolysed homopolysaccharide: A comparison of four experimental methods applied to mannuronan. *Journal of Chromatography A*, **1026**, 271-281.

- Carlsson, A., van Beilen, J., Moller, R. & Clayton, D. (2007) Micro- and macro-algae: utility for industrial applications. In: D, B. (eds.) *Outputs from the EPOBIO project*. York: University of York.
- Chisti, Y. (2007) Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*, **25**, 294-306.
- Davis, B. R. & Ewing, W. H. (1964) Lipolytic, pectolytic and alginolytic activities of *Enterobacteriaceae*. *J Bacteriol*, **88**, 16-19.
- Doran, P. M. (1995) *Bioprocess engineering principles*, London, Academic press (Elsevier).
- Doubet, R. S. & Quatrano, R. S. (1982) Isolation of Marine Bacteria Capable of Producing Specific Lyases for Alginate Degradation. *Appl. Environ. Microbiol.*, **44**, 754-756.
- Draget, K. I., Moe, S. T., Skjåk-Bræk, G. & Smidsrød, O. (2006) Alginates. In: STEPHEN, A. M., PHILLIPS, G. O. & WILLIAMS, P. A. (eds.) *Food polysaccharides and their applications*. CRC/Taylor & Francis.
- Draget, K. I. & Taylor, C. (2011) Chemical, physical and biological properties of alginates and their biomedical implications. *Food Hydrocolloids*, **25**, 251-256.
- Ehrlich, G. G., Goerlitz, D. F., Bourell, J. H., Eisen, G. V. & Godsy, E. M. (1981) Liquid chromatographic procedure for fermentation product analysis in the identification of anaerobic bacteria. *Appl Environ Microbiol*, **42**, 878-85.
- Farmer, J. J., 3rd & Eagon, R. G. (1969) Aldohecuronic acid catabolism by a soil Aeromonas. *J Bacteriol*, **97**, 97-106.
- Forro, J. (1987) Microbial degradation of marine biomass. In: BIRD, K. T. & BENSON, P. H. (eds.) *Seaweed cultivation for renewable resources*. Amsterdam: Elsevier.
- Gacesa, P. (1992) Enzymic degradation of alginates. *International Journal of Biochemistry*, **24**, 545-552.
- Graevenitz, A. von & Currington, G. O. (1973) Halophilic vibrios from extraintestinal lesions in man. *Infection*, **1**, 54-58.
- Guiry, M. D. & Blunden, G. (eds.) (1991) *Seaweed resources in Europe, uses and potential*, Chichester: John Wiley & Sons Ltd.
- Hanssen, J. F., Indergaard, M., Østgaard, K., Bævre, O. A., Pedersen, T. A. & Jensen, A. (1987) Anaerobic digestion of *Laminaria* spp. and *Ascophyllum nodosum* and application of end products. *Biomass*, **14**, 1-13.
- Haug, A. (1964) *Composition and properties of alginates*, Trondheim, Norsk institutt for tang- og tareforskning.

- Haug, A. & Jensen, A. (1954) *Seasonal variations in the chemical composition of Alaria esculenta, Laminaria saccharina, Laminaria hyperborea and Laminaria digitata from Northern Norway*, Trondheim, Norsk institutt for tang- og tareforskning.
- Haug, A., Larsen, B. & Smidsrød, O. (1967) Studies on the sequence of uronic acid residues in alginic acid. *Acta chemica scandinavica*, **21**, 691-704.
- Haug, A., Larsen, B. & Smidsrød, O. (1974) Uronic acid sequence in alginate from different sources. *Carbohydrate Research*, **32**, 217-225.
- Haugen, F., Kortner, F. & Larsen, B. (1990) Kinetics and specificity of alginate lyases: Part I, a case study. *Carbohydrate Research*, **198**, 101-109.
- Hickman, J. & Ashwell, G. (1960) Uronic acid metabolism in bacteria. II. Purification and properties of D-altronic acid and D-mannonic acid dehydrogenases in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, **235**, 1566-70.
- Horn, S. J. (2000) *Bioenergy from brown seaweeds*. Doktor ingeniøravhandling, Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet.
- Horn, S. J. (2010) *Vibrio splendidus*. *Internt notat*, Institutt for kjemi, bioteknologi og matvitenskap, Universitet for miljø og biovitenskap, Ås.
- Horn, S. J., Aasen, I. M. & Østgaard, K. (2000a) Production of ethanol from mannitol by *Zymobacter palmae*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, **24**, 51-57.
- Horn, S. J., Aasen, I. M. & Østgaard, K. (2000b) Ethanol production from seaweed extract. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, **25**, 249-254.
- Indergaard, M. & Jensen, A. (1991) *Utnyttelse av marin biomasse*, Ås/Trondheim, Institutt for bioteknologi, Norges Tekniske Høgskole.
- Ivanova, E. P., Bakunina, I. Y., Sawabe, T., Hayashi, K., Alexeeva, Y. V., Zhukova, N. V., Nicolau, D. V., Zvaygintseva, T. N. & Mikhailov, V. V. (2002) Two Species of Culturable Bacteria Associated With Degradation of Brown Algae *Fucus Evanescons*. *Microbial Ecology*, **43**, 242-249.
- Jensen, A. & Haug, A. (1956) Geographical and seasonal variation in the chemical composition of *Laminaria hyperborea* and *Laminaria digitata* from the Norwegian coast, Trondheim, Norsk institutt for tang- og tareforskning.
- Kilgore, W. W. & Starr, M. P. (1959) Catabolism of galacturonic and glucuronic acids by *Erwinia carotovora*. *J Biol Chem*, **234**, 2227-35.
- KLIF. (2010) *Klima- og forurensningsdirektoratet, Innføring av nye kra for drivstoff og biodrivstoff* [Online]. Available: <http://www.klif.no/Aktuelt/Horinger-og-kunngjoringer/2010/2009-1462/> [Accessed 21.01. 2011].

- Kraan, S. (2010) Mass-cultivation of carbohydrate rich macroalgae, a possible solution for sustainable biofuel production. *Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change*, 1-20.
- Kristiansen, K. A., Schirmer, B. C., Aachmann, F. L., Skjåk-Bræk, G., Draget, K. I. & Christensen, B. E. (2009) Novel alginates prepared by independent control of chain stiffness and distribution of G-residues: Structure and gelling properties. *Carbohydrate Polymers*, **77**, 725-735.
- Krylova, A., Kozyukov, E. & Lapidus, A. (2008) Ethanol and diesel fuel from plant raw materials: A review. *Solid Fuel Chemistry*, **42**, 358-364.
- Lange, B., Wingender, J. & Winkler, U. K. (1989) Isolation and characterization of an alginate lyase from *Klebsiella aerogenes*. *Arch Microbiol*, **152**, 302-8.
- Lee, S.-M. & Lee, J.-H. (2011) The isolation and characterization of simultaneous saccharification and fermentation microorganisms for *Laminaria japonica* utilization. *Bioresource Technology*, In Press, Corrected Proof.
- Lilleengen, S. (2009) *Biogass - Miljøvennlig, sikker, lønnsom*, Trondheim, Tapir Akademisk Forlag.
- Lin, Y. & Tanaka, S. (2006) Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **69**, 627-642.
- Lüning, K. & Pang, S. (2003) Mass cultivation of seaweeds: current aspects and approaches. *Journal of Applied Phycology*, **15**, 115-119.
- Madigan, M. T. & Martinko, J. M. (2006) *Brock Biology of Microorganisms*, San Francisco, Pearson Education, Inc.
- Maicas, S., Ferrer, S. & Pardo, I. (2002) NAD(P)H regeneration is the key for heterolactic fermentation of hexoses in *Oenococcus oeni*. *Microbiology*, **148**, 325-32.
- Michaud, P., Da Costa, A., Couritois, B. and Courtois, J. (2003) Polysaccharide Lyases: Recent Developments as Biotechnological Tools. *Critical Reviews in Biotechnology*, **23**, 233-266.
- Moat, A. G., Foster, J. W. & Spector, M. P. (2002) *Microbial physiology*, New York, Wiley-Liss, Inc.
- Moen, E. (1997) *Biological degradation of brown seaweeds*. Doktor ingeniøravhandling, Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet.
- Moen, E., Horn, S. & Østgaard, K. (1997) Biological degradation of *Ascophyllum nodosum*. *Journal of Applied Phycology*, **9**, 347-357.

- Mountfort, D. O., Rainey, F. A., Burghardt, J. & Stackebrandt, E. (1994) *Clostridium grantii* sp. nov., a new obligately anaerobic, alginolytic bacterium isolated from mullet gut. *Archives of Microbiology*, **162**, 173-179.
- Mussatto, S. I., Dragone, G., Guimarães, P. M. R., Silva, J. P. A., Carneiro, L. M., Roberto, I. C., Vicente, A., Domingues, L. & Teixeira, J. A. (2010) Technological trends, global market, and challenges of bio-ethanol production. *Biotechnology Advances*, **28**, 817-830.
- Nakamura, L. K. (1987) *Bacillus alginolyticus* sp. nov. and *Bacillus chondroitinus* sp. nov., two alginat-degrading species. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **37**, 284-286.
- Persson, M. & Wellinger, A. (2006) *Biogas upgrading and utilisation*, IEA Bioenergy.
- Picataggio, S. (2009) Potential impact of synthetic biology on the development of microbial systems for the production of renewable fuels and chemicals. *Curr Opin Biotechnol*, **20**, 325-9.
- Preiss, J. & Ashwell, G. (1962a) Alginic acid metabolism in bacteria: I. Enzymatic formation of unsaturated oligosaccharides and 4-deoxy-L-Erythro-5-hexoseulose uronic acid. *The journal of biological chemistry*, **237**, 309-316.
- Preiss, J. & Ashwell, G. (1962b) Alginic acid metabolism in bacteria: II. The enzymatic reduction of 4-deoxy-L-Erythro-5-hexoseulose uronic acid to 2-keto-3-deoxy-D-gluconic acid. *The journal of biological chemistry*, **237**, 317-321.
- Quain, D. E. & Boulton, C. A. (1987) Growth and metabolism of mannitol by strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of General Microbiology*, **133**, 1675-1684.
- Radakovits, R., Jinkerson, R. E., Darzins, A. & Posewitz, M. C. (2010) Genetic Engineering of Algae for Enhanced Biofuel Production. *Eukaryotic Cell*, **9**, 486-501.
- Ratkowsky, D. A., Olley, J., McMeekin, T. A. & Ball, A. (1982) Relationship between temperature and growth rate of bacterial cultures. *J Bacteriol*, **149**, 1-5.
- Ruijsenaars, H. J., de Bont, J. A. & Hartmans, S. (1999) A pyruvated mannose-specific xanthan lyase involved in xanthan degradation by *Paenibacillus alginolyticus* XL-1. *Appl Environ Microbiol*, **65**, 2446-52.
- Rødde, R. S. H. (1997) *Chemical composition and alginate biosynthesis in protoplasts from Laminaria digitata and Laminaria saccharina*. Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet.
- Sawabe, T., Oda, Y., Shiomi, Y. & Ezura, Y. (1995) Alginate degradation by bacteria isolated from the gut of sea urchins and abalones. *Microbial Ecology*, **30**, 193-202.

- Sawabe, T., Setoguchi, N., Inoue, S., Tanaka, R., Ootsubo, M., Yoshimizu, M. & Ezura, Y. (2003) Acetic acid production of *Vibrio haliotocoli* from alginate: a possible role for establishment of abalone-*V. haliotocoli* association. *Aquaculture*, **219**, 671-679.
- Sawabe, T., Sugimura, I., Ohtsuka, M., Nakano, K., Tajima, K., Ezural, Y. & Christen, R. (1998) *Vibrio haliotocoli* Spm nov., a non-motile alginolytic marine bacterium isolated from the gut of the abalone *Haliotis discus hannai*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **48**, 573-580.
- Schmidt, U., Chmel, H. & Cobbs, C. (1979) *Vibrio alginolyticus* infections in humans. *J Clin Microbiol*, **10**, 666-668.
- Shida, O., Takagi, H., Kadowaki, K., Nakamura, L. K. & Komagata, K. (1997) Transfer of *Bacillus alginolyticus*, *Bacillus chondroitinus*, *Bacillus curdlanolyticus*, *Bacillus glucanolyticus*, *Bacillus kobensis*, and *Bacillus thiaminolyticus* to the genus *Paenibacillus* and emended description of the genus *Paenibacillus*. *Int J Syst Bacteriol*, **47**, 289-98.
- Singh, A., Nigam, P. S. & Murphy, J. D. (2011) Renewable fuels from algae: An answer to debatable land based fuels. *Bioresource Technology*, **102**, 10-16.
- Skjak-Braek, G., Grasdalen, H. & Larsen, B. (1986) Monomer sequence and acetylation pattern in some bacterial alginates. *Carbohydr Res*, **154**, 239-50.
- Smidsrød, O. & Moe, S. T. (2008) *Biopolymer chemistry*, Trondheim, Tapir Academic Press.
- Smiley, J. D. & Ashwell, G. (1960) Uronic acid metabolism in bacteria. III. Purification and properties of D-altronic acid and D-mannonic acid dehydrases in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, **235**, 1571-5.
- Tang, J., Xiao, Y., Oshima, A., Kawai, H. & Nagata, S. (2008) Disposal of seaweed wakame (*Undaria pinnatifida*) in composting process by marine bacterium *Halomonas* sp. AW4. *International Journal of Biotechnology*, **10**, 73-85.
- Tang, J. C., Taniguchi, H., Chu, H., Zhou, Q. & Nagata, S. (2009) Isolation and characterization of alginate-degrading bacteria for disposal of seaweed wastes. *Lett Appl Microbiol*, **48**, 38-43.
- Tseng, C.-H., Yamaguchi, K., Nishimura, M. & Kitamikado, M. (1992) Alginate Lyase from *Vibrio alginolyticus* ATCC 17749. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **58**, 2063-2067.
- UNFCCC. (2011) *United Nations Framework Convention on Climate Change: Kyoto protocol* [Online]. http://unfccc.int/kyoto_protocol/items/2830.php. Available: http://unfccc.int/kyoto_protocol/items/2830.php [Accessed 21.02. 2011].
- Unkles, S. E. (1977) Bacterial flora of the sea urchin *Echinus esculentus*. *Appl Environ Microbiol*, **34**, 347-50.

- Wahba, A. J., Hickman, J. W. & Ashwell, G. (1958) Enzymatic formation of D-tagaturonic and D-fructuronic acid I. *Journal of the American Chemical Society*, **80**, 2594-2595.
- Wong, T. Y., Preston, L. A. & Schiller, N. L. (2000) Alginate lyase: review of major sources and enzyme characteristics, structure-function analysis, biological roles, and applications. *Annu Rev Microbiol*, **54**, 289-340.
- Østgaard, K. (1992) Enzymatic microassay for the determination and characterization of alginates. *Carbohydrate Polymers*, **19**, 51-59.
- Østgaard, K., Indergaard, M., Markussen, S., Knutsen, S. & Jensen, A. (1993) Carbohydrate degradation and methane production during fermentation of *Laminaria saccharina* (Laminariales, Phaeophyceae). *Journal of Applied Phycology*, **5**, 333-342.

VEDLEGGSLISTE

Vedlegg V1: Medier

Vedlegg V2: Primere

Vedlegg V3: DNA ekstraksjon

Vedlegg V4: Tabeller fra bakterieisolasjon

Vedlegg V5: HPLC data

Vedlegg V6: Utregninger

Vedlegg V7: HPAEC-PAD

VEDLEGG V1: MEDIER

Ferskvannsmediet beskrevet i Avsnitt 2.2.1 ble tilsatt spormetalløsningen TMS-6, og innhold i denne er vist i Tabell V.1. Når mediet ble brukt til *Paenibacillus*stammene ble det i tillegg tilsatt en vitaminblanding, og innhold i denne er vist i Tabell V.2.

Tabell V.1: TMS-6 spormetalløsning tilsatt FM-medium.

Stoff	Konsentrasjon (g/L)
FeSO ₄ -7H ₂ O	50
CuSO ₄ -5H ₂ O	3,9
ZnSO ₄ -7H ₂ O	4,4
MnSO ₄ -H ₂ O	1,5
Na ₂ MoO ₄ -H ₂ O	0,1
CoCl ₂ -6H ₂ O	0,2
Konsentrert HCl	50 mL/L
Destillert vann	Til 1000 mL

Tabell V.2: Vitaminblanding tilsatt FM-medium.

Stoff	Firma	Konsentrasjon (mg/L)
Pyridoxine-HCl	Sigma	10
Thiamine-HCl	Sigma	5
Riboflavin	Sigma	5
Niacinamide	Sigma	5
D-Ca-pantothenate	Sigma	5
p-amino-benzoic acid	Sigma	5
NA-lipoic acid	Sigma	5
Biotin	Sigma	2
Folic acid	Sigma	2
Vitamin B ₁₂	Sigma	5
2-Mercaptoethane sulfonic acid	MP Biochemicals	5

VEDLEGG V2: PRIMERE

Primere til PCR reaksjonen ble bestilt inn til tre ulike enzymer på bakgrunn av fermenteringssporene funnet i Avsnitt 1.4.2. Enzymene som ble undersøkt var Mannonate dehydratase (EC 4.2.1.8), 2-dehydro-3-deoksyglukonokinase (EC 2.7.1.45) og 2-dehydro-3-deoksyfosfoglukonat aldolase (EC 4.1.2.14). Da genomene til de aktuelle stammene benyttet i denne oppgaven ikke var kjent, ble primersekvensene laget etter en sammenligning av flere ulike stammer i samme familie/slekt. For *Vibrio alginolyticus* 2047 ble alle eller noen av stammene *Vibrio vulnificus* CMCP6, YJD16 og M06-24/o, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio harveyi*, *Vibrio splendidus* og *Vibrio sp.* Ex 25 sammenlignet, og for *Enterobacteriaceae* 1994 ble alle eller noen stammene *Vibrio sp.* Ex 25, *Vibrio splendidus*, *Enterobacter cloacae* ATCC 13047, *Escherichia coli* K12 MG1655, *Eriwinia amylovora* ATCC 49946 og *Enterobacter sp.* 638 sammenlignet. Gensekvenser ble funnet i genomdatabasen til DOE Joint Genome Institute. Sekvensene ble sammenlignet og primere designet ved hjelp av programvaren Clone. Primersekvenser for de tre genene er vist i Tabell V.3, Tabell V.4 og Tabell V.5.

Tabell V.3: Primersekvenser til Mannonate dehydratase.

EC 4.2.1.8 Mannonate dehydratase			
Stamme	Base nr.	Sekvens	Smeltetemp. (°C)
<i>Enterobacteriaceae</i> 1994 Forward	547-567	GYGCDGAAGARGGYTACACS	66,0
<i>Enterobacteriaceae</i> 1994 Reverse	1049-1068	GCCTRGTGCCDGTRGTYTAC	57,2
<i>Vibrio alginolyticus</i> 2047Forward	67-86	CRGGYCAACAGGCATTGTG	70,4
<i>Vibrio alginolyticus</i> 2047Reverse	573-592	GGTTCGCGTTGAGCTRCCGA	69,3

Tabell V.4: Primersekvenser til 2-dehydro-3-deoksyglukonokinase.

EC 2.7.1.45 2-dehydro-3-deoksyglukonokinase			
Stamme	Base nr.	Sekvens	Smeltetemp. (°C)
<i>Enterobacteriaceae</i> 1994 Alt. 1 Fwd.	31-50	GGTGAAGCSATGGCRATGTT	58,8
<i>Enterobacteriaceae</i> 1994 Alt. 1 Rev.	507-526	GTTRRACGCGGGCCACGACT	64,7
<i>Enterobacteriaceae</i> 1994 Alt. 2 Fwd.	31-50	GGCGAATGYATGRTKGAGCT	59,5
<i>Enterobacteriaceae</i> 1994 Alt. 2 Rev.	507-526	ATTGRASGCRGGCYMCRAS	64,0
<i>Vibrio alginolyticus</i> 2047 Fwd.	97-116	CTBAAYRCBGRSTKTAYCT	51,9
<i>Vibrio alginolyticus</i> 2047Rev.	298-317	GCRTSGAAGRWRATRACCGC	52,9

Tabell V.5: Primersekvenser til 2-dehydro-3-deoksyfosfoglukonat aldolase.

EC 4.1.2.14 2-dehydro-3-deoksyfosfoglukonat aldolase			
Stamme	Base nr.	Sekvens	Smelte-temp. (°C)
<i>Enterobacteriaceae</i> 1994 Alt. 1 Fwd.	93-112	GATGGCRAAAGCGYTGGTTG	68,2
<i>Enterobacteriaceae</i> 1994 Alt. 1 Rev.	370-389	CCRTACCTGATGCCARACTT	58,4
<i>Enterobacteriaceae</i> 1994 Alt. 2 Fwd.	93-112	MYTRGSMMARGYRCTGRTTG	44,6
<i>Enterobacteriaceae</i> 1994 Alt. 2 Rev	370-389	CGTTACCTTTACCCRGAMGC	65,5
<i>Vibrio alginolyticus</i> 2047 Fwd.	347-366	TRGTTGARCAAGCRATGGAA	48,7
<i>Vibrio alginolyticus</i> 2047 Rev.	525-544	MACACCRCAATGMACCTACC	45,7

VEDLEGG V3: DNA EKSTRAKSJON

Modifisert protokoll fra Qiagen DNeasy Blood & Tissue kit (250)

3 mL kultur dyrket på alginat ble sentrifugert og supernatanten fjernet. Pellet ble frosset ned for lagring over natten og DNA ekstrahert på følgende måte neste morgen.

180 µL enzymatisk lysisbuffer ble tilsatt prøven for resuspending av pelletsen. Prøven ble så inkubert ved 37 °C i 30 minutter. 40 µL Proteinase K og 180 µL ATL buffer ble så tilsatt prøven og blandet med en Vortex 3 (IKA®, Tyskland) og inkubert ved 55 °C i 30 minutter. 200 µL AL buffer ble deretter tilsatt og løsningen ble igjen blandet med vortex og inkubert ved 70 °C i 10 minutter.

Etter siste inkubasjon ble 300 µL 96 % etanol tilsatt løsningen og blandet inn med vortex som over. Hvis prøven ikke var fullstendig lysert etter tilsats av etanol ble uløst materiale sentrifugert ned og supernatanten tatt videre.

Prøven ble så overført til en DNeasy kolonne plassert i et 2 mL rør, og sentrifugert ved 8000 rpm i 1 minutt. Filtratet ble fjernet. 500 µL AW 1 buffer ble tilsatt kolonnen og prøven ble på nytt sentrifugert ved 8000 rpm i 1 minutt. Filtratet ble fjernet.

500 µL AW 2 buffer ble så tilsatt kolonnen og prøven ble sentrifugert ved full hastighet (15 000 rpm) i 3 minutter. Kolonnen ble deretter overført til et eppendorfrør og tilsatt 100 µL DNA fritt vann. Prøven ble inkubert ved romtemperatur i 1 minutt før den ble sentrifugert ved 8000 rpm i 1 minutt. Kolonnen ble fjernet og DNA ekstraktet i eppendorfrøret ble kvantifisert med Nanodrop.

Løsninger benyttet:

- Enzymatisk lysis buffer; 20 mM Tris, 10 mM EDTA, 1,2 % Triton. Buffer ble tilsatt 20 mg/mL lysozym (EC 3.2.1.17) like før brukt.
- QUIAGEN Proteinase K, Lot nr. 136234707
- ATL buffer (Tissue lysis buffer), Lot nr. 130170222
- AL buffer (lysis buffer), Lot nr. 130171976
- AW 1 buffer (wash buffer), Lot nr. 124115068
- AW 2 buffer (wash buffer), Lot nr. 124116545

VEDLEGG V4: TABELLER FRA BAKTERIEISOLASJON

KRÅKEBOLLER

Renkulturer fra bakteriestammene isolert fra kråkebolletarm som ble tatt videre til et aerobt dyrkingsforsøk på alginat er vist i Tabell V.6. Tabellen viser hvordan renkulturene ble dyrket frem. Kintall av tarmprøven ble beregnet ved utstrykning på Marine-Broth agarplater, og etter 4 dager inkubering ved 13 °C ga fortynningen 10^{-6} 74, 70 og 53 kolonier på de 3 platene.

Tabell V.6: Stammer isolert fra kråkebolletarm og dyrkingsmetoden benyttet for å isolere de. Tabellen viser også høyeste oppnådde OD verdi ved vekst på flytende MM1 medium med alginat, og tidspunkt denne verdien ble oppnådd ved i timer etter inkulering,

Stamme	Dyrkingsmetode	Maks OD	Tid
1	MB-flytende (rør2) --> MB plate --> renkultur MM plate	1,83	167,5
2	MB-flytende (rør1) --> MB plate --> renkultur MM plate	1,59	188
3	MB-flytende (rør2) --> MB plate --> renkultur MM plate	0,75	51,5
4	MM-flytende (rør1) --> MM plate --> renkultur MM plate	3,00	94
5	MM-flytende (rør1) --> MM plate --> renkultur MM plate	0,82	188
6	MM-flytende (rør1) --> MM plate --> renkultur MM plate	3,08	94
7	MM-flytende (rør2) --> MM plate --> renkultur MM plate	2,70	94
8	MM-flytende (rør2) --> MM plate --> renkultur MM plate	3,12	94
9	Fortynning 10-2 --> MM plate --> renkultur MM plate	3,38	94
10	Fortynning 10-3 --> MM plate --> renkultur MM plate	3,56	94
11	Fortynning 10-4 --> MM plate --> renkultur MM plate	0,53	94
12	Fortynning 10-6 --> MM plate --> renkultur MM plate	1,66	167,5
13	Fortynning 10-6 --> MM plate --> renkultur MM plate	0,73	188
14	Fortynning 10-4 --> MB plate --> renkultur MM plate	2,86	188
15	Fortynning 10-6 --> MB plate --> renkultur MM plate	1,93	94
16	Fortynning 10-6 --> MB plate --> renkultur MM plate	1,23	188

TAREISOLASJON

Renkulturer isolert fra tare tatt med i et dyrkingsforsøk på flytende medium med alginat er vist i Tabell V.8. Prøve 1 er fra skallet på stilken, prøve 2 fra inni stilken, prøve 3 fra roten og prøve 4 fra bladet. Tabell V.7 viser kimtall av de ulike prøvene.

Tabell V.7: Kimtall av prøver fra råttene tare. Tabellen viser de ulike prøvene og antall kolonier og derav celler funnet for hver prøve.

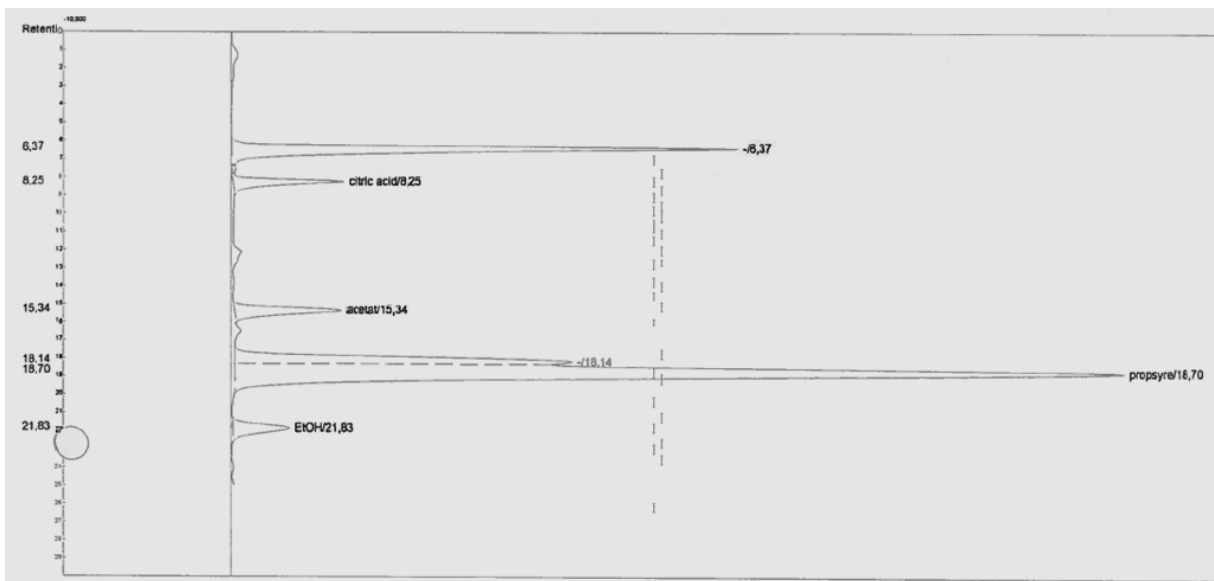
Prøve (g)	Antall kolonier	Fortynning	Celler per mL	Celler per gram
Skall på stilk (0,8)	44	10 ⁻⁶	4,4 x 10 ⁷	5,5 x 10 ⁸
Masse inni stilk (1,4)	181	10 ⁻⁴	1,81 x 10 ⁶	1,29 x 10 ⁷
Rot (0,2)	10	10 ⁻⁶	1 x 10 ⁷	5 x 10 ⁸
Blad (0,3)	9	10 ⁻⁶	9 x 10 ⁶	3 x 10 ⁸

Tabell V.8: Stammer isolert fra tare og dyrkingsmetode benyttet for isolering. Tabellen viser også høyeste oppnådde OD verdi ved vekst på flytende MM1 medium med alginat, og tidspunkt denne verdien ble oppnådd ved i timer etter inokulering.

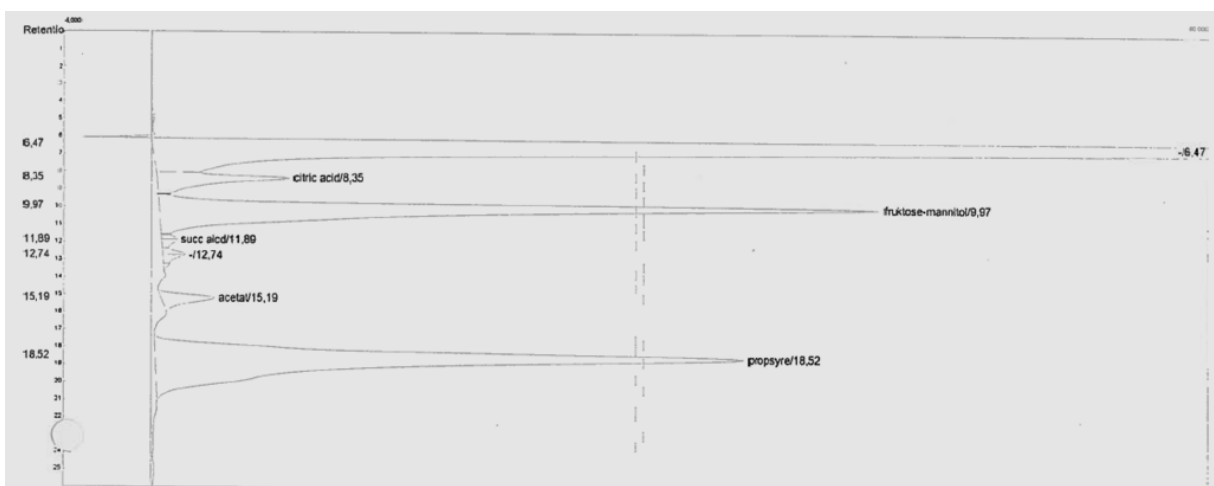
Stamme	Dyrkingsmetode	Maks OD	Tid
1	Prøve 3 --> Fortynning 10 ⁻² --> MM plate --> renkultur MM plate	1,86	72
2	Prøve 1 --> Fortynning 10 ⁻⁴ --> MM plate --> renkultur MM plate	2,84	44
3	Prøve 2 --> MM-flytende (rør 2) --> MM plate --> renkultur MM plate	2,92	102
4	Prøve 4 --> MM-flytende (rør 2) --> MM plate --> renkultur MM plate	1,10	22
5	Prøve 1 --> Fortynning 10 ⁻⁴ --> MB plate --> renkultur MM plate	1,76	102
6	Prøve 3 --> MM-flytende (rør 1) --> MM plate --> renkultur MM plate	2,12	72
7	Prøve 1 --> MM-flytende (rør 2) --> MM plate --> renkultur MM plate	2,09	72
8	Prøve 1 --> MM-flytende (rør 1) --> MM plate --> renkultur MM plate	3,20	44
9	Prøve 4 --> Fortynning 10 ⁻² --> MB plate --> renkultur MM plate	2,07	102
10	Prøve 3 --> Fortynning 10 ⁻² --> MB plate --> renkultur MM plate	1,29	102
11	Prøve 2 --> Fortynning 10 ⁻² --> MM plate --> renkultur MM plate	1,92	102
12	Prøve 2 --> Fortynning 10 ⁻⁶ --> MB plate --> renkultur MM plate	0,60	44

VEDLEGG V5: HPLC DATA

Væskekromatografi (HPLC) ble benyttet til å analysere substratkonsentrasjon og fermenteringsprodukt i oppgaven. Figur V.1 og Figur V.2 viser eksempler på HPLC kromatogram. Figur V.1 viser et bra kromatogram med tydelig separerte toppene. Det er da liten usikkerhet i identifiseringen og kvantifiseringen av de ulike toppene. Figur V.2 viser et kromatogram hvor toppene var dårlig separert. Fordi mange av kromatogrammene var slik som vist i Figur V.2 er usikkerheten i resultatene fra HPLC analysen ganske stor.



Figur V.1: HPLC kromatogram med godt separerte toppene.



Figur V.2: HPLC kromatogram med dårlig separerte toppene.

Standarder analysert med høytrykks væskechromatografi (HPLC) er oppsummert i Tabell V.9. Tabellen viser standardavvik i konsentrasjon beregnet ut fra flere analyser med samme prøve.

Tabell V.9: Standarder med kjent konsentrasjon analysert på HPLC. Tabellen viser gjennomsnittlig retensjonstid og areal for flere analyser av samme prøve, samt standardavvik mellom prøvene. Standardavvik ble ikke beregnet for laktat, succinat, format og pyruvat.

Stoff (g/L)	Retensjonstid (min)	Areal	Standardavvik areal/konsentrasjon (g/L)
Etanol (8,00)	21,72	1022,7	15,4/0,12
Acetat (2,03)	15,20	337,1	18,7/0,11
Glukose (5,00)	9,07	1577,8	44,2/0,14
Mannitol (4,41)	10,04	1662,7	123,0/0,33
Laktat (2,70)	12,50	451,3	Ikke funnet
Succinat (2,90)	11,65	576,6	Ikke funnet
Format (2,00)	13,70	196,7	Ikke funnet
Pyruvat (1,80)	9,35	274,9	Ikke funnet

HPLC analyser av UMB-stammer dyrket i Avsnitt 3.1 er vist i Tabell V.10 og Tabell V.11. Tabellene viser sluttprøver av *Vibrio splendidus* stammer dyrket på mannitol og alginat. For kulturene dyrket på mannitol ble sluttprøver av alle stammene analysert, mens for alginat ble kun stammene 78, 1217, 71 og 173 analysert. Videre er HPLC analyser av supernatant og cellelysatsprøver fra *Enterobacteriaceae* 1994 tilsatt M- og G-blokk, analysert i Avsnitt 3.3.1, vist i Tabell V.12 og Tabell V.13. For de toppene som ble identifisert er konsentrasjon er beregnet ut fra standarder. Andre HPLC-data vist i Avsnitt 3 er tilgjengelig ved etterspørsel.

Tabell V.10: HPLC analyse av *Vibrio splendidus* fra UMB dyrket på mannitol.

Prøve	Retensjonstid (min)	Stoff	Areal	Konsentrasjon prøve (g/L)
VS 60 anaerob mannitol	6,57		8334,53	
	8,34		352,6	
	9,03		213,4	
	10,04	mannitol	3454,87	8,81
	13,34		72,32	
VS 4361 anaerob mannitol	6,58		8667,66	
	8,35		364,03	
	9,04		191,37	
	10,04	mannitol	3513,23	8,95
	13,35		53,4	
VS 1217 anaerob mannitol	6,57		8409,44	
	8,36		374,72	
	9,03		179,93	
	10,03	mannitol	3704,81	9,44
	13,34		88,19	
	18,56		51,57	
VS 78 anaerob mannitol	6,57		8392,19	
	8,36		377,06	
	9,04		175,78	
	10,03	mannitol	3637,82	9,27
	13,36		72,22	
	18,55		50,4	
VS 4286 anaerob mannitol	6,57		8301,77	
	8,35		363,48	
	9,04		203,04	
	10,04	mannitol	3451,82	8,80
	13,33		90,34	
VS 173 anaerob mannitol	6,57		8295,2	
	8,35		525,9	
	10,04	mannitol	3357,83	8,56
	13,37		88,17	
	15,21	acetat	44,98	0,26
	18,97		728,33	
VS 71 anaerob mannitol	6,58		8427,33	
	8,36		377,27	
	9,05		179,56	
	10,04	mannitol	3693,98	9,42
	13,32		68,04	
	18,54		46,56	
VS 4294 anaerob mannitol	6,57		8316,06	
	8,35		363,79	
	9,03		184,7	
	10,04	mannitol	3414,5	8,70
	13,32		68,06	

Tabell V.11: HPLC analyse av *Vibrio splendidus* fra UMB dyrket på alginat

Prøve	Retensjonstid (min)	Stoff	Areal	Konsentrasjon prøve (g/L)
VS 71 anaerob alginat	5,54		85,85	
	6,57		9158,92	
	8,37		442,85	
	9,01		429,84	
	18,54		45,15	
VS 173 anaerob alginat	5,68		39,24	
	6,56		9500,31	
	8,36		823,54	
	13,32		27,15	
	15,3	acetat	ikke reg.	
VS 78 anaerob alginat	5,61		60,71	
	6,58		9354,04	
	8,38		389,13	
	9,04		358,11	
	13,3		ikke reg.	
	18,55		52,38	
VS 1217 anaerob alginat	5,64		60,59	
	6,58		9232,35	
	8,37		379,44	
	9,03		342,73	
	13,3		ikke reg.	
	18,55		48,09	

Tabell V.12: HPLC analyser av supernatant og cellelysat fra *Enterobacteriaceae* 1994 tilsatt M-blokk. Noen prøver ble tilsatt NAD⁺/NADH og ADP/ATP for å øke enzymaktiviteten, og dette er merket med "med tilsats" i tabellen.

Prøve		Retensjonstid (min)	Stoff	Areal	Konsentrasjon prøve (g/L)
Enterobacteriaceae 1994 Supernatant+cellelysat M-blokk	0	6,19		3359,68	
		7,41		110,12	
		8,03		66,34	
		18,5		770,9	
	15	6,16		3283,63	
		7,39		65,19	
		8,02		66,87	
		18,46		764,38	
	30	6,15		3475,49	
		7,38		121,03	
		8,02		74,75	
		18,4		794,83	
	45 med tilsats	6,14		3454,26	
		7,02		10,85	
		7,36		51,55	
		8,02		422,9	
		18,37		789,62	
	60 med tilsats	6,13		3276,3	
		7,37		47,72	
		8,02		665,64	
		18,36		742,54	
	120 med tilsats	6,13		3296,15	
		7,36		92,7	
		8		636,87	
		18,33		736,73	
	180 med tilsats	6,12		3181,83	
		7,35		106,89	
		8		630,33	
		18,33		705,24	
		19,3		50	
	60 uten tilsats	6,12		3292,64	
		7,35		94,61	
		7,98		74,08	
		18,32		685,04	
		19,27		51,31	
	180 uten tilsats	6,11		2657,17	
7,33			114,62		
7,96			93,69		
18,3			673,68		
19,27			51,68		

Tabell V.13: HPLC analyser av supernatant og cellelysate fra *Enterobacteriaceae* 1994 tilsatt G-blokk. Noen prøver ble tilsatt NAD⁺/NADH og ADP/ATP for å øke enzymaktiviteten, og dette er merket med "med tilsats" i tabellen.

Prøve	Retensjonstid (min)	Stoff	Areal	Konsentrasjon prøve (g/L)
<i>Enterobacteriaceae</i> 1994 Supernatant+cellelysate at G-blokk	0		6,17	3669,4
			7,38	48,44
			8,01	72,29
			18,45	848
	15		6,18	4352,48
			7,38	76,64
			8,03	85,82
			18,46	967,35
	30		6,18	4026,8
			7,38	64,05
			8,02	82,32
			18,45	917,76
	45 med tilsats		6,18	3660,7
			8,05	804,25
			18,43	915,67
	60 med tilsats		6,17	3562,13
			8,04	623,47
			18,43	869,33
	120 med tilsats		6,17	3774,16
			7,41	59,31
			8,04	688,8
			18,41	862,32
	180 med tilsats		6,17	3400,72
			7,4	70,44
			8,03	551,68
			18,44	730,48
	60 uten tilsats		6,17	3846,31
			7,38	81,06
			8	74,53
			18,41	807,33
	180 uten tilsats		6,18	4047,67
			7,41	137,04
		8,02	85,76	
		18,48	786	

VEDLEGG V6: UTREGNINGER

Ved behandling av resultater fra bakteriedyrking ble det gjort noen utregninger for å kunne si mer ut fra resultatene. Fra vekstkurver ble det beregnet eksponentiell veksthastighet, og ut fra produkt- og substratkonsentrasjoner målt underveis på vekstkurven ble celleutbytte (Y_{XS}), produktutbytte (Y_{PS}) og spesifikk produktivitet (q_p). Disse ble beregnet som forklart under.

Veksthastighet (μ)

Det eksponentielle området på vekstkurvene ble funnet ved at y-aksen ble satt til logaritmisk skala, og de punktene som lå på en rett linje ble tatt ut. For disse punktene ble det satt inn en eksponentiell trendlinje, som gir forholdet:

$$y = y_0 e^{\mu x}$$

Der y er tørrvektverdiene i g/L, y_0 krysningpunktet ved x-aksen, μ spesifikk veksthastighet og x tiden i timer.

Celleutbytte (Y_{XS})

Celleutbytte fra substrat ble beregnet ut fra formelen:

$$Y_{XS} = \frac{\text{g biomasse produsert}}{\text{g substrat omsatt}}$$

Produktutbytte (Y_{PS})

Produktutbytte fra substrat ble beregnet ut fra formelen:

$$Y_{PS} = \frac{\text{g produkt produsert}}{\text{g substrat omsatt}}$$

Spesifikk produktivitet (q_p)

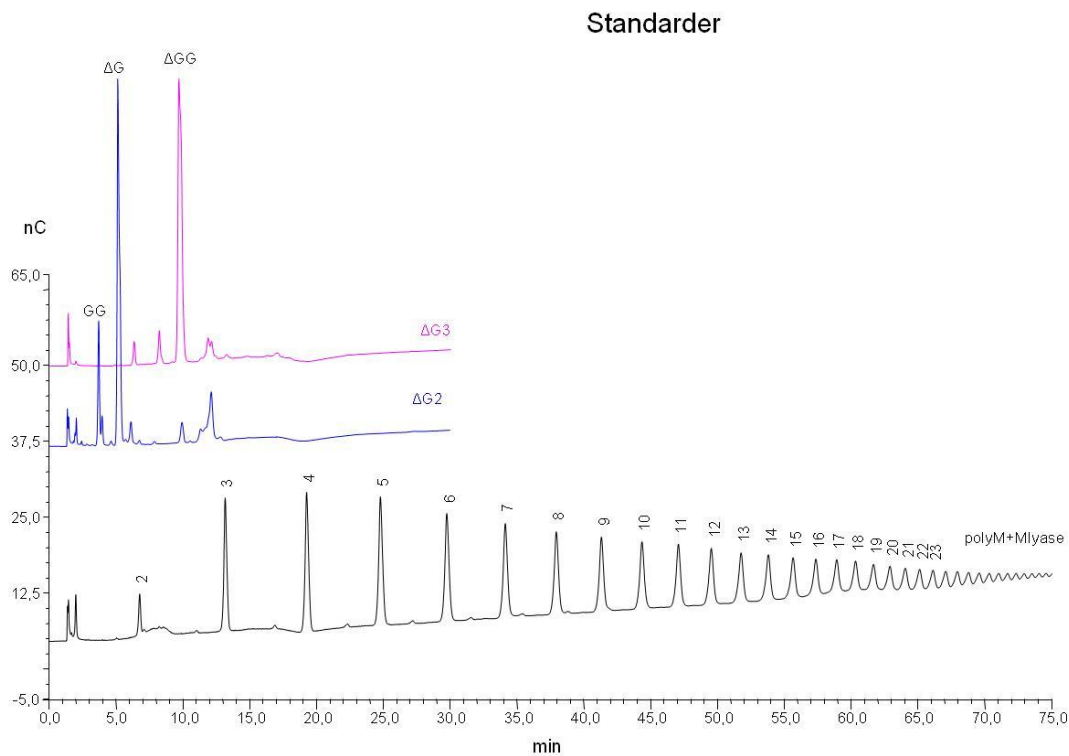
Spesifikk produktivitet (q_p) basert på celledensitet ble beregnet for produktene acetat og etanol ut fra formelen:

$$q_p = \frac{\Delta P / \Delta T}{X}$$

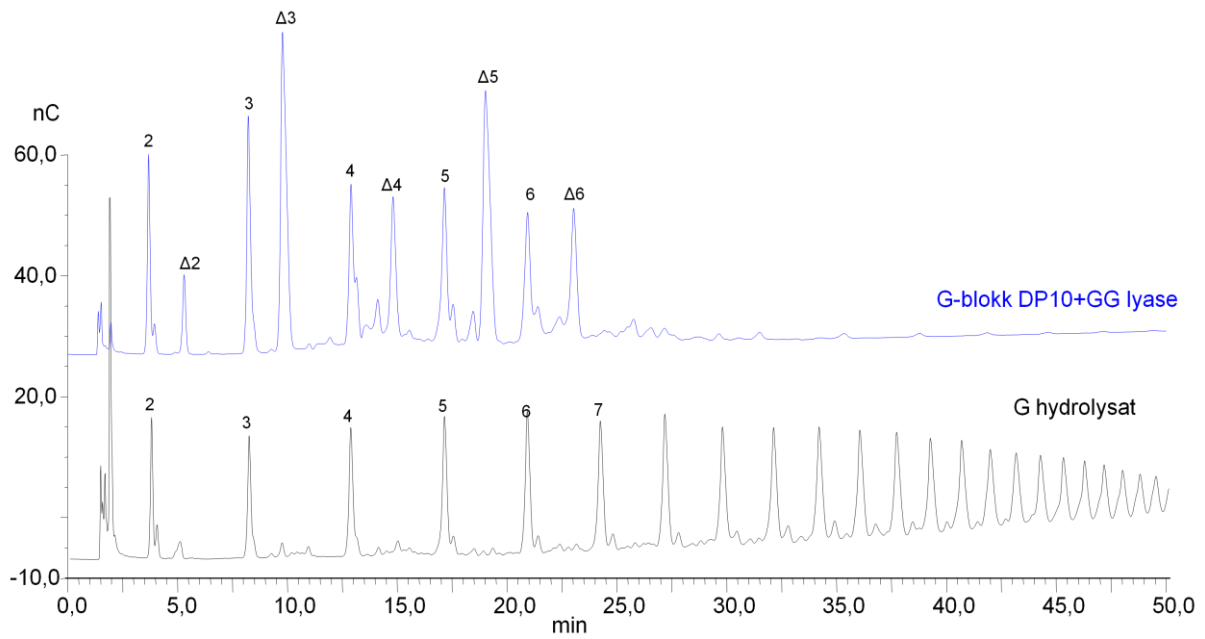
Der ΔP er mengde produkt i g/L produsert i tidsintervallet ΔT , og X er gjennomsnittlig celledensitet i det samme tidsintervallet.

VEDLEGG V7: HPAEC-PAD

Høypresisjon anionbytter-kromatografi (HPAEC) med pulsamperimetrisk deteksjon (PAD) ble benyttet for å analysere oligomersammensetningen i prøvene. For å identifisere topper i kromatogrammet ble standarder benyttet (Figur V.3 og Figur V.4). Standardene var korte topper av G- og M-blokker brutt ned med alginat lyaser eller syre. Δ angir en umettet ende på kjeden. Dimerer som ΔG og ΔM vises som topper på kromatogrammet etter henholdsvis 5 og 7 minutter. Videre kommer trimerer etter ca 10 minutter, og tetramerer etter ca 15 minutter.

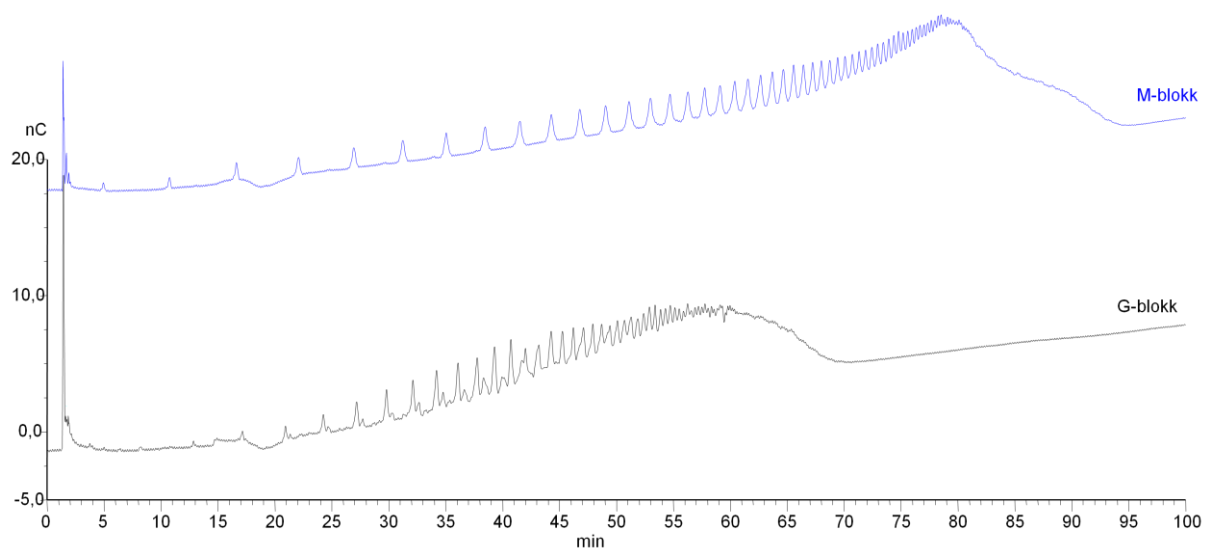


Figur V.3: Standard for korte oligomerer av G og M-blokker med umettet ende, Δ .



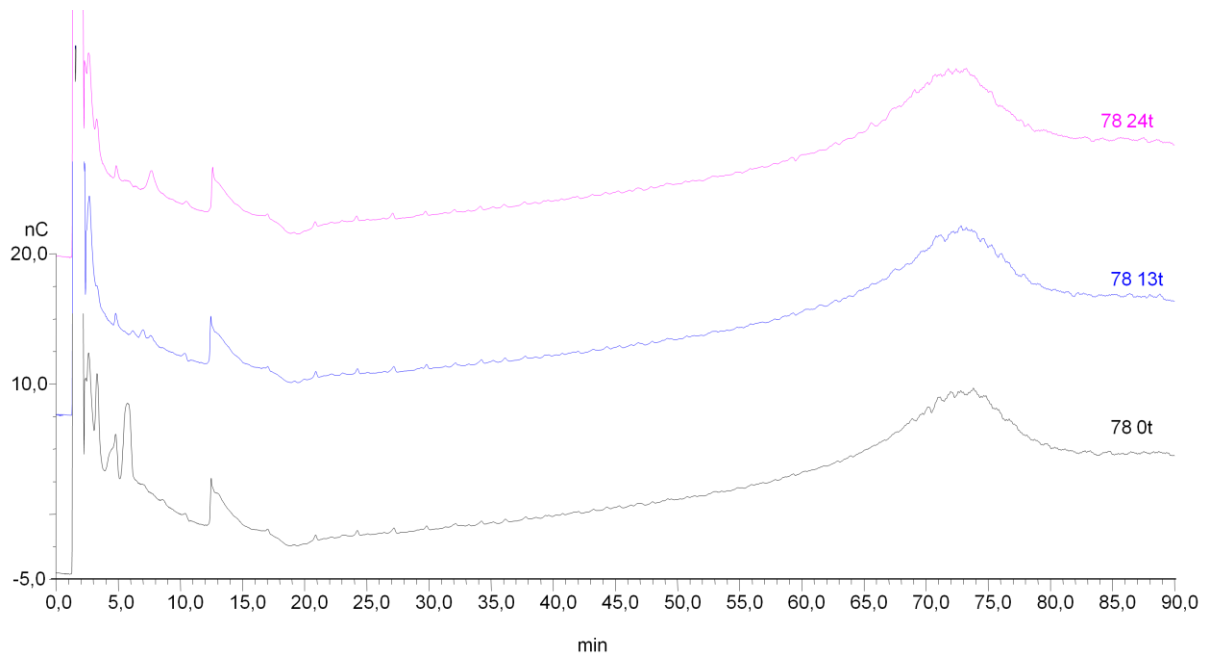
Figur V.4: G-blokk brutt ned med G-lyase (øverst) og syre (nederst).

Som substrat i analysen av ekstracellulære lyaser gjort i Avsnitt 3.3.1 ble det benyttet M- og G-blokk. Fordelingen av kjedene i hver prøve er vist i Figur V.5. M-blokken har en lengre gjennomsnittslengde på kjedene enn G-blokk, og fordelingen er derfor skjøvet mer mot høyre.



Figur V.5: Syrenedbrutt M- og G-blokk brukt som substrat til nedbryting med ekstracellulære lyaser.

I analysen av aerob alginatnedbryting med HPAEC-PAD analyse (Avsnitt 3.2.4) ble stammen *Vibrio splendidus* 78 tatt med. Denne viste svært dårlig nedbryting av alginatet, og kromatogrammet ble derfor ikke inkludert i resultatene. Kromatogrammet er vist i Figur V.6, og det vises tydelig at det skjer liten endring i løpet av inkuberingstiden.



Figur V.6: Analyse av alginatnedbryting for stammen *Vibrio splendidus* 78. Prøvene er tatt ut ved start (svart), etter 13 timer inkubering (blå) og etter 24 timer inkubering (rosa). Det ble ikke observert noen vesentlig endring i prøvene.