



CHALMERS

Karaktärisering av tropiska svampar och deras enzymer

Kandidatarbete BBTX01-16-06

John Andersson, Josefin Blell,
Edvin Blomstrand, Olle Hartvigsson,
Hanna Törnkvist, Alvina Westling

Handledare: Johan Larsbrink, Jenny Arnling Bååth och Silvia Hüttner

Department of Biology and Biological Engineering
Industrial Biotechnology
Chalmers University of Technology
Gothenburg, Sweden 2016

Sammanfattning

Dagens samhälle är i behov av alternativa energikällor som ersättning till fossila bränslen på grund av de rådande miljöproblemen. Ett alternativ för att delvis ersätta fossila bränslen kan vara omvandling av växtbiomassa till produkter som kan användas som drivmedel. Ett effektivt sätt att omvandla växtbiomassa är användning av enzymer, vilka återfinns hos organismer som livnär sig på växtbiomassa. I detta kandidatarbete, på Chalmers tekniska högskola i Göteborg, har sex svampar med relativt okända egenskaper från Vietnam studerats. Detta för att undersöka vilka olika komponenter av växtbiomassa dessa kan bryta ner med hjälp av deras enzymer. Genom att odla svamparna på utvalda substrat, inbundna i en fast agar, kunde tillväxten studeras genom deras utbredning, utseende och tillväxthastighet. Därefter odlades svamparna i vätskekulturer och de utsöndrade proteinerna, inklusive enzymer, extraherades och undersöktes därefter med hjälp av Bradfordanalys och enzymatiska analyser (pNP och DNS).

Från ett urval av tio olika svampstammar från sex olika svamparter, valdes en av varje art ut efter visuella olikheter och arbetets tidsbegränsning. Studiens syfte var att undersöka deras tillväxt och proteinutsöndring på sju olika substrat. Samt enzymernas förmåga att bryta ner substraten. I denna studie benämndes de utvalda svampstammar 5.2, 5.71, 6.2, 10.42, 10.5 och 10.6 och substraten som undersöktes var glukos, xylos, xylan, vetekli, risstrå, cellulosa och lignin.

God tillväxt kunde generellt ses på glukos, xylos, xylan, vetekli och risstrå på de fasta odlingarna. Ingen tillväxt observerades på lignin eller cellulosa, förutom för 6.2 på cellulosa. Därför undersöktes inte längre lignin medan cellulosa endast undersöktes för 6.2. Inte heller 5.2 undersöktes ytterligare då den endast visat tillväxt på vetekli. Av de svampar som vidare odlades i vätska visade samtliga tillväxt. Från proteinkoncentrationsmätning på extraherade enzymlösningar från vätskeodlingarna kunde det ses att 10.6 utsöndrade mest proteiner. Däremot hade 6.2 som växt på cellulosa jämförelsevis låg koncentration av proteiner. Generellt kunde det observeras att de svampar som växt på polysackarider, med undantag för cellulosa, påvisade en markant högre proteinkoncentration jämfört med de som växt på monosackarider. pNP-analys visade att samtliga proteinblandningar tagna från glukos- och xylosvätskekulturerna hade högre specifik enzymaktivitet vid nedbrytning av glukos och xylos. Svampstam 10.5 utmärkte sig med generellt högst specifik enzymaktivitet vid nedbrytning av såväl glukos som xylos. Från DNS-analys, som visade hur bra enzymerna var på att bryta polysackaridkedjor, kunde inte några entydiga slutsatser dras eftersom att inga jämförbara duplikat erhöles men 10.42 hade generellt hög specifik enzymaktivitet.

I enlighet med resultaten från denna studie kan fortsatt forskning på svampstammarna 10.42 och 10.5 vara aktuellt. Detta för att få fram enzymer som skulle kunna användas för att effektivt omvandla växtbiomassa till mindre beståndsdelar vid högre temperaturer. Dessa skulle sedan kunna användas för att producera biobränsle.

Abstract

Characterization of tropical fungi and their enzymes.

We are living in a society that is in need of an alternative source of energy other than fossil fuels due to the current environmental issues. To partially replace fossil fuels one option could be to convert plant biomass into biofuels. An efficient way of converting plant biomass is the use of enzymes which are found in organisms that live off of plant biomass. In this bachelor thesis, at Chalmers University of Technology in Gothenburg, six fungal strains with partially unknown properties obtained from Vietnam have been examined. This in order to investigate which plant biomass components their enzymes are able to decompose. By growing the fungi on chosen substrates, bound to a solid agarose gel, their proliferation, appearance and growth rate could be studied. Subsequently the fungi were grown in liquid cultures and the secreted proteins, including the enzymes, were extracted and examined by Bradford and enzymatic analyses (pNP and DNS).

From a selection of ten different fungal strains from six different species one of each specie was selected depending on visual traits and time limitations of the project. The aim of the study was to investigate their growth and protein secretion on seven different substrates. The degradation of the substrates was also investigated. The fungal strains in this study were named 5.2, 5.71, 6.2, 10.42, 10.5 and 10.6 and the substrates investigated were glucose, xylose, xylan, wheat bran, rice straw, cellulose and lignin.

In general, good growth could be seen on glucose, xylose, xylan, wheat bran and rice straw on the solid cultures. Weak growth was observed on lignin and cellulose, because of this lignin was not investigated further and cellulose was only investigated for 6.2. Fungal strain 5.2 were also not investigated further because it only grew on wheat bran. All the fungi that were cultured in liquid showed growth. From protein concentration measurements on the extracted enzyme solutions from the liquid cultures it could be observed that 10.6 secreted the most protein. However 6.2 that grew on cellulose showed a comparatively low protein secretion. In general a considerably higher protein concentration could be observed for the fungi that grew on polysaccharides, with an exception for cellulose, compared to those that grew on monosaccharides. The pNP-analysis showed that all the species had higher specific enzymatic activity when degrading glucose compared to xylose. In general fungal strain 10.5 showed the highest specific enzymatic degradation of both glucose and xylose. From the DNS analysis, which showed how good the enzymes were at breaking polysaccharide chains, no direct conclusions could be made since no comparable duplicates were obtained, however 10.42 showed high specific enzymatic activity in general.

In accordance to our study, continued research on fungal strain 10.42 and 10.5 could be relevant for future studies to obtain enzymes that could be used to convert plant biomass into smaller components that could be used to produce biofuels.

Innehållsförteckning

1	Inledning	1
2	Svampar, nedbrytning av växtcellväggen och enzymanalysering	2
2.1	Filamentösa svampar	2
2.2	Filamentösa svampars enzymatiska nedbrytning av lignocellulosa	3
2.2.1	Växtcellväggens uppbyggnad	3
2.2.2	Nedbrytning av lignocellulosa (cellulosa, hemicellulosa och lignin)	5
2.3	Termofila svampar i studien	7
2.4	Filamentösa och termofila svampars användning i industrin	8
2.5	Metodteori	8
2.5.1	Bestämning av proteinkoncentration.....	8
2.5.2	Mätning av enzymaktivitet.....	9
3	Metod	11
3.1	Odling på agarplatta.....	11
3.2	Odling i vätska.....	12
3.3	Enzymanalys.....	12
3.3.1	Bradfordanalys	12
3.3.2	pNP-analys	13
3.3.3	DNS-analys	13
4	Resultat och Diskussion	14
4.1	Tillväxt och morfologi på agarplattor.....	14
4.2	Tillväxt och morfologi i vätskekulturer	17
4.3	Mätning av proteinkoncentration – Bradford	19
4.4	Enzymaktivitetsmätning – pNP	20
4.5	Enzymaktivitetsmätning – DNS	22
5	Slutsats	25
	Referenser.....	26
	Bilaga 1 – Tillväxtbilder på agarplatta	I
	Bilaga 2 – Tillväxtbilder i vätskekulturer	IV
	Bilaga 3 – Bradfordanalys.....	VII
	Bilaga 4 – pNP-analys.....	VIII
	Bilaga 5 – DNS-analys.....	IX

1 Inledning

Världen står inför stora miljöproblem som till stor del skapats av den stora användningen av fossila bränslen och att hitta alternativ till dessa är av högt intresse. Regeringen har som mål att Sverige ska bli fritt från fossila bränslen till år 2050 (1). För att uppnå detta behövs flera åtgärder, en av dessa är att hitta alternativa energikällor (2). Ett intressant område inom alternativa energikällor är växtbiomassa. Genom att omvandla växtbiomassa till biobränsle kan det sedan användas som drivmedel och delvis konkurrera med fossila bränslen (3). I dagsläget finns det inte några metoder som är tillräckligt bra för att effektivt kunna utnyttja växtbiomassa som energikälla. För att tillgodogöra sig energin måste växtbiomassan brytas ner till mindre beståndsdelar. Detta skulle kunna göras med hjälp av enzymer, vilket är något som det i dagsläget bedrivs mycket forskning på (4). Fördelarna med att använda enzymer rent kemiskt är att de inte behöver några farliga lösningsmedel samt att de fungerar som katalysatorer.

En av utmaningarna med att använda enzymer är att hitta de som bryter ner växtbiomassa mest effektivt. Vilket är svårt då olika organismer innehåller enzymer med varierande funktion. Det är av denna anledning som forskning på området ofta sker genom att först hitta organismer som livnär sig på den typ av växtbiomassa som är av intresse att bryta ner (4). Därefter undersöks hur dessa organismer kan användas rent praktiskt och vilka enzymer som de använder i nedbrytningsprocessen. Ett exempel på organismer som livnär sig på växtbiomassa är svampar, vilket är vad denna studie undersöker. Trots sin stora utbredning är svampar ett relativt outforskat område, men baserat på tidigare studier visar deras enzymer stor potential för förbättring inom området för biomassanedbrytning (5). Detta för att det bland annat finns en stor diversitet av svampar och en liten andel av dem kan dessutom växa vid höga temperaturer. Enzymer som fungerar vid höga temperaturer är extra intressanta då reaktionshastigheter ofta är högre vid höga temperaturer.

Detta kandidatprojekt har med ovanstående grunder undersökt ett antal relativt ostuderade termofila svampstammar. I genomförandet av denna undersökning behandlades bland annat tillväxthastighet och morfologi hos svampstammarna som studerades. Även aktiviteten för enzymerna i proteinblandningar som svamparna utsöndrade vid tillväxt på ett antal specifika kolkällor. Det sistnämnda utfördes för att identifiera huruvida några av enzymerna kan vara av vidare intresse för användning inom olika industriella applikationer relaterat till nedbrytning av växtbiomassa.

2 Svampar, nedbrytning av växtcellväggen och enzymanalysering

Denna teori innefattar filamentösa svampar och dess förmåga att bryta ner växtbiomassa samt hur enzymaktivitet kan uppmätas. Även en mer detaljerad presentation av de svamparter som används i studien ingår.

2.1 Filamentösa svampar

Idag finns det ungefär 600 000 kända svamparter i världen medan det totala antalet uppskattas till ca 5,1 miljoner arter (6, 7). Det finns tre riken av svampar; *fungi*, *chromista* och *protozoa*. Riket *fungi* är det som kallas "egentliga svampar" och det är ifrån detta rike som svamparna som studeras i projektet tillhör (8).

Filamentösa svampar är en typ av svampar i släktet *fungi*. Dessa är eukaryota och heterotrofer, vilket betyder att de tillgodogör sig näring genom att bryta ner organiskt material (9). De filamentösa svamparna är uppbyggda av celltrådar som kallas hyfer. Det är hyferna som bildar de filamentösa svamparnas karaktäristiska nätverk som benämns mycel (se *Figur 1*). För att degradera organiskt material utsöndrar svampen olika enzymer från hyferna. När det organiska materialet är i nedbruten form kan svampen absorbera det som näring. Det är kolet i organiskt material som är den största energikällan för svampar men även andra komponenter som syre, kväve och vissa mineraler är essentiella för överlevnad och tillväxt (8).



Figur 1. Bild på mycel från Oyster mushroom av Kellner T. (10). Bilden är tagen från Wikipedia med tillåtelse under (CC).

Filamentösa svampar kan föröka sig genom fragmentering av mycelelet (8). Även könslig produktion av sporer eller vegetativ produktion av sporer är ett sätt för svampen att föröka sig. Dessa fortplantningsmetoder är en del i det som gör att svampar kan överleva under extrema förhållanden. Svampar förekommer över hela vår planet, även på områden där många andra organismer har svårt att överleva, till exempel runt polerna och på djuphavsbottnar.

Det är inte bara geografiskt som svampar skiljer sig åt, även deras morfologier är mycket varierande. Två huvudbegrepp för att beskriva morfologin är *macrofungi* och *microfungi* (11). Många *macrofungi* kan kännas igen på dess sexuella fruktkroppar. De sexuella fruktkropparna är till exempel den ätbara delen av en champinjon. *Microfungi* är det som kallas mögel och vid

närmare inspektion kan även skillnader i dessa upptäckas. Det kan då ses att dessa skiljer sig i bland annat struktur, färg och förmåga att producera sporer.

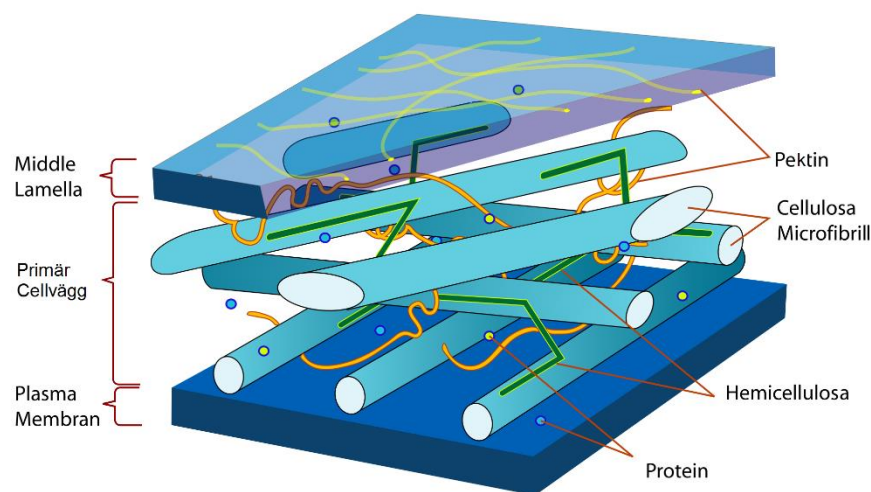
Mycel och sporulering gör det enkelt att odla filamentösa svampar i laboratoriemiljö. Vid odling av svampar är det vanligast att agar används som fast media. Agar är ett gelbildande ämne bestående av polysackariderna agaros och agaropektin (12). Till en agarlösning tillsätts en valfri kolkälla och andra nödvändiga komponenter. Då ofta en specifik kolkälla undersöks är det vanligt att en negativ tillväxtkontroll används för att säkerställa att den observerade tillväxten inte beror på nedbrytning av agar. Vid tillväxtsodling av en svamp tas en bit av den önskade svampens mycel och överförs till en agarplatta. För att undvika kontaminering av toxiska ämnen eller andra organismer sker all hantering av svampar i laboratorier under sterila och kontrollerade omständigheter.

2.2 Filamentösa svampars enzymatiska nedbrytning av lignocellulosa

Lignocellulosa är ofta det mest tillgängliga och kolrika materialet i en filamentös svamps närhet (13). Då det består av komplexa polymerer som svampen inte kan tillgodose sig direkt behöver svampen strategier för att bryta ner lignocellulosan i mindre beståndsdelar. Detta gör den genom att utsöndra extracellulära enzymer. Kompositionen av lignocellulosa i en växt varierar främst beroende på växtart och växtvävnad men även delvis beroende på vilken miljö den växer i (13, 14). Som följd av den varierande kompositionen av lignocellulosa kommer även de utsöndrade enzymerna från en nedbrytande svamp bero på både svampart såväl som den typ av växter svampen livnär sig på. (13, 15). De extracellulära enzymerna kan delas upp i olika familjer utifrån vilken roll de har i nedbrytningsprocessen och är även intressanta för användning inom olika industriapplikationer, mer om detta i *Avsnitt 2.4*.

2.2.1 Växtcellväggens uppbyggnad

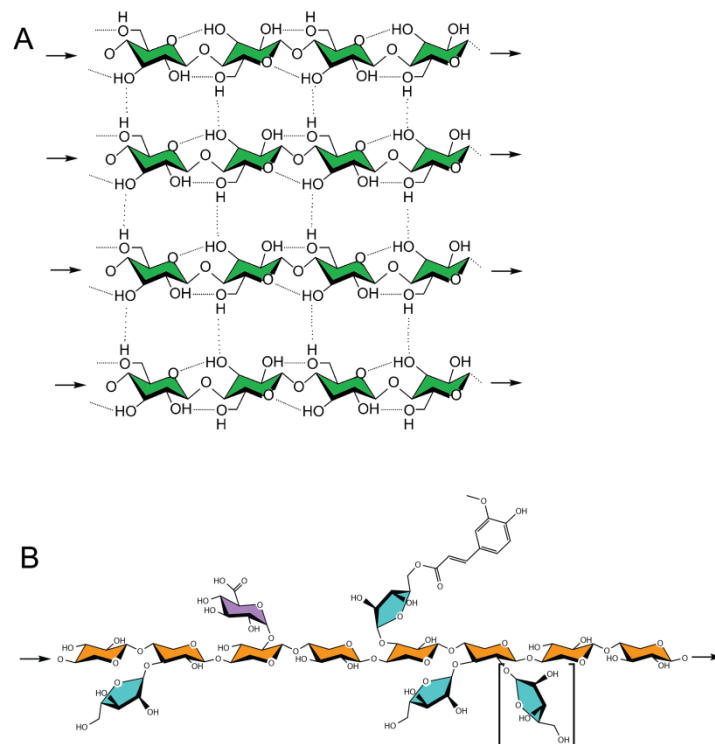
Växtceller har en cellvägg som är uppbyggd av ett komplext kompositmaterial bestående av olika polysackarider och den heterogena aromatiska polymeren lignin, vilka i bulk ibland även kallas för lignocellulosa (14). Cellväggen kan delas upp i en primär och en sekundär cellvägg. Den primära cellväggen innehåller mestadels polysackarider och kan expandera i takt med att cellen växer (16). När cellen nått sin slutliga storlek och form tillkommer den sekundära cellväggen, vilken är robustare än den primära cellväggen då den är tjockare och ofta innehåller lignin (14, 17, 18). Polysackarider i sig består av långa kedjor länkade monosackarider och kan delas upp i tre huvudgrupper: cellulosa, hemicellulosor och pektiner (14, 16).



Figur 2. Illustration över hur cellulosa, hemicellulosa och pektin är arrangerade i cellväggen. Cellulosa bildar mikrofibriller som ger strukturell stadga åt cellväggen. Hemicellulosa binder in till cellulosa och bildar nätverk som ökar stabiliteten hos cellväggen. Pektin finns framförallt i den primära cellväggen och mellan celler (middle lamella) där det fyller en vidhäftande funktion. Bilden är gjord av Mariana Ruiz Villarreal och är hämtad från Wikipedia med tillåtelse under (CC) (19).

Cellulosa är uppbyggt av flera glukosmolekyler som är sammanlänkade via $\beta(1 \rightarrow 4)$ -bindningar till (1,4)- β -D-glukankedjor (14, 16). Dessa kan ordna sig parallellt i kristallina mikrofibrillformationer (se Figur 2 och Figur 3A), vilket ger cellväggen strukturell stadga och skyddar delvis mot enzymatisk nedbrytning (16). Hemicellulosor liknar cellulosa i att de har en huvudkedja av $\beta(1 \rightarrow 4)$ -länkade sackarider (14). Beroende på vilken typ av sackarid som huvudkedjan består av tilldelas hemicellulosorna olika namn. Till skillnad från cellulosa binder olika sidogrupper till hemicellulosans huvudkedja och vilka sidokedjor som är inbundna skiljer sig åt mellan olika växtarter (16). Ett exempel är xylan (se Figur 3B) som har en huvudkedja bestående av $\beta(1 \rightarrow 4)$ -D-xylosgrupper med sidogrupper så som arabinofuranos, glukuronsyra och aromatiska grupper (20). Sidokedjorna hindrar hemicellulosan från att bilda mikrofibrillformationer vilket cellulosa kan göra (16). I cellväggar binder hemicellulosa till cellulosa och bildar på så sätt ett nätverk (se Figur 2) som stärker cellväggen ytterligare.

Pektiner är en klass komplexa heterogena polysackarider som är mycket förgrenade och innehåller många olika byggstenar (21). De brukar delas upp i så kallade "släta" och "håriga" regioner, där släta syftar på regioner utan sidokedjor och håriga syftar på regioner med länkade alternerande grupper av flera olika sockermolekyler. Pektin fyller många funktioner i cellväggen och bidrar bland annat till porositet, tjocklek och till bildandet av ett vidhäftande lager mellan celler som kallas "middle lamella" (se Figur 2) (16).



Figur 3. Schematisk bild på cellulosa och hemicellulosan xylan. A) visar hur (1,4)- β -D-glukankedjor interagerar med varandra genom vätebindningar och bildar en mikrofibrillstruktur. B) visar ett tvärsnitt av en möjlig struktur för xylan, där huvudkedjan (1,4)- β -D-xylos illustreras med orange och huvudkedjans sidogrupper illustreras med lila (glukuronsyra) och blått (arabinofuranos) samt med en acetylgrupp på en arabinofuranosgrupp. Bilden är en modifierad och kombinerad version av Luca Laghis "Cellulosa strand" (22) (Figur 3A, hämtad från Wikipedia med tillåtelse under (CC)) och en bild på xylan (Figur 3B) av vår handledare, Johan Larsbrink.

Lignin finns i stor utsträckning i den sekundära cellväggen och skiljer sig från polysackariderna då den är en heterogen aromatisk polymer (18). Lignin kan delas upp i tre olika grupper, nämligen guaiacyl lignin (barrträd), guaiacylsyringyl lignin (lövträd) och guaiacylsyringyl-p-hydroxylphenyl lignin (gräs) (17). Lignin bildar både kovalenta och icke-kovalenta bindningar med polysackariderna i cellväggen, vilket tillsammans med dess heterogena och hydrofoba struktur ger en ökad strukturell stabilitet och ett bra skydd mot nedbrytande enzymer (14, 17).

2.2.2 Nedbrytning av lignocellulosa (cellulosa, hemicellulosa och lignin)

De enzymer som är involverade i svampars nedbrytning av lignocellulosa kan delas in i följande familjer:

- Glykosidhydrolaser: Bryter glykosidbindningar mellan två länkade glykosider genom hydrolys i närvaro av en protondonator och en nukleofil (23, 24). Det finns två huvudmekanismer för glykosidhydrolas, i den ena bibehålls den strukturella orienteringen av glykosidbindningen efter hydrolys, medan i den andra får glykosidbindningen en omvänd orientering. Glykosidhydrolaser kan även vara *exo*-aktiva eller *endo*-aktiva, vilket betyder att de antingen verkar på glykosidkedjor från ändarna (*exo*) eller slumpmässigt mitt i (*endo*).

- Kolhydratesteraser: Bryter esterbindningar och tar därmed bort funktionella grupper från kolhydrater via hydrolys, mer specifikt för ester och N-acetyl grupper (25).
- Polysackaridlyaser: Bryter glykosidbindningar via β -elimination om en av glykosiderna vid bindningen innehåller en sur grupp (25).
- Oxiderande enzymer: Bryter kovalenta bindningar genom oxidation. Följande två klasser är aktiva vid nedbrytning av lignocellulosa.
 - Lignin-nedbrytande enzymer: Oxiderar sidokedjor och aromatiska ringar i lignin. Två exempel är ligninperoxidas och lackas som bildar mediator-komplex där ligninperoxidas använder väteperoxid som substrat och lackas använder syre som substrat (17).
 - Lytiska polysackarid-monooxygenaser (LPMOs): LPMO-enzymerna fungerar genom att oxidera både de reducerade och icke-reducerade ändarna av en bindning mellan två sockermolekyler (26).

För att bryta ner cellulosa behövs både enzymer inom glykosidhydrolasfamiljen och de oxidativa LPMO-enzymerna. Tre enzymklasser ur glykosidhydrolasfamiljen behövs vid nedbrytningen; β -glukosidas, β -1,4-endoglukanaser och cellobiohydrolaser (15, 27). Cellobiohydrolaser är *exo*-agerande på (1,4)- β -D-glukankedjorna medan β -1,4-endoglukanaser är *endo*-agerande på kedjorna. Först efter klyvning på ändarna och i mitten av cellulosan kan β -glukosidas komma åt de efterlämnade oligomererna och klyva dem till glukos (15).

Generellt liknar nedbrytningen av hemicellulosa den för cellulosa. *Endo*-aktiva glykosidhydrolaser bryter först huvudkedjan varpå andra glykosidhydrolaser bryter de mer lättillgängliga oligomererna (15, 27). Xylan klyvs exempelvis först på mitten av 1,4- β -endoxylanas varefter de resulterande xylos-oligomererna klyvs av 1,4- β -xylosidas (15). För att fullständigt bryta ner hemicellulosan behövs även specifika enzymer från både glykosidhydrolasfamiljen och kolhydratesterasfamiljen beroende på de olika sidogrupper som kan sitta på huvudkedjan.

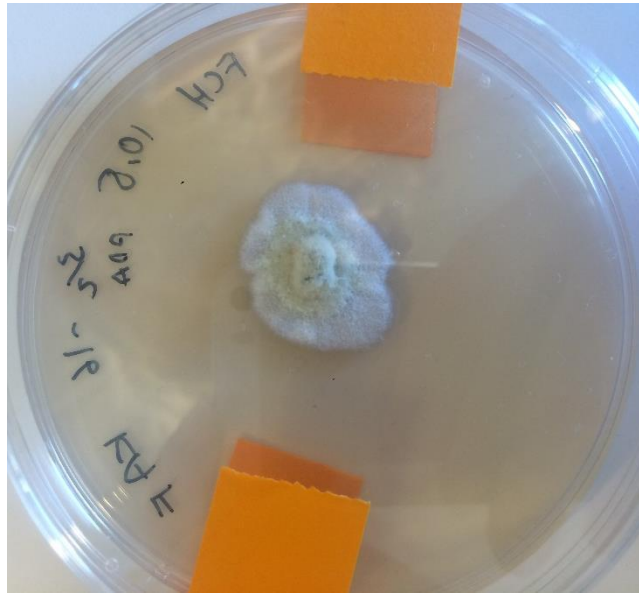
Lignin bryts inte ner särskilt bra via hydrolys utan behöver istället oxideras för att sedan kunna brytas ner i mindre delar (17). Nedbrytningen sker både via en enzymatisk och en icke-enzymatisk reaktion. Den enzymatiska reaktionen står för oxidering av sidokedjor och aromatiska ringar till aromatiska radikaler via ligninperoxidas eller lackas. Den icke-enzymatiska reaktionen står för tre olika attacker på radikalerna, vilka leder till kluvna bindningar. Dessa attacker är homo- eller heterolytisk klyvning, syreattack på kolcentrerade radikaler eller nukleofil attack på arylkatjoner från vatten eller en hydroxidgrupp. Det finns indikationer på att inga mikroorganismer klarar att endast leva på lignin som primär kolkälla, men om de har ett annat substrat att växa på kan lignin utgöra en sekundär kolkälla (18).

2.3 Termofila svampar i studien

De svampstammar som användes i denna studie är termofila och hämtade från *Food Industries Research Institute* i Vietnam. Att de är termofila innebär att de kan växa vid höga temperaturer samt att enzymerna de producerar är stabila vid dessa temperaturer. En klassificering av termofila organismer är; organismer med en optimal tillväxttemperatur mellan 45 °C och 80 °C. Av de 600 000 kända arter är endast en mycket liten del termofila (5). I *Tabell 1* beskrivs i korthet det som är känt om de berörda termofila svamparterna. Notera att de egenskaper som svampstammarna i denna studie har kan skilja sig från de generella egenskaper som svamparterna har i *Tabell 1*. Exempel på hur en svamp kan se ut när den växer på en agarplatta visas i *Figur 4*.

Tabell 1. Kortfattad beskrivning av de kända egenskaperna hos de svamparter som berörs i studien.

Svampart	Förekomst och enzymproduktion	Benämning i studien
<i>Rhizomucor miehei</i>	Används i dagsläget för att producera enzymer som kan användas till att skapa löpe för mejeriindustrin. Enzymerna som bildas tillhör familjen aspartylproteas, pepsin, cathepsin och renin är exempel på sådana. (28).	5.2
<i>Rhizomucor pusillus</i>	Är vanlig i komposter och är en god producent av amylasenymer, vilka katalyserar nedbrytningen av glykogen och stärkelse (29).	5.71
<i>Scytalidium thermophilum</i>	Är en vanligt förekommande svamp i komposter (30).	6.2
<i>Talaromyces thermophilus</i>	Producerar enzymet xylanase. Xylanase degraderar xylan till xylos (31).	10.42
<i>Malbranchea cinnamomea</i>	Är en viktig källa till lignocellulolytiska enzymer (32).	10.5
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	Är en utbredd och relativt välansvända termofil svampart (33). Flera stammar av denna svampart har rapporterats producera höga nivåer av cellulas-fria β -xylanaser.	10.6



Figur 4. Svampstam 10.5 växande på potatis dextros agar.
Författarnas egen bild.

2.4 Filamentösa och termofila svampars användning i industrin

Filamentösa svampar är viktiga organismer i nedbrytningen av många organiska material (34). Som tidigare nämnts består en betydande del av växtceller av lignocellulosa. Nedbrytning av lignocellulosa och de enzymer som används i denna process kan vara mycket användbara i industrin. Exempel på när de används är vid blekning inom massa- och pappersindustrin, tillverkning av djurfoder och textilier, sanering av avloppsutsläpp och produktion av biodrivmedel (13, 35). Termofila svampar är av särskilt intresse då deras enzymer kan arbeta stabilt vid höga temperaturer. Fördelarna med nedbrytning av biomassa vid höga temperaturer är högre reaktionshastigheter, större utbyte, sänkt substratviskositet och minskad risk för mikrobiell kontaminering (36).

2.5 Metodteori

För att kunna avgöra om svampstammarna i studien kan användas för att effektivt bryta ner växtbiomassa bör aktiviteten hos deras enzymer bestämmas. Detta kan göras genom att bestämma proteinkoncentrationen med Bradfordmetoden och enzymsaktiviteten med *p*NP- och DNS-analys.

2.5.1 Bestämning av proteinkoncentration

För att kvantifiera mängden protein i ett prov används ofta Bradfordmetoden som utformades av Marion M. Bradford på 1970-talet (37). Bradfordmetoden möjliggör en snabb, enkel och noggrann kvantifiering av proteiner, detta i jämförelse med andra metoder för att uppskatta proteinkoncentrationer (38). På grund av detta är Bradfordmetoden den metod som oftast används i olika laboratorier för att bestämma mängden protein i ett prov. I denna metod används färgen Coomassie Brilliant Blue G-250 som binder till proteiner (37). Coomassie Brilliant Blue G-250 finns i två olika former, katjonform och anjonform. Innan bindning till protein har den en röd färg och är i dess katjonform och efter inbindning är den i anjonform och blir blå (38,

39). Detta beror på att vid bindning till proteiner ändras dess absorptionsmaximun från 465 nm till 595 nm.

Ökningen av provets förmåga att absorbera ljus vid 595 nm mäts med hjälp av spektrofotometer och resultatet används för att, med hjälp av en standardkurva, avgöra proteinkoncentration (39). Inbindningen av Coomassie Brilliant Blue G-250 till proteiner har visat sig ske huvudsakligen genom interaktioner till aminosyran arginin hos proteinerna (40). Interaktionerna består av van der Waals-krafter samt hydrofoba interaktioner.

2.5.2 Mätning av enzymaktivitet

Mätning av enzymaktivitet kan göras på en rad olika sätt. Nedan presenteras de två analysmetoder som används i denna studie.

2.5.2.1 *p*NP-analys

För att studera enzymaktivitet hos kolhydrat-aktiva enzymer kan *para*-nitrofenol-glykosider användas. *Para*-nitrofenol-glykosider består av *para*-nitrofenol (*p*NP) bundet till ett substrat (9). Exempel på substrat kan vara monosackarider så som glukos och xylos (41). *p*NP är en kromogen förening vilket innebär att den innehåller så kallade kromoforer, vilka är atomgrupper som kan absorbera ljus vid specifika våglängder (42, 43). I en alkalisk lösning absorberar *p*NP ljus vid 410 nm, vilket kan mätas med spektrofotometer (41, 43).

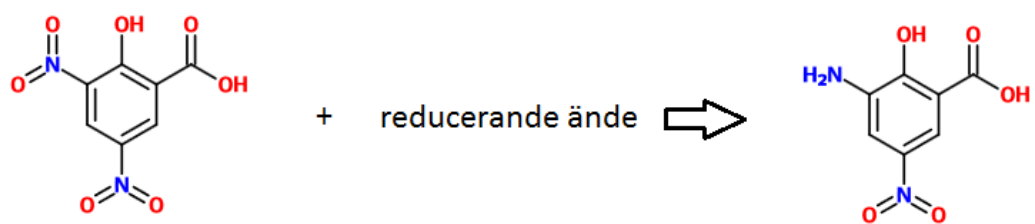
När *p*NP-glykosider tillsätts i en lösning innehållande enzymer kan vissa enzymer klyva bindningen mellan *p*NP och substratet. Detta leder till att tidigare bundet *p*NP frigörs (41). Absorbansen hos provet kan då mätas och vilken koncentration den uppmätta absorbansen motsvarar tas fram genom att använda en *p*NP-standardkurva. När koncentrationen av fritt *p*NP är känt kan hastigheten som enzymerna bryter ner substrat med räknas ut (41).

En nackdel med att använda *p*NP-analys för att studera enzymaktivitet är att det inte fungerar för *endo*-aktiva enzymer (44). Detta beror på att *p*NP binder in till ändarna på substraten och *endo*-aktiva enzymer kan därför inte komma åt att klyva bindningarna.

2.5.2.2 DNS-analys

Dinitrosalicylsyra-metoden (DNS) utformades år 1921 och kan användas för att undersöka hur bra ett enzym eller en proteinblandning är på att bryta kedjor av polysackarider (45, 46). DNS används för att analysera hur många reducerande ändar på sockerkedjor det finns i ett prov (46). En polysackarid har en reducerande ände och en icke-reducerande ände; när sackariden klyvs av ett enzym bildas två kortare sackarider vilka har var sin reducerande ände. Den reducerande änden är den som har ett fritt kol som är en del av en aldehyd, keton, hemiacetal eller hemiketal grupp (47). Detta kol möjliggör reduktion av andra molekyler (47, 48).

När DNS reagerar med en reducerande sockerände reduceras en av NO₂ grupperna på DNS till en NH₂ grupp enligt *Figur 5*. Detta leder till att lösningen färgas och absorbansen vid 575 nm kan mätas med en spektrofotometer (46). Erhållna värden jämförs med referensprov där substratet blandats med DNS utan enzymtillsats och med en standardkurva med kända glukoskoncentrationer. Den resulterande aktiviteten divideras med proteinkoncentrationen från Bradfordanalysen för att få ut specifik enzymaktivitet.



Figur 5. Reaktionen som sker mellan en reducerande sockerände och dinitrosalicylsyra. Författarens egen bild.

3 Metod

Från ett urval av 11 svampstammar, hämtade från Vietnam, valdes 6 stycken ut, detta för att begränsa studiens omfattning. De svampstammar som valdes ut var de som hade störst variation i morfologi. Odlingen av de 6 olika svamparna gjordes på 7 utvalda substrat för att se vad dessa svampstammar kunde bryta ner. Substraten valdes på grund av dess olikheter, xylos och glukos valdes för att de är monosackarider och xylan valdes för att det är en hemicellulosa. Vetekli och risstrå valdes då dessa är komplexa substrat, vilket innebär att de är substrat där sammansättningen är okänd och varierad. Lignin valdes då det är väldigt ovanligt att svampar kan bryta ner det. Cellulosa valdes då det är svårnedbrutet och frekvent förekommande i naturen och är den största källan till förnybart kol.

Odling på agarplattor gjordes för att snabbt och överskådligt se en eventuell tillväxt, odling i vätskekultur för att kunna extrahera utsöndrade proteiner och enzymatiska analyser så som DNS- och pNP-analys för att karaktärisera de utsöndrande enzymerna. Laborerandet skedde sterilt och all kontakt med svamparna gjordes i en bänk med laminärt luftflöde (LAF-bänk) som är ett dragskåp som förhindrar kontamination. Under laborationen användes antingen MQ vatten som är vatten som avjonats genom en Milli-Q vattenrenare eller autoklaverat MQ vatten.

3.1 Odling på agarplatta

Moderplattor gjordes genom att föra över en agarkub (ca 3x3 mm) med mycel från ursprungsplattorna till nya plattor med potatis dextros agar (38,46 vikt% agar), vilket förkortas PDA (3,9 % vikt/volym (v/v)). Denna koncentration av agar användes för samtliga plattor med PDA i studien. PDA används då alla svampar i studien kan tillgodogöra sig detta substrat och god tillväxt uppvisas.

Agarplattor användes för odling på fast substrat där näringslösningen innehöll ett M9 medium (49) och en kolkälla. M9 mediet bestod av 200 delar M9 saltlösning (8,6 % Na_2HPO_4 1,5 % KH_2PO_4 , 0,25 % NaCl och 0,5 % v/v NH_4Cl), 20 delar $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ lösning (25 % v/v), 1 del $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ lösning (3 % v/v) samt 100 delar spårämneslösning (0,1 % FeSO_4 , 0,032 % MnSO_4 , 0,028 % ZnSO_4 och 0,04 % v/v CoCl_2) för att säkerställa svamparnas tillväxt. Kolkällan var antingen glukos (20 %, monohydrat), cellulosa (10 %, mikrokristallint pulver), xylos (4 %, D-(+)-xylos), xylan (10 %, från bokträd), lignin (10 %, alkali), vetekli (10 %, från Coop Änglamark) eller risstrå (10 % v/v). För att få en färdig näringslösning blandades 100 ml M9 medium med 50 ml substrat (undantag: 10 ml glukos) och 300 ml agarlösning (2,5 % v/v) och fyllde upp till 500 ml med autoklaverat MQ vatten. Detta gav en slutkoncentration av substrat på 1 % v/v för alla substrat förutom xylos och glukos som hade 0,4 % v/v. Denna färdiga lösning hälldes i petriskålar, 85 mm diameter på bottenplattan, och läts stelna. Därefter inokulerades alla plattor med respektive svamp. Detta gjordes genom att föra över en agarkub med mycel från moderplattan till den nya agarplattan. Även 20 μl MQ autoklaverat vatten tillsattes för att svamparna inte skulle torka ut. Alla plattor gjordes i duplikat. Negativ kontroll utan substrat gjordes för att säkerställa att svamparna inte växer på agar. Positiv kontroll gjordes på PDA plattor för att kontrollera att de yttre omständigheterna var gynnsamma för tillväxt. Plattorna inkuberades i 50 °C i 6 dagar varefter morfologin dokumenterades skriftligt och

fotografiskt. Plattor som inte hade representativa duplikat gjordes om. Ytterligare agarplattor, på de svampar som växt i första odlingen, gjordes på samma sätt som tidigare och inkuberades i 50 °C i 11 dagar. Detta gjordes för att kunna ta fram tillväxtkurvor för de olika svamparna. Medelradien mättes varje dag i en vecka samt efter 11 dagar.

3.2 Odling i vätska

De kombinationer av svamp och substrat som påvisat tillväxt på agarplattorna valdes ut för att odlas i flytande medium. För detta gjordes en mycellösning från den agarplatta där svampen hade störst tillväxt. Mycellösningen gjordes genom att 5 ml autoklaverat MQ vatten tillsattes till plattan och mycelet skrapades bort. Vätskan pipetterades till ett Falconrör och mixades i en provrörsskak.

Det flytande mediet hade samma komposition som agarplattorna men utan agar och substraten hade samma koncentrationer. E-kolvar med 25 ml lösning (0,8 % mycellösning vikt/volym (v/v)) inkuberades i en skakinkubator (ThermoMixer) i 50 °C i 7 dagar, varefter morfologin dokumenterades skriftligt och fotografiskt. För att erhålla prover med de utsöndrade enzymerna överfördes 6 ml av vätskekulturen till Falconrör. Dessa centrifugerades på 5000 RPM/ 5311 RCF i 10 minuter i 20 °C. Efter centrifugering sögs lösningen upp och filtrerades genom ett 0,2 µl cellulosafilter till nya Falconrör. Detta för att få en ren lösning med proteiner utan mycel. Proven förvarades i 4 °C för användning till enzymatisk analys.

3.3 Enzymanalys

Nedan beskrivs genomförandet av de metoder som mäter proteinkoncentration och enzymaktivitet.

3.3.1 Bradfordanalys

En Bradford-standardkurva gjordes för att få ett förhållande mellan absorbans och koncentration. Utvalda koncentrationer av proteinstandarden bovint serumalbumin (BSA) tillsattes i en 96-brunnsplatta tillsammans med MQ vatten och Bradfordreagens. Proven inkuberades i rumstemperatur i 30 minuter och därefter mättes absorbansen vid 595 nm hos de olika proven med hjälp av spektrofotometer av modellen FLUOstar Omega från företaget BMG LABTECH och en standardkurva togs fram.

Enzymproven från de olika svampodlingarna tillsattes till en 96-brunnsplatta tillsammans med MQ vatten och Bradfordreagens. Proven inkuberades i rumstemperatur i 30 minuter och därefter mättes absorbansen vid 598 nm hos proverna. Med hjälp av standardkurvan kunde proteinkoncentrationerna hos respektive prov tas fram.

Då några av proverna innehöll låga koncentrationer av protein gjordes även en mikro-Bradfordanalys. En standardkurva förbereddes med koncentrationer mellan 1 µg/ml och 10 µg/ml. De prover som misstänktes ligga mellan 10-100 µg/ml späddes 10 gånger i MQ vatten. Enzymproverna och standardproverna blandades med lika volym Bradfordreagens till totalvolym på 800 µl och dessa inkuberades i rumstemperatur i 24 minuter. Proverna pipetterades till kyvetter och absorbansen mättes vid 595 nm.

3.3.2 pNP-analys

Olika koncentrationer av fritt pNP blandades med MQ vatten, stopplösning bestående av Na_2CO_3 (200 mM) och citrat-fosfat buffert (0,1 M) med pH 6. Citrat-fosfat buffert gjordes genom att 2,10 g citratmonohydrat löstes upp i 100 ml MQ vatten och 5,68 g dibasic natriumfosfat löstes upp i 200 ml MQ vatten. 73,7 ml av syran och 126,3 ml av basen blandades så att ett pH på ungefär 6 erhöles. Bufferten ställdes sedan in till exakt pH 6 med hjälp av en pH-meter och tillsatts av mer syra alternativt bas. Lösningarna innehållande fritt pNP tillsattes till en 96-brunnsplatta, absorbansen vid 410 nm mättes med spektrofotometer och en standardkurva togs fram.

Två olika pNP-glykosider, pNP- β -glukos och pNP- α -xylos, blandades med enzymlösningar och citrat-fosfat buffert med pH 6. Enzymlösningarna som blandades med pNP- β -glukos kom från svampar som växt på glukos och enzymlösningarna som blandades med pNP- α -xylos kom från svampar som växt på xylos. Det gjordes även två blanka prov innehållande MQ vatten istället för enzymlösning. Lösningarna inkuberades i 30 minuter i 50 °C och därefter tillsattes stopplösning bestående av Na_2CO_3 (pH>10) och proverna lades på is. Proven pipetterades över till en 96-brunnsplatta och absorbansen vid 410 nm mättes med spektrofotometer. Koncentrationen av fritt pNP som bildats i varje prov räknades därefter ut med hjälp av standardkurvan. Från detta resultat kunde enzymhastigheten räknas ut och med hjälp av Bradfordanalysen erhöles ett mått på specifik enzymaktivitet för proverna.

3.3.3 DNS-analys

En DNS-lösning innehållande 98 ml MQ-vatten, 1 g 3,5-dinitrosalicylat, 0,2 g fenol och 2 ml 50 % natriumhydroxid förbereddes. En standardkurva erhöles genom att 50 μl buffert, 20 μl vatten och 130 μl glukoslösning i koncentrationerna 0, 0,5, 1, 2, 3, 4 och 5 g/l blandades. 100 μl av DNS-lösningen tillsattes till 100 μl av respektive lösning med de olika glukoskoncentrationerna. Rören inkuberades i 90 °C i 20 minuter och innehållet pipetterades över till en 96-brunnsplatta och därefter avlästes absorbansen vid 575 nm med spektrofotometer.

En tidslinje för de fem utvalda svamparna, på xylan, vetekli, risstrå och cellulosa, gjordes där 10 prov analyserades under loppet av 24 timmar. Genom att 200 μl enzym, 500 μl buffert och 1300 μl substrat blandades i Eppendorfrör som inkuberades i 50 °C. För xylan och cellulosa var koncentrationen 5 mg/ml och för vetekli och risstrå var koncentrationen 5,4 mg/ml. Vid provtagning pipetterades 100 μl från varje lösning till ett nytt provrör innehållande 100 μl DNS-lösning. Dessa prover inkuberades i 90 °C i 20 minuter. Proverna pipetterades över till en 96-brunnsplatta och absorbansen mättes vid 575 nm med spektrofotometer. Proverna jämfördes med antalet reducerande ändrar i ett prov utan enzymtillsatts och med resultaten från Bradfordanalysen erhöles ett mått på den specifika enzymaktiviteten. Mätningarna gjordes i två omgångar då xylan och cellulosa analyserades först och därefter vetekli och risstrå. En standardkurva gjordes vid båda tillfällena för säkerhetsställa tillförlitliga resultat. Vetekli och risstrå inkuberades under skakning för att enzymerna lättare skulle kunna komma åt de olösliga substraten.

4 Resultat och Diskussion

Följande avsnitt behandlar projektets laborationsresultat i form av tillväxtmätningar, proteinkoncentrationsmätningar och enzymanalyser.

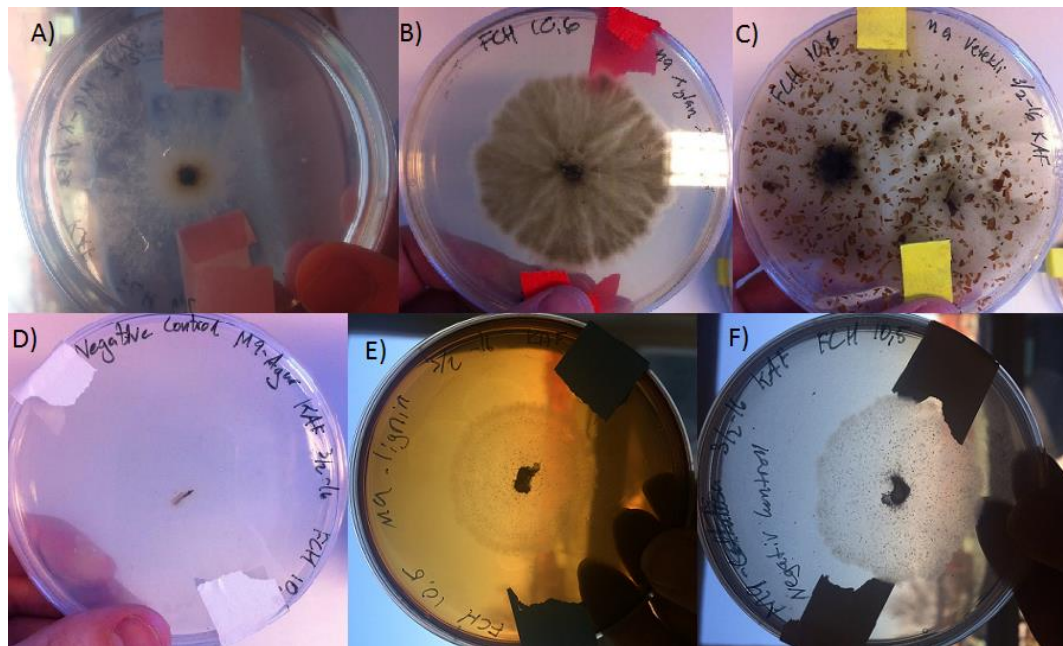
4.1 Tillväxt och morfologi på agarplattor

De observerade tillväxterna och morfologierna för varje svampstam växande på xylos, xylan, cellulosa, vetekli och lignin presenteras i *Tabell 2*.

Tabell 2. Observerade tillväxter och morfologier för varje svampstams tillväxt på xylos, xylan, cellulosa, vetekli och lignin efter 6 dagars tillväxt i 50 °C.

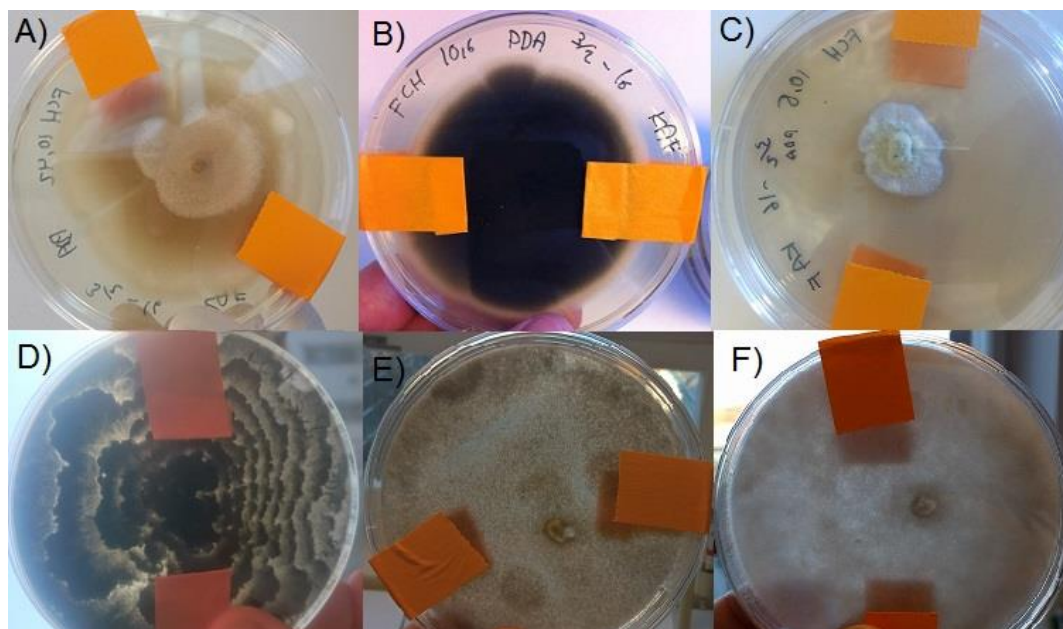
Substrat/ Svampstam	Xylos	Xylan	Cellulosa	Vetekli	Lignin
5.2	Ingen tillväxt.	Ingen tillväxt.	Ingen tillväxt.	Stark tillväxt. Hela plattan luddig.	Ingen tillväxt.
5.71	Stark tillväxt. Spretig utspridning.	Väldigt svag tillväxt.	Ingen tillväxt.	Medelstark tillväxt. Utspridning över hela plattan.	Ingen tillväxt.
6.2	Stark spretig tillväxt.	Stark tillväxt. Spretig.	Svag tillväxt. Rund.	Tillväxt runt varje kli.	Ingen tillväxt.
10.42	Stark tillväxt. Rund, luden och vit.	Stark tillväxt. Rund.	Ingen tillväxt.	Svag tillväxt. Rund.	Ingen tillväxt.
10.5	Medelstark tillväxt. Rund.	Stark tillväxt. Rund och gulaktig.	Ingen tillväxt.	Stark tillväxt. Rund och luddig.	Ingen tillväxt.
10.6	Stark tillväxt. Rund.	Stark tillväxt. Rund.	Ingen tillväxt.	Bitvis stark tillväxt. Bitvis små runda kolonier.	Ingen tillväxt.

Exempel på tillväxterna i *Tabell 2* beskrivs i *Figur 6*. För de svampstammar som visat viss tillväxt på den negativa kontrollen har detta tolkats som att svampen har växt från substratet i agarkuben. När liknande tillväxt som negativa kontrollen funnits på andra plattor har detta tolkats på samma sätt (se *Figur 6E* och *F*).



Figur 6. Illustrerande exempel för beskrivningar av tillväxter och morfologier ur Tabell 2. A) visar tillväxten av svampstam 6.2 på xylos, beskriven som "stark spretig tillväxt". B) visar tillväxten av svampstam 10.6 på xylan, beskriven som "stark tillväxt". C) visar tillväxten av svampstam 10.6 på vetekli, beskriven som "bitvis tillväxt". D) visar en typisk avsaknad av tillväxt för negativ kontroll. E) och F) visar hur svampstam 10.5 har liknande utspridning på lignin och negativ kontroll, vilket har tolkats som ingen tillväxt. Författarnas egna bilder.

Ingen av svampstammarna visade tillväxt på den negativa kontrollen medan samtliga hade växt på PDA-plattor (se Figur 7).



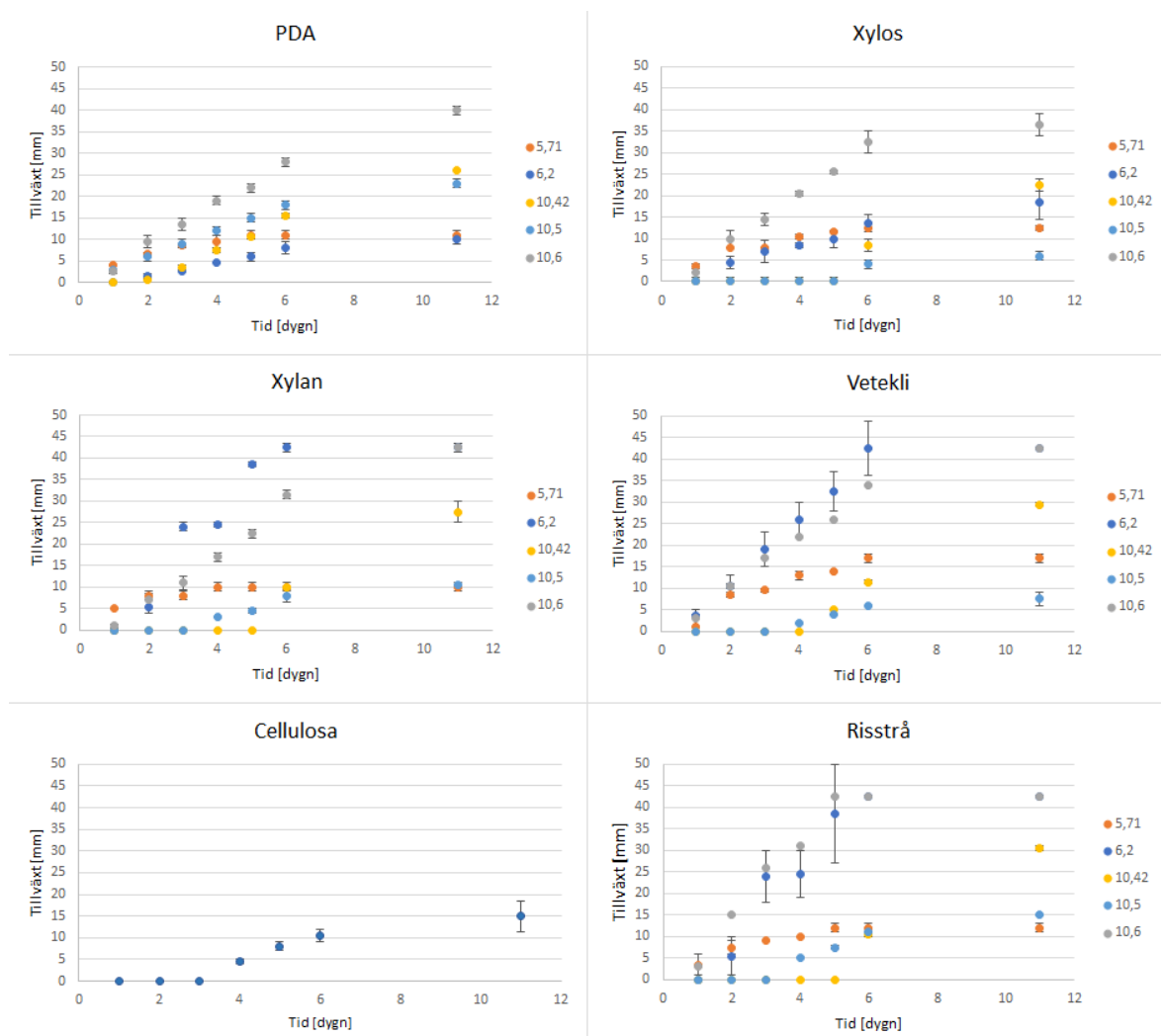
Figur 7. Samtliga svampstammars tillväxt på PDA vid 50 °C efter 6 dagar. A) 10.42, B) 10.6, C) 10.5, D) 6.2, E) 5.72, F) 5.2. Författarens egna bilder.

Då 5.2 enbart visade tillväxt på vetekli uteslöts denna från efterföljande delar av studien. Även lignin och delvis cellulosa uteslöts från vidare försök då ingen av svampstammarna visade

tillväxt på lignin, vilket var förväntat, och endast 6.2 visade tillväxt på cellulosa. Svampstam 10.5 visade stark tillväxt på höjden snarare än utbredning på plattorna. I *Bilaga 1 – Tillväxtbilder* visas tillväxt för samtliga svampstammar på varje substrat.

Samtliga svampstammar studerades under mikroskop där det kunde observeras att 5.71 var den enda som bildade sporer. På grund av detta gjordes mycellösningar för samtliga svampstammar för vidare odling i vätskekulturer istället för spörlösningar.

För att göra tillväxtstidslinjer gjordes nya plattor för samtliga svampstammar, utom för 5.2, på de substrat som de visat tillväxt på i den första tillväxtundersökningen. Utöver de tidigare substrat som testats för tillväxt valdes risstrå som ytterligare ett substrat. Risstrå tillkom efter att goda resultat av tillväxt på vetekli erhållits, då vetekli likt risstrå är ett komplext substrat. Risstrå är även en vanlig form av växtbiomassa i Vietnam där svamparna var tagna ifrån och är därför av intresse att studera. För att göra tillväxtmätningarna mättes medelradien hos svampstammarna på de olika substraten varje dag i en vecka samt efter 11 dygn. Resultaten presenteras i *Figur 8* och är ett medelvärde på tekniska duplikat där standardfelen är angivna som felstaplar som beräknats med en inbyggd funktion i Excel.



Figur 8. Tillväxtförloppen för svampstam 5.71, 6.2, 10.42, 10.5 och 10.6 på PDA, xylos, xylan, risstrå, cellulosa och vetekli under 11 dygn. Felstaplar visar standardfelet mellan de biologiska duplikaten. Plattorna som användes hade en radie på 42,5 mm och därför har inga högre värden på tillväxten kunnat uppmätas.

Värdena på tillväxten hos vissa av svampstammarna är till viss del missvisande då mätningen tvingades avbrytas när svampen växt över hela plattan. *Figur 8* visar till exempel att tillväxten av svampstam 6.2 på risstrå avstannar när den växt 42,5 mm (efter 6 dagar). Om större plattor använts hade fortsatt tillväxt möjliggjorts och ett annat resultat kunnat erhållas.

Från *Figur 8* syns att 10.6 har en hög tillväxt på majoriteten av substrat, jämfört med de andra svampstammarna. Denna svampstam har även en jämn tillväxtkurva i jämförelse med till exempel 10.42. På flera av substraten tog det upp till 4 dagar innan en tillväxt kunde observeras hos både 10.42 och 10.5. Detta skulle kunna bero på att de behöver längre tid att acklimatisera sig till nya substrat jämfört med övriga svampstammar. Svampstam 6.2 hade en hög tillväxt på xylan, risstrå och vetekli. Detta var även den enda svampstam som visade en tillväxt på cellulosa. Värt att notera var att dess tillväxthastighet på PDA var relativt låg jämfört med på de övriga substraten. Svampstammarna 5.71 och 10.5 hade liknande tillväxtkurvor, vilka var relativt låga jämfört med de övriga svampstammarna och avstannar efter cirka 6 dagar. En skillnad i *Tabell 2* för svampstam 5.71 är att olika inkubatorer har använts. Inkubatorn som användes då de lägre tillväxterna erhöles i *Figur 8* använde sig av varmluft för att värmas upp, detta kan ha påverkat svampstam 5.71 då denna var den enda som sporulerade.

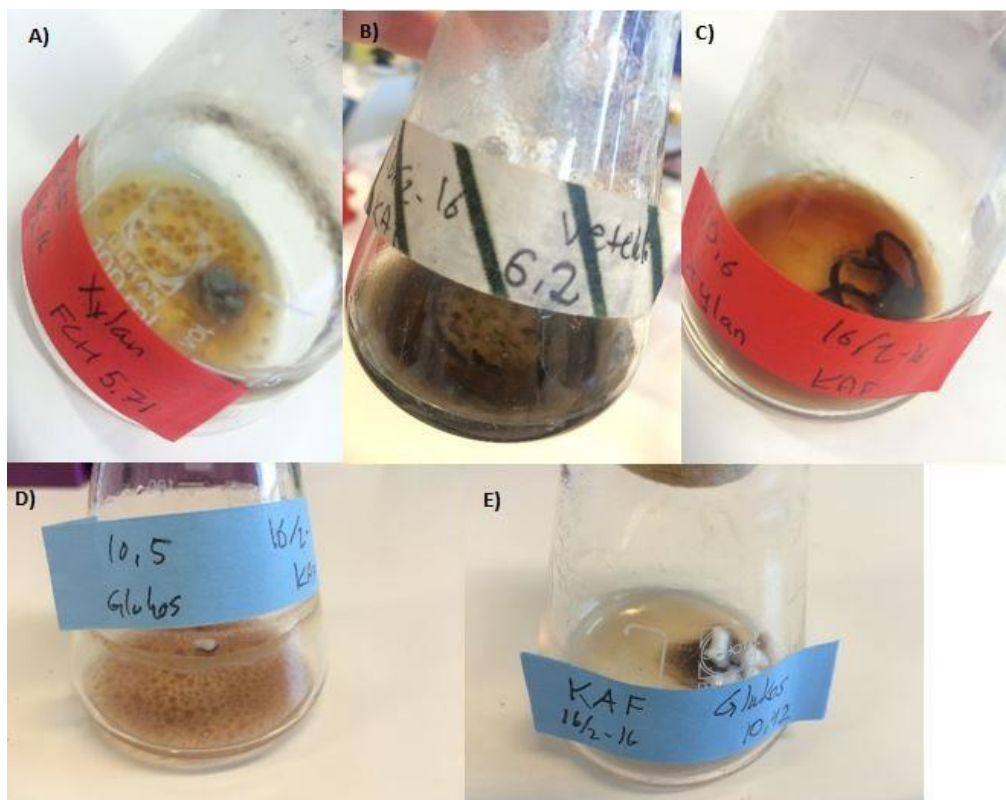
4.2 Tillväxt och morfologi i vätskekulturer

Svampstam 5.71, 6.2, 10.42, 10.5 och 10.6 odlades i vätska på substraten glukos, xylos, xylan, cellulosa och vetekli. Anledningen till att ingen vätskekultur med risstrå gjordes var för att detta substrat tillkom senare i studien. Vid kommande enzymatiska analyser av nedbrytning av risstrå användes istället vätskekulturer från tillväxt på vetekli. Detta gjordes för att det ansågs att både risstrå och vetekli är komplexa substrat och de svampar som har växt på vetekli borde därför utsöndra likande enzymsammansättning som om att de skulle växt på risstrå.

Svampstammarnas tillväxt och morfologi analyserades efter 7 dagars tillväxt i 50 °C och resultatet från detta syns i *Tabell 3*. Exempel på hur odlingarna i vätskekultur kunde se ut visas i *Figur 9*. I *Bilaga 2 – Tillväxtbilder i vätskekulturer* visas tillväxt för samtliga svampstammar på varje substrat. Bilderna illustrerar några av de olika morfologier som uppvisades.

Tabell 3. Observerade tillväxter och morfologier i vätskekultur efter 7 dagars tillväxt i 50 °C för varje svampstam på glukos, xylos, xylan och vetekli samt för svampstam 6.2 på cellulosa.

Substrat/ Svampstam	Glukos	Xylos	Xylan	Cellulosa	Vetekli
5.71	Medelstark tillväxt. Små geléliknande ansamlingar. Vit och grumlig.	Stark tillväxt. Finfördelad, vit geléaktig massa.	Medelstark tillväxt. Stor grå ansamling och små bruna geléaktiga ansamlingar i omgivande vätska.		Svag tillväxt. Grå och grumlig. Högre viskositet på vätskan än vatten.
6.2	Svag tillväxt. Klar vätska och små gröna ansamlingar.	Svag tillväxt. Små svarta ansamlingar med vitt ludd.	Svag tillväxt. Små runda och små avlånga bruna ansamlingar.	Svag tillväxt. En större svart ansamling och många korta smala förgreningar.	Svag tillväxt. Svart grumlig vätska med svarta avlånga ansamlingar.
10.42	Stark tillväxt. Stor geléaktig ansamling med mycket vitt ludd.	Stark tillväxt. En stor vit och en stor grå geléaktig ansamling.	Stark tillväxt. Brun geléaktig ansamling och vit på toppen.		Stark tillväxt. Stor vit ansamling med många små vita ansamlingar.
10.5	Stark Tillväxt. En stor vit och många små bruna ansamlingar. Svagt rosa vätska.	Stark tillväxt. Många små ljusbruna ansamlingar.	Stark tillväxt. En brun ansamling med vitt ludd.		Medelstark tillväxt. Lång, vit och smal ansamling på flaskhalsen över vätskenivån.
10.6	Medelstark tillväxt. Stor mörk ansamling. Brunröd vätska.	Stark tillväxt. Svagt orange vätska med avlånga svarta ansamlingar.	Medelstark tillväxt. Långa svarta ansamlingar. Röd vätska.		Inga märkbara fasta partiklar. Grumlig vätska.



Figur 9. Illustrerande exempel för beskrivningar av tillväxter och morfologier ur Tabell 3. A) visar tillväxten av 5.71 på xylan, beskriven som "medelstark tillväxt". B) visar tillväxten av 6.2 på vetekli, beskriven som "grumlig svag tillväxt". C) visar tillväxten av 10.6 på xylan, beskriven som "medelstark tillväxt". D) visar tillväxten av 10.5 på glukos, beskriven som "stark tillväxt". E) visar tillväxten av 10.42 på glukos, beskriven som "stark tillväxt" Författarnas egna bilder.

För samtliga flaskodlingar gjordes duplikat, skapade från samma mycellösning. Då mycel ej är fullständigt lösligt kan olikheter ha uppstått mellan mängd överförd svamp i de olika proven. Proteinlösningar från flaskodlingarna användes sedan som separata biologiska duplikat i de fortsatta analyserna, det vill säga för Bradford- pNP- och DNS-analyserna (se Avsnitt 4.3, 4.4 och 4.5). Biologiska duplikat användes för att visa om svampen kontinuerligt kunde producera liknande resultat vid repeterad användning till skillnad från tekniska duplikat som påvisade om metoden var tillförlitlig och korrekt genomförd.

4.3 Mätning av proteinkoncentration – Bradford

För att bestämma proteinkoncentrationer av de utsöndrade proteinlösningarna från vätskekulturerna uppmättes först en absorbans enligt Bradfordmetoden. Koncentrationer beräknades därefter utifrån förberedda standardkurvor (se Bilaga 3 – Bradfordanalys). Tabell 4 visar den totala proteinkoncentrationen i mg/ml med två separerade biologiska duplikat. Resultaten är ett medelvärde på tekniska duplikat och feltermen är angiven som standardfel. Det finns en tydlig trend när svampstammarna växt på substrat bestående av polysackarider, jämfört med när de växt på monosackarider. Detta för att de då har utsöndrat en högre mängd protein, med undantag för cellulosa.

Tabell 4. Proteinkoncentrationer för varje svampstam som växt på glukos, xylos, xylan, vetekli och vetekli samt för svampstam 6.2 på cellulosa från Bradfordanalyserna. Siffrorna efter substratnamnen representerar olika biologiska duplikat. Värdena i

tabellen anger totalmängd proteinkoncentration i mg/ml och är medelvärden över tekniska duplikat med standardfel angivet som felterm.

Substrat/ Svampstam	5.71	6.2	10.42	10.5	10.6
Glukos	$9,23 \times 10^{-3} \pm 0$	$7,53 \times 10^{-3} \pm 0,222 \times 10^{-3}$	$130 \times 10^{-3} \pm 34,5 \times 10^{-3}$	$44,1 \times 10^{-3} \pm 5,72 \times 10^{-3}$	$386 \times 10^{-3} \pm 151 \times 10^{-3}$
Xylos (duplikat 1)	$59,5 \times 10^{-3} \pm 48,6 \times 10^{-3}$	$12,1 \times 10^{-3} \pm 1,20 \times 10^{-3}$	$103 \times 10^{-3} \pm 61,7 \times 10^{-3}$	$42,0 \times 10^{-3} \pm 52,6 \times 10^{-3}$	$191 \times 10^{-3} \pm 31,9 \times 10^{-3}$
Xylos (duplikat 2)	$17,9 \times 10^{-3} \pm 0,554 \times 10^{-3}$	$5,72 \times 10^{-3} \pm 0,443 \times 10^{-3}$	$53,0 \times 10^{-3} \pm 33,9 \times 10^{-3}$	$51,0 \times 10^{-3} \pm 32,0 \times 10^{-3}$	$226 \times 10^{-3} \pm 133 \times 10^{-3}$
Xylan (duplikat 1)	$196 \times 10^{-3} \pm 112 \times 10^{-3}$	$124 \times 10^{-3} \pm 59,8 \times 10^{-3}$	$189 \times 10^{-3} \pm 92,0 \times 10^{-3}$	$308 \times 10^{-3} \pm 155 \times 10^{-3}$	$542 \times 10^{-3} \pm 258 \times 10^{-3}$
Xylan (duplikat 2)	$158 \times 10^{-3} \pm 53,3 \times 10^{-3}$	$193 \times 10^{-3} \pm 55,3 \times 10^{-3}$	$165 \times 10^{-3} \pm 88,2 \times 10^{-3}$	$151,8 \times 10^{-3} \pm 66,9 \times 10^{-3}$	$601 \times 10^{-3} \pm 281 \times 10^{-3}$
Vetekli (duplikat 1)	$148,6 \times 10^{-3} \pm 81,7 \times 10^{-3}$	$209 \times 10^{-3} \pm 71,4 \times 10^{-3}$	$158 \times 10^{-3} \pm 76,5 \times 10^{-3}$	$243 \times 10^{-3} \pm 112 \times 10^{-3}$	$551 \times 10^{-3} \pm 448 \times 10^{-3}$
Vetekli (duplikat 2)	$85,3 \times 10^{-3} \pm 36,5 \times 10^{-3}$	$231 \times 10^{-3} \pm 108 \times 10^{-3}$	$143 \times 10^{-3} \pm 33,2 \times 10^{-3}$	$363 \times 10^{-3} \pm 22,9 \times 10^{-3}$	$203 \times 10^{-3} \pm 85,6 \times 10^{-3}$
Cellulosa (duplikat 1)		$1,85 \times 10^{-3} \pm 0,738 \times 10^{-3}$			
Cellulosa (duplikat 2)		$2,40 \times 10^{-3} \pm 1,66 \times 10^{-3}$			

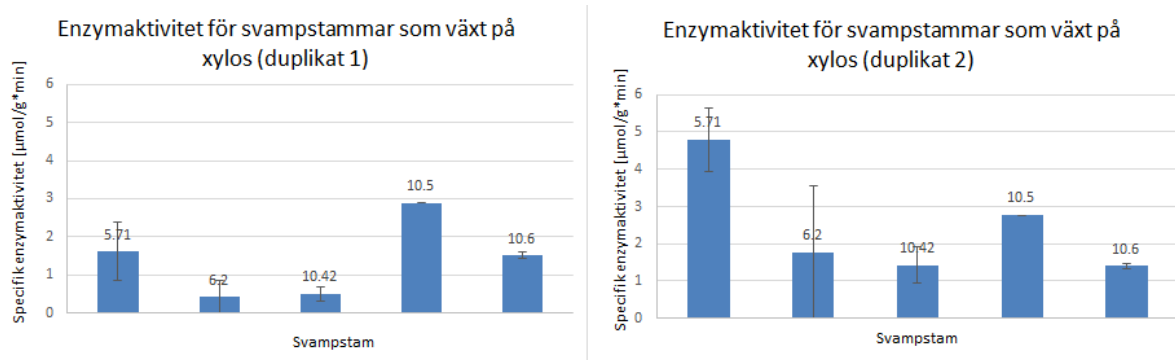
I *Tabell 4* framgår att svampstam 10.6 generellt producerade högst mängd protein medan 6.2 generellt producerade lägst mängd protein. Värt att notera är att då svampstam 6.2 växte på cellulosa producerades avsevärt lägre proteinmängd.

Feltermerna i *Tabell 4* är i vissa fall väldigt stora, detta skulle kunna bero på bubblor i 96-brunnsplattan, inkonsekvent mängd Bradfordreagens i brunnarna, spädningsfel för proteinproverna eller Bradfordmetodens precision. När proteinkoncentrationerna sedan används för att beräkna specifik enzymaktivitet kommer de proverna som har en stor felterm i Bradfordanalysen inte vara helt tillförlitliga.

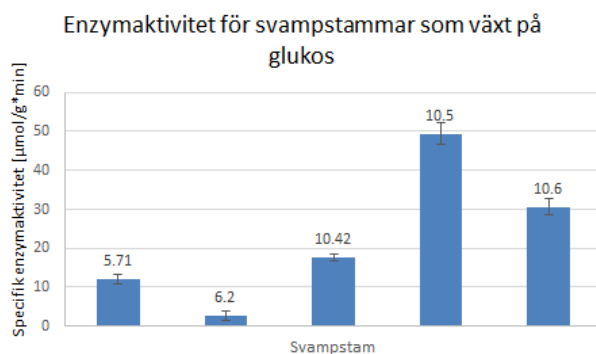
4.4 Enzymaktivitetsmätning – pNP

För att bestämma den specifika enzymhastigheten för klyvning till monosackarider hos proteinblandningarna från de olika svampstammarna utfördes en pNP-analys. Från pNP-analysen räknades koncentrationen av fritt pNP hos de olika proverna ut med hjälp av en standardkurva (se *Bilaga 4 – pNP-analys*). Då tiden som enzymreaktionen fortskred var känd kunde hastigheten med vilken enzymerna bröt ner substratet tas fram. Resultatet från Bradfordanalysen användes sedan för att beräkna den specifika enzymaktiviteten hos proteinblandningarna från de olika svampstammarna som växt på glukos och xylos. Detta gjordes genom att dividera enzymhastigheten med proteinkoncentrationen som erhöles i Bradfordanalysen.

Endast proteinblandningar från svampstammar som växt på glukos och xylos valdes för att undersöka om det var någon skillnad i enzymaktivitet mellan de svampar som växt på monosackarider. Respektive prov blandades med *pNP*- α -xylos eller *pNP*- β -glukos. Det hade tidigare gjorts biologiska duplikat av svampstammar som vuxit på xylos och dessa analyserades var för sig. Resultaten från *pNP*-analysen åskådliggörs i *Figur 10* och *Figur 11*.



Figur 10. Specifik enzymaktivitet i $\mu\text{mol}_{\text{fritt pNP}}/\text{g}_{\text{protein}} \cdot \text{min}$ för svampstam 5.71, 6.2, 10.42, 10.5 och 10.6 på xylos från det första samt andra biologiska duplikatet. Felstaplar är standardfel mellan de tekniska duplikaten.



Figur 11. Specifik enzymaktivitet i $\mu\text{mol}_{\text{fritt pNP}}/\text{g}_{\text{protein}} \cdot \text{min}$ för svampstam 5.71, 6.2, 10.42, 10.5 och 10.6 på glukos. Felstaplar är standardfel mellan de tekniska duplikaten.

I *Figur 10* och *Figur 11* syns att svampstam 10.5 verkar ha högst specifik enzymaktivitet. Detta innebär att den bryter ner substratet mest effektivt per utsöndrat protein. Denna svampstam har även låga standardfel mellan de tekniska duplikaten vilket tyder på att resultatet är relativt pålitligt.

Svampstam 6.2 visar lägst specifik enzymaktivitet men har även stora standardfel för de tekniska duplikaten. I *Figur 8* i *Avsnitt 4.1* syns att 6.2 hade en stark tillväxt på xylan, risstrå och vetekli, men svagare tillväxt på xylos. Detta stämmer överens med resultaten från *pNP*-analysen eftersom endast monosackarider som glukos och xylos ingår i denna. Detta tyder på att 6.2 utsöndrar enzymer som bryter ner substrat innehållande polysackarider bra, men växer sämre på enbart monosackarider.

Den specifika enzymaktivitet för 5.71 skiljde sig mycket åt mellan de olika biologiska duplikaten, vilket kan ses av de stora skillnaderna i *Figur 10*. Detta kan bero på, som tidigare nämnts i *Avsnitt 4.2*, att extraheringsmetoden inte är helt tillförlitlig. Svampstam 10.42 och 10.6

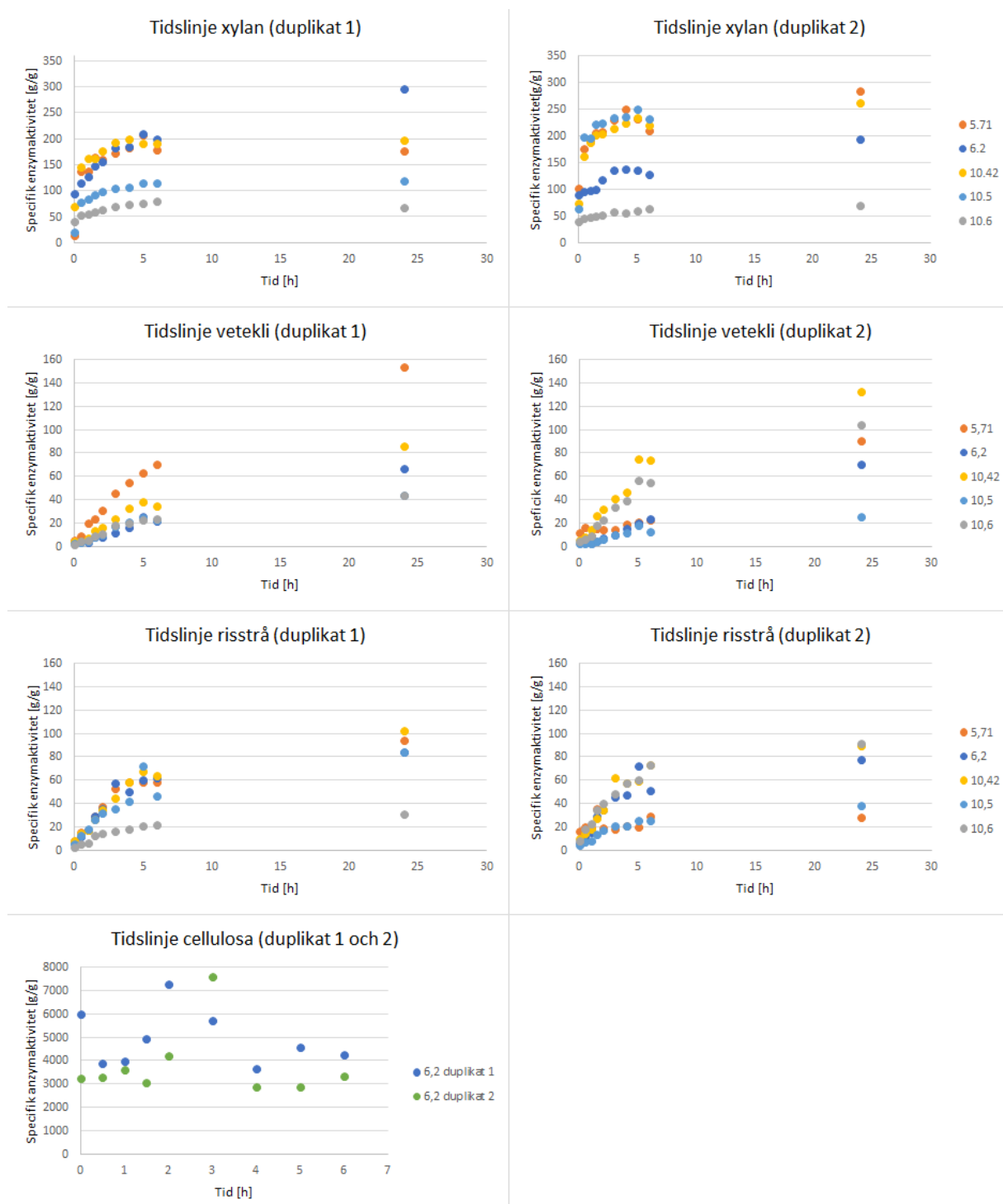
hade relativt låga specifika enzymaktiviteter. I *Figur 8* i *Avsnitt 4.1* syns dock att svampstam 10.6 hade en stark tillväxt på xylos jämfört med de andra svampstammarna och den har också högst totalutsöndring av proteiner, som kan ses i *Tabell 4*. Detta tyder på att 10.6 utsöndrar en större andel proteiner med andra ändamål än att frigöra monosackarider.

För alla svampstammar var den specifika enzymaktiviteten mycket högre vid nedbrytning av glukos än vid nedbrytning av xylos. Detta tyder på att alla svampstammar utsöndrar enzymer mer anpassade för att frigöra glukos, troligtvis β -glukosidaser (se *Avsnitt 2.2.2*). I *Tabell 3*, *Avsnitt 4.1* visas observerad tillväxt för de olika svampstammarna på glukos och xylos men alla svamparna hade en relativt hög tillväxt på båda substraten och därför är det svårt att dra någon direkt slutsats ifrån detta.

Den specifika enzymaktiviteten för de biologiska duplikaten för tillväxt på xylos skiljer sig åt för 3 av 5 svampar. Även om de biologiska duplikaten skiljer sig åt följer de samma trender och därför anses det inte att skillnaden mellan de biologiska duplikaten minskar trovärdigheten för resultaten. Detta beror snarare på olika mängder mycel i proverna vid start.

4.5 Enzymaktivitetsmätning – DNS

Från de två erhållna standardkurvorna (se *Bilaga 5 – DNS-analys, Figur 27*) beräknades ett medelvärde på lutningen som korrelerar mellan absorbans och koncentration av reducerande ändrar på sockermolekylerna. Med detta samband beräknades koncentrationen reducerade sockerändrar i mg/ml från den uppmätta absorbansen. Därefter dividerades koncentrationen med de erhållna värdena på proteinkoncentrationerna från Bradfordanalysen, som även de är i mg/ml, för att få den specifika enzymaktiviteten som då blir enhetslös ($\text{reducerande ändrar}_{\text{prov}} / [\text{reducerande ändrar}_{\text{glukos}} / \{\text{milligram}_{\text{glukos}} / \text{milliliter}\}] / [\text{milligram}_{\text{enzym}} / \text{milliliter}]$). Varje biologiskt duplikat behandlades separat. Värdena från Bradfordmätningen är specifika för varje svampstam och substrat men eftersom inga proteinprover från risstrå gjordes användes istället värdena från vetekli. Den specifika enzymaktiviteten för varje svampstam efter tillväxt på xylan, vetekli och risstrå samt för 6.2 på cellulosa visas i *Figur 12*.



Figur 12. Tidslinjer för svampstam 5.71, 6.2, 10.42, 10.5 och 10.6 som växt på xylan, risstrå, vetekli och 6.2 på cellulosa. På y-axeln visas den enhetslösa specifika enzymaktiviteten som visar hur bra enzymerna är på att bryta polysackariderna i substraten till mindre bitar, i förhållande till mängden protein. På x-axeln visas tid i timmar efter tillsatts av enzym. Mätningar togs vid start samt efter 0, 5, 1, 1,5, 2, 3, 4, 5, 6 och 24 timmar. De biologiska duplikaten är separerade. Observera att i vetekli (duplikat 1) ligger värdena för svampstam 10.5 bakom värdena för 10.6 på alla mätpunkter, och i risstrå (duplikat 1) ligger 24 timmarsvärdet för 6.2 bakom värdet på 10.5.

Enligt tidslinjerna från DNS-analysen i Figur 12 kan det ses att den totala specifika enzymaktiviteten generellt ökar med tiden vilket innebär att det bildas fler reducerande ändrar

per protein i lösningen. Att kurvornas lutning avtar kan tyda på reaktionerna inhiberas av produkterna eller att enzymerna inte längre kommer åt substraten. Från den specifika enzymaktiviteten går det att säga hur inriktad en svamp är på att bryta ner ett substrat men inte hur mycket substrat den egentligen bryter ner. Det går inte heller att säga vilken bindning som bryts då frigörandet av en monosackarid ger samma utslag som klyvningen av en polysackarid. En svamp som utsöndrar få enzymer som är effektiva på att bryta ner det specifika substratet kan ge samma specifika enzymaktivitet som en svamp som utsöndrar stora mängder enzymer men gör det mindre effektivt. Ett högt värde på den specifika enzymaktiviteten innebär att enzymerna är bra på att bryta ner substraten i proportion till den totala proteinmängden.

Nedbrytning av xylan, risstrå och vetekli för de olika duplikaten följer en förväntad kurva men då de två olika duplikaten inte överensstämmer går det inte att dra någon klar slutsats. Även ytterligare försök visade att det var svårt att få replikerbara resultat (se *Bilaga 5 – DNS-analys, Figur 28*). Under laborationens gång upptäcktes det att för analyser av olösliga substrat uppstod problem med att få samma mängd substrat i de båda duplikaten och det var inte säkert att sammansättningen av substraten var lika på grund av dess komplexitet. Vid provtagningen från inkubatorn vid 50 °C togs inte några bitar av vetekli med, dock gick det inte att undvika att pipettera upp bitar av risstrå vilket kan ha påverkat absorbansmätningen. En hypotes till att nedbrytning av cellulosa inte följer samma trend som de andra substraten är för att stora cellulosabitar är olösliga, vilket gör att dessa inte kan mätas med DNS-analys. Av samma anledning kan cellulosa hamnat i botten på 96-brunnsplattan och gett högre absorbans än förväntat beroende på mängden cellulosa i provet. Anledningen till att nedbrytningen av cellulosa visar på ovanligt hög specifik enzymaktivitet kan vara för att koncentrationerna från Bradfordmätningen var väldigt låga och osäkra. Resultaten visar att svampstam 10.6 i de flesta fall har den lägsta specifika enzymaktiviteten. En möjlig anledning till detta är att den har den högsta proteinkoncentrationen från Bradfordmätningen. Från *Tabell 1* i *Avsnitt 2.3* framgår det att svampstam 10.42 producerar enzymet xylanas vilket stärks från resultaten av DNS-analysen där 10.42 har hög specifik enzymaktivitet på xylan.

5 Slutsats

De svampstammar som visat störst potential för framtida forskning är 10.42 och 10.5. Svampstam 10.42 visade stark tillväxt både på agarplattor och i vätskekulturer. Den visade även hög proteinutsöndring och hög specifik enzymaktivitet i DNS-analysen. Svampstam 10.5 visade stark tillväxt i vätskekulturerna och hade hög proteinutsöndring. Den hade även hög specifik enzymaktivitet i *p*NP-analysen. Båda svampstammarna påvisade hög specifik enzymaktivitet trots hög proteinkoncentration, vilket tyder på att av de utsöndrande proteinerna var antingen en stor andel enzymer eller så var det få enzymer som var väldigt effektiva. Detta skiljer sig från 10.6 som hade hög proteinutsöndring men låg specifik enzymaktivitet vilket indikerar att enzymerna var ineffektiva eller att proteinerna hade en annan funktion än nedbrytning av substratet. Svampstam 6.2 uppvisade viss tillväxt på cellulosa men utsöndrade endast en liten mängd protein. Detta gör att den troligtvis inte är av intresse för fortsatt forskning om det inte gäller cellulosanedbrytning. Övriga svampstammar gav inte några anmärkningsvärda resultat för studiens syfte. En anledning till att det var svårt att dra slutsatser var att de biologiska duplikaten visade stora skillnader. Det hade varit bättre att utföra alla experiment i minst tre replikat istället för två för att få mer tillförlitliga resultat.

Det var även svårt att hitta litteratur för att jämföra värden från analyserna med, då de svamparter som användes är relativt ostuderade. Svampstammarna visade dock förväntat tillväxtbeteende för termofila svampar eftersom de uppvisade tillväxt vid 50 °C. Detta innebär att enzymerna kan verka vid höga temperaturer vilket är gynnsamt för industriell tillämpning enligt *Avsnitt 2.4*.

Som förväntat var tillväxt på lignin och cellulosa problematisk för samtliga svampstammar. I kommande forskning skulle det vara önskvärt att studera tillväxt på kombinationer av lignin och andra substrat där tillväxt tidigare observerats. Detta för att växtbiomassa till viss del består av lignin och det är eftertraktat att med hjälp av enzymer kunna bryta ner substrat trots lignins närvaro. Det skulle även vara intressant att i vidare studier rena upp enzymerna för att bli av med oönskat protein samt undersöka vilken typ av enzymer som är aktiva i nedbrytningsprocessen. Exempelvis skulle substraten kunna undersökas med högupplösande vätskekromatografi före och efter tillsats av enzymlösning för att se vilka beståndsdelar substratet bryts ner till. Detta kan användas för att hjälpa till med att ta reda på om enzymerna är *endo*- eller *exo*-aktiva som beskrivs i *Avsnitt 2.2.2*. För vidare studier skulle *p*NP-analys behöva göras även för de prover där svampstammar fått växa på polysackaridssubstrat. Detta för att se hur effektiva de är på att faktiskt bryta ner substrat till monosackarider.

Med detta arbete har vi visat att dessa svampstammar och deras enzymer kan hjälpa till med att omvandla växtbiomassa till mindre beståndsdelar. Ytterligare studier skulle sedan kunna undersöka möjligheterna att nyttja enzymerna i produktionen av biobränsle.

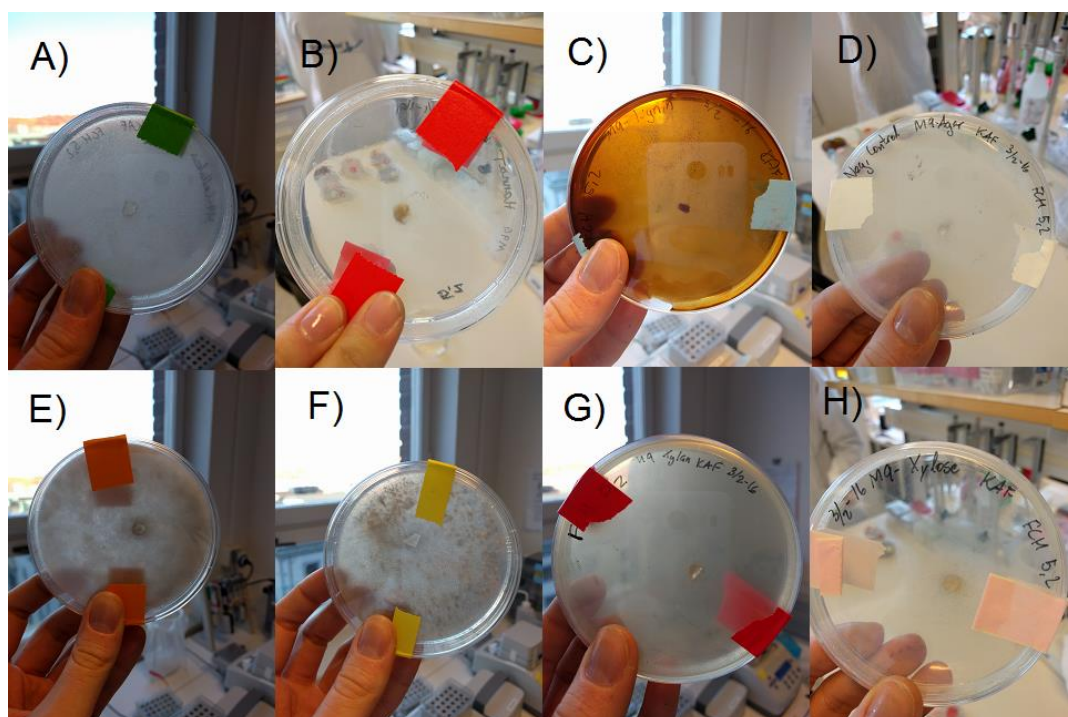
Referenser

1. Miljödepartementet. Klimatfärdplan 2050 - strategi för hur visionen att Sverige år 2050 inte har några nettoutsläpp av växthusgaser ska uppnås www.riksdagen.se: Sveriges Riksdag; 2014. Tillgänglig från: http://www.riksdagen.se/sv/dokument-lagar/dokument/kommittedirektiv/klimatfardplan-2050---strategi-for-hur-visionen_H2B153.
2. Regeringskansliet. Fossilfritt Sverige:Tillsammans nyckeln för att lyckas www.regeringen.se: Regeringskansliet; 2016 [updated 10 februari 2016; cited 2016 2016-05-03]. Tillgänglig från: <http://www.regeringen.se/artiklar/2016/02/fossilfritt-sverige-tillsammans-nyckeln-for-att-lyckas/>.
3. Kumar R, Singh S, Singh OV. Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*. 2008;35(5):377-91.
4. Demain AL, Vaishnav P. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnology Advances*. 2009;27(3):297-306.
5. Morgenstern I, Powlowski J, Ishmael N, Darmond C, Marqueteau S, Moisan MC, et al. A molecular phylogeny of thermophilic fungi. *Fungal Biology*. 2012;116(4):489-502.
6. Mora C TDP, Adl S, Simpson A.G.B, Worm B. How many species are there on earth and in the ocean? *PLoS Biology*. 2011;9.
7. Hawksworth DL. Global species numbers of fungi: are tropical studies and molecular approaches contributing to a more robust estimate? *Biodiversity and Conservation*. 2012;21(9):2425-33.
8. Lundqvist N, Norden B, Friis EM, Skogh L. svampar. www.ne.se: Nationalencyklopedin; 2016.
9. Berrin JG, Navarro D, Couturier M, Olive C, Grisel S, Haon M, et al. Exploring the natural fungal biodiversity of tropical and temperate forests toward improvement of biomass conversion. *Applied and environmental microbiology*. 2012;78(18):6483-90.
10. Kellner T. Oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) mycelium in petri dish on coffee grounds. In: [grounds.JPG OmPomipdoc](#), editor. 2012.
11. K K. Fungi – Biology and Applications: Wiley; 2011.
12. Grubb R, Movitz J. agar. www.ne.se: Nationalencyklopedin; 2016.
13. Mäkelä MR, Donofrio N, de Vries RP. Plant biomass degradation by fungi. *Fungal Genetics and Biology*. 2014;72:2-9.
14. Carpita N, McCann M. The Cell Wall. *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. Volume 1: John Wiley & Sons; 2000.
15. van den Brink J, de Vries RP. Fungal enzyme sets for plant polysaccharide degradation. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2011;91(6):1477-92.

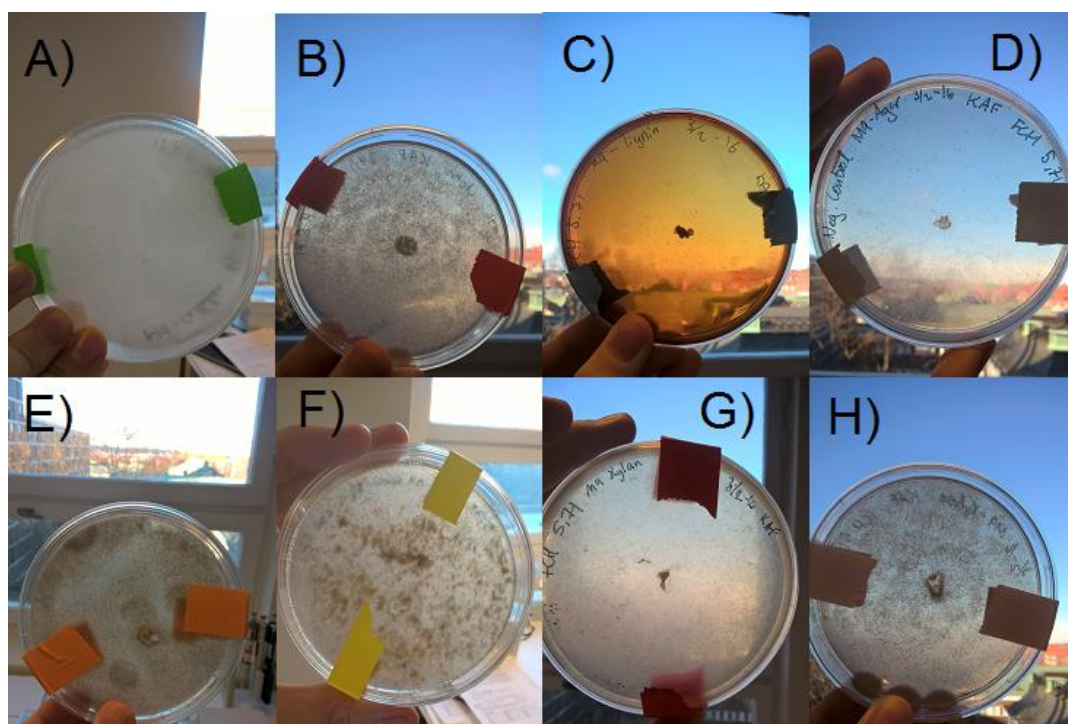
16. Cosgrove DJ. Growth of the plant cell wall. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2005;6(11):850-61.
17. Higuchi ET. Look back over the studies of lignin biochemistry. *Journal of Wood Science*. 2006;52(1):2-8.
18. Kirk TK. Degradation of lignin. *Microbial degradation of organic compounds*. 13. New York: Forest Products Laboratory; 1984.
19. Ruiz Villarreal M. Molecular structure of the primary cell wall in plants. In: *diagram-en.svg Pcw*, editor. Wikipedia2007.
20. Bastawde K. Xylan structure, microbial xylanases, and their mode of action. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 1992;8(4):353-68.
21. Pérez S, Mazeau K, du Penhoat CH. The three-dimensional structures of the pectic polysaccharides. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2000;38(1):37-55.
22. Laghi L. Cellulose strand. In: *Cellulose_strand.svg*, editor. Wikipedia2013.
23. Davies G, Henrissat B. Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure*. 1995;3(9):853-9.
24. Withers S, Williams S. Glycoside hydrolases2016 30 April 2016 08:34 UTC. Tillgänglig från: http://www.cazypedia.org/index.php?title=Glycoside_hydrolases&oldid=9143.
25. Davies GJ, Gloster TM, Henrissat B. Recent structural insights into the expanding world of carbohydrate-active enzymes. *Current opinion in structural biology*. 2005;15(6):637-45.
26. Harris P. Auxiliary Activity Family 9. CAZypedia. Tillgänglig från: http://www.cazypedia.org/index.php/Auxiliary_Activity_Family_92016.
27. de Vries RP, Visser J. Aspergillus enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2001;65(4):497-522.
28. Preetha S, Boopathy R. Purification and characterization of a milk clotting protease from *Rhizomucor miehei*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 1997;13(5):573-8.
29. Ellis D. *Rhizomucor* The University of Adelaide; 2016 [2016-05-11]. Tillgänglig från: http://www.mycology.adelaide.edu.au/Fungal_Descriptions/Zygomycetes/Rhizomucor/.
30. Wiegant W. Growth characteristics of the thermophilic fungus *Scytalidium thermophilum* in relation to production of mushroom compost. *Applied and environmental microbiology*. 1992;58(4):1301-7.
31. Maalej I, Belhaj I, Masmoudi NF, Belghith H. Highly thermostable xylanase of the thermophilic fungus *Talaromyces thermophilus*: purification and characterization. *Applied biochemistry and biotechnology*. 2009;158(1):200-12.
32. Mahajan C, Basotra N, Singh S, Di Falco M, Tsang A, Chadha B. *Malbranchea cinnamomea*: A thermophilic fungal source of catalytically efficient lignocellulolytic glycosyl hydrolases and metal dependent enzymes. *Bioresource technology*. 2016;200:55-63.

33. Singh S, Madlala AM, Prior BA. *Thermomyces lanuginosus*: properties of strains and their hemicellulases. FEMS Microbiology Reviews. 2003;27(1):3-16.
34. Söderström B. Nedbrytning. www.ne.se: Nationalencyklopedin; 2016.
35. Wesenberg D, Kyriakides I, Agathos SN. White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents. Biotechnology advances. 2003;22(1):161-87.
36. Haki G, Rakshit S. Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. Bioresource technology. 2003;89(1):17-34.
37. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical biochemistry. 1976;72(1-2):248-54.
38. Kruger NJ. The Bradford Method for Protein Quantitation. In: Walker JM, editor. Basic Protein and Peptide Protocols. Totowa, NJ: Humana Press; 1994. p. 9-15.
39. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry. 1976;72(1):248-54.
40. Compton SJ, Jones CG. Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. Analytical Biochemistry. 1985;151(2):369-74.
41. Couturier M, Navarro D, Olivé C, Chevret D, Haon M, Favel A, et al. Post-genomic analyses of fungal lignocellulosic biomass degradation reveal the unexpected potential of the plant pathogen *Ustilago maydis*. BMC Genomics. 2012;13(1):1-14.
42. Nationalencyklopedin. kromoforer. www.ne.se: Nationalencyklopedin; 2016.
43. Bowers GN, Jr., McComb RB, Christensen RG, Schaffer R. High-purity 4-nitrophenol: purification, characterization, and specifications for use as a spectrophotometric reference material. Clin Chem. 1980;26(6):724-9.
44. McCleary B. Measurement of Polysaccharide Degrading Enzymes Using Chromogenic and Colorimetric Substrates. Chemistry in Australia. 1991.
45. Sumner JB. The estimation of sugar in diabetic urine, using dinitrosalicylic acid. Journal of Biological Chemistry. 1924;62(2):287-90.
46. Miller GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Analytical chemistry. 1959;31(3):426-8.
47. Bruice PY, Education P. Essential organic chemistry: Pearson Education; 2006.
48. Nelson DL, Lehninger AL, Cox MM. Lehninger principles of biochemistry: Macmillan; 2008.
49. M9 Minimal Media Recipe (1000 ml) [Internet]. theLabRat. 2005.

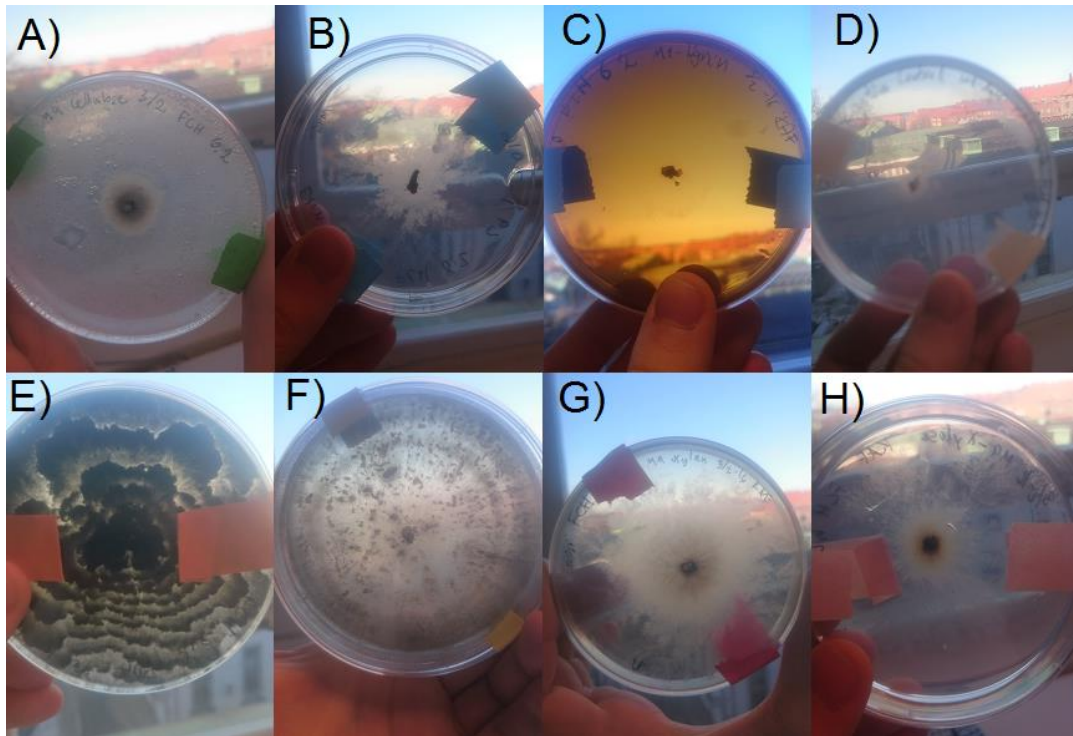
Bilaga 1 – Tillväxtbilder på agarplatta



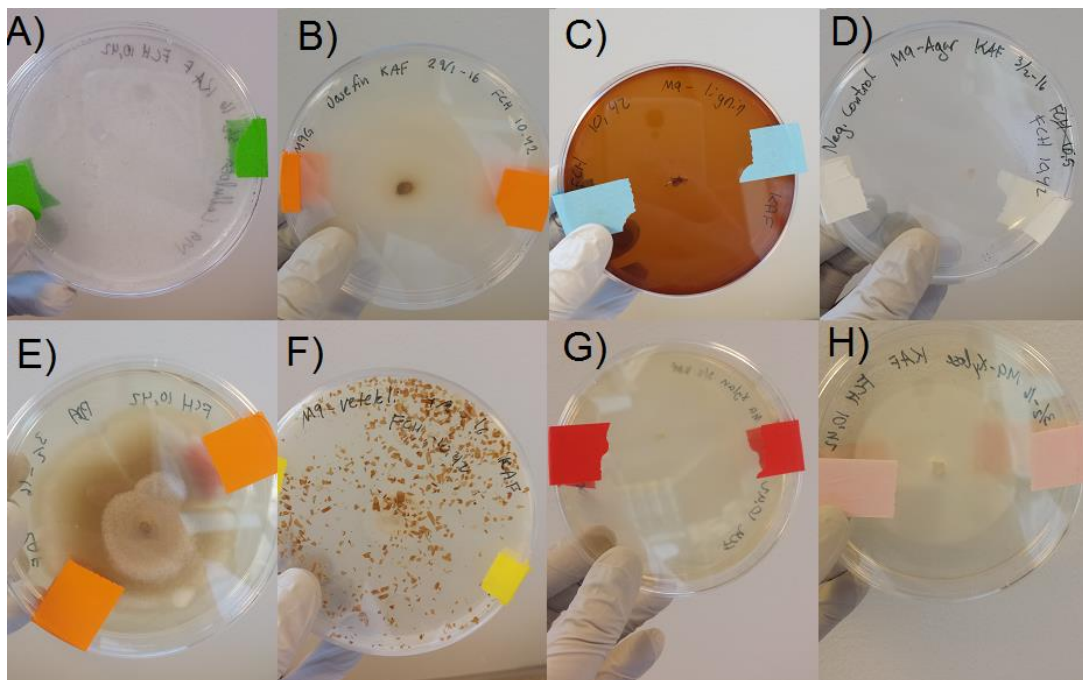
Figur 13. Bilder på tillväxten för svampstam 5.2 efter 6 dagar vid 50 °C för följande substrat: A) cellulosa B) glukos C) lignin D) negativ kontroll E) PDA F) vetekli G) xylan och H) xylos. Författarnas egna bilder.



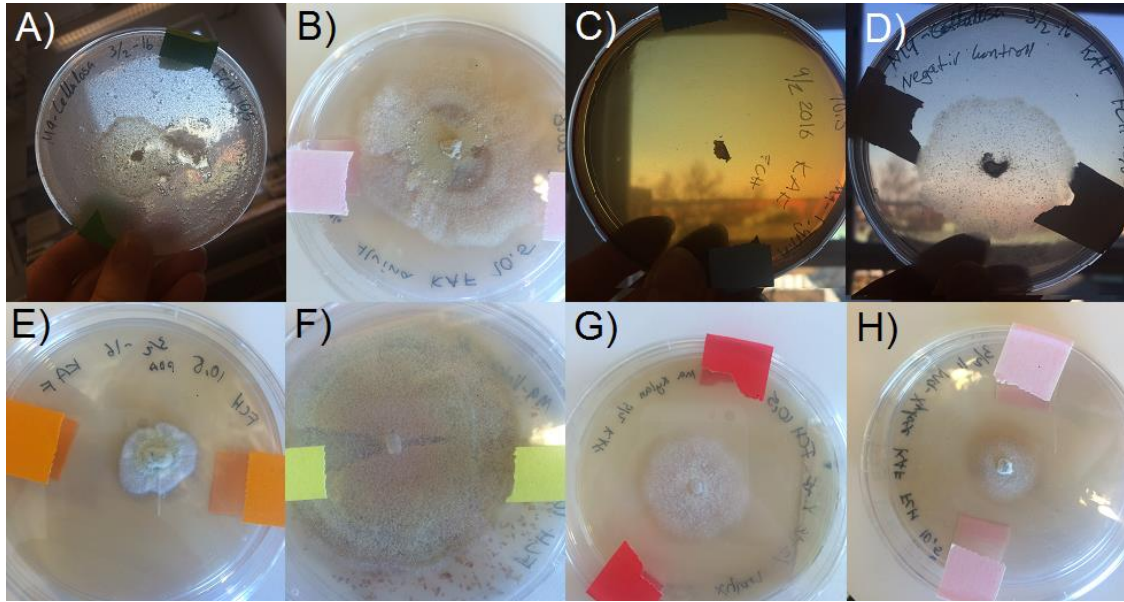
Figur 14. Bilder på tillväxten för svampstam 5.71 efter 6 dagar vid 50 °C för följande substrat: A) cellulosa B) glukos C) lignin D) negativ kontroll E) PDA F) vetekli G) xylan och H) xylos. Författarnas egna bilder.



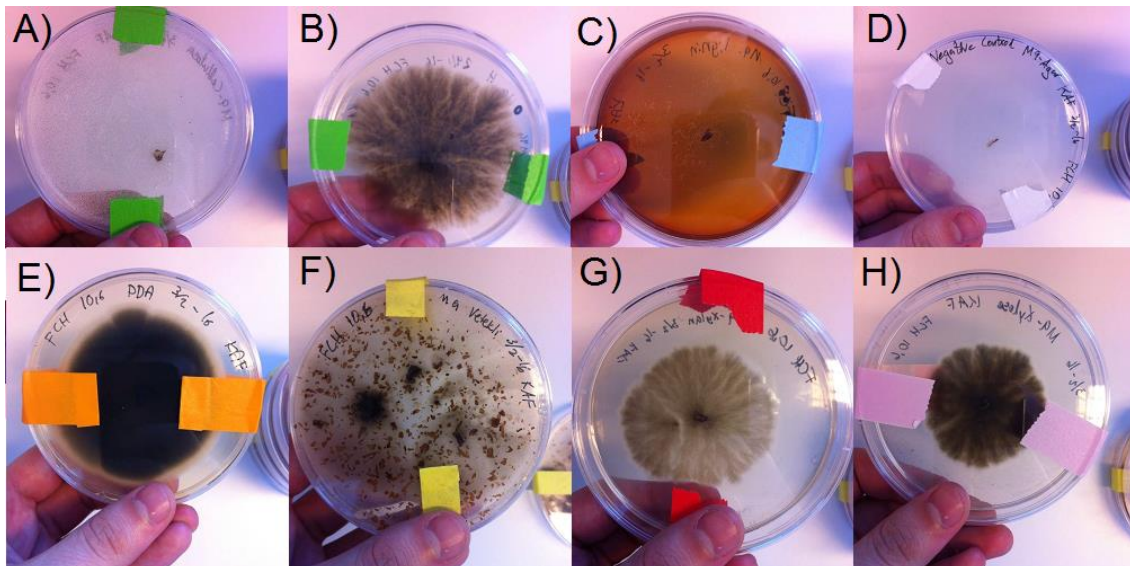
Figur 15. Bilder på tillväxten för svampstam 6.2 efter 6 dagar vid 50 °C för följande substrat: A) cellulosa B) glukos C) lignin D) negativ kontroll E) PDA F) vetekli G) xylan och H) xylos. Författarnas egna bilder.



Figur 16. Bilder på tillväxten för svampstam 10.42 efter 6 dagar vid 50 °C för följande substrat: A) cellulosa B) glukos C) lignin D) negativ kontroll E) PDA F) vetekli G) xylan och H) xylos. Författarnas egna bilder.

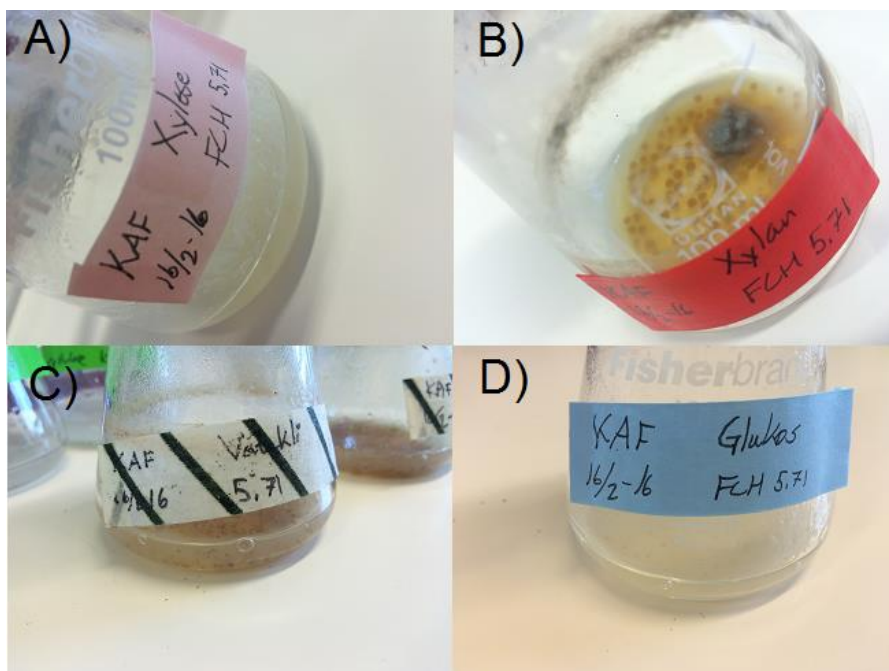


Figur 17. Bilder på tillväxten för svampstam 10.5 efter 6 dagar vid 50 °C för följande substrat: A) cellulosa B) glukos C) lignin D) negativ kontroll E) PDA F) vetekli G) xylan och H) xylos. Författarnas egna bilder.

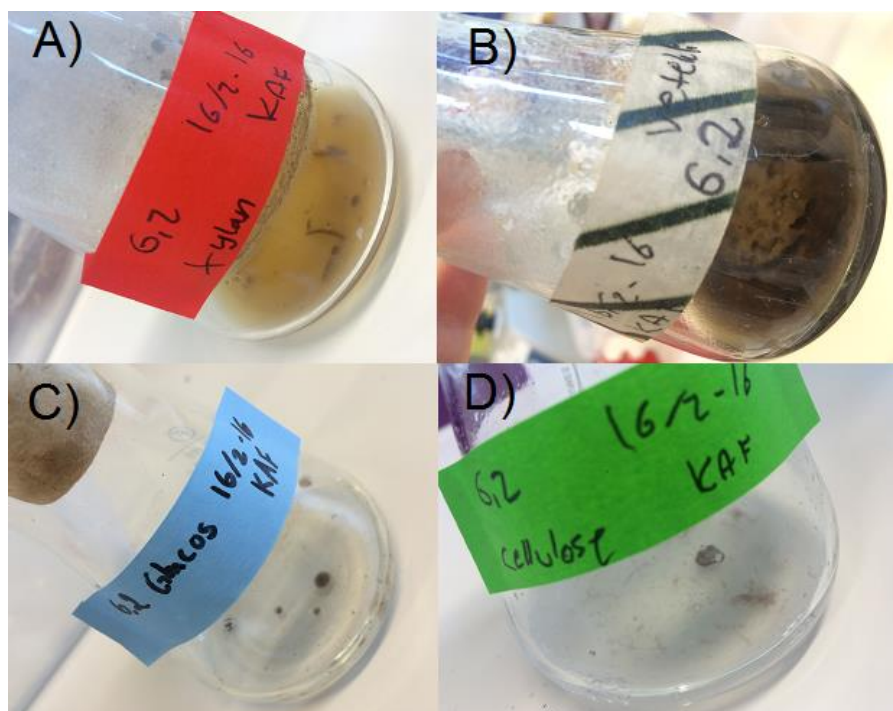


Figur 18. Bilder på tillväxten för svampstam 10.6 efter 6 dagar vid 50 °C för följande substrat: A) cellulosa B) glukos C) lignin D) negativ kontroll E) PDA F) vetekli G) xylan och H) xylos. Författarnas egna bilder.

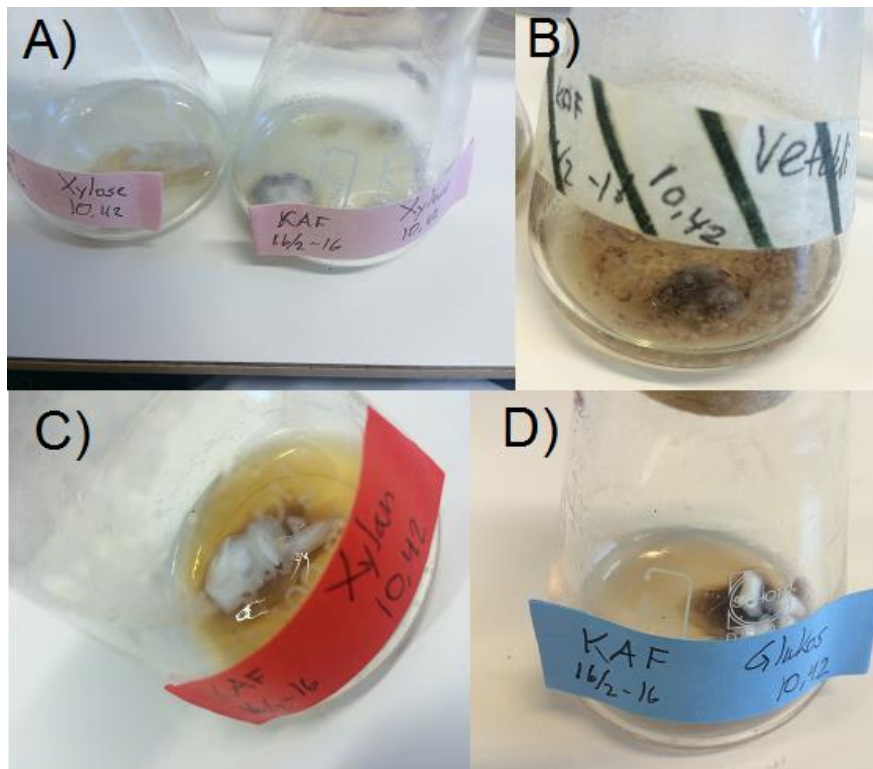
Bilaga 2 – Tillväxtbilder i vätskekulturer



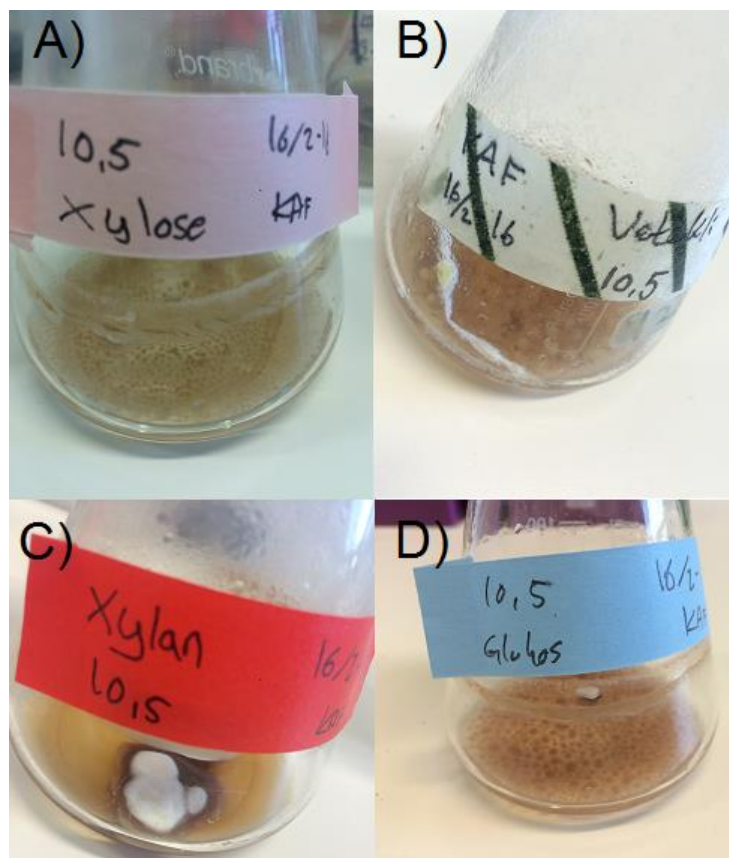
Figur 19. Bilder på tillväxten för svampstam 5.71 efter 7 dagar vid 50 °C för följande substrat: A) xylos B) xylan C) vetekli D) glukos. Författarnas egna bilder.



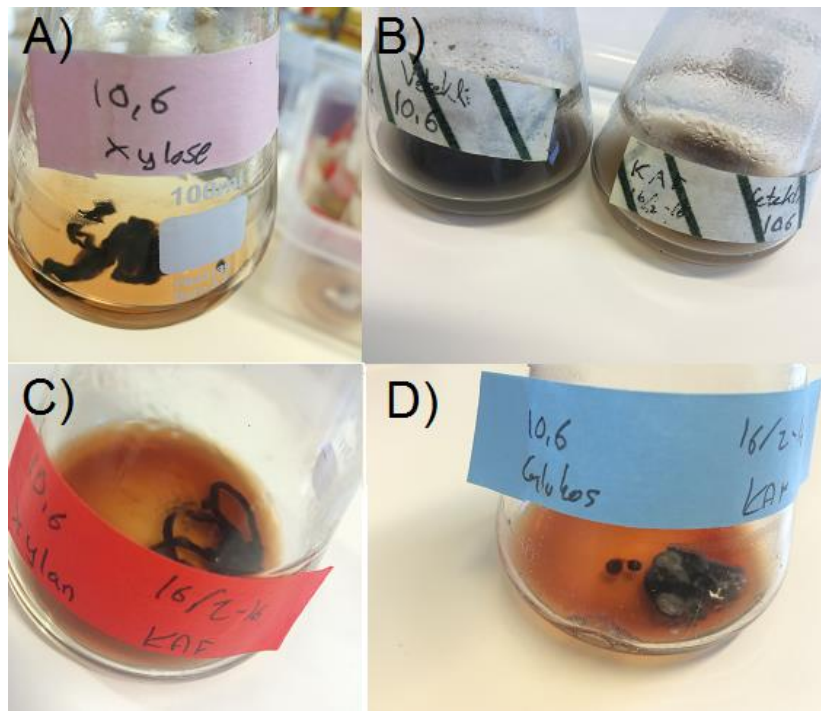
Figur 20. Bilder på tillväxten för svampstam 6.2 efter 7 dagar vid 50 °C för följande substrat: A) xylan B) vetekli C) glukos D) cellulosa. Bild på tillväxt i xylos saknas. Författarnas egna bilder.



Figur 21. Bilder på tillväxten för svampstam 10.42 efter 7 dagar vid 50 °C för följande substrat: A) xylos B) vetekli C) xylan D) glukos. Författarnas egna bilder.

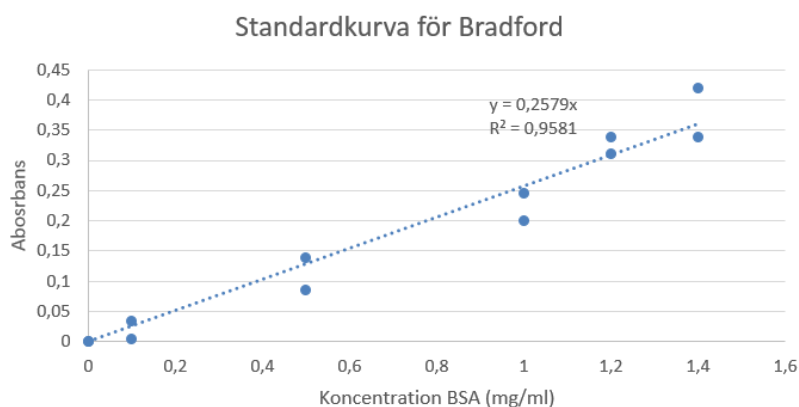


Figur 22. Bilder på tillväxten för svampstam 10.5 efter 7 dagar vid 50 °C för följande substrat: A) xylos B) vetekli C) xylan D) glukos. Författarnas egna bilder.

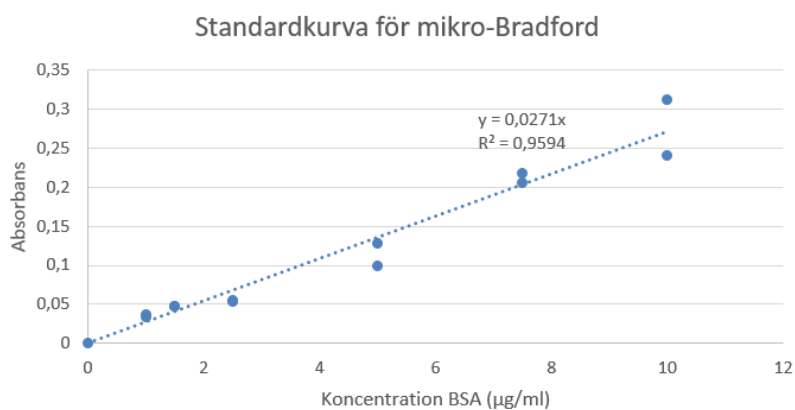


Figur 23. Bilder på tillväxten för svampstam 10.6 efter 7 dagar vid 50 °C för följande substrat: A) xylos B) vetekli C) xylan D) glukos. Författarnas egna bilder.

Bilaga 3 – Bradfordanalys

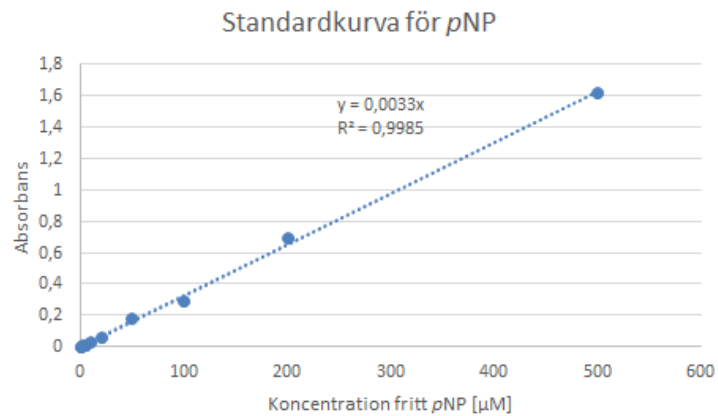


Figur 24. Standardkurva för Bradfordanalys med BSA-koncentrationer 0, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8, 1, 1,2, 1,4 och 1,6 mg/ml. Lutningen ger en ekvation som korrelerar mellan absorbans och koncentration BSA. Trendlinjen ger ekvationen $y = 0,2579x$ och $R^2 = 0,9581$.



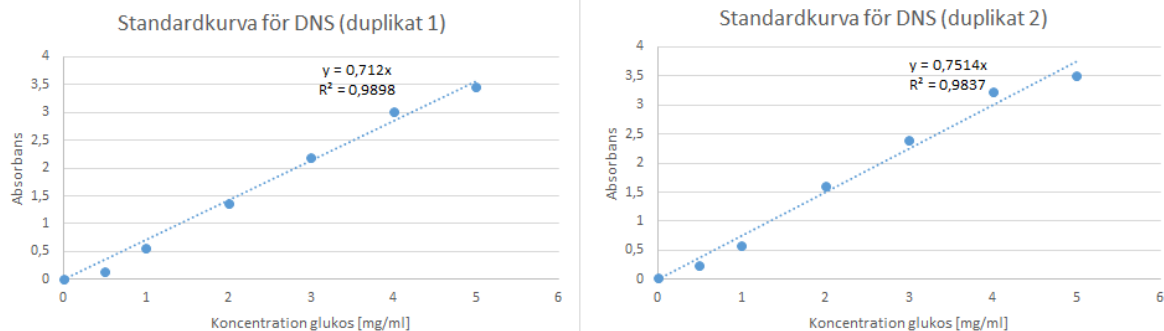
Figur 25. Standardkurva för mikro-Bradfordanalys med BSA-koncentrationer 0, 2, 4, 6, 8, 10 och 12 µg/ml. Lutningen ger en ekvation som korrelerar mellan absorbans och koncentration BSA. Trendlinjen ger ekvationen $y = 0,0271x$ och $R^2 = 0,9594$.

Bilaga 4 – pNP-analys

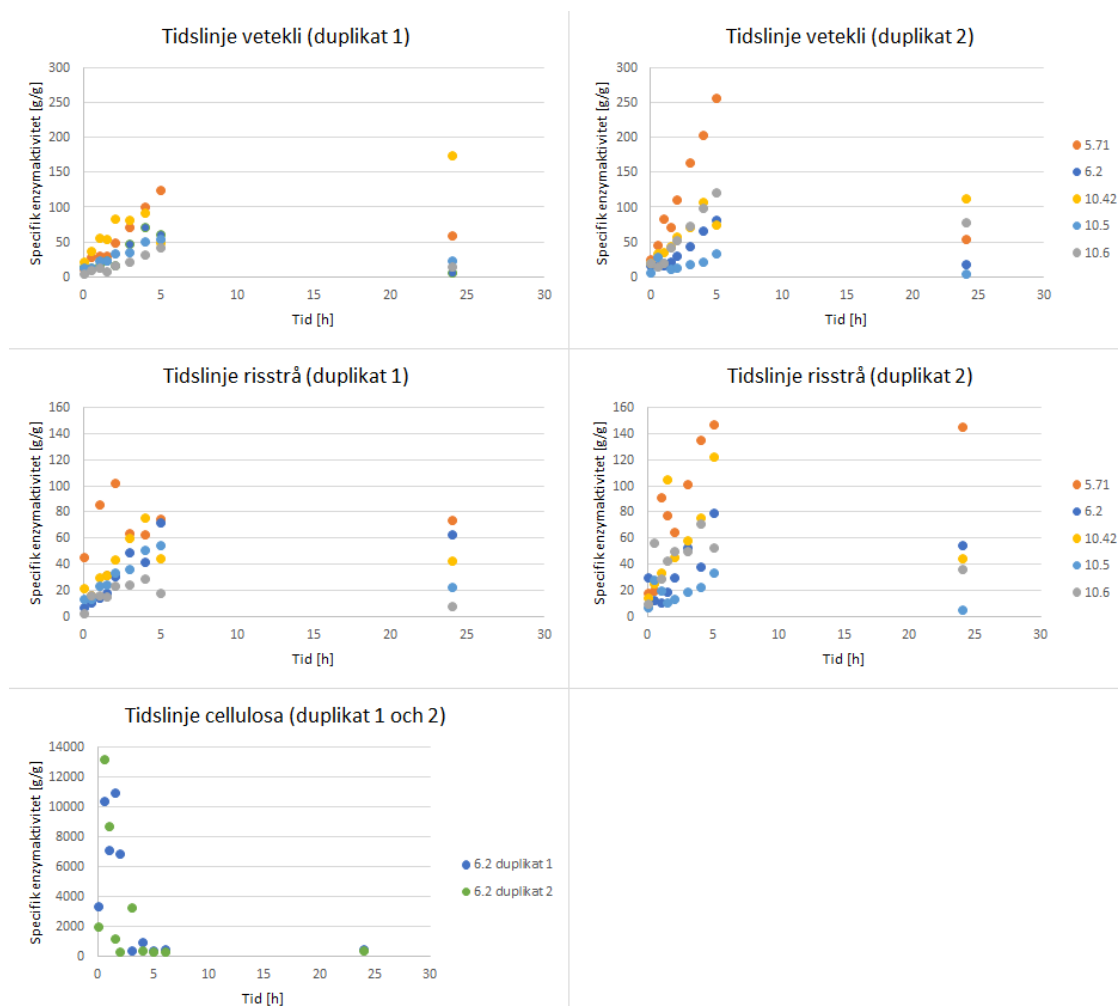


Figur 26. Standardkurvor för pNP-analys med fritt pNP i koncentration 0, 0,5, 1, 2, 5, 10, 20, 50, 100, 200, 500 $\mu\text{mol/l}$. Lutningen ger en ekvation som korrelerar mellan absorbans och koncentration fritt pNP. Trendlinjen ger ekvationen $y = 0,0033x$ och $R^2 = 0,9985$.

Bilaga 5 – DNS-analys



Figur 27. Standardkurvor för DNS-analys med glukos i koncentration 0, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5 mg/ml. Lutningen ger en ekvation som korrelerar mellan absorbans och koncentration reducerade ändrar. Glukos används som utgångspunkt eftersom att de innehåller endast en reducerande ände. Medelvärden av de två trendlinjerna ger ekvationen $y = 0,7317x$ och R^2 -värdena fås till $R^2 = 0,9898$ för duplikat 1 respektive $R^2 = 0,9837$ för duplikat 2.



Figur 28. Ett ytterligare försök på tidslinjer för svampstam 5.71, 6.2, 10.42, 10.5 och 10.6 som växt på risstrå, och vetekli och 10.6 på cellulosa. På y-axeln visas den enhetslösa specifika enzymaktiviteten som visar hur bra enzymerna är på att bryta polysackariderna i substraten till mindre beståndsdelar, i förhållande till mängden protein. På x-axeln visas tid i timmar efter tillsatts av enzym. Mätningar togs vid start samt efter 0, 5, 1, 1,5, 2, 3, 4, 5, 6 och 24 timmar. De biologiska duplikaten är separerade.