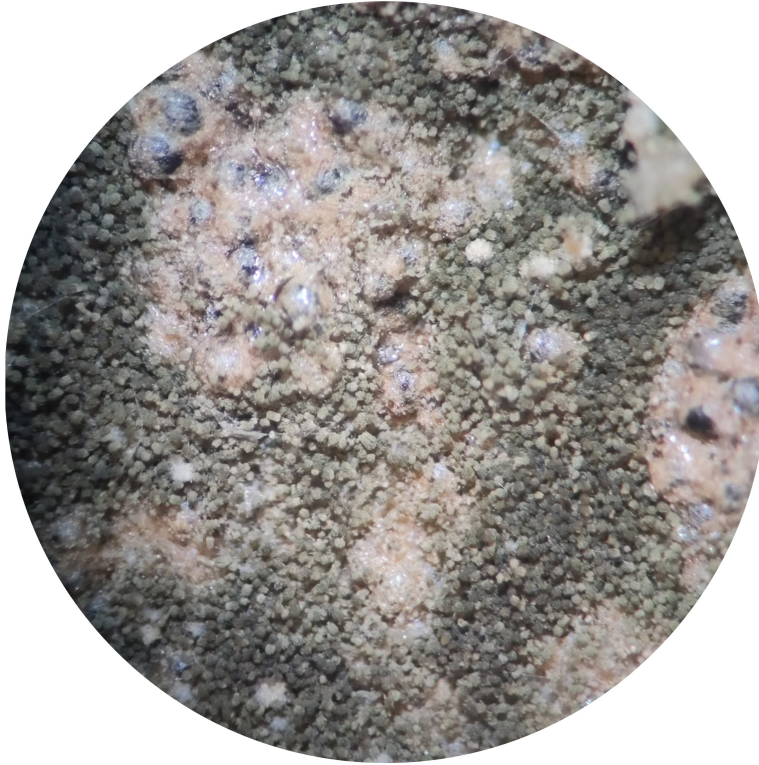




Från restbiomassa till protein: En studie om filamentösa svampar

BBTX11-23-04

William Bergstedt, Stina Björnell,
Cecilia Johansson, Cecilia Rydberg

Institutionen för Life Sciences

CHALMERS TEKNISKA HÖGSKOLA
Göteborg 2023
www.chalmers.se

KANDIDATARBETE 2023

Från restbiomassa till protein: En studie om filamentösa svampar

BBTX11-23-04

William Bergstedt, Stina Björnelf, Cecilia Johansson och Cecilia Rydberg



CHALMERS

Institutionen för Life Sciences
CHALMERS TEKNISKA HÖGSKOLA
Göteborg 2023

Handledare: Yvonne Nygård, Pavithra Umashankar och Pavithra Ealumalai

Skriven i L^AT_EX
Göteborg 2023

From Residual Biomass to Protein: a Study on Filamentous Fungi

Abstract

One of today's greatest challenge is producing enough nutritious food for the growing population of the world in a sustainable way. One solution could be the increased use of residual biomass. Forestry and agriculture generate an estimated 140 gigatons of residual biomass annually globally. Some of these residual streams can be valorized by filamentous fungi, which convert residual biomass into proteins to produce food and animal feed. This Bachelor thesis aimed to contribute to a more sustainable production of food by improving the growth of filamentous fungi on Spent Sulfur Liquor (SSL) with two methods of Classical Strain Improvement (CSI) and investigated in whether fungi can grow on other waste streams. Eight proprietary strains (mutants of CirkuleinTM) and *Trichoderma reesei*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus nidulans* and *Myceliophthora thermophila* were screened.

The original and mutated fungi were screened on different liquid media to determine the strains most adapted to each media. The best strains, ranked by growth rate, were grown in shake flasks and their dry biomass was measured. Fungi were also grown on solid media in petri dishes. Methods used for strain development are Adaptive Laboratory Evolution (ALE) and UV mutagenesis, with the ambition to mutate strains with a higher growth rate that can be used in large-scale industries.

The screening of the strains resulted in six strains being chosen for fermentation in shake flasks. The largest growth, in terms of dry weight, was obtained from the strains grown on SSL. The ALE showed a slight improvement in growth rate for one CirkuleinTM-strain while another remained unchanged. The UV-mutagenesis resulted in a survival rate of 1-3% and one of the mutated colonies showed an improved growth rate. The other replicates generally showed a lower growth rate than the control groups.

From the screening on liquid media, it can be concluded that high-throughput screening is an effective first thinning of available strains. However, fermentation in shake flasks is necessary to get a reliable result since it ensures that the fungi are growing on the medium and not on the agar, for example. Though the fungi grew best on SSL they also grew on the other side streams tested and it is therefore of interest to continue investigating those. The fungi grew on two of the solid media, but their growth was inhibited on the coffee grounds. UV mutagenesis is a method that can produce improved strains, though a low survival rate is imperative to see change in a small sample size. ALE also procured improved strains, however, some of the developed strains obtained an unchanged growth rate. For both of these methods, further rounds of treatment would be necessary to obtain more efficient strains. Furthermore, the concentrations of the SSL used in ALE should be assessed in further studies to optimize the strain development.

Sammanfattning

En av vår tids största utmaningar är att producera näringsrik mat till jordens växande befolkning på ett miljövänligt sätt. En lösning skulle kunna vara en ökad användning av restbiomassa. Skogs- och jordbruk genererar uppskattningsvis 140 gigaton restbiomassa årligen globalt. Dessa restströmmar kan valoriseras av filamentösa svampar, som omvandlar restbiomassa till proteiner för att producera livsmedel och djurfoder. Denna kandidatuppsats syftade till att bidra till en mer hållbar produktion av mat genom att förbättra tillväxten av filamentösa svampar på rödlut samt undersökte om andra restströmmar kan användas. Åtta konfidentiella stammar (CirkuleinTM-mutanter) och *Trichoderma reesei*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus nidulans* och *Myceliophthora thermophila* screenades.

Tillväxten på de utvalda flytande medierna screenades för att identifiera de stammar som växte bäst på vardera medium. De bästa stammarna, utvalda efter tillväxthastighet, odlades därefter i skakflaskor och fick torrvikten mätt. Stammarna odlades dessutom på fasta medium i petriskålar. Metoder som användes för stamutveckling var Adaptiv Laboratorieevolution (ALE) och UV-mutagenes med ambitionen att mutera stammar för att nå en större tillväxthastighet. Detta för att öka möjligheten att använda stammarna i storskalig industri.

Screeningen av stammarna resulterade i valet av sex stammar för fermentering i skakflaskor. Den största tillväxten i dessa, mätt i torrvekt, erhöles från stammarna växta i rödlut. ALE gav en ökad tillväxthastighet för en av CirkuleinTM-stammarna medan en annan var oförändrad. UV-mutagenesen resulterade i en överlevnadsgrad på 1-3% och en koloni med en ökad tillväxthastighet. Övriga kolonier erhöles en minskad tillväxthastighet än sina kontrollgrupper.

Från screeningen kan det konstateras att high-throughput screening är en effektiv metod som första gallring. Fermentering i skakflaskor är dock avgörande för att få trovärdiga resultat eftersom det säkerställer att stammarna växer på mediet och inte något annat, exempelvis på agar. Stammarna växte på samtliga testade medier, även om de växte bäst på rödlut, vilket visar att ytterligare undersökning om dessa kan vara av intresse. Stammarna växte även på de fasta medierna, men tillväxten hämmades något för ett medium. UV-mutagenes visades kunna ge förbättrade stammar, men en låg överlevnadsgrad verkar vara avgörande för att se skillnader vid små provstorlekar. Även ALE gav förbättrade stammar, men för några uppmättes en oförändrad tillväxthastighet. För båda dessa metoder är flera rundor av behandlingar nödvändiga för att producera mer effektiva stammar. Utöver detta borde koncentrationerna av rödlut för ALE ses över i vidare studier för att optimera stamutvecklingen.

Förord

Vi vill tacka våra handledare för allt ni lärt oss och hjälpt oss med. Tack till Yvonne Nygård för din strukturerade handledning och återkoppling i arbetet med denna rapport och Pavithra Umashankar för att du alltid fanns närvarande under laborationerna och nära till hands för frågor som uppkom under arbetets gång. Vi vill även tacka Pavithra Ealumalai från Cirkulär AB för din ihärdighet och ditt tålamod kring förberelser inför och utförandet av laborationerna. Tack till Emil Andreasson från Cirkulär AB för din R-kod som underlättade vårt arbete. Ytterligare ett stort tack till alla på IndBio på Chalmers för er vänlighet och hjälpsamhet.

Innehåll

1	Inledning	1
1.1	Syfte	1
1.2	Samarbetet med Cirkulär AB	2
1.3	Etik	2
2	Teori	2
2.1	Filamentösa svampar	2
2.1.1	Livscykel	3
2.1.2	Näringsbehov och tillväxtförhållanden	3
2.1.3	Tillväxtkurvor	4
2.1.4	Projektets icke-konfidentiella svampstammar	5
2.2	Single Cell Protein	6
2.3	Valorisering av biomassa med svampar	6
2.4	Klassisk stamutveckling	7
2.5	High-throughput screening	7
3	Metod	8
3.1	Litteraturstudier	8
3.2	Laborativa studier	8
3.3	Förberedelser	8
3.3.1	Stammar	9
3.3.2	Tillredning av medier	9
3.3.3	Tillredning av stamlösningar	9
3.3.4	Tillverkning av PDA-plattor och odling av stammar	9
3.4	Stamutveckling	9
3.4.1	Adaptiv laboratorieutveckling	10
3.4.2	UV-mutagenes	10
3.5	Utvärdering och bearbetning av råmaterial	11
3.5.1	Screening av olika stammar på flytande medier	11
3.5.2	Screening av olika stammar på fasta medier	12
3.6	Analys av data från Growth Profiler	12
4	Resultat	13
4.1	Uteslutning av <i>M. thermophila</i>	13
4.2	Morfologi på PDA-plattor	13
4.3	Stamutveckling	13
4.3.1	Adaptiv laboratorieevolution	13
4.3.2	UV-mutagenes	14
4.4	Utvärdering och bearbetning av råmaterial	17
4.4.1	Screening av olika stammar på flytande medier	17
4.4.2	Screening av olika stammar på fasta medier	20
5	Diskussion	22
5.1	Stamutveckling	22
5.1.1	Adaptiv laboratorieevolution	22
5.1.2	UV-mutagenes	23
5.2	Utvärdering och bearbetning av råmaterial	24
5.2.1	Screening av olika stammar på flytande medier	24
5.2.2	Screening av olika stammar på fasta medier	25
5.3	Begränsningar och möjliga felkällor	26

6	Slutsats	27
A	Bilaga A	i
A.1	Harvesting Spores from Agar plates	i
A.2	Counting Spores using a Neubauer chamber	i
A.3	UV Mutagenesis	i
A.4	Adaptive Laboratory Evolution in Solid Media	ii
A.5	Shake flask culture and harvesting biomass	ii
A.6	Media Preparation	iii
B	Bilaga B	v
C	Bilaga C	vi

1 Inledning

En av de största utmaningarna vi står inför är att producera tillräckligt med mat till jordens växande befolkning och att göra det på ett sätt som är miljövänligt och ger tillräckligt med näring. År 2015 kom 34% av de totala utsläppen av växthusgaser från livsmedelsindustrin och sedan dess har jordens befolkning fortsatt att öka [1]. Det globala matbehovet uppskattas öka med 60% till 2050 men den landmassa som finns kvar att odla på är långt ifrån tillräcklig [2]. För att klara av att producera mer mat på ett hållbart sätt behövs därför något mer än enbart djurhållning och lantbruk. Ett etablerat förslag är cellulärt lantbruk [2]. Cellulärt lantbruk innebär att celler producerar biomassa som sedan kan användas till föda eller djurfoder. Detta i kontrast till andra användningar av celler där de producerar ämnen som exempelvis smakämnen, bränslen och färgämnen [2]. Genom att utveckla ett cellulärt lantbruk kan näringsrik, säker och hälsosam mat produceras, samtidigt som användningen av landyta, energi och vatten minimeras [2].

Samtidigt som behovet av mat ökar sker en utarmning av naturens resurser. Övergången till en hållbar framtid kräver att de resurser som finns är förnybara och utnyttjas optimalt [3]. Cirkulär ekonomi är en metodik som innebär att de resurser som används ingår i ett kretslopp där mycket som möjligt återanvänds och återvinns. Komplementärt används även konceptet bio-ekonomi som förlitar sig på att omvandling av förnybara kolkällor från skogsbruk, jordbruk och bioavfall ger värdefulla produkter som till exempel material, mat och bio-bränsle [3]. Skogsbruk och jordbruk genererar enorma mängder restbiomassa som globalt uppskattats till 140 gigaton årligen [4] och dessa restströmmar har potential att valoriseras till användbara produkter. Under de senaste 25 åren har restbiomassa framför allt använts för att tillverka energi i form av till exempel biobränsle [4]. På senare år har flera nya sätt att valorisera restbiomassa utvecklats och användningen av mikroorganismer är ett av dem [5].

En grupp mikroorganismer med stor potential inom utvecklingen av en bio-baserad cirkulär ekonomi är filamentösa svampar. Filamentösa svampar har länge använts för att ta fram viktiga produkter så som penicillin, citronsyra och många enzymer [5]. De är väldigt effektiva nedbrytare av organiska material då de utsöndrar en mängd olika enzymer som kan bryta ner både komplexa och enkla molekyler [5]. Eftersom jordens växtbiomassa till största del består av polysackarider kan forskare utnyttja svampens affinitet för nedbrytning av dessa för att tillverka användbara produkter [5]. Användandet av svampar inom cellulärt lantbruk kan vara en del av lösningen till en säker, stabil och förbättrad framställning av mat för jordens ökande population [5]. Detta medför minskade utsläpp av växthusgaser och mindre exploatering av jordens resurser. Studier visar att svampbaserat protein i jämförelse med animaliskt protein är bättre ur miljösynpunkt när effektivitet av markanvändning, global uppvärmingspotential och energianvändning undersökts [6].

1.1 Syfte

Projektet syftade till att vara en del i arbetet med att ställa om livsmedelsindustrin mot en mer hållbar produktion genom en ökad användning av filamentösa svampar. För att uppnå detta hade projektet två delsyften. Det första var att utveckla svampars tillväxt på restmaterialet rödlut från pappersindustrin med hjälp av två klassiska stamutvecklingsmetoder. Det andra var att utvärdera rödlut samt tre andra restströmmar från industrier som substrat för tolv olika svampstamar att producera Single Cell Proteins på. De tolv stammarna som används är *Trichoderma reesei*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus nidulans* och *Myceliophthora thermophila* samt åtta konfidentiella stammar från företaget Cirkulär AB. Utöver detta ska ytterligare två material, valda av laboranterna, testas för att se om de bör undersökas vidare.

Projektet ämnar att resultera i identifierandet av de stammar som växer mest och snabbast på de utvalda restmaterialen. Resultatet kommer fås i form av tillväxtkurvor, tillväxthastigheter och torr-viktsmätningar av utvalda stammar samt bilder som visar tillväxten av stammarna på olika material.

1.2 Samarbetet med Cirkulär AB

Projektet utfördes i samarbete med bioteknikföretaget Cirkulär AB som arbetar med att omvandla restströmmar från papperstillverkning till en proteinrik fiskfoderingrediens med filamentösa svampar. Denna produkt kallas CirkuleinTM och det är CirkuleinTM-stammarna som delvis utvärderas i detta projekt.

Cirkulär AB använder sig av en egen teknik för att tillsammans med pappersbruket i Nymölla, ägt av företaget Sylvamo, valorisera brukets restströmmar för att minska på avfall och bidra till en cirkulär ekonomi. Målet är att skapa en produkt som kan ersätta de nuvarande proteinkällorna i fiskfoder för att minska både utsläpp samt produktions- och transportkostnad. De arbetar även med produktion av mjölkproteinet casein med hjälp av filamentösa svampar då nuvarande produktion av mjölkprodukter har en stor inverkan på klimatet [7].

1.3 Etik

Under projektets gång har flera etiska aspekter tagits hänsyn till. Organismerna som används sporerar och därför har allt laborativt arbete med dessa utförts sterilt i LAF-bänkar. De genetiska förändringar som gjorts är inte kända och stammarna från Cirkulär AB är konfidentiella. Detta medför en osäkerhet kring stammarnas patogenicitet och påverkan på ekosystemen vilket ökar behovet av försiktighet vid det laborativa arbetet. Samtliga lösningar och redskap som kommit i kontakt med svamparna har därför kasserats som biologiskt avfall. Mediet rödlut som används i flera moment innehåller furfural, vilket i större koncentrationer misstänks vara carcinogent samt dödligt vid inandning [8]. Furfural hanteras endast som utspädd komponent i mediet men för att undvika risker för samtliga i lokalen hanteras mediet med varsamhet och kasseras som kemiskt avfall.

Som beskrivet i inledningen kan en hållbar produktion av biomassa från filamentösa svampar bidra till en positiv klimatpåverkan [5], och vid val av restbiomassa finns det flera aspekter som bör tas hänsyn till. Den bör exempelvis inte innehålla höga koncentrationer av farliga ämnen, både för att inte hämma tillväxten av svamparna med också för att minska risker vid hantering och kassering.

2 Teori

Forskningen om filamentösa svampar har ökat under de senaste åren och allt fler biotekniska användningsområden har uppstått. Här presenteras en överblick av den kunskap och de tidigare studier om filamentösa svampar som ligger till grund för det här projektet.

2.1 Filamentösa svampar

Svampar utgör ett eget rike som består av eukaryota organismer [9]. Svamparna utmärker sig från både djurriket och växtriket med sina kitinrika cellväggar och har en mycket viktig roll i ekosystemen då de kan utnyttja organiskt material som är otillgängligt för många andra organismer. De bidrar därmed till att återföra många näringsämnen till ekosystemen [10]. Uppskattningsvis finns det idag över en miljon olika svampar, vilka skiljer sig extremt åt både morfologiskt, fysiologiskt och ekologiskt [10].

Svampars morfologi kan användas för att klassificera svampar som antingen filamentösa, encelliga eller dimorfa. Dimorfa svampar kan existera både filamentöst och encelligt beroende på miljön de lever i [11]. Filamentösa svampar karakteriseras av sina trådformade strukturer. De som växer uteslutande encelligt är mer kända som jäst [11].

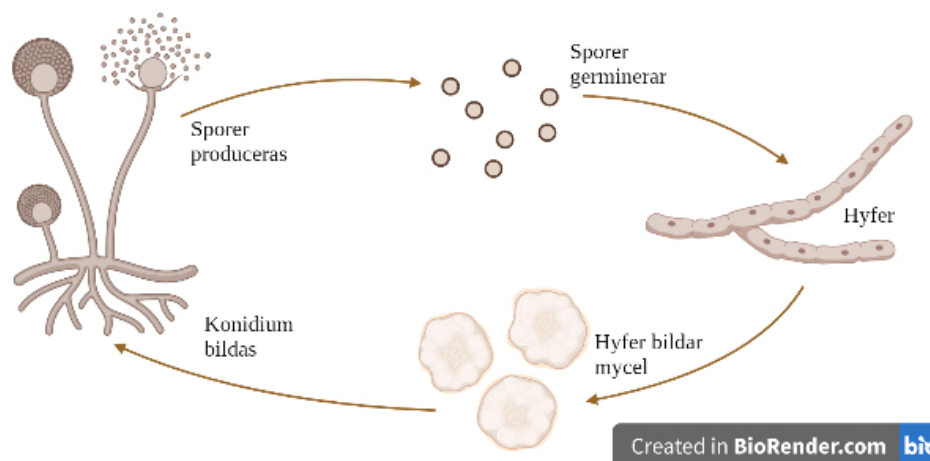
Filamentösa svampar har använts biotekniskt av människan sedan lång tid tillbaka. Sedan århundraden har exempelvis sake och tempeh tillverkats med hjälp av filamentösa svampar [6]. Idag ökar antalet produkter och processer där filamentösa svamparter används inom biotekniken och användningen sker

inom vitt skilda områden [5]. Till exempel används de idag i bioraffinaderier för att producera värdefulla produkter som biobränsle, men används även som material i möbler [5].

2.1.1 Livscykel

Filamentösa svampar börjar som en spor på några mikrometer i diameter, vilken gror i en fuktig och näringsrik miljö. Sporutväxten, som kallas groddrör, förlängs och blir en hyf [5]. Fler hyfer bildas och förgrenas och dessa kan aggregera till ett nätverk benämnt mycel [11]. Hyferna består alltså av rörformade celler som i vissa fall är separerade med septa [10]. Septa återfinns i fylumet Ascomycota, vilket samtliga svamparter i denna rapport tillhör. De är perforerade och genom poren kan organeller och cellkärnor förflytta sig [12].

Mycelet kan, när mängden näring minskar, börja utforska omgivningen för att bilda reproduktiva strukturer. Ascomycota kan bilda konidium vilka producerar sporer asexuellt, och/eller fruktkroppar vilka producerar sporer sexuellt [5]. Asexuell förökning visas i Figur 1.



Figur 1: Filamentösa svampars livscykel vid asexuell förökning. Gjord i BioRender.com.

Svampar är multinukleära organismer där varje cellkärna opererar individuellt trots att de befinner sig i samma cytoplasma [13]. För att erhålla en renodlad stam måste samtliga cellkärnor ha samma genom. Eftersom filamentösa svampar har flera cellkärnor per cell samt kan flytta cellkärnor sinsemellan [12] kompliceras karakteriseringen. Den kan underlättas genom användning av sporer på dessa endast innehåller en cellkärna [5].

I flytande medier kan filamentösa svampar växa i tre olika former: homogent utspridda i mediet, som oregelbundna klumpar med varierande täthet och storlek, eller som pellets. Pellets är små, tätt packade kluster av mycel som kan bildas på olika sätt. Antingen kan en spor germinera och dess hyfer trassla in sig i varandra, eller så kan utspritt mycel trassla ihop sig. Storleken på pellets kan variera [14]. Att svampen bildar pellets kan vara både en fördel och en nackdel. I en del biotekniska processer föredras pelletbildning [14]. Ett exempel är *A. niger*, som har en optimal produktion av citronsyra i pelletform, och optimal produktion av vissa enzym i mycelform [15].

2.1.2 Näringsbehov och tillväxtförhållanden

Svampar bryter ner substrat externt och absorberar därefter näringsämnena genom cellväggen [16]. Eftersom svampar är kemoorganotrofer behöver de ta upp kol fixerat i organiska föreningar för att tillhandahålla energi [17]. Svampar kan inte heller binda kvävet i luften och behöver därför även förses

med detta [17]. Kraven på näring är för de flesta svamparter relativt låga. De allra flesta arter kan klara sig bra i aerobiska förhållanden där de har tillgång till glukos, ammoniumsalter, oorganiska joner och ett fåtal tillväxtfaktorer [17]. En del svampar har ännu lägre krav, som exempelvis *A. niger* vilken kan syntetisera sina tillväxtfaktorer på egen hand från glukos [17].

Näringsämnen som filamentösa svampar behöver kan delas upp i makro- och mikronutrientier. Nöd-vändiga makronutrientier är kolkällor, kväve, syre, svavel, fosfor, kalium och magnesium, och dessa behövs i koncentrationer på några millimolar. Mikronutrientier krävs i mindre koncentrationer, på några mikromolar, och omfattar kalcium, koppar, järn, mangan och zink [17][6].

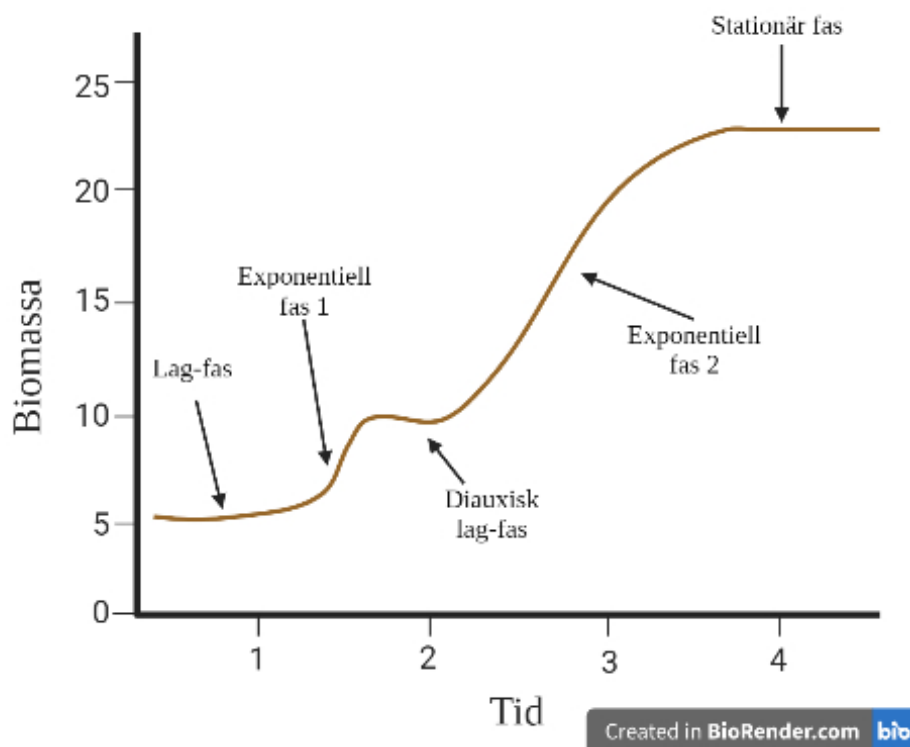
Filamentösa svampar kan växa på mängder av olika substrat. För att ta upp näring sekreterar svamparna olika enzymer genom hyferna som cellulaser, amylaser, pektinaser, inulaser, proteaser och lipaser [5]. Detta gör att de kan hydrolysera komplexa organiska molekyler som cellulosa, hemicellulosa, lignin, stärkelse, lipider och proteiner till respektive monomerer [6]. Dessa tas sedan upp genom membranen med hjälp av specifika transportproteiner [5]. Vid odling av filamentösa svampar bör substratet uppfylla näringsbehovet samt inte innehålla några stora mängder av ämnen som kan hämma tillväxten. Substratet bör innehålla åtminstone kol- och kvävekällor, men vilka kol och kvävekällor som ger en optimal tillväxt varierar mellan olika arter [6].

Förutom krav på näring påverkar också olika fysiska parametrar svampens tillväxt. De flesta svampar växer bra runt 25°C, men spannet på temperaturer är relativt stort. Psykrotrofa arter trivs i kallare temperaturer medan termofila arter trivs vid högre temperaturer. De flesta svampar är acidofiler och föredrar en sur miljö med ett pH-värde mellan 4-6 [17].

2.1.3 Tillväxtkurvor

Svamparnas tillväxt karakteriseras generellt av fem olika faser [6]. Dessa är lag-fas, första övergångsperioden, exponentiell fas, andra övergångsperioden samt stationär fas [18]. När svampen inokulerats behöver den anpassa sig till sin omgivning och växer inte, detta kallas lag-fas [19]. I den exponentiella fasen börjar mycel bildas och svampen växer med sin maximala, specifika tillväxthastighet. Denna hastighet är beroende av tillväxtförhållandena [17]. När näringen i mediet börjar ta slut och sekundära metaboliter bildats från utsöndrade enzymer börjar den stationära fasen där nettotillväxten är noll [19]. I övergångsperioderna anpassas svampens metabolism för nästkommande fas [18].

Om mediet som används innehåller flera olika kolkällor kan tillväxtkurvan innehålla två exponentiella faser där först en kolkälla konsumeras och sedan en annan (Figur 2). De två exponentiella faserna skiljs åt av en lag-fas med mycket liten tillväxt [20]. En tillväxt med två exponentiella faser kallas för diauxisk tillväxt. Diauxisk tillväxt har setts i studier på filamentösa svampar som odlats i substrat med flera kolkällor [21].



Figur 2: Generisk diauxisk tillväxt med tillväxtfaser specificerade. Gjord i Biorender.com.

2.1.4 Projektets icke-konfidentiella svampstammar

De fyra icke-konfidentiella svampstammarna som används i projektet, *Aspergillus niger*, *Aspergillus nidulans*, *Trichoderma reesei* och *Myceliophthora thermophila* skiljer sig i både optimala temperaturer, pH och morfologi (Tabell 1). Många stammar kan överleva vid förhållanden som skiljer sig mycket från deras optimum. Exempelvis kan *A. niger* växa i större temperaturspann, 6-47°C, än övriga som används [22] och *A. nidulans* har visats kunna växa vid pH mellan 2 och 12 [23].

Tabell 1: Optimala temperaturer och pH samt morfologi för stammarna *A. niger*, *A. nidulans*, *T. reesei* och *M. thermophila*.

Stam	<i>A. niger</i>	<i>A. nidulans</i>	<i>T. reesei</i>	<i>M. thermophila</i>
Temperatur (°C)	35-37 [24]	28-37 [25]	27-30 [26]	41-43 [6]
pH	5.5 [27]	Runt 7 [23]	5.5-7.5 [26]	6-7 [28]
Morfologi	Svart[6]	Vitt fluffigt mycel, gröna sporer [30]	Färglös, nyanser av grönt och brunt [31]	Ljusbrun [29]

2.2 Single Cell Protein

När mikrobiella celler konsumerar substrat producerar de biomassa som bland annat kan användas till föda och foder. Biomassan kan torkas som hela celler eller genom att proteinet extraheras ur cellen, men oavsett behandling benämns det ofta som Single Cell Protein (SCP) [32][33]. SCP har funnits länge och kan användas som föda för både djur och människor. Exempelvis spirulina, en alg som säljs som pulver för mänsklig konsumtion [33]. Andra exempel är företaget Quorn, grundat 1985 [34], och de Göteborgsbaserade företagen Mycorena, grundat 2017 [35], och Millow, grundat 2020 [36]. Dessa företag använder sig av svampbaserad SCP för att producera alternativa proteinkällor för livsmedelsändamål. SCP har visats vara ett bra alternativ till animaliska produkter då de likt kött och ägg innehåller de essentiella aminosyror som människor behöver, samt inte innehåller de mättade fettsyror och carcinogena ämnen som hittats i processat, rött kött [2]. För att en organism ska vara lämplig för produktion av SCP så bör den ha ett högt näringsinnehåll, inte innehålla något toxiskt ämne och ha låg produktionskostnad [37]. En typ av organism som visats vara en effektiv tillverkare av SCP är filamentösa svampar.

Ett område med stor utvecklingspotential är användningen av SCP från filamentösa svampar inom produktion av foder [37]. Protein är den mest värdefulla komponenten i foder och SCP har ett högt proteininnehåll som kan konkurrera med till exempel fisk- och sojamjöl vilka idag är de vanligaste proteinkällorna i foder. Utöver det höga proteininnehållet är SCP även rikt på vitaminer och strukturella polysackarider. I en studie visades det att användning av SCP i foder för fiskar har en positiv effekt på fiskars hälsa [37].

Det fisk- och sojamjöl som används idag i fiskfoder är inte hållbart när jordens population ökar [37]. Fiskmjöl produceras av vildfångad fisk som till följd av hög andel olja och ben inte används för mänsklig konsumtion [37]. Odlad fisk som föds upp på fiskmjöl förlitar sig alltså på överfiske för att existera [38], men på grund av dess omfattande näringsinnehåll används det ändå i stor utsträckning [38]. Sojamjöl utvinns från sojabönor och kräver stora mängder vatten och landyta [39]. En stor del av den soja som används till foder odlas i Amazonas där regnskog skövlas för att produktionen ska hålla jämna steg med efterfrågan [39]. Det behövs alltså mer hållbara alternativ.

2.3 Valorisering av biomassa med svampar

Cirkulär ekonomi är en modell där produkters livslängd utökas och mängden avfall minskas. Detta är ett sätt att arbeta mot ett mer hållbart samhälle [40]. För att sträva mot en mer cirkulär ekonomi behöver restmaterial från dagens produktion tas till vara i en större utsträckning. De behöver *valoriseras*. Valorisering av biomassa är processen att omvandla biprodukter och avfall från till exempel livsmedels-, lantbruks- och skogsindustri till nya material med hjälp av exempelvis mikroorganismer som filamentösa svampar. Användandet av just svamp som huvudkomponent i bland annat isolering, mat och fordon är områden där det idag pågår mycket forskning och utveckling [5]. Detta är på grund av svamparnas goda förmåga att växa på många olika typer av substrat. [37]

I Europa används idag ungefär 40% av allt brukat trä till energi, 40% till trä-produkter samt 20% till pappersmassa [41]. Att producera energi av trä innebär utsläpp av kol som tidigare lagrats i dess celler. För att gå mot en cirkulär ekonomi behöver kol fortsätta lagras i långlivade produkter, vilket kan göras genom just valorisering [5]. De delar av träden som inte kan användas till träprodukter eller pappersmassa är ofta rika på lignin [5], vilket är svårnedbrutet för många organismer [42]. Filamentösa svampar har förmågan att bryta ner både lignin och restmaterial från pappersmassatillverkning [42][5]. Rödlut är en restström från pappersmassatillverkning som bildas under delignifieringen av flis och har visats vara användbar som substrat för odling av filamentösa svampar [43]. Dessutom är filamentösa svampar motståndskraftiga mot de hämmande ämnen som finns i många restströmmar [5].

2.4 Klassisk stamutveckling

Klassisk stamutveckling är ett begrepp som inkluderar de metoder för stamutveckling som har potential att introducera mutationer i alla delar av genomet. Dessa metoder är ospecifika till skillnad från hybrid-DNA-tekniker, som exempelvis CRISPR/Cas9, som används för att kunna göra specifika förändringar i genomet [44]. Organismer som utvecklats med hjälp av hybrid-DNA-tekniker klassificeras som genetiskt modifierad organism (GMO) och omges av en mer begränsande lagstiftning än de organismer som tas fram med klassisk stamutveckling [44]. Det finns i EU idag endast en GMO som är godkänd för kommersiell odling och ett fåtal godkända växtsorter som får användas inom livsmedelsproduktion [45]. Utöver detta finns även ett motstånd mot GMO hos konsumenter och frågan om genetiskt modifierade livsmedel är kontroversiell [46]. Klassiska stamutvecklingsmetoder är idag mer allmänt accepterade [47]. Den begränsande lagstiftningen för GMO och konsumenternas motstånd bör därför tas i beaktande vid val av metod för stamutveckling om slutmålet är en produkt som ska säljas på den europeiska marknaden.

En metod som kategoriseras som klassisk stamutveckling är adaptiv laboratorieutveckling (ALE). Vid ALE görs odlingar av en organism i en noggrant utvald miljö för att med hjälp av det naturliga urvalet få fram de organismer som förvärvat fördelaktiga mutationer. När stammarna odlas under en längre tid med selektionstryck kommer fördelaktiga mutationer konkurrera ut omuterade stammar samt de med ogynnsamma mutationer. Vanligt är att utföra ALE i en kontinuerlig odling under den exponentiella fasen, med det har visats att mikrober kan utvecklas snabbare om de odlas satsvis under en förlängd stationär fas [48]. Metoden kan utföras i flera steg där mutagenes och selektion upprepas med ett ökande selektionstryck från omgivningen eller med ett konstant selektionstryck [49].

Ytterligare en metod som kategoriseras som klassisk stamutveckling är UV-mutagenes. Genom att behandla organismen med UV-strålning kan en signifikant ökning av antalet mutationer fås och därmed en större variation i det genetiska materialet [44]. UV-strålningen leder till att pyrimidindimerer bildas i DNAt, vilket i sin tur kan leda till flera olika typer av mutationer som punktmutationer och gendelitioner [50]. Efter mutagenesen görs en screening för att identifiera de mest förbättrade stammarna. Metoden bygger ofta på en upprepad behandling med UV-strålning [51]. Fördelen med metoder som UV-mutagenes är att man inte behöver ha någon djupare kunskap om genomet och vilken typ av mutation man vill göra. Nackdelen är att stammarna ofta får flera mutationer. Detta ökar sannolikheten för mutationer som kan försämra tillväxten vid exempelvis uppskalade odlingar eller överskuggar fördelaktiga mutationer [52].

Överlevnadsgraden och mutationsfrekvensen efter bestrålning med UV-ljus påverkas starkt av intensiteten och tidslängden som cellerna utsätts för strålningen [44]. Att bestämma den optimala doseringen är därför nödvändigt för att kunna få goda resultat. Om mutationsfrekvensen är för låg kommer andelen celler med mutationer, och särskilt de med förbättrade fenotyper, vara sällsynta vilket gör det svårt att upptäcka dessa även med storskalig screening [44]. Om mutationsfrekvensen däremot är för hög kan effekterna av de mutationer som leder till förbättringar försvinna bland effekten av de som leder till skadliga mutationer. Detta ger istället försämrade stammar eller stammar som inte är livsdugliga [44].

2.5 High-throughput screening

High-throughput screening (HTS) är en process som sedan 90-talet etablerats inom både läkemedels- och bioteknikföretag [53]. Den möjliggör en snabb och effektiv screening av olika typer av kemiska föreningar eller biologiska material för att hitta önskade egenskaper. Inom industrin är denna process automatiserad med hjälp av robotar samt miniaturiserad vilket innebär att man jobbar i små volymer för att göras så effektiv som möjligt [53].

En vanlig arbetsgång för HTS inkluderar förberedande av prover, avläsning och datainsamling [54]. Målet med HTS är att finna lovande kandidater för experimentets syfte för fortsatt undersökning

och kan genomföras med många olika detekteringstekniker beroende på experimentets karaktär [55]. Förberedandet kan till exempel innebära att de prover som ska screenas placeras på en mikrotiterplatta. Dessa plattor finns i storlekar från 24 brunnar upp till 6144 brunnar [56]. Antalet brunnar per platta tillåter en hög genomströmning av prover. När en HTS genomförs avläses resultatet och data samlas in. Även här finns många olika avläsningsmetoder tillgängliga [54]. Beroende på vad som undersöks tillämpas en lämplig metod för analys av data med hjälp av olika typer av instrument och mjukvaror för att visualisera resultaten av screeningen.

För att undersöka till exempel tillväxt hos mikroorganismer under olika betingelser kan HTS användas för att urskilja cellmassans ökning. Vanligtvis används mikrotiterplattor som analyseras med hjälp av en till exempel en Growth Profiler eller annat instrument som läser av mikrotiterplattor. En Growth Profiler är ett instrument som används för high-throughputodling av mikrobiella- och/eller cellkulturer i mikrotiterplattor på mikro-skala, där övervakning av bildningen av biomassa och tillväxtkinetiken sker. Instrumentet utgår från temperaturen 30°C och genererar tillväxtkurvor för biomassa i de olika brunnarna och tar bilder på brunnarnas genom den transparenta botten av plattan med ett bestämt tidsintervall [57]. Bildbehandlingsmjukvaran bygger på analys av pixlar i brunnarna som görs om till OD₆₀₀-värden för att generera tillväxtkurvan för Growth Profileren [58].

3 Metod

Projektet består till stor del av laborativa studier vars resultat ligger till grund för diskussioner och dragna slutsatser. Utöver detta har litteraturstudier även gjorts för att förbättra förståelsen för de laborativa momenten och som grund för rapportens inledande och teoretiska avsnitt.

3.1 Litteraturstudier

Projektet startades med litteraturstudier för att få kunskap om ämnet, aktuella forskningsområden samt begränsningar. Resultatet av studierna inför laborationerna utgjorde en viktig del i valet av rest-material som gruppen skulle föreslå att låta svampstammarna växa på. *Chalmers Library* har använts för att komma vidare till naturvetenskapliga tidskrifter och databaser, men även *Google Scholar* har använts. Vidare har även handledarna försett gruppen med artiklar och information att läsa på mer om. Sökord som använts under litteraturstudierna har varit exempelvis [*Circular Economy; Filamentous Fungi; Single Cell Protein; Classical Strain Engineering; High-Throughput Screening; Adaptive Laboratory Evolution*], men även varje icke-konfidentiell stam har undersökts.

3.2 Laborativa studier

Projektets laborativa del består i huvudsak av två delar. I den första delen utvecklas ett flertal svampstammar med hjälp av två metoder som kategoriseras som klassisk stamutveckling för att förbättra deras tillväxt på rödlut. I en andra del av projektet undersöktes svampstammars tillväxt på olika medier, både fasta och flytande. Metoderna för undersökandet av de två delarna beskrivs nedan. Även hur medierna tillreddes och svamparna odlades upp och skördades, samt hur andra förberedelser inför experimenten utfördes beskrivs nedan. Metoden är baserad på protokoll erhållna från projektets handledare [59] och återfinns i Bilaga A.

3.3 Förberedelser

Här presenteras metoden för de förberedande delarna. Dessa innefattar uppodling av svampstammarna samt tillberedning av de medier som användes under studien.

3.3.1 Stammar

De 12 olika svampstammar som använts under kandidatarbetet består av åtta CirkuleinTM-stammar från Cirkulär AB. Dessa är konfidentiella och benämns härnäst som C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7 och C8. Utöver dessa används de fyra icke-konfidentiella svamparna *T. reesei*, *A. niger*, *A. nidulans* och *M. thermophila* (Avsnitt 2.1.4).

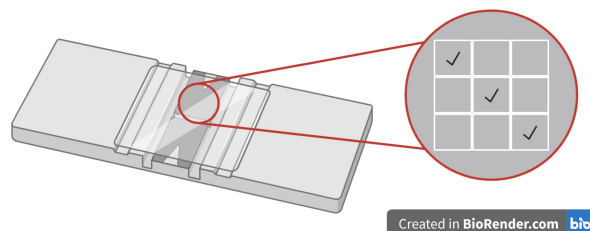
3.3.2 Tillredning av medier

Vid tillredning av svampbasalt medium (FBM), 2% Agar, rödlut (benämnt SSL i Bilaga A) och potatis-dextrosagar (PDA) följdes protokoll som återfinns i Bilaga A.6.

3.3.3 Tillredning av stamlösningar

Sporer från samtliga stammar skördades enligt Bilaga A.1 med några justeringar. NaCl-lösningen var 1% istället för 0.8%, samt att centrifugen kördes i 4800 rpm istället för 4000 rpm. Stammarna C4, C5, C6, C7, C8 och *T. reesei* skördades efter tre dagar, C1, C2, C3 och *A. niger* efter fyra dagar och slutligen *M. thermophila* och *A. nidulans* efter tio dagar. Detta gjordes för att få så många sporer som möjligt.

För räkning av sporer späddes lösningarna ut i 2 omgångar om x10, dvs. till en spädning på x100. De utspädda sporer räknades med en Neubauer Counting Chamber i ett ljusmikroskop. C4 hade få sporer och fick därför räknas i x10-spädningen istället för x100. Därefter räknades sporkoncentrationen ut enligt Ekvation A.E2, och samtliga stammar späddes till 10^6 sporer/mL. Förutom stam C3 och C4 som fick en slutkoncentration på 1.27×10^6 respektive 0.9×10^6 på grund av pipetteringsfel. De rutor som räknades visas i Figur 3. Kryotuber förbereddes med 1:1 lösning av 40% glycerol och sporlösningarna och lades i -80°C-frys. Resterande sporlösningar förvarades i en vanlig frys.



Figur 3: Illustration av en hemocytometer med de rutor som räknades markerade. Samma rutor räknades på nedre halvan av hemocytometern. Gjord i BioRender.com.

3.3.4 Tillverkning av PDA-plattor och odling av stammar

Den autoklaverade PDA-lösningen hälldes i petriskålar så att botten precis täcktes och läts stelna. Därefter tinades de 12 stammar och sporlösningarna vortexades. 50 µL av varje stam pipetterades i mitten på varsin platta och dropparna spreds ut med rackla tills de torkat. I största möjliga mån undveks petriskålarnas väggar vid spridningen av sporer. Alla stammar droppades på ytterligare varsin platta, och droppen läts torka utan att spridas ut. Detta gjordes för att bättre kunna fotografera stammar. Efter detta sattes samtliga lock på petriskålarna och dessa förslöts med parafilm. Därefter inkuberades plattorna upp-och-ned i ett rum i 30°C i en stängd låda.

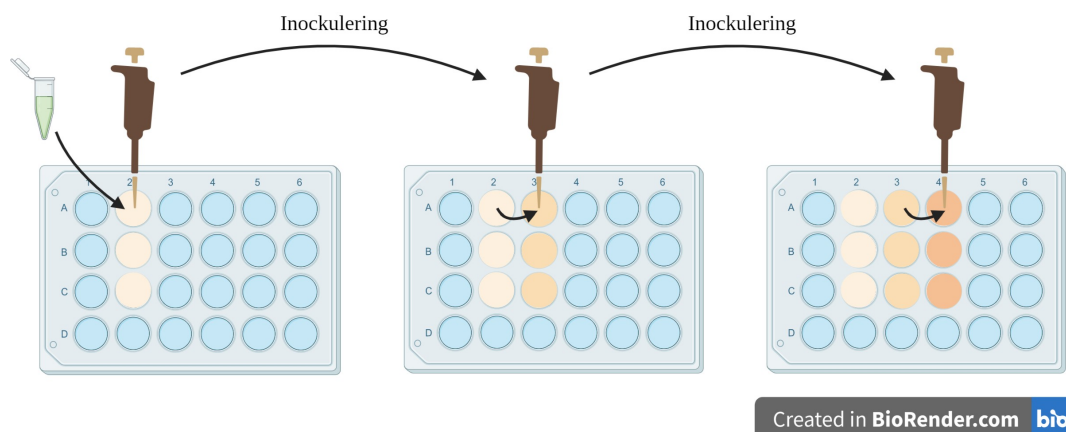
3.4 Stamutveckling

Denna del av projektet syftade till att utveckla några av projektets svampstammar för att de skulle växa bättre på det utvalda mediet rödlut. För att utveckla stammar användes två metoder som båda

kategoriseras som klassisk stamutveckling: adaptiv laboriöretveckling (ALE) och UV-mutagenes.

3.4.1 Adaptiv laboriöretveckling

ALE utfördes med stammarna C2 och C3, som valdes ut av handledarna. Utvecklingen av stammarna utfördes i tre rundor där sporer från stammarna läts germinera och hyferna växa på medium med en ökande koncentration rödlut för varje runda (Figur 4).



Figur 4: Schematisk bild av ALE, där varje 24-hålsplatta representerar en ny runda och varje ny runda har en högre koncentration av rödlut. Gjord i BioRender.com.

Sporer från stammarna inokulerades i den första rundan av ALE i tre brunnar vardera i en 24-hålsplatta där brunnarna fyllts med medium med en 30% koncentration av rödlut. Mediet tillreddes av rödlut, agar och milliQ. 1 mL medium tillsattes till varje brunn och därefter inokulerades brunnarna med 60 000 sporer per brunn. Inokulering och tillredning av mediet utfördes enligt protokoll (Bilaga A.4), dock med andra volymer och koncentrationer då en 24-hålsplatta använts istället för en 96-hålsplatta. Ändringen gjordes efter att flera omgångar med 96-hålsplattan blivit kontaminerade efter andra rundan. Även platta och lock byttes därför mellan varje runda och förslöts noggrant med parafilm. Då dessa ändringar gjorts gentemot protokollet skedde ingen kontaminering av odlingen.

Plattan placerades i en Growth Profiler för att låta sporna germinera och svampen växa under 4 dagar. Därefter utfördes ytterligare två rundor ALE där sporer från föregående runda skördades. Skördningen utfördes genom att 0.5 mL milliQ tillsattes till brunnarna och sporna skrapades därefter upp i vattnet med en T-cellspridare. Därefter pipetterades 0.1 mL av sporlösningen i varsin ny brunn. I runda två inokulerades sporna i brunnar med medium av 40%-ig koncentration rödlut, och slutligen i runda tre med en koncentration på 50%-ig rödlut. Under både runda två och tre läts svamparna växa under 3 dagar i Growth Profilern.

Sporerna efter runda tre skördades och läts germinera på stora PDA-plattor. Detta gjordes för att tydligare kunna se att odlingen inte kontaminerats med bakterier i Growth Profilern. Därefter skördades sporna från dessa och 6000 sporer per brunn inokulerades i en 96-hålsplatta med 50%-ig koncentration av rödlut för att kunna utvärdera tillväxten i Growth Profilern. På samma platta inokulerades även sporer från de omuterade stammarna.

3.4.2 UV-mutagenes

UV-mutagenes utfördes med stammarna C1, C6 och C7, även dessa stammar valdes ut av handledarna. Stammarna bestrålades med UV-ljus för att introducera mutationer. De överlevande kolonierna

undersöktes därefter i en Growth Profiler för att hitta stammar som växer bättre på rödlut.

Sporer från svampstammarna spädde i sterilt milliQ och behandlades därefter med högintensivt UV-ljus med en UV-transilluminator. Sporerne bestrålades under olika långa tidsperioder enligt protokoll (Bilaga A.3), dock användes andra tidsperioder. De nya intervallen för bestrålning blev 30, 60, 90 och 180 sekunder. Sporerne odlades på PDA-plattor och överlevnadsgraden beräknades efter det. Överlevnadsgraden för sporerne efter behandlingen beräknades ungefärligt enligt Ekvation A.E3 från protokollet, skillnaden var att 200 kolonier odlades istället för 100 och att kontrollen inte späddes ut, utan 200 kolonier odlades även för kontrollen. Ekvationen som användes såg ut på följande vis:

$$\text{Överlevnadsgrad (\%)} = \frac{\text{Antal kolonier bildade i UV-bestrålad platta}}{\text{Antal kolonier bildade i kontrollplatta}} \times 100 \quad (1)$$

Kravet för överlevnadsgrad var satt till under 2% för de som valdes att gå vidare med stamkaraktärisering. För stammar med en högre överlevnadsgrad än vad som efterfrågades utfördes metoden igen, med tidsperioder på 240, 300, 360 och 390 sekunder denna gång.

Kolonier från de muterade svampstammarna med erhållen överlevnadsgrad skars ut med hjälp av steriliserade tandpetare och placerades på varsin petriskål med PDA och inkuberades för att sedan kunna gå vidare med de enskilda kolonierna. Efter en tillväxtperiod skördades och räknades sporerne (Bilaga A.1 och A.2). I en Growth Profiler inokulerades varje utvald koloni i tre brunnar vardera på en 96-hålsplatta och utvärderades på 40% rödlut för att se om mutationer för bättre tillväxt har erhållits.

3.5 Utvärdering och bearbetning av råmaterial

För att utvärdera tillväxten på de olika råmaterialen användes samtliga CirkuleinTM-stammar, *T. reesei*, *A. niger* och *A. nidulans*. Medierna som stammarna utvärderades på var rödlut, A, B, havrerester från kandidatgruppens egna havremjökstillverkning samt kaffesump.

3.5.1 Screening av olika stammar på flytande medier

Rödlut och medium A är flytande, medan medium B innehåller både en flytande och en fast fas, varav endast den flytande delen användes här. Medierna vakuumfiltrerades för att sterilisera lösningen och avlägsna fasta partiklar, som fibrer. Medium A och B filtrerades med varsitt rapid flow filter till en filtrerad volym på 50 mL. Därefter justerades pH till 5.5 med NH₄OH (10%).

En 50%-ig lösning av medium A och B erhöles genom att 50 mL av de filtrerade medierna tillsattes i varsin autoklaverad 100 mL flaska, och därefter tillsattes 1 mL (NH₄)₂SO₄, 1 mL KH₂PO₄, 0.1 mL CaCl₂, 0.1 mL MgSO₄ och 47.8 mL milliQ i båda flaskorna till den totala volymen 100 mL. Rödlut tillreddes vid tidigare moment enligt Bilaga A.6.

Stammarnas tillväxt på medierna utvärderades i två 96-hålsplattor. Samtliga medier späddes med agar och vatten till 40%, pipetterades ner i brunnarna och läts stelna. 6000 sporer från varje stam inokulerades i varje brunn för alla tre medier med tre replikat av varje. En kontrollbrunn utan sporer gjordes även för varje medium. Plattorna inkuberades i en Growth Profiler i 5 dagar.

De två stammar med brantast tillväxtkurva för vardera medium utvärderades ytterligare genom odling i små, 100 mL, och stora, 2 L, sterila bafflade skakflaskor. I 100 mL skakflaskorna användes 3 replikat för de 2 bästa stammarna samt en kontroll för flytande medium rödlut, A och B. 2.5 mL inokulerades till 25 mL medium per flaska. Replikat 3 av *A. niger* gick sönder under fermenteringen och gjordes därför om när 2 L flaskorna inokulerades.

Efter 48 timmars fermentering under omskakning i 30°C autoklaverades 100 mL bafflade skakflaskorna och filtrerades därefter med miracloth som torkats i 65°C-ugn. Miracloth vägdes innan och efter filtre-

ringen. Därefter placerades miracloth med biomassan i aluminiumformar och torkades i en desickator med kiselgel i 3 dagar.

Till de tre medierna användes två 2 L bafflade skakflaskor per medium, en för varje stam. 30 mL sporlösning inokulerades i 300 mL medium per flaska. Mediet filtrerades med miracloth och pH justerades till ungefär 5.5 med tillsats av 10% NH_4OH , därefter tillsattes saltlösningar (Bilaga A.6). Till 2 L skakflaskorna behövdes mer sporlösning göras, därför odlades de 6 stammar som skulle inokuleras på nytt och skördning och räkning av sporer utfördes igen (Bilaga A.1 och A.2).

3.5.2 Screening av olika stammar på fasta medier

Vågarna som användes desinficerades med EtOH, placerades i LAF-bänken där de steriliserades med UV-bestrålning. De tre fasta medierna; medium B, havrerester och kaffesump vägdes upp till 1g på varje platta. För varje medium användes 1 platta till kontroll och 3 plattor för varje stam. 11 stammar användes, vilket innebär 34 plattor per medium. FBM tillreddes på olika sätt för havreresterna och kaffesump. Glukos tillsattes till i kaffesumpen så stammarna skulle ha sockerarter att växa på, och därför kompensterades det med lika mängd sterilt vatten till medium B och havre-mediet (Tabell 2).

33 μL av respektive mediers FBM tillsattes till alla plattor för det mediet. Med T-formad cellspredare jobbades det fungala basmediet in i det fasta mediet, som sedan packades ihop i mitten av plattan. Därefter inokulerades $3 \times 20 \mu\text{L}$ av respektive sporlösning på tre punkter på det fasta mediet för varje platta. Plattorna för alla de tre fasta medierna växte 6 dagar i 30°C .

Tabell 2: Ingredienser för tillredning av FBM för medium B, havrerester och kaffesump

Ingredienser till FBM	Till medium B (μL)	Till havrerester(μL)	Till kaffe (μL)
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	400	350	350
KH_2PO_4	400	350	350
CaCl_2	40	35	35
MgSO_4	40	35	35
Glukos	-	-	350
Spårämnen	40	35	35
Sterilt vatten	400	350	-

3.6 Analys av data från Growth Profiler

Datan som erhöles från odlingarna i Growth Profiler analyserades med hjälp av programmet TIBCO Spotfire®. Datan bearbetades och normerades först i Excel och exporterades därefter till analysprogrammet. Med hjälp av TIBCO Spotfire® kunde tillväxtkurvor tas fram för de odlade stammarna.

Med hjälp av datan från Growth Profiler kunde även en uppskattning av tillväxthastigheten i den exponentiella fasen tas fram. För att ta fram värdena användes en datamanipulerings- och visualiseringskod från programmeringsspråket R, vilken skapade regressionslinjer över ett antal tidpunkter i datan och sedan extraherade de fem högsta tillväxthastigheterna (Bilaga C). Ett medelvärde för de fem högsta tillväxthastigheterna kunde sedan beräknas. Dessa värden användes för att jämföra stammarnas tillväxthastigheter.

4 Resultat

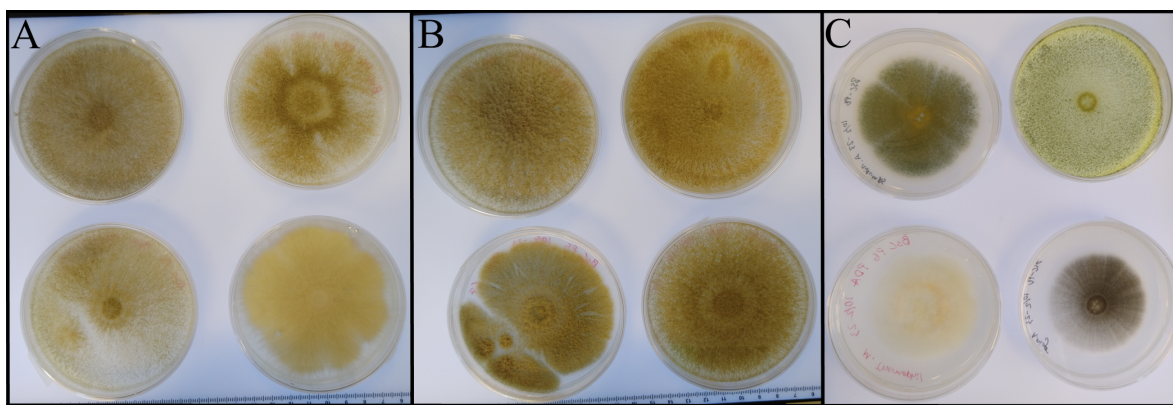
I detta projekt har svampstammar dels utvecklats med hjälp av två olika klassiska stamutvecklingsmetoder, ALE och UV-mutagenes, dels utvärderats på flera olika fasta och flytande medier. Här presenteras resultaten från projektets laborativa delar.

4.1 Uteslutning av *M. thermophila*

Vid skördning och räkning av sporer för *M. thermophila* beräknades koncentrationen för stamlösningen till 3.00×10^4 sporer/mL. Det beslutades att inte gå vidare med stammen i något av experimenten eftersom sporkoncentrationen var för låg. En sporkoncentration på 10^6 sporer/ml behövdes i de efterföljande experimenten (Bilaga A).

4.2 Morfologi på PDA-plattor

Samtliga CirkuleinTM-stammar odlade på PDA-plattor bildade kolonier med gröngul färg. De fyra icke-konfidentiella stammarna varierade mer i färg. *A. nidulans* och *T. reesei* var båda gröna, *M. thermophila* var äggskalsvit och *A. niger* var gråsvart. Kolonibildningsmönstret för samtliga var cirkelformat (Figur 5).



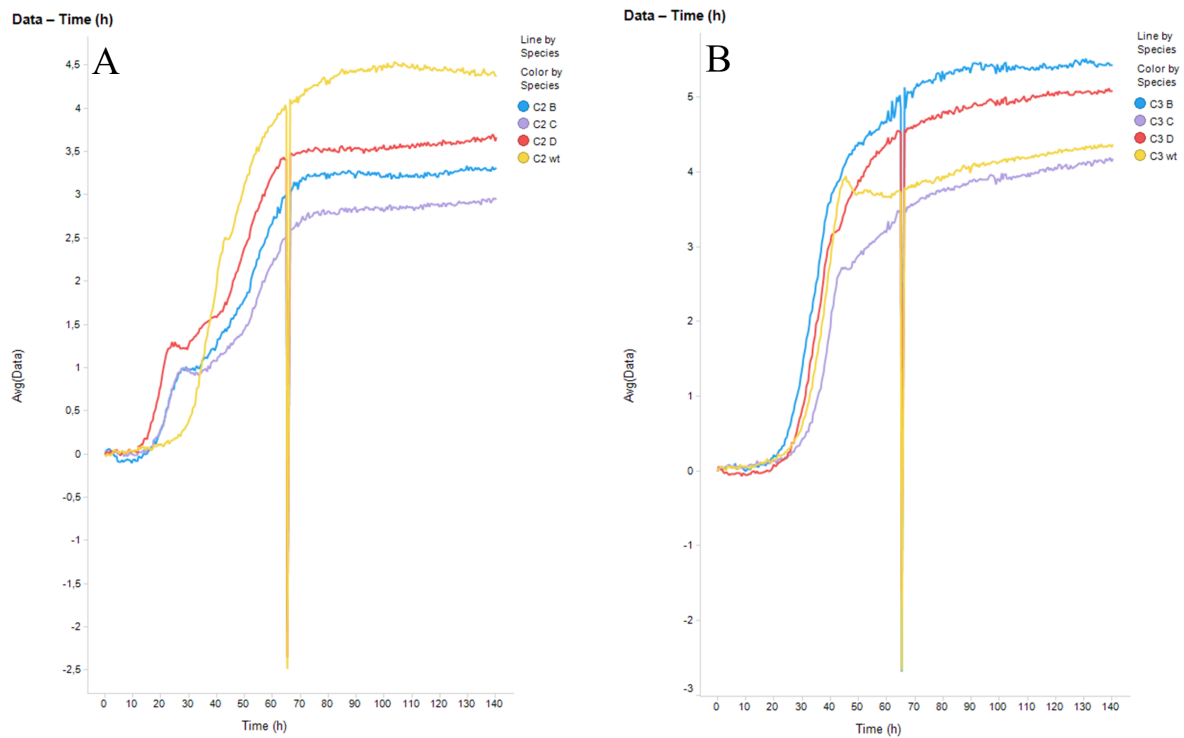
Figur 5: Stammar i delfigur A) från övre vänster: C1, C2, C3, C4. B) från övre vänster: C5, C6, C7, C8. C) från övre vänster: *A. nidulans*, *T. reesei*, *M. Thermophila*, *A. niger*. Samtliga stammar odlades på PDA.

4.3 Stamutveckling

Här presenteras resultaten från den stamutveckling som gjordes på fem CirkuleinTM-stammar. Utvecklingen gjordes med hjälp av två olika klassiska stamutvecklingsmetoder, ALE och UV-mutagenes.

4.3.1 Adaptiv laboratorieevolution

Efter tre rundor ALE hade stammarna utvecklade från C2 erhållit ytterligare en exponentiell fas runt tiden 25 timmar, samt en mindre brant lutning på den andra exponentiella fasen än den ursprungliga stammen (Figur 6). Stammarna utvecklade från C3 följde ursprungsstammens tillväxtmönster under den exponentiella fasen. Två av de muterade kolonierna, C3 B och C3 D, hade ett högre slutvärde än ursprungsstammen: 5.5 och 5.0 jämfört med 4.3. Värdena korrelerar med mängden biomassa. Några mätpunkter saknas kring tiden 65 timmar eftersom Growth Profileren vid den tidpunkten stoppades för service (Figur 6).



Figur 6: Tillväxtkurvor för svamparna A) C2 och B) C3 samt tre mutanter för vadera svamp som erhållits efter tre runder ALE. Ursprungsstammar benämns wt. Svamparna odlades på fast medium med 40%-ig rödlut.

Stammarna utvecklade från C3 hade en högre tillväxthastighet än ursprungsstammen (Tabell 3). Stammarna utvecklade från C2 uppvisade samma eller en något försämrade tillväxthastighet.

Tabell 3: Största lutningen på tillväxtkurvorna för stammar utvecklade med ALE samt ursprungsstammarna. Ursprungsstammarna benämns wt, bokstäverna representerar de muterade stammar.

C2	Maximal lutning	C3	Maximal lutning
wt	0.06	wt	0.06
B	0.06	B	0.07
C	0.05	C	0.08
D	0.06	D	0.09

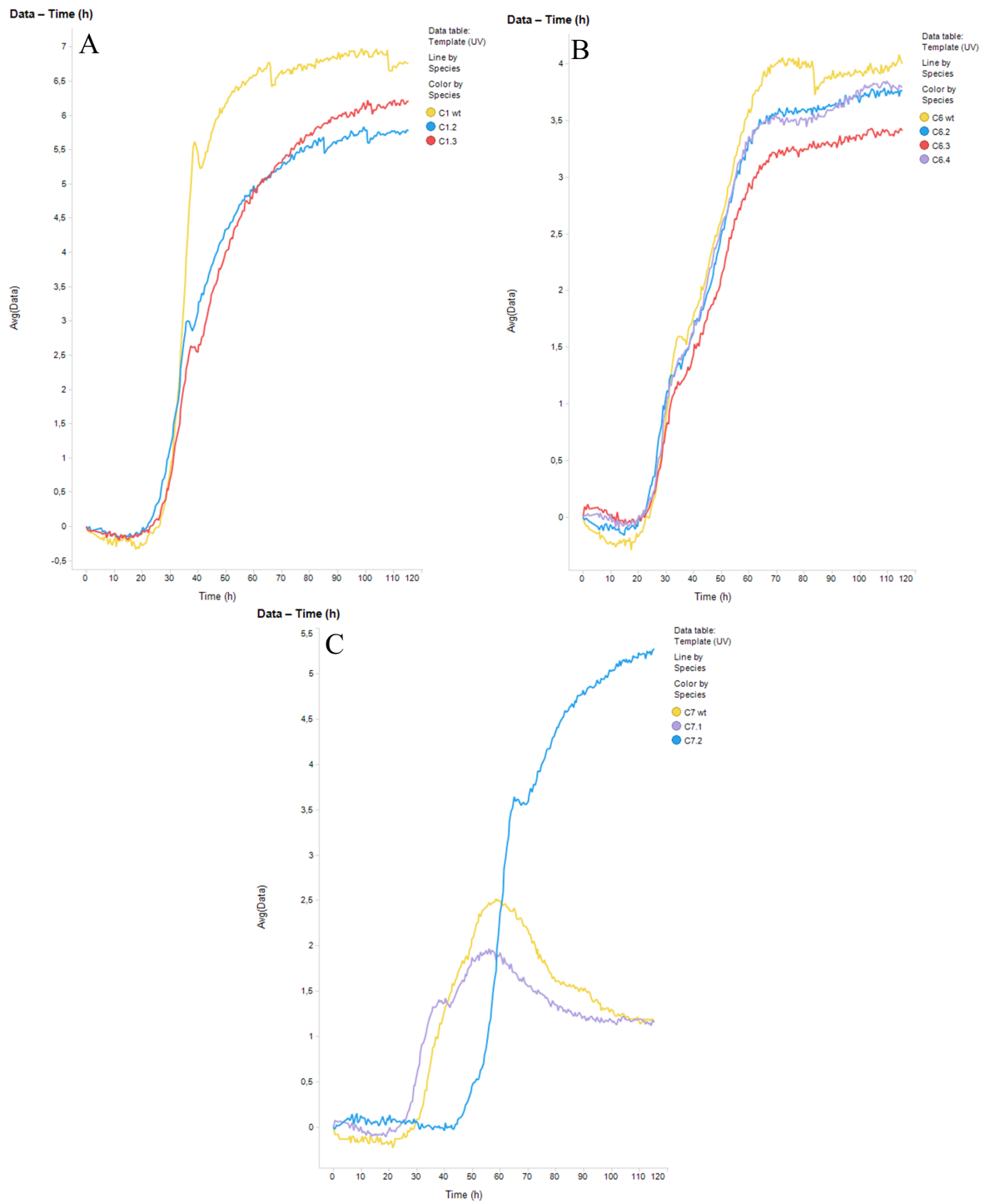
4.3.2 UV-mutagenes

Den beräknade överlevnadsgraden varierade mellan 1.45% och 3.00% för de tre behandlade stammar (Tabell 4). Stammarna behandlades under olika långa tidsperioder för att uppnå en tillräckligt låg överlevnadsgrad. C6 bestrålades under nästan dubbelt så lång tid som C1, 300 sekunder jämfört med 180 sekunder, och erhölet en nästan dubbelt så hög överlevnadsgrad, 3% jämfört med 1.6%.

Tabell 4: Överlevnadsgrad efter UV-bestrålning av stammarna C1, C6 och C7

Stam	Bestrålningstid (s)	Antal överlevande kolonier efter UV	Antal kolonier kontroll	Överlevnadsgrad (%)
C1	180	2	125	1.60
C6	300	6	200	3.00
C7	390	2	138	1.45

Tillväxtkurvorna för de UV-behandlade stammarna visade en liknande eller försämrade tillväxt för samtliga muterade kolonier förutom C7.2 (Figur 7). För de muterade C1-kolonierna försämrades tillväxthastigheten efter ca 35 timmar. De muterade C6-kolonierna hade tillväxtkurvor som följde den omuterade under nästan hela mätningen. Stam C7 hade en koloni, C7.2, med en högre tillväxthastighet än sin ursprungsstam. Denna nådde ett slutvärde drygt dubbelt så stort som C7. C7.2 uppvisade både en längre exponentiell fas och en längre lag-fas än både sin ursprungsstam och den andra muterade kolonin.



Figur 7: Tillväxtkurvor mätta i en Growth Profiler med de omuterade stammarna markerad med gult. A) C1, B) C6 och C) C7. De omuterade stammarna är benämnda wt. Odlade på 40%-ig rödlut.

Samtliga muterade C1-kolonier hade en försämrad tillväxthastighet jämfört med ursprungsstammen (Tabell 5). De muterade C6-kolonierna hade en lika hög eller en svagt försämrad tillväxthastighet gentemot ursprungsstammen. De muterade från C7-kolonierna uppvisade en något förbättrad tillväxthastighet.

Tabell 5: Största lutningen på tillväxtkurvorna för de UV-bestrålade kolonierna och deras ursprungstammar odlade på fast medium med 40%-ig rödlut.

C1	Maximal lutning (h ⁻¹)	C6	Maximal lutning (h ⁻¹)	C7	Maximal lutning (h ⁻¹)
wt	0.1	wt	0.05	wt	0.05
1.2	0.07	6.2	0.05	7.1	0.06
1.3	0.08	6.3	0.05	7.2	0.07
		6.4	0.04		

4.4 Utvärdering och bearbetning av råmaterial

Här presenteras resultaten från odlingen av 11 svampstammar (*M. thermophila* utelämnades) på flera olika medier. Svampstammarna odlades i skakflaskor i tre olika flytande medier samt i petriskålar på tre olika fasta medier.

4.4.1 Screening av olika stammar på flytande medier

De stammar odlade på rödlut med den högsta uppmätta tillväxthastigheten var *A. niger*, C1 och C2 (Tabell 6). För medium A hade *A. niger*, C8 och C7 de högsta tillväxthastigheterna och för medium B hade C6, *A. nidulans* och *A. niger* de högsta.

Tabell 6: Maximal tillväxt för de 11 stammarna på 40%-ig rödlut, medium A och B

Stam	Maximal lutning på rödlut (h^{-1})	Maximal lutning på medium A (h^{-1})	Maximal lutning på medium B (h^{-1})
C1	0.10	0.09	0.14
C2	0.09	0.08	0.14
C3	0.09	0.08	0.13
C4	0.08	0.13	0.23
C5	0.10	0.08	0.13
C6	0.05	0.10	0.34
C7	0.05	0.12	0.15
C8	0.08	0.14	0.15
<i>A. nidulans</i>	0.06	0.03	0.29
<i>T. reesei</i>	0.02	0.03	0.21
<i>A. niger</i>	0.14	0.2	0.28
Kontroll	0.01	0.02	0.03

Två stammar valdes ut för vardera medium (Tabell 7) och undersöktes vidare med odling i skakflaskor. För medium A och B valdes de med högst uppmätt tillväxthastighet. För rödlut valdes den stam med näst, respektive tredje högst tillväxthastighet. Detta gjordes eftersom det inte fanns tillräckligt mycket sporlösning av *A. niger* för odling på både rödlut och medium A. C4 hade den tredje högsta tillväxthastigheten för medium A men på grund av för låg sporkoncentration på dess stamlösning valdes *A. niger* på medium A istället för rödlut.

Tabell 7: De utvalda stammarna för vardera medium (rödlut, A och B) för odling i skakflaskor.

Flytande medium	Stam med bäst tillväxt	Stam med näst bäst tillväxt
Rödlut	C1 ¹	C5 ²
A	<i>A. niger</i>	C8
B	C6	<i>A. nidulans</i>

¹ Näst brantast tillväxt för rödlut.

² Tredje brantast tillväxt för rödlut.

Samtliga stammar odlade i rödlut och medium A i 100 mL skakflaskorna producerade mer biomassa än de odlade i medium B (Tabell 8). Medeltorrvikten skiljde sig mest mellan C6 på 1.9 mg och C5 på 67.3 mg, där C6 odlades på medium B och C5 på rödlut. Ett replikat av *A. niger* resulterade i ca 7 mg mer torr biomassa än de andra denna odlades i en annan omgång då den första gick sönder.

Tabell 8: Uppmätt torrsvikt för producerad biomassa från fermentering i 100 mL skakflaskor på rödlut, medium A och B

Medium	Stam	Torrsvikt biomassa (mg)	Medelsvikt (mg)
Rödlut	C1	24.34	31.5
Rödlut	C1	26.40	
Rödlut	C1	43.77	
Rödlut	C5	62.57	67.3
Rödlut	C5	67.35	
Rödlut	C5	72.01	
A	C8	74.87	59.3
A	C8	36.96	
A	C8	65.92	
A	<i>A. niger</i>	3.38	6.3
A	<i>A. niger</i>	3.97	
A	<i>A. niger</i>	11.04 ¹	
B	C6	2.66	1.9
B	C6	2.03	
B	C6	1.01	
B	<i>A. nidulans</i>	9.23	7.2
B	<i>A. nidulans</i>	11.74	
B	<i>A. nidulans</i>	0.68	

¹ Skakflaskan odlades lika länge som övriga, men i en annan omgång då den gick sönder under första odlingen.

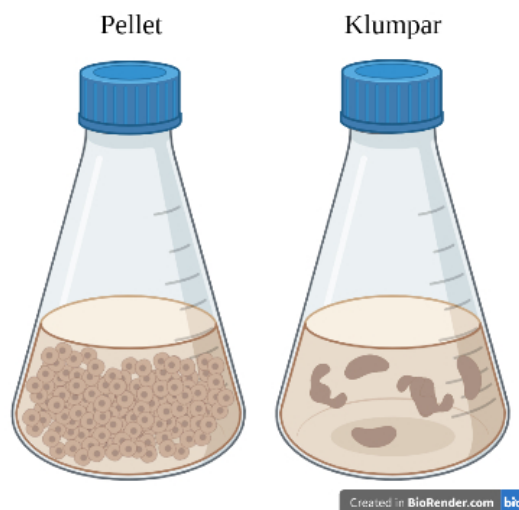
Resultatet av torrsviktsmätningarna på 2 L skakflaskorna (Tabell 9) liknar dem för 100 mL skakflaskorna (Tabell 8). Stammar odlade på rödlut och medium A hade en större torrsvikt jämfört med de odlade på medium B. CirkuleinTM-stammarna C2 och C3 var kontroller odlade på rödlut, och har utvecklats på det mediet av Cirkulär AB. C2 hade högst uppmätt torrsvikt på 3.42 g jämfört med C6, odlad på medium B, som uppvisade lägst torrsvikt på 0.03 g.

Tabell 9: Uppmätt torrsvikt för producerad biomassa från fermentering i 2 L skakflaskor med rödlut, medium A och B.

Media	Stam	Torrsvikt biomassa (g)
Rödlut	C2 ¹	3.42
Rödlut	C3 ¹	1.52
Rödlut	C1	1.45
Rödlut	C5	2.37
A	<i>A. niger</i>	1.65
A	C8	1.72
B	C6	0.03
B	<i>A. nidulans</i>	0.49

¹ Agerar kontroller vid analys

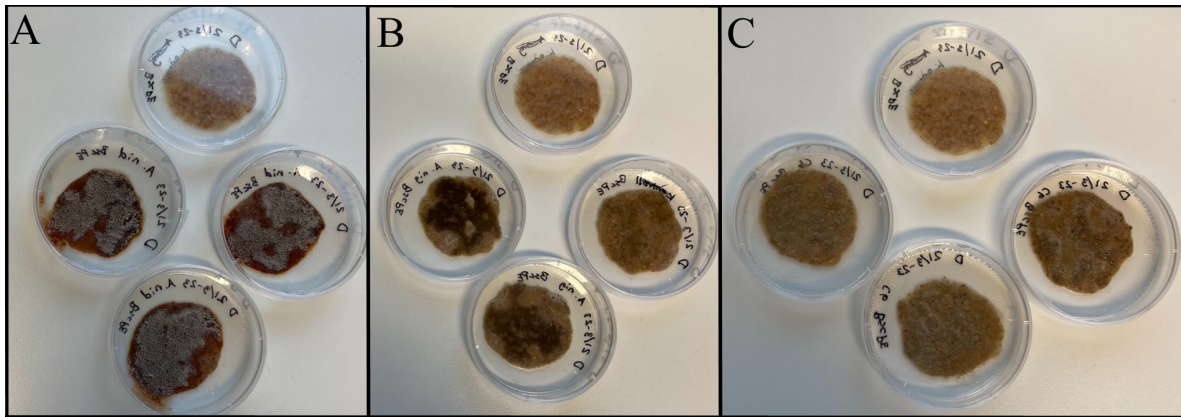
Kontrollstammarna C2 och C3 bildade pellets på några millimeter i diameter i 2 L skakflaskorna. De var ljusa med mörka prickar i mitten. De övriga stammarna som odlades på rödlut och A bildade geleliknande klumpar (Figur 8). C6 och *A. nidulans* som odlades på medium B växte för lite för att deras morfologi skulle kunna identifieras.



Figur 8: Illustration av skillnader i svampars morfologi vid odling i skakflaskor. Notera att pellets visas större i figuren än i verkligheten. Gjord i Biorender.com.

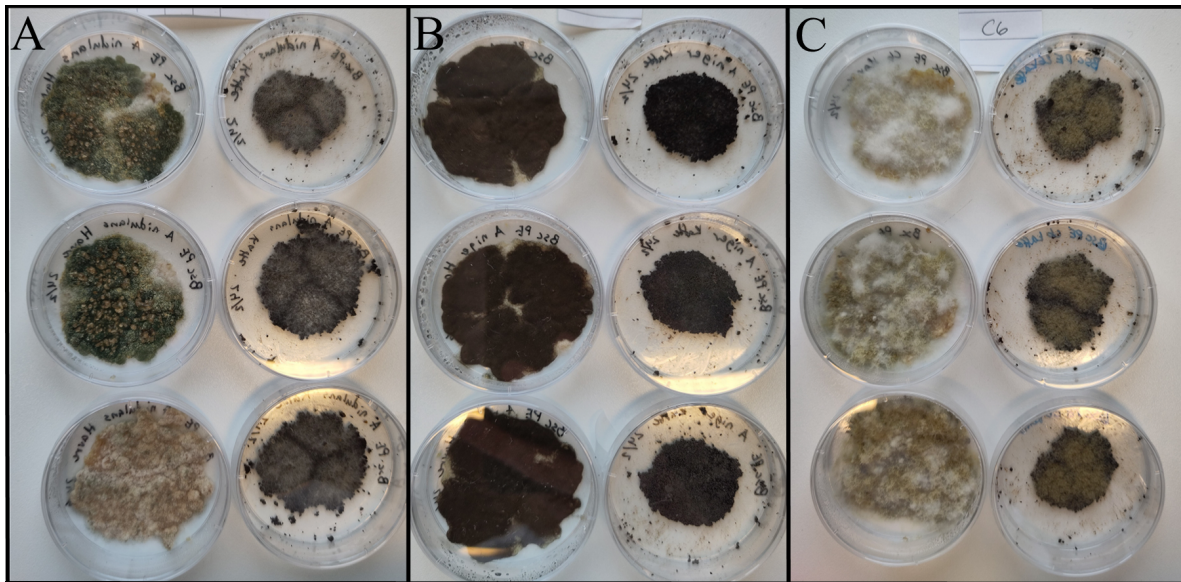
4.4.2 Screening av olika stammar på fasta medier

Resultatet av screeningen utvärderades genom en visuell analys av tillväxten på plattorna. Tillväxt observerades på samtliga 99 plattor, men i varierande omfattning. Ett representativt urval gjordes vid presentation av datan. För medium B erhöles en morfologi lik den på PDA-plattor (Figur 5) bortsett från *A. nidulans* (Figur 9). *A. nidulans* hade ljusa prickar på en röd yta, vilket skiljer sig från dess gröna utseende på PDA-plattan (Figur 5).



Figur 9: Tillväxt på medium B där samtliga delfigurer har kontrollplattan överst. A) *A. nidulans*, B) *A. niger* och C) C6.

Vid odling av stammar på havrerester och kaffesump skiljdes tillväxten mer mellan medierna än mellan stammarna (Figur 10). På havrerester var *A. nidulans* grön med guldiga korn på två av replikaten och beige på det tredje. *A. niger* hade stora partier med svart mycel och C6 hade ett brunaktigt mycel med vita, fluffiga partier. På mediet med kaffesump växte samtliga stammar mindre än på havrerester och tre små fläckar mycel växte (Figur 10).



Figur 10: Tillväxt av stammar på havrerester (till vänster i varje delfigur) och medium med kaffesump (till höger i varje delfigur). A) *A. nidulans*, B) *A. niger* och C) C6.

5 Diskussion

I detta projekt har ett flertal svampstammar dels utvecklats med hjälp av två olika klassiska stamutvecklingsmetoder, ALE och UV-mutagenes, dels utvärderats på både fasta och flytande medier. Nedan diskuteras resultaten från de laborativa studierna som presenterades i föregående kapitel.

5.1 Stamutveckling

Resultaten från den stamutveckling som gjorts på fem CirkuleinTM-stammar diskuteras. Utvecklingen gjordes med två olika klassiska stamutvecklingsmetoder, ALE och UV-mutagenes.

5.1.1 Adaptiv laboratorieevolution

Efter tre rundor ALE hade flera av tillväxtkurvorna för de utvecklade stammarna erhållit två tydliga exponentiella faser (Figur 6). Tillväxtkurvorna skulle kunna vara ett exempel på diauxisk tillväxt (Avsnitt 2.1.3). Rödlut innehåller flera olika sockerarter vilket är en förutsättning för diauxisk tillväxt (Bilaga B). Detta gör även agar, vilket tillsattes till rödlut vid odlingen. De två exponentiella faserna syns tydligast i de stammar som utvecklats med ALE från C2 men kan även anas i de som utvecklats från C3. Detta skulle kunna tyda på att den stamutveckling som utfördes med ALE gjort att stammarnas tillväxtkurvor utvecklat en mer diauxisk karaktär.

Den första exponentiella fasen är längre för stammarna utvecklade från C3 jämfört med de utvecklade från C2 (Figur 6). Eftersom C3 är utvecklad från C2, bland annat med hjälp av just ALE, är det möjligt att fler rundor ALE kan förlänga den första exponentiella fasen. Utöver detta är lag-fasen mellan de två exponentiella faserna kortare hos stammarna utvecklade från C3 än de utvecklade från C2. Den längre första exponentiella fasen skulle kunna tyda på att C3-stammarna bättre kan bryta ner både enkla och komplexa sockerarter på samma gång än C2 stammarna i denna fas. Den kortare lag-fasen skulle kunna tyda på att C3-stammarna har lättare att ställa om metabolismen för nedbrytning av olika sockerarter. C2 kan därför beskrivas som mer av en specialist och C3 som mer av en generalist [60]. För valorisering av komplexa substrat har C3 alltså fler önskvärda egenskaper. Att C2 har en fördröjd metabolism av vissa kolkällor kan minska produktiviteten i industriella processer och gör den mindre effektiv.

Tillväxthastigheten för de utvecklade stammarna blev något större för C3 jämfört med ursprungsstammen. Den största ökningen för C3 vars tillväxthastighet ökade med 50% jämfört med ursprungsstam. Detta är den största förbättringen jämfört med ursprungsstam för både ALE och UV-mutagenes. Skillnaderna är mindre för C2, där den maximala tillväxthastigheten varierar med som mest 0.01 mellan de utvecklade stammarna och ursprungsstammen (Tabell 3). Detta tyder på att C2 inte har förbättrat sin tillväxt på mediet, men för att avgöra om förbättringarna i C3 är signifikanta behövs fler replikat, statistiska test samt en renodling göras.

Under ALE utvecklas en mutantpopulation, alltså en population med en blandning av olika muterade celler. För att identifiera de mutanter som bidrar till förbättringar i tillväxthastighet behöver en renodling göras. Under renodling isoleras mutanter, vilka screenas för att identifiera deras egenskaper [61]. Detta kan behöva göras i flera omgångar för att erhålla homogena kulturer. För att verifiera resultatet från ALE bör alltså en renodling göras.

Då båda ursprungsstammarna är utvecklade av Cirkulär AB för att växa på rödlut är det möjligt att de använda koncentrationerna av rödlut vid samtliga ALE-rundor var för låg. Detta kan ha lett till att stammarna nu istället utvecklades vid en lägre koncentration än de tidigare anpassats till. Dessutom är det möjligt att stammarna inte heller hunnit anpassa sig till någon av de koncentrationer av rödlut som användes då endast en runda utfördes vid varje koncentration. Att det totala antalet rundor var så få skulle kunna vara en bidragande orsak till att ingen förbättring erhöles för stammarna. ALE har i tidigare studier visat sig vara en effektiv metod för att utveckla filamentösa svampar [62][63][64]. I

en studie kunde exempelvis *A. nigers* produktion av cellulas femdubblas med hjälp av ALE. I studien utfördes ALE under 24 veckor med både betydligt fler rundor och i varje runda tilläts stammarna växa under fem dagar istället för tre som i detta projektet [63].

ALE-odlingarna kontaminerades vid ett flertal tillfällen och fick göras om på nytt. Initialt användes en 96-hålsplatta och en ny kolumn användes för varje runda (Bilaga A). Vid flera tillfällen blev odlingarna kontaminerade i runda två. Detta syntes genom mörka prickar på mediet som antogs vara bakterier. För att minska risken för kontaminering modifierades metoden (Avsnitt 3.4.1). Överföringen inom plattan mellan runda 1 och 2 antogs vara en trolig källa till kontamination. Detta åtgärdades genom att nya plattor och lock användes för varje runda. Plattorna förslöts dessutom noggrant med parafilm. Bakterier kan dessutom ha introducerats i dragskåpet via laboranternas munnar, varpå större försiktighet vidtogs vid arbetet. Efter dessa åtgärder erhöles slutligen en lyckad ALE.

5.1.2 UV-mutagenes

Tillväxthastigheten för stammarna som utvecklades från C1 med UV-mutagenes minskade med 20% efter behandling med strålning (Tabell 5). Mutationerna som introduceras med UV-mutagenes är inte specifika och kan därför leda till både förbättrade och försämrade fenotyper (Avsnitt 2.4). Att det ändå är en kraftfull metod visar sig dock i en av de muterade C7 stammarna, C7.2, som visade sig ha en förlängd exponentiell fas med 40% högre tillväxthastighet än ursprungsstammen (Figur 7, Tabell 5). Det kan dock även finnas ofördelaktiga mutationer i C7.2 som visar sig först vid en uppskalad odling (Avsnitt 2.4). Det krävs alltså ytterligare utvärdering för att avgöra om C7.2 kan användas industriellt. UV-mutagenes har i flera tidigare studier visat sig vara en framgångsrik metod för att utveckla industriella svampstammar som till exempel *Aspergillus* och *Trichoderma* [51],[52].

De kolonier erhållna från stammarna med lägst överlevnadsgrad skiljde sig mest från ursprungsstammarna vid en jämförelse mellan tillväxtkurvor och tillväxthastighet (Figur 7, Tabell 5). Detta tyder på att överlevnadsgraden är en avgörande faktor för stamutveckling med UV-mutagenes (Avsnitt 2.4). En låg överlevnadsgrad krävs för att kunna ta fram stammar som skiljer sig så mycket som möjligt från de ursprungliga. I tidigare studier där filamentösa svampar utvecklats med UV-mutagenes varierar den använda överlevnadsgraden [65], [66]. En överlevnadsgrad på 10% användes i en studie för en ökad produktion av en sekundär metabolit [66]. Dessa 10% motsvarade 50 000 överlevande kolonibildande enheter, jämfört med våra två till sex. Vid en högre kapacitet för screening är det alltså inte nödvändigt med en lika låg överlevnadsgrad för att erhålla gynnsamma mutationer. Dessutom minskar då risken för att bra mutationer överskuggas eftersom färre mutationer introduceras överlag. En annan studie visade att den optimala strålningsdosen, vilket är korrelerat med överlevnadsgraden, kan variera beroende på önskat resultat [67]. En ökad produktion av biomassa krävde, enligt studien, mindre exponering än exempelvis förbättrad enzymaktivitet. Alltså är det möjligt att en högre överlevnadsgrad kan ge en högre tillväxthastighet, men detta skulle kräva screening av fler stammar och kan vara intressant för vidare studier.

För att hitta fler stammar med intressanta fenotyper hade ett större antal sporer kunnat bestrålas och fler stammar screenats. För att vidareutveckla de framtagna fenotyperna ytterligare, i synnerhet C7.2, hade fler rundor UV-mutagenes behövts göras. I många studier har UV-mutagenes använts i kombination med andra klassiska stamutvecklingsmetoder så som kemisk mutagenes vilket visat sig ge goda resultat [51]. Detta hade därför också varit en möjlig väg för att utveckla stammarna ytterligare.

Jämfört med ALE är UV-mutagenes en metod som, på detta projektets skala, är smidigt och ger snabba resultat. På större skala krävs dock ett mer omfattande arbete, då plattor behöver bestrålas och inokuleras, och räkna sporer manuellt eller automatiserat. Den relativt låga sannolikheten för en förbättrad stam är också en nackdel för UV. En fördel med ALE är att metoden introducerar mindre slumpartade mutationer än UV-mutagenes då mutationerna som förvärvas i större utsträckning gör dem bättre anpassade till den valda miljön.

5.2 Utvärdering och bearbetning av råmaterial

Här diskuteras resultaten från odlingen av de 11 svampstammarna på olika typer av medier. Svampstammarna odlades dels på tre flytande medier i skakflaskor och dels på petriskålar med tre olika fasta medier.

5.2.1 Screening av olika stammar på flytande medier

Från screeningen av svampar på de flytande medierna bestämdes de olika stammarnas tillväxthastigheter (Tabell 6). Utifrån resultatet är det tydligt att tillväxthastigheten generellt var högre för alla stammar på medium B. Medium B innehåller troligen störst mängd monosackarider bland de undersökta medierna (Bilaga B). Om B verkligen innehåller den största mängden monosackarider kan inte sägas med säkerhet då datan som erhållits om mediernas innehåll inte har samma enheter. Den högre andelen monosackarider skulle kunna vara en orsak till den högre tillväxthastigheten då de är lättare att bryta ner. I screeningen var rödlut och medium A relativt lika varandra i tillväxthastighet och har därför troligen en liknande sammansättning. Utifrån denna screening bestämdes de stammar som skulle odlas i skakflaskor för att se hur tillväxten skiljer sig från screeningen.

100 mL skakflaskorna visade generellt en större tillväxt i rödlut än de andra medierna, och en markant sämre tillväxt i medium B. C6, som under screeningen verkade växa bäst på medium B, gav efter odling i skakflaskor den lägsta biomassan av samtliga skakflaskor. De stammar som producerade mest biomassa var CirkuleinTM-stammarna C1 och C5 på rödlut och C8 på medium A. Då rödlut är mediet som Cirkulär AB använder sig av var det väntat att de stammarna skulle vara anpassade till det. Även medium A, som inte är lika beprövat, har en relativt hög tillväxt av C8, men lägre tillväxt av *A. niger*. Det är möjligt att denna har en längre lag-fas, och därför kräver en längre tillväxttid. Odlingen i skakflaskorna stoppades efter 48 timmar då svamp-kulturerna förväntades vara i exponentiell fas, men det kan variera mellan medierna och stammarna. I en tidigare gjord studie med rödlut och andra filamentösa svamparter har odling under 48 timmar gett maximal biomassaproduktion, vilket gjordes i en satsvis bioreaktor [68]. En bioreaktor bidrar till en mer kontrollerbar miljö, vilket kan vara användbart vid uppskalning. Det har även visats att syresättning är avgörande för biomassaproduktionen [43], vilket inte kan kontrolleras i skakflaskor.

De låga torrvikterna erhållen från 100 mL skakflaskorna i medium B för både C6 och *A. nidulans* tyder på att det troligen inte är ett bra material att odla svampar på, i jämförelse med rödlut och medium A. Detta kan bero på att den fasta delen av mediet filtrerades bort och undersöktes separat (Figur 9). Det är möjligt att den innehåller tillväxtfrämjande ämnen som då togs bort från den flytande fasen. Därför skulle tillväxt på hela medium B testats vilket den metod som användes inte tillät. Filtreringen som gjordes efter odlingen i skakflaskorna skulle ha extraherat både biomassan och den fasta fasen vilket hade påverkat resultatet.

I 2 L skakflaskorna uppmättes en biomassa som motsvarade de halter som uppmättes i 100 mL skakflaskorna. Stammarna odlade i rödlut växte mest, medan de i medium B växte minst. Både odlingarna i 2 L och 100 mL flaskor visade en låg tillväxt av C6 i medium B, vilket motsäger resultatet från Growth Profilern (Tabell 6). Detta kan bero på att mediet blandats med agar för screeningen, vilket innehåller polysackarider [69]. I skakflaskorna, där ingen agar tillsatts, hade C6 inte längre tillräckligt med näring vilket kan ha lett till den låga tillväxten på medium B.

Screeningen i Growth Profilern används för att identifiera potentiella kandidater med hög tillväxt att arbeta vidare med. Det är viktigt att notera att dess resultat måste bekräftas med en uppskalad odling i skakflaskor. Detta eftersom skakflaskorna bidrar med en miljö mer lik den i industriella odlingar [70]. Detta syns för de stammar som odlades på medium B, vilka hade högst tillväxthastighet under screeningen men producerade minst biomassa i skakflaskorna. Det är alltså möjligt att få ett sämre resultat vid torrviktsmätningen, som för C6, eller ett bättre, som för C5 och C8. Stammar kan därför ha valts bort på grund av dess låga tillväxt under screeningen, men på grund av tidsbegränsning kunde

vi bara gå vidare med ett utvalt antal svampar. För att få ett bättre resultat bör experimentet utökas till fler stammar per medium.

Ytterligare en fördel med odling i skakflaskor är möjligheten att identifiera morfologin i flytande medium. Två av stammarna, C2 och C3, visade sig växa som pellets medan övriga växte jämt utspridda i mediet eller som klumpar (Figur 8). Denna typ av information är avgörande vid industriell odling eftersom morfologin påverkar bland annat omrörningen och utbytet av producerade molekyler [71][15].

För att förbättra experimentet bör inte fibrerna filtreras bort från medierna som används i skakflaskorna. Vid uppskalning blir filtrering opraktiskt eftersom det tar för lång tid. Det har till exempel visats att komponenter i rödlut agerar inhiberande på fermentering [72] och det är därför viktigt att utveckla stammar för det fullständiga mediet. Stammarna kunde producera biomassa på både rödlut och medium A, men för att avgöra ifall biomassan går att använda som SCP i foder behöver innehållet analyseras. En tidigare studie som gjorts med andra filamentösa svampar och rödlut visade på att det framtagna SCPt kan ersätta sojamjöl och fiskmjöl innehållsmässigt [68]. Detta hade även behövts verifieras för denna studie.

5.2.2 Screening av olika stammar på fasta medier

På medium B uppvisade *A. nidulans* en röd färg och prickar (Figur 9). Detta skiljer sig från dess morfologi vid odling på PDA där den var grön (Figur 5). Vid nedbrytning bildas biprodukter, och det är möjligt att någon av dessa gav den röda färgen. Det har tidigare visats att val av medium kan påverka de pigment som produceras [73]. Anledningen till att prickar uppkommer är inte känd och de sågs inte på någon annan stam eller på något annat medium. Det är möjligt att prickarna är konidier, men vidare analys behövs för att säkerställa detta. Övriga stammar växte mer filamentöst, men replikaten uppvisade ofta olika stadier av tillväxt trots att de inkuberats lika länge.

Samtliga svampstammar växte bra på havrerester, men precis som för medium B noterades en variation mellan replikaten. Denna är tydligast för *A. nidulans*, där endast två av replikaten var gröna. Dessa uppvisade små korn på ytan, vilka inte observerades på det tredje replikatet. Det är inte känt vad det är eller vad det beror på, men även dessa skulle kunna vara konidier.

Då svamparna odlades på mediet med kaffesump sågs en låg tillväxt jämfört med odling på havrerester. Kaffesump innehåller inte tillräckligt med sockerarter för svamptillväxt, därför tillsattes även glukos utöver FBM. Samtliga stammar hade relativt dålig tillväxt, vilket tyder på att kaffesump har en hämmande effekt på stammarnas tillväxt. I en studie som gjorts med rötsvampar undersöktes de inhiberande effekterna hos kaffesump [74]. Det kunde då visas att kaffesump innehåller inhiberande kemikalier som påverkar tillväxten, som koffein, cinnamater och alkaloider [74]. Utifrån våra observationer kan även den slutsatsen dras.

Kaffesumpen och havreresterna var de två medier som valdes ut för att utvärdera potentiella nya restströmmar. Kaffesump är inte ett bra alternativ som restström på grund av dess sammansättning och de inhiberande kemikalierna. Betydligt mer lovande är havreresterna utifrån den bättre tillväxten på dessa odlingarna. Flera andra faktorer talar för havrerester från havremjölksproduktion som en intressant restström att undersöka vidare. Havremjölksproduktion finns idag i Sverige på flera platser. Detta innebär relativt korta transportsträckor av havreresterna till fabriken. Långa transportsträckor kan påverka klimatet negativt och har uppskattats stå för 32% av CO₂-utsläppen [75]. Produktionen av biomassa bör alltså ligga nära de industrier som restbiomassan kommer från. En del företag som producerar restbiomassa använder den till produktion av biobränsle [4][76] och om den istället används till annat bör produktionen av biobränsle ses över. En brist på biobränsle skulle kunna innebära en större användning av fossila bränslen och det är därför viktigt att alternativ är implementerade som stödjer upp behovet när mängden tillgängligt biobränsle minskar.

5.3 Begränsningar och möjliga felkällor

Då koncentrationen av *M. thermophilus* stamlösning beräknades visade den sig vara så låg att den inte kunde användas i de efterföljande experimenten. En möjlig orsak skulle kunna vara att *M. thermophila* är en termofil art som växer optimalt vid 41-43°C [6]. De förberedande odlingarna inkuberades i ett rum med en temperatur på 30°C, vilket alltså är betydligt lägre än *M. thermophilus* optimala temperatur [6]. Stammen skulle kunna vara intressant att studera vidare eftersom dess termofila egenskaper skulle kunna vara till fördel vid en industriell odling. Vid odling i bioreaktorer produceras värme som i många fall behöver ledas bort, vilket inte skulle behövas i samma utsträckning med en termofil stam. Ytterligare en fördel med en högre temperatur är att det hindrar patogena organismer, som växer optimalt kring kroppstemperatur, från att växa. [77].

Likt hur alla odlingar gjordes vid samma temperatur valdes även ett pH-värde på 5.5 för samtliga medier. Alla undersökta stammar växte i pH 5.5 (Avsnitt 2.1.4) och många svamparter har visats överleva mellan stora pH-intervall [78]. Att undersöka pH vidare kan dock vara av intresse inför uppskalning då ett lägre pH tenderar att missgynna bakterier men påverkar filamentösa svampar mindre [78]. Både temperatur och pH för de utvecklade stammarna bör också undersökas ytterligare vid en uppskalning för att kunna optimera processen då pH för exempelvis rödlut uppmättes till runt 3.7 och krävde en del justering för att nå 5.5.

En möjlig felkälla som bör noteras är de beräkningar av sporkoncentrationer som utfördes inför flera laborativa moment. Beräkningarna gjordes endast en gång per lösning och utfördes av olika laboranter. Storleken på felet vid räkning med en Neubauer hemocytometer har uppskattats till 20-30% [79], vilket inkluderar pipetteringsfel, räknfel med mera. En normalisering av data gjordes för minska påverkan på resultatet från variationer i sporkoncentrationen, men kunde endast göras med den data som erhöles från Growth Profilern. Resultaten för övriga experiment, som odlingen i skakflaskor, kan därför ha påverkats av denna felkälla.

Ytterligare en felkälla som kan ha påverkat resultatet är hur Growth Profilern mäter tillväxten. Den analyserar botten av varje brunn i plattan vilket innebär att mycel som växer på kanterna eller i flera lager blir svårare att mäta [58]. Detta ger upphov till mätfel av tillväxthastigheterna. Även mängden producerad biomassa hos svamparna, som motsvarar höjden på kurvorna i graferna, kan bli missvisande då det inte går att säga exakt hur mycket svamp som växt i brunnen. Dock är mängden biomassa inte något som tas hänsyn till i utvärderingen då den viktigaste faktorn är tillväxthastigheten. Detta beror på att uppskalning i större odlingstankar sker med kontinuerlig odling i industrin.

6 Slutsats

Från ALE kan det konstateras att metoden kan användas för förbättring av tillväxt på medier, men att en längre exponeringstid och fler rundor antagligen krävs för ett tydligare resultat. UV-mutagenes visade sig vara en oförutsägbart men effektiv metod när få replikat och rundor användes och resulterade i en markant förbättrad koloni. Skalan på detta projekt var relativt liten, och på grund av de många kontamineringsfall som skedde under ALE, samt de små skillnaderna i tillväxthastighet var UV-mutagenes en mer effektiv metod än ALE. Utöver detta var en låg överlevnadsgrad avgörande för att få en mutation med betydande förändrad tillväxt.

Resultaten från odling i skakflaskor skiljde sig från den initiala screeningen av stammarna. Fermentationen i skakflaskorna är mer lik miljön i industrin och trots att HTS är effektiv för en gallring innehåller den bland annat agar som eventuellt påverkar tillväxten. Utöver tillväxthastigheten visade sig olika morfologier i skakflaskorna som mycel och pellets, vilka kan vara avgörande i industriella processer. Tillväxten på de fasta medierna tolkades visuellt. Samtliga stammar växte på både medium B och havrerester, men kaffesump verkade ha en inhiberande effekt. Några svampstammar växte på kaffesump, men märkbart mindre trots addition av glukos. Att odla på havrerester kan vara intressant att undersöka vidare som potentiell restström.

Idag pågår ett stort arbete med omställningen till ett mer hållbart samhälle. En viktig del i detta är livsmedelsindustrin, som står för stora utsläpp. Genom att använda restströmmar från industrier kan ett mer cirkulärt samhälle skapas och klimatpåverkan minskas. Även en minskad tillgång till jordbruksmark blir ett allt större problem när jordens befolkning ökar. En ökad odling i bioreaktorer skulle kunna bli en del av lösningen. Syftet att utveckla svampstammar för användning i livsmedelsindustrin samt utvärdering restströmmar uppnåddes. Det öppnar också upp för ytterligare forskning kring att utveckla vidare de intressanta mutanter som erhållits och fortsätta förbättra de filamentösa svampar som kan växa på andra restströmmar från industrin samt identifiera bra restmaterial som kan valoriseras i den fortsatta strävan efter en cirkulär ekonomi, där en del är valorisering av restbiomassa till protein med filamentösa svampar.

Referenser

- [1] Crippa, M. m.fl. "Food systems are responsible for a third of global anthropogenic GHG emissions". I: *Nature Food* 2.3 (2021), s. 198–209. DOI: 10.1038/s43016-021-00225-9.
- [2] Rischer, H., Szilvay, G. R. och Oksman-Caldentey, K.-M. "Cellular agriculture — industrial biotechnology for food and materials". I: *Current Opinion in Biotechnology* 61 (2020), s. 128–134. DOI: 10.1016/j.copbio.2019.12.003.
- [3] Maina, S., Kachrimanidou, V. och Koutinas, A. "A roadmap towards a circular and sustainable bioeconomy through waste valorization". I: *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry* 8 (2017), s. 18–23. DOI: 10.1016/j.cogsc.2017.07.007.
- [4] Tripathi, N. m.fl. "Biomass waste utilisation in low-carbon products: harnessing a major potential resource". I: *npj Climate and Atmospheric Science* 2.1 (2019), s. 35. DOI: 10.1038/s41612-019-0093-5.
- [5] Meyer, V. m.fl. "Growing a circular economy with fungal biotechnology: a white paper". I: *Fungal Biology and Biotechnology* 7.1 (2020), s. 5. DOI: 10.1186/s40694-020-00095-z.
- [6] Awasthi, M. K. m.fl. "Filamentous fungi for sustainable vegan food production systems within a circular economy: Present status and future prospects". I: *Food Research International* 164 (2023), s. 112318. DOI: 10.1016/j.foodres.2022.112318.
- [7] Cirkulär. <https://cirkular.bio/case/> [Internet], hämtad 30 januari 2023.
- [8] National Center for Biotechnology Information. *Furfural*. URL: %5Curl%7Bhttps://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/furfural#datasheet=LCSS%7D. [Internet], hämtad 2 maj 2023.
- [9] Galagan, J. E. m.fl. "Genomics of the fungal kingdom: Insights into eukaryotic biology". I: *Genome Research* 15 (2005), s. 1620–1631. DOI: 10.1101/gr.3767105.
- [10] Troiano, D., Orsat, V. och Dumont, M. J. "Status of filamentous fungi in integrated biorefineries". I: *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 117 (2020). DOI: 10.1016/j.rser.2019.109472.
- [11] Ángeles de Paz, G. m.fl. I: *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering*. Elsevier, 2023. Kap. 1 - World of fungi and fungal ecosystems, s. 1–29. DOI: 10.1016/B978-0-323-91872-5.00010-7.
- [12] Maheshwari, R. I: *Fungi : Experimental Methods in Biology, Second Edition*. 2. utg. Baton Rouge: Taylor & Francis Group, 2011. Kap. 1: The Hyphal Mode of Life.
- [13] Roberts, S. E. och Gladfelter, A. S. "Nuclear autonomy in multinucleate fungi". I: *Current Opinion in Microbiology* 28 (2015), s. 60–65. DOI: 10.1016/j.mib.2015.08.009.
- [14] Ángeles de Paz, G. m.fl. I: *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering*. Elsevier, 2023. Kap. 7 - Filamentous fungal morphology in industrial aspects, s. 197–217. DOI: 10.1016/B978-0-323-91872-5.00015-6.
- [15] Maheshwari, R. I: *Fungi : Experimental Methods in Biology, Second Edition*. 2. utg. Baton Rouge: Taylor & Francis Group, 2011. Kap. 7: Fungi as Chemical Factories.
- [16] Carris, L. M., Little, C. R. och Stiles, C. M. "Introduction to Fungi". I: *The Plant Health Instructor* (2012). DOI: 10.1094/PHI-I-2012-0426-01.
- [17] Walker, G. M. och White, N. A. "Introduction to Fungal Physiology". I: *Fungi*. John Wiley & Sons, Ltd, 2017. Kap. 1, s. 1–35. DOI: 10.1002/9781119374312.ch1.
- [18] Meletiadiis, J. m.fl. "Analysis of Growth Characteristics of Filamentous Fungi in Different Nutrient Media". I: *Journal of Clinical Microbiology* 39.2 (2001). DOI: 10.1128/JCM.39.2.478-484.2001.
- [19] Melgar, G. Z. m.fl. "Growth Curves of Filamentous Fungi for Utilization in Biocatalytic Reduction of Cyclohexanones". I: *Global Journal of Science Frontier Research Chemistry* 13.5 (2013).
- [20] Chu, D. och Barnes, D. J. "The lag-phase during diauxic growth is a trade-off between fast adaptation and high growth rate". I: *Scientific Reports* 6 (2016). DOI: <https://doi.org/10.1038/srep25191>.

- [21] Adour, L., Couriol, C. och Amrane, A. "Diauxic growth of *Penicillium camembertii* on glucose and arginine". I: *Enzyme and Microbial Technology* 36 (2005). DOI: <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2004.05.011>.
- [22] Semova, N. m.fl. "Generation, annotation, and analysis of an extensive *Aspergillus niger* EST collection". I: *BCM Microbiology* 6.7 (2006). DOI: 10.1186/1471-2180-6-7.
- [23] Agnihotri, V. P. "Studies on *Aspergilli* XVI. Effect of pH, temperature, and carbon and nitrogen interaction". I: *Mycopathologia et mycologia applicata* 24 (1946), s. 305–314. DOI: 10.1007/BF02053641.
- [24] Costa, C. P. m.fl. "Shedding light on *Aspergillus niger* volatile exometabolome". I: *Scientific Reports* 6.27441 (2016). DOI: 10.1038/srep27441.
- [25] Kaminskyj, S. G. W. "Fundamentals of growth, storage, genetics and microscopy of *Aspergillus nidulans*". I: *Fungal Genetics Newsletter* 48 (2001).
- [26] Singh, A. m.fl. "AccessOptimal Physical Parameters for Growth of *Trichoderma* Species at Varying pH, Temperature and Agitation". I: *Virology & Mycology* 3.1 (2014). DOI: 10.4172/2161-0517.1000127.
- [27] Chang, Y. och Wang, J. "A Study of the Optimal Condition for the Growth of *Aspergillus niger* (BCRC 31494, ATCC 10864)". I: (2018). DOI: 10.13140/RG.2.2.16695.16804.
- [28] Zinder, S. H., Sowers, K. R. och Ferry, J. G. "Methanosarcina thermophila sp. nov., a thermophilic, acetotrophic, methane-producing bacterium". I: *International Journal of Systematic Bacteriology* 35 (4 1985), s. 522–523. DOI: 10.1099/00207713-35-4-522.
- [29] Sutton, D. A., Rinaldi, M. G. och Sanche, S. E. I: *Clinical Mycology*. 2. utg. 2009. Kap. 14 - Dematiaceous Fungi. DOI: 10.1016/B978-1-4160-5680-5.X0001-1.
- [30] Fujii, I. "1.16 - Polyketide Biosynthesis in Filamentous Fungi". I: *Comprehensice Natural Products Chemistry* 1 (1999), s. 409–441. DOI: 10.1016/B978-0-08-091283-7.00016-3..
- [31] Błaszczyk, L. m.fl. "Trichoderma spp. - Application and prospects for use in organic farming and industry". I: *Journal of Plant Protection Research* 54 (jan. 2014). DOI: 10.2478/jppr-2014-0047.
- [32] Ugalde, U. O. och Castrillo, J. I. "Single cell proteins from fungi and yeasts". I: *Agriculture and Food Production*. Utg. av Khachatourians, G. G. och Arora, D. K. Vol. 2. Applied Mycology and Biotechnology. Elsevier, 2002, s. 123–149. DOI: 10.1016/S1874-5334(02)80008-9.
- [33] Thiviya, P. m.fl. "Single Cell Protein Production Using Different Fruit Waste: A Review". I: *Separations* 9.7 (2022). DOI: 10.3390/separations9070178.
- [34] Quorn. *Mycoprotein*. <https://www.quorn.se/mycoprotein> [Internet], hämtad 6 februari 2023.
- [35] Mycorena. *About Mycorena*. <https://mycorena.com/about-us> [Internet], hämtad 8 maj 2023.
- [36] Millow. *Millow*. <https://millow.co/> [Internet], hämtad 8 maj 2023.
- [37] Karimi, S., Ferreira, J. A. och Taherzadeh, M. J. "Filamentous fungi as animal and fish feed ingredients". I: *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering*. Elsevier, 2023, s. 399–433. DOI: 10.1016/B978-0-323-91872-5.00002-8.
- [38] Malcorps, W. m.fl. "The Sustainability Conundrum of Fishmeal Substitution by Plant Ingredients in Shrimp Feeds". I: *Sustainability* 11.4 (2019), s. 1212. DOI: 10.3390/su11041212.
- [39] Marin, F. R. m.fl. "Protecting the Amazon forest and reducing global warming via agricultural intensification". I: *Nature Sustainability* 5.12 (2022), s. 1018–1026. DOI: 10.1038/s41893-022-00968-8.
- [40] News European Parliament. *Circular economy: definition, importance and benefits*. <https://www.europarl.europa.eu/news/en/headlines/economy/20151201ST005603/circular-economy-definition-importance-and-benefits> [Internet], hämtad 6 februari 2023. 2015.
- [41] Council, E. A. S. A. *Multi-functionality and sustainability in the European Union's forests*. 2017. ISBN: 9783804737280.
- [42] Wendt, L. M. m.fl. "Exploring filamentous fungi depolymerization of corn stover in the context bioenergy queuing operations". I: *Food and Energy Security* 11 (1 febr. 2022). ISSN: 2048-3694. DOI: 10.1002/fes3.333.
- [43] Ferreira, J. A. m.fl. *Production of Rhizopus sp. from SSL*. 2012, s. 173–188.

- [44] Crook, N. och Alper, H. S. "Classical Strain Improvement". I: *Engineering Complex Phenotypes in Industrial Strains*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., okt. 2012, s. 1–33. DOI: 10.1002/9781118433034.ch1.
- [45] Livsmedelsverket. *Genmodifierad mat, GMO*. <https://www.livsmedelsverket.se/livsmedel-och-innehall/genmodifierad-mat-gmo?AspxAutoDetectCookieSupport=1> [Internet], hämtad 8 maj 2023.
- [46] Eurobarometern. *Europeans and Biotechnology in 2010*. <https://europa.eu/eurobarometer/surveys/detail/755> [Internet], hämtad 8 maj 2023.
- [47] Kun, R. S. m. fl. "Developments and opportunities in fungal strain engineering for the production of novel enzymes and enzyme cocktails for plant biomass degradation". I: *Biotechnology Advances* 37 (6 2019), s. 107361. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.02.017>.
- [48] Dragosits, M. och Mattanovich, D. "Adaptive laboratory evolution – principles and applications for biotechnology". I: *Microbial Cell Factories* 12 (64 2013). DOI: 10.1186/1475-2859-12-64.
- [49] Sandberg, T. E. m. fl. "The emergence of adaptive laboratory evolution as an efficient tool for biological discovery and industrial biotechnology". I: *Metabolic Engineering* 56 (2019), s. 1–16. DOI: 10.1016/j.ymben.2019.08.004.
- [50] Tillich, U. M. m. fl. "The Optimal Mutagen Dosage to Induce Point-Mutations in *Synechocystis* sp. PCC6803 and Its Application to Promote Temperature Tolerance". I: *PLoS ONE* 7.11 (2012). DOI: 10.1371/journal.pone.0049467.
- [51] Nevalainen, K. M. H. "Strain improvement in filamentous fungi-an overview". I: *Applied Mycology and Biotechnology* 1 (2001). DOI: 10.1016/S1874-5334(01)80013-7.
- [52] Kun, R. S. m. fl. "Developments and opportunities in fungal strain engineering for the production of novel enzymes and enzyme cocktails for plant biomass degradation". I: *Biotechnology Advances* 37 (6 2019), s. 107361. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2019.02.017.
- [53] Mayr, L. M. och Bojanic, D. "Novel trends in high-throughput screening". I: *Current Opinion in Pharmacology* 9.5 (2009), s. 580–588. DOI: 10.1016/j.coph.2009.08.004.
- [54] Singer Instrument. *What is High-Throughput Screening?* <https://www.singerinstruments.com/resource/what-is-high-throughput-screening/?v=f003c44deab6> [Internet], hämtad 14 april 2023. 2015.
- [55] Faisal Bokhari, F. och Albukhari, A. "Design and Implementation of High Throughput Screening Assays for Drug Discoveries". I: *High-Throughput Screening for Drug Discovery*. IntechOpen, 2022. DOI: 10.5772/intechopen.98733.
- [56] Bean, G. J. m. fl. "Development of Ultra-High-Density Screening Tools for Microbial "Omics"". I: *PLoS ONE* 9.1 (2014), e85177. DOI: 10.1371/journal.pone.0085177.
- [57] Enzysscreen. *Growth Profiler*. <https://enzyscreen.com/article/growth-profiler/> [Internet], hämtad 12 april 2023.
- [58] Lennen, R. M. m. fl. "Transient overexpression of DNA adenine methylase enables efficient and mobile genome engineering with reduced off-target effects". I: *Nucleic Acids Research* 44.4 (2016), e36–e36. DOI: 10.1093/nar/gkv1090.
- [59] Ealumalai, P. *Important Protocols*. 2023.
- [60] Sandberg, T. E. m. fl. "Laboratory Evolution to Alternating Substrate Environments Yields Distinct Phenotypic and Genetic Adaptive Strategies". I: *Evolutionary and geno,ic microbiology* 83 (13 2017). DOI: /10.1128/AEM.00410-17.
- [61] Britannica. *Pure culture*. <https://www.britannica.com/science/pure-culture> [Internet], hämtad 10 maj 2023.
- [62] Peng, Z.-Q. m. fl. "Cellulase production and efficient saccharification of biomass by a new mutant *Trichoderma afroharzianum* MEA-12". I: *Biotechnology for Biofuels and Bioproducts* 14 (219 2021). DOI: 10.1186/s13068-021-02072-z.
- [63] Patyshakuliyeva, A. m. fl. "Improving cellulase production by *Aspergillus niger* using adaptive evolution". I: *Biotechnology Letters* 38 (2016), s. 969–974. DOI: 10.1007/s10529-016-2060-0.
- [64] Lubbers, R. m. fl. "Evolutionary adaptation of *Aspergillus niger* for increased ferulic acid tolerance". I: *J Appl Microbiol.* 128 (3 2020), s. 735–746. DOI: 10.1111/jam.14505.

- [65] Kramer, A. m.fl. "Development and Validation of a Fast and Optimized Screening Method for Enhanced Production of Secondary Metabolites Using the Marine Scopulariopsis brevicaulis Strain LF580 Producing Anti-Cancer Active Scopularide A and B". I: *PLOS one* 9 (7 2014). DOI: 10.1371/journal.pone.0103320.
- [66] Yi, M.-H. m.fl. "Characterization of a mutant strain of a filamentous fungus Cladosporium phlei for the mass production of the secondary metabolite phleochrome". I: *The Journal of Microbiology volume* 49 (2011), s. 680–683. DOI: 10.1007/s12275-011-1022-4.
- [67] Irfan, M., Javed, J. och Syed, Q. "UV mutagenesis of Aspergillus niger for enzyme production in submerged fermentation". I: *Pakistan Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 44 (4 2011). ISSN: 1681-4525, hämtad 4 maj 2023, s. 137–140.
- [68] Asadollahzadeh, M. m.fl. "Production of fungal biomass protein by filamentous fungi cultivation on liquid waste streams from pulping process". I: *BioResources* 13 (3 maj 2018), s. 5013–5031. DOI: 10.15376/biores.13.3.5013-5031.
- [69] Arminsén, R. och Gaiatas, F. I: *Handbook of Hygrocolloids (Second edition)*. 2009. Kap. 4 - Agar, s. 82–107.
- [70] Huth, I., Schrader, J. och Holtmann, D. "Microtiter plate-based cultivation to investigate the growth of filamentous fungi". I: *Engineering in Life Sciences* 17 (10 okt. 2017), s. 1064–1070. DOI: 10.1002/elsc.201700041.
- [71] Enshasy, H. A. E. "Fungal morphology: a challenge in bioprocess engineering industries for product development". I: *Current Opinion in Chemical Engineering* 35 (mars 2022), s. 100729. ISSN: 22113398. DOI: 10.1016/j.coche.2021.100729.
- [72] Asadollahzadeh, M. T. m.fl. "Ethanol and Biomass Production from Spent Sulfite Liquor by Filamentous Fungi". I: *International Journal of Agricultural and Biological Engineering* 11 (10 2017). Hämtad 2 maj 2023.
- [73] Costa Souza, P. N. da m.fl. "Production and chemical characterization of pigments in filamentous fungi". I: *Microbiology* 162 (1 2016). DOI: 10.1099/mic.0.000168.
- [74] Barbero-López, A. m.fl. "Activity of spent coffee ground cinnamates against wood-decaying fungi in vitro". I: *BioResources* 13 (3 juli 2018), s. 6555–6564. DOI: 10.15376/biores.13.3.6555-6564.
- [75] Fan, Y. V. m.fl. "A review on air emissions assessment: Transportation". I: *Journal of Cleaner Production* 194 (2018), s. 673–684. DOI: 10.1016/j.jclepro.2018.05.151.
- [76] YinPin. *Fråga oss om Tofu*. <https://yipin.se/faq/> [Internet], hämtad 4 maj 2023.
- [77] Parker, N. m.fl. I: *Microbiology*. OpenStax, 2017. Kap. 9.4 Temperature and Microbial Growth.
- [78] Pitt, J. I. och Hocking, A. D. I: *Fungi and Food Spoilage*. 3. utg. Springer Science, 2009. Kap. 2.2 Hydrogen Ion Concentration. DOI: 10.1007/978-0-387-92207-2.
- [79] Sciences, E. M. *Neubauer Haemocytometry*. <https://www.emsdiasum.com/docs/technical/datasheet/68052-14> [Internet], hämtad 28 april 2023.

A Bilaga A

A.1 Harvesting Spores from Agar plates

Open the plate with spores inside the LAF bench under sterile conditions

- Pipette 10 mL sterile milliQ water carefully to the plate
- Scrape the spores carefully using a T-cell spreader
- Draw the spore solution carefully using the 10 mL serological pipette and filter them using 2 layers of sterile Mira Cloth into a 50 mL tube.
- Wash the spores with 0.8% NaCl solution, followed by sterile water by spinning down the spores in a centrifuge at 4000 RPM, 5 minutes.
- Make a glycerol stock of the spore by adding 40% glycerol in 1:1 ratio.

A.2 Counting Spores using a Neubauer chamber

- Transfer 50 uL spore solution to a 1 mL tube and dilute them 10x/100x with sterile milliQ water.
- Pipette 5 uL to each chamber of the Neubauer chamber, slide the coverslip carefully (avoid air bubble formation).
- Place the Neubauer chamber under the light microscope under 10X objective to facilitate localization of the grid (as below image)
- Start counting the spores in the large squares (3 squares diagonally works well, highlighted in red). Note: If there are spores on the line, then count the spores on the top and left lines of the square. (Not on the bottom and right lines of the square)
- Find the spore concentration using the formula:

$$\text{Spore concentration (spores/ml)} = \frac{\text{Number of spores counted} \times \text{dilution factor} \times 10,000}{\text{Number of large squares counted}} \quad (\text{A.E2})$$

A.3 UV Mutagenesis

- To a small petri dish transfer 5.9 mL of sterile water and then pipette 100 uL of spore solution (spore concentration 10^5 spores/mL).
- Seal the petri plate with parafilm
- Irradiate the spores to high intensity UV transilluminator for 30, 60, 120, 150, 180 and 210 seconds.
- Dilute the UV exposed spore solution with sterile milliQ water and then plate 100 spores on PDA plates.
- Also prepare a Control plate with WT strain by plating 10 spores on PDA plate. (The spore solution is diluted 10 times compared to the UV treated spores, this is because you can count the number of colonies formed easily)
- Incubate the plates at 30°C in the dark for a week.
- Calculate the survival rate:

$$\text{Survival rate (\%)} = \frac{\text{Number of colonies formed in UV exposed plate}}{\text{Number of colonies formed in Wild Type plate} \times 10} \times 100 \quad (\text{A.E3})$$

- The colonies from the plate with lowest survival rate (less than 1%) is then characterized

A.4 Adaptive Laboratory Evolution in Solid Media

Media preparation: Take a sterile (autoclaved) 100 mL bottle, inside the LAF bench replace the bottle cap with Rapid-flow filter unit. Transfer 50 mL SSL to the filter unit and then move it to the fume hood to vacuum filter the media.

Prepare 2% agar and autoclave. Heat the filtered SSL + salts in the microwave and then mix the agar. Say to prepare SSL20 agar, make SSL40 media and heat it in microwave, then mix equal parts of agar and SSL40 to make the final media concentration of SSL20.

Take 96 well growth profiler plate, pipette 100 μ L of freshly prepared media carefully, try to avoid the formation of air bubbles.

Sporulation:

Transfer 6000 spores to the first column (A1 – C1; E1 – G1) of the 96 well plate. Place the plates in the growth profiler and incubate the plate for 5-6 days.

ALE: Round 1 – Round 3

Pipette 50 μ L sterile milliQ water to harvest the spores from the previous round and then inoculate 10 μ L in well with fresh media. And incubate the plate in Growth profiler for 5-6 days (for every round of ALE)

Round 1: SSL30

Round 2: SSL40

Round 3: SSL50

Purification:

- Harvest spores from round 3 (SSL50) wells and then count the spore concentration.
- Dilute the spore solution and plate 10 spores on a PDA plate, after incubating the plate for 2-3 days
- When you see small colonies, pick individual colonies using a sterile inoculation loop/tooth pick and plate them in a separate plate and incubate the plate for 4-5 days.
- Harvest the spores from each plate and then evaluate them.

Evaluation: For evaluation prepare SSL40 agar and Mannose media (with FBM salts), inoculate 6000 spores to each well (include triplicates), include WT spores as control. Incubate the plates in Growth profiler for 4-5 days.

A.5 Shake flask culture and harvesting biomass

- Prepare SSL50 media and transfer 50 mL media to a 250 mL baffled flask.
- Inoculate 10^7 spores and incubate the shake flasks at 30°C, 200 RPM for 58-62 hours.
- After culturing for 58-62 hours, sterilize the flasks by autoclaving.
- For harvesting the biomass, cut Mira cloth into small circles of 4 cm in diameter. Place the cloths in the desiccator for 4-5 hours/overnight. Then weigh the empty Mira cloth.

- Place a layer of double folded Mira-cloth and on top of that place the weighed one. Clamp the filter cup to the vacuum filtration apparatus as shown below. Connect the apparatus to the vacuum line and filter the biomass.
- Place the wet biomass in the 65°C oven for upto 1 hour and then keep them in the desiccator overnight.
- Weigh the biomass using a scale.

IMPORTANT: While performing these experiments always include a Control (WT) and 3 replicates.

Note: If you are sending the biomass for protein analysis then scale up the culture volume to 300 mL in a 2L baffled flask. 0.5 g of dry biomass will be sent for protein analysis.

A.6 Media Preparation

SSL50 – here 50 means the concentration of SSL i.e., 50% of SSL and the rest includes salts + sterile milliQ water.

SSL50 medium

- Resuspend thoroughly the SSL in the tank (make sure it is properly thawed)
- Take a 500 ml aliquot from the container under a sterile bench.
- Sterilise the pH meter (water, EtOH, water) and adjust to relevant pH with NH₄OH.
- Add salt solutions to these final concentrations:
 - (NH₄)₂SO₄ 5 g/L
 - MgSO₄*7H₂O 0.5 g/L
 - CaCl₂ 0.1 g/L
 - KH₂PO₄ 5 g/L
- Top up volume to 1 L using a sterile graded column.
- Store at 4°C, use in less than a week.

SSL50 Agar medium

- Prepare 2% agar solution and Autoclave at 121°C.
- Transfer 100 mL of SSL to 500 mL Rapid-Flow filter units under LAF bench and then vacuum filter the SSL.
- To the agar, add adequate amount of salt solutions (salt concentration same as above) and then mix equal volume of SSL100 and agar solution to make a SSL50 agar medium.

NOTE: For the salt solution prepare a stock solution:

- (NH₄)₂SO₄ - (10x) 5 g dissolved in 100 mL milliQ water and the pH adjusted to 5.5
- KH₂PO₄ - (10x) 5g dissolved in 100 mL milliQ water and the pH adjusted to 5.5
- CaCl₂ - (100x) 1 g dissolved in 100 mL milliQ water
- MgSO₄*7H₂O - (100x) 5 g dissolved in 100 mL milliQ water
- *pH is adjusted to 5.5 using NH₄OH

Salt Solutions	SSL50 (mL)
(NH ₄) ₂ SO ₄	10
KH ₂ PO ₄	10
CaCl ₂	1
MgSO ₄	1
SSL	50
Sterile water	up to 100

PDA Transfer 19.5 g of PDA to a 500 mL Pyrex bottle and add milliQ water up to 500 mL followed by heat sterilizing at 121°C.

FBM

- (NH₄)₂SO₄ - (10x) 13.6g dissolved in 100 mL milliQ water and the pH adjusted to 5.5
- KH₂PO₄ - (10x) 4g dissolved in 100 mL milliQ water and the pH adjusted to 5.5
- CaCl₂ - (100x) 8g dissolved in 100 mL milliQ water
- MgSO₄ · 7 H₂O - (100x) 6 g dissolved in 100 mL milliQ water
- Glucose (10x) - 20g in 100 mL milliQ water

All the reagents are sterilized by autoclaving at 121°C.

Salt Solutions	FBM (mL)
(NH ₄) ₂ SO ₄	10
KH ₂ PO ₄	10
CaCl ₂	1
MgSO ₄	1
Glucose	10
Trace elements	1
Sterile water	up to 100

Preparing Growth Profiler plate:

Prepare SSL Agar as described above (based on the required SSL concentration, dilute it with sterile water before adding the agar).

Transfer 200 uL of SSL Agar carefully to each wells (Best practice is to hold the pipette perpendicular to the plate and not touching the pipette tip to the walls of the well).

B Bilaga B

Sockerinnehåll i tre av odlingsmedierna som tillhandahållits av Cirkulär AB. Analysen av medium B är gjord på en blandning av den fasta och flytande delen.

Socker i rödlut	Koncentration (g/L)
Glucose	2.5
Xylose	2.7
Galactose	0.5
Arabinose	0.0
Mannose	5.3
Sum	4.72

Socker i medium A	Andel (%) av totala mängden socker
Proteiner	39.6
Lignin ¹	15
Cellulosa	13
Hemicellulosa ²	24
Monosackarider	5
Aska	4

¹ Lignin: varav Klason lignin 7.5% och syralösligt lignin 11.8%

² Hemicellulosa: varav arabionos 7.7%, Xylos 13.0% + Mannos 2.4% och Galactos 0.9%)

Socker i medium B	Koncentration (g/kg)
Arabinos	0.67
Galaktos	3.8
Glukos	8.5
Xylos	8.6
Mannos	19.6
Sum	41.17

C Bilaga C

Kod för analys av data från Growth Profilern tillhandahållen av handledare.

```
library(tidyverse) #for data manipulation and visualization library(ggpubr) #: creates
  easily a publication ready-plot
#Loading of data. Make sure there is one time column, followed by data columns with unique
  names.
data <- readxl::read_excel("~/R/Screening liq.xlsx", sheet = 1 ,col_names = TRUE) data_X <-
  data[1]
data_Y <- data[(2):ncol(data)]
#base e log transforms data
logdata <- cbind(data_X, log(data_Y))
#number of time points to plot trendlines over
t=5
#makes a regression line over t consecutive time points for each time point bar the last few
  (given by t-1) and saves
#slope in matrix "modslope", intersect in "modinter" and r-squared in modr.
  modslope=matrix(data=0,nrow=(nrow(logdata)-(t-1)),ncol=ncol(logdata)-1)
  modinter=matrix(data=0,nrow=(nrow(logdata)-(t-1)),ncol=ncol(logdata)-1)
  modr=matrix(data=0,nrow=(nrow(logdata)-(t-1)),ncol=ncol(logdata)-1)
for (j in 1:(ncol(logdata)-1)) {
for (i in 1:(nrow(logdata)-(t-1))) {
modtemp = lm(logdata[i:(i+(t-1)),(j+1)]~logdata[i:(i+(t-1)),1]) modslope[i,j] =
  modtemp$coefficients[2]
modinter[i,j] = modtemp$coefficients[1]
modr[i,j] = summary(modtemp)$r.squared
} }
#adding column names
colnames(modslope) <- paste(colnames(logdata[,2:ncol(logdata)]),"u",sep="_")
  colnames(modinter) <- paste(colnames(logdata[,2:ncol(logdata)]),"inter",sep="_")
  colnames(modr) <- paste(colnames(logdata[,2:ncol(logdata)]),"r2",sep="_")
#gather growth data in one matrix
mod = cbind(modslope, modinter, modr)
#sort by column names
mod <- mod[, order((colnames(mod)))]
# add time column
time=logdata[1:(nrow(logdata)-t+1),1] mod = cbind(time, mod)
#extract  $\mu$ , intercept, r2 and time for the 5 highest growth rates.
savedata <- 0
for (c in 1:(ncol(mod)-1)) {
pos <- sort(mod[, (1+3*c)], index.return=TRUE, decreasing=TRUE) pos$ix[2]
savedata <- cbind(savedata,mod[pos$ix[1:5],c(1,(3*c-1):(3*c+1))])
}
save excel doc #write.csv(savedata, file=".csv")
#matplot(mod[,1],mod[,4], type = "b",pch=1,col = 1:3,ylim =range(-.1,.2))
  #matplot(logdata[(a+1):b], type = "b",pch=1,col = 1:3,ylim =range(-4,-2))
```
