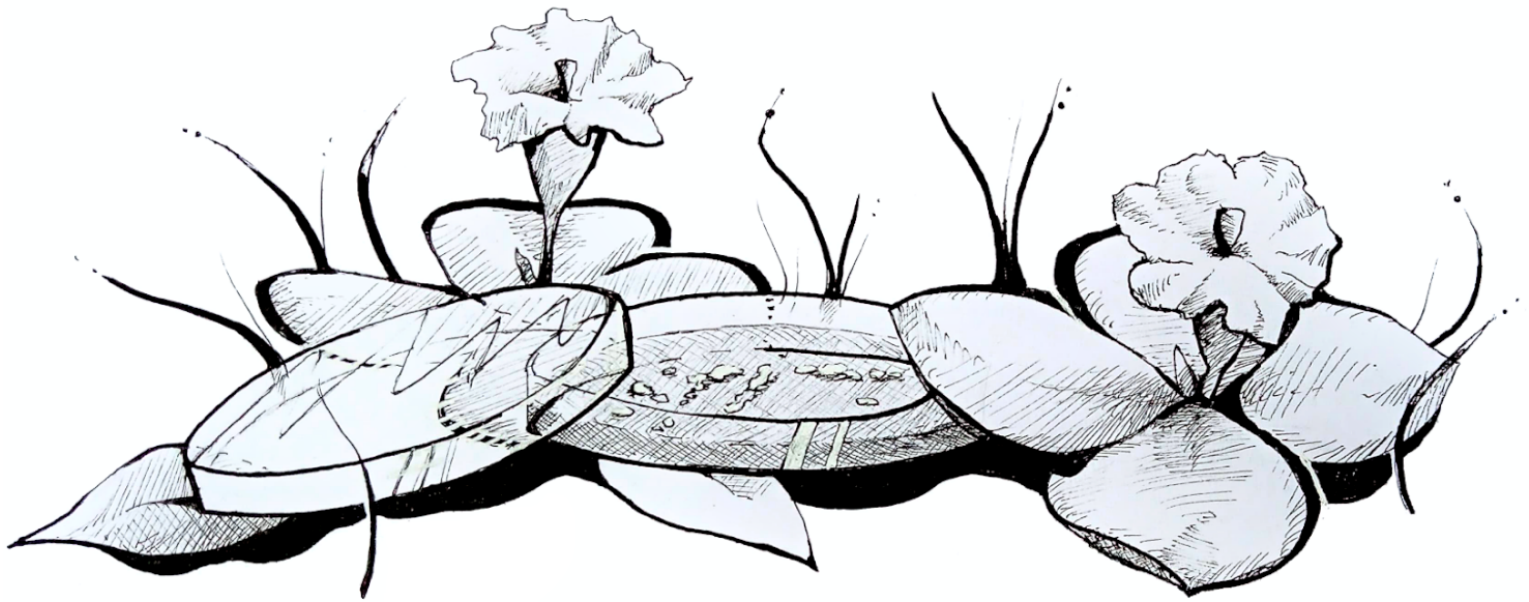




CHALMERS



Artbestämning och karaktärisering av laktosväxande vild jäst från Nigeria

Examensarbete inom högskoleingenjörsprogrammet kemiteknik

Gelmy Bellot Avendaño
Johanna Good

INSTITUTIONEN FÖR BIOLOGI OCH BIOTEKNIK

CHALMERS TEKNISKA HÖGSKOLA

Göteborg, Sverige 2022

www.chalmers.se

Abstract

During cheese production, whey is a residual product, containing disaccharide lactose and other nutrients and minerals. Large quantities of whey must be disposed of yearly, which becomes costly since it requires further processing. The possibility of using microorganisms to convert this cheap and available resource into valuable bioproducts is an attractive approach. However, few known yeasts can perform this task without extensive genomic engineering. The discovery of yeast species that naturally produce valuable biochemicals could increase the value of whey in the industry. Therefore, from a large collection of wild Nigerian yeast isolates, our research sought to identify new yeast species that can grow on lactose.

This was done by identifying species with DNA sequence data from a collection of ~6000 wild Nigerian yeast strains, where ~230 were found to grow on lactose. One representative isolate from 15 selected species was chosen for cultivating, HPLC-analysis, and literature review. The species were selected based on findings in literature such as usage in industry, bioproduct formation and biohazard level. The selected species include *Apiotrichum mycotoxinovorans*, *Candida orthopsilosis*, *Candida pseudointermedia*, *Clavispora lusitaniae*, *Cutaneotrichosporon curvatum*, *Cyberlindnera fabianii*, *Kodamaea ohmeri*, *Meyerozyma caribbica*, *Meyerozyma carpophila*, *Moesziomyces antarcticus*, *Papiliotrema flavescens*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Trichosporon insectorum*, *Vishniacozyma taibaiensis* and *Yarrowia lipolytica*.

The literature research of this study revealed that all yeast species may have industrial potential, but more research is needed, especially for *C. pseudointermedia*, *M. carpophila* and *V. taibaiensis*, for which information was lacking. Species that produced fatty lipids deemed of special interest, due to the potential for future use in biotechnology. The result from the cultivation showed that half of the species grew well on lactose medium, which was backed up by the HPLC analysis. *M. antarcticus* was the only species which had greater growth in lactose medium than in glucose medium, and which also, shown through the HPLC analysis, produced products that differed from other species.

Although a few species showed good potential, further research is needed to determine if the species is suitable for future industrial usage.

Förord

Stort tack till vår handledare Karl Persson för allt stöd och uppmuntran, vilket har lett till att vi lärt oss så mycket. Vi tackar också vår examinator Cecilia Geijer som inspirerade oss med lärorika föreläsningar och gav oss möjlighet till detta examensarbete. Slutligen, tack till Cecilias grupp, samt alla andra på IndBio som tog så väl hand om oss.

Innehållsförteckning

1. INTRODUKTION	5
1.1. BAKGRUND	5
1.2. INTERN TRANSKRIBERAD SPACER (ITS)	6
2. SYFTE	6
3. AVGRÄNSNINGAR	6
4. METOD	7
4.1. BIOINFORMATISK UNDERSÖKNING AV ITS-REGIONEN MED BLAST	7
4.2. LITTERATURSTUDIE	7
4.3. INSAMLING AV VILD JÄST FRÅN HÖBAL	9
4.4. TILLVÄXTFENOTYPNING	10
4.4.1. <i>RotorHDA och Scan-o-matic</i>	10
4.4.2. <i>Aquila</i>	10
4.5. ODLING	10
4.5.1. <i>Jäst från Nigeria</i>	10
4.5.2. <i>Isolering av jäst från höbal</i>	12
4.6. RENSTRYKNING	13
4.6.1. <i>Lac196 – Clavispora lusitaniae</i>	13
4.6.2. <i>Jäst från höbal</i>	13
4.7. PCR	14
4.7.1. <i>DNA extraktion med koloni PCR</i>	14
4.7.2. <i>Polymeraskedjereaktion (PCR)</i>	14
4.7.3. <i>PCR-rening, jäst från höbal</i>	14
4.7.4. <i>Gel-elektrofores</i>	15
4.8. ARKIVERING I GLYCEROL	15
4.9. HPLC	16
5. RESULTAT	17
5.1. BIOINFORMATISK UNDERSÖKNING AV ITS-REGIONEN MED BLAST	17
5.2. SCAN-O-MATIC	18
5.3. AQUILA	19
5.4. GEL-ELEKTROFORES	21
5.5. LITTERATURSTUDIE & MORFOLOGI	22
5.5.1. <i>Apiotrichum mycotoxinovorans</i>	22
5.5.2. <i>Candida orthopsilosis</i>	23
5.5.3. <i>Candida pseudointermedia</i>	24
5.5.4. <i>Clavispora lusitaniae</i>	25
5.5.5. <i>Cutaneotrichosporon curvatum</i>	26
5.5.6. <i>Cyberlindnera fabianii</i>	27
5.5.7. <i>Kodamaea ohmeri</i>	28
5.5.8. <i>Meyerozyma caribbica</i>	29
5.5.9. <i>Meyerozyma carpophila</i>	30
5.5.10. <i>Moesziomyces antarcticus</i>	31
5.5.11. <i>Papiliotrema flavescens</i>	32
5.5.12. <i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	33
5.5.13. <i>Trichosporon insectorum</i>	34
5.5.14. <i>Vishniacozyma taibaiensis</i>	35
5.5.15. <i>Yarrowia lipolytica</i>	36
5.5.16. <i>Jäst från höbal - Wickerhamomyces anomalus</i>	37
5.6. HPLC	39
6. DISKUSSION	41
6.1. BIOINFORMATIKS UNDERSÖKNING AV ITS-REGIONEN MED BLAST	41
6.2. LITTERATURSTUDIE	41
6.3. TILLVÄXTKURVOR	41

6.3.1.	<i>Scan-o-matic</i>	41
6.3.2.	<i>HPLC.....</i>	42
6.3.3.	<i>Faktorer som påverkar tillväxt.....</i>	43
6.4.	FÖRBÄTTRINGSFÖRSLAG	44
7.	SLUTSATS	45
	KÄLLFÖRTECKNING	46
	BILAGA 1: SÖKHISTORIK	58
	BILAGA 2: JÄSTÖVERSIKT	61
	BILAGA 3: BLAST	63
	BILAGA 4: RECEPT FÖR YPD-MEDIUM, SAMT AGARPLATTOR	68
	BILAGA 5: RECEPT FÖR DELFT LACTOSE & DELFT GLUCOSE MEDIUM	69

1. Introduktion

Vassle är en biprodukt vid tillverkning av ost. När löpe-enzym tillsätts i den sen innan syrade mjölken, binds det till kaseinet som koagulerar, dvs stelnar. Kvar blir en ostmassa som "skär" sig från den övriga vätskan, som kallas vassle [1] och här samlas i princip all laktos, vilket gör ost mer eller mindre helt laktosfri. Traditionellt sett används spill-vasslen till kok av messmör och liknande sötostar [2]. I nutid används vassle i en rad produkter som finns tillgängliga, så som proteinpulver, skyr och djurfoder, men fortfarande, i och med den industrialiserade osttillverkningen, produceras årligen stora mängder överskott på vassle som går till spillo [3].

Vasslen innehåller förutom vatten, höga halter av laktos, fruktos, proteiner, samt mjölksyra och borde därför lämpa sig alldeles utmärkt för att användas i produktionen av tex biokemikalier. I utvecklingen mot ett hållbart samhälle, där mjölkindustrin redan har ett så pass stort ekologiskt fotavtryck bör en sådan tillgång inte gå förlorad [4]. Här kommer cellfabriken som även kallas jäst in. *Saccharomyces cerevisiae* är vad man också kallar "bagerijäst" och det är den vanligaste jästen att använda inom industrin. Inom till exempel bageri och vinjäsning har den använts i hundratals, om inte tusentals år [5].

Förutom *S. cerevisiae* finns ca 2000 andra kända jästarter [6], där de flesta är harmlösa för människor och miljö. Troligtvis finns det ytterligare ett mycket stort antal oupptäckta arter. Olika arter innebär olika egenskaper och olika förmågor att klara olika förhållanden och växtmedier vilket gör det extra intressant att leta efter, och undersöka nya arter från naturen. Problemet med jäst är att den normalt sett saknar enzymer för att bryta ner laktos eller galaktos, vilket gör att jäst med andra ord normalt sett inte kan använda laktos som energikälla. Här kommer den här studiens syfte in. För att använda laktos till dess fulla potential som kolkälla behövs nya cellfabriker som effektivt kan leva och omvandla vassle till användbar produkt. Ungefär 6000 jästisolat har samlats från Nigeria och dessa har testats för tillväxt på laktos. Cirka 230 av dessa ursprungliga 6000 har visat sig kunna växa på medium med laktos, och av dessa 230 kunde 187 kulturer DNA-sekvenseras tillräckligt bra för att en sökning på en DNA databas kunnat göras. Dessa 187 kulturer visade sig bestå av totalt 32 olika arter av jäst av varierande förekomst. Av dessa 32 arter valdes 15 stammar ut för en litteraturstudie samt för odling på labb.

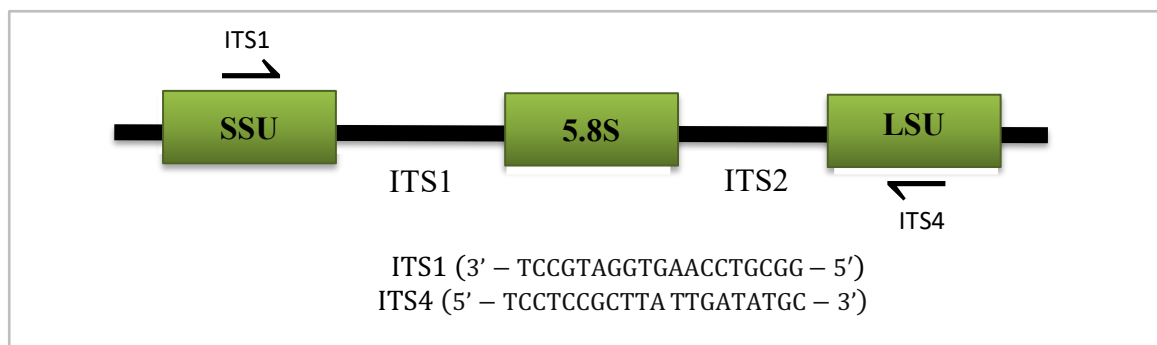
1.1. Bakgrund

Varje år produceras ungefär 108 ton vassle i världen. Vassle består till 5% av laktos vars beståndsdelar är glukos och galaktos. Vidare har vassle en hög biokemisk förbrukning vilket innebär att det förbränns mycket syre vid nedbrytningen av det, och det krävs ytterligare behandling innan det kan släppas ut som avloppsvatten. Denna process blir mycket kostsam och skapar därför intresset av att använda den överflödiga vasslen till något annat, som till exempel till att producera biokemikalier med vassle som råvara [7].

S. cerevisiae tillsammans med ett fåtal andra jästarter står för den främsta produktionen av biotekniska produkter inom industrier så som biofarmaci, mat och dryck samt bioetanol. Trots dess rikliga tillämpningar har *S. cerevisiae* sina begränsningar, vilket lämnar mycket utrymme för utveckling [8]. Nästa utvecklingsfas är att utnyttja och producera andra förnybara och ekonomiskt lönsamma kolkällor för tillverkningen av biokemikalier, biobränslen och biomaterial. Det är där icke-konventionella jästarter (ICJ), d.v.s. jästarter som innefattar alla arter som inte är *S. cerevisiae*, blir relevanta då många de inte är utforskade ännu. Man ser många fördelar med dessa eukaryota organismer, exempelvis deras märkvärdiga motstånd till utmanande förhållanden, såsom termiska, osmotiska samt tillsättning av inhibitorer, med mera [9].

1.2. Intern transkriberad spacer (ITS)

ITS-regionen kan liknas vid ett fingeravtryck då det är en specifik del i DNA-genomet som har bevarats under evolutionen. Närmare besläktade svampar har mer likartade DNA sekvenser, medan evolutionen förändrat DNA sekvensen mer vid längre evolutionära distanser. Denna region befinner sig mellan 18S (SSU) och 28S (LSU) i nrDNA-enheten, den består utav ITS1 och ITS2-regionen som separeras utav 5.8S genen. Det finns ett flertal primers som kan användas vid amplifiering beroende på vilken del av ITS-regionen man är intresserad av. I denna studie används både ITS1 och ITS4 (se Figur 1. för primersekvens) varav den första är framåtriktad och löper från 3' till 5', medan den andra är omvänd och riktar sig i motsatt riktning [10]. Dessa primers är universella för alla eukaryota organismer, då de binder till de konserverade regionerna för att sedan amplifiera de icke-konserverade regionerna mellan.



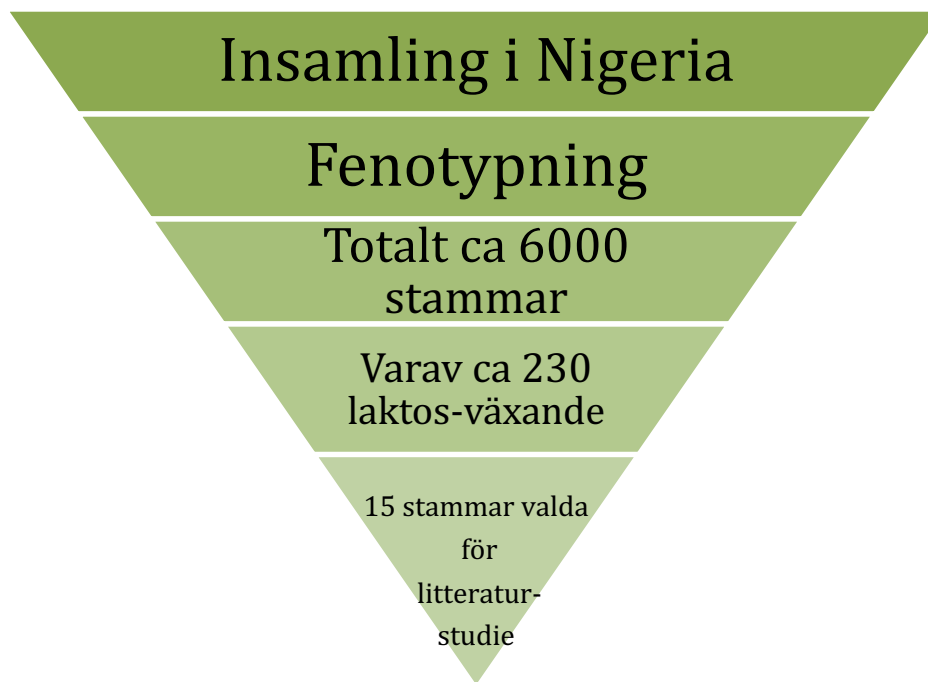
Figur 1. ITS-regionen med primers som används i denna studie samt deras respektive primersekvens.

2. Syfte

Syftet med examensarbetet är att identifiera arter utifrån DNA-sekvensdata, välja ut och utföra en litteraturstudie av utvalda vilda jäststammar från Nigeria, samt karaktärisering och odling av dessa för att finna intressanta metaboliter vid odling på laktos med hjälp av HPLC.

3. Avgränsningar

Avgränsningar för arbetet illustreras i Figur 2. Från den ursprungliga insamlingen av jästarter i Nigeria samlades cirka 6000 vilda jäststammar in. Av dem växte ungefär 230 stammar på laktos och den här rapporten presenterar ett urval på 15 arter från de ursprungliga 6000 stammarna. Endast jästarter som visat sig kunna växa på laktos enligt resultat från Chalmers forskningsgrupp sedan innan valdes ut, och övriga anledningar till att de 15 arterna valts demonstreras i Tabell 1. i avsnitt 4.2. Jästarter med Biohazard Safety Level (BSL) -märkning 2 eller högre valdes bort, samt alla filamentösa jästarter, detta för att följa Chalmers restriktioner för eventuellt hälsofarliga organismer.



Figur 2. Avgränsningar i urvalet av jästarter.

4. Metod

Under arbetets gång har många metoder använts och här beskrivs de.

4.1. Bioinformatisk undersökning av ITS-regionen med BLAST

ITS-sekvenserna tillhandahölls från forskningsgruppen på Chalmers, de erhöles genom sekvensering från ett externt företag. ITS-sekvenserna analyserades i NCBI BLAST standarddatabas [11]. Innan stammarna kunde artbestämmas hade de fått en "Lactose growing yeast identity", Lac ID, som ses i Tabell 5, under avsnittet resultat, 5.1. Här visas de tillsammans med en mycket kortfattad sammanfattning av "percent identity" samt en kommentar om huruvida arten gav utslag för "TYPE material". En "percent identity"-hit under 98,4 % kan tyda på att arten inte ännu finns i databasen, och att arten skulle kunna vara oupptäckt [12]. Beskrivningar som innehöll "TYPE material" var det mest önskvärda då detta är en "mall" som använts för en specifik art som gör att man kan vara mycket säker på att databasen identifierat den analyserade arten korrekt [13]. Resultat som innehöll beskrivningar så som "mixed compost" har i möjligaste mån undvikits då dessa gav en otillräcklig artbeskrivning eftersom namnet på arten saknades, samt ansågs vara opålitliga då analysproven ofta innehållit en mix av okända saker.

4.2. Litteraturstudie

Litteraturstudien påbörjades med en förundersökning på samtliga 32 jästarter som framkommit efter BLAST-sökningen. Från dessa valdes 15 stammar ut beroende på deras egenskaper efter förundersökningen med hjälp av relevant information från sökmotorerna Web of Science och PubMed, samt riskklassinformation på stamdatabasen ATCC. Arterna valdes med hänsyn till vanlighet,

systematisk indelning, BSL-märkning, huruvida det är känt enligt theyeasts.org om de växer på laktos sen tidigare samt övrig intressant information som uppkom i förundersökningen. Då jästarterna valdes med syfte att odlas på laktosmedium, på Chalmers industriella biotekniklaboratorium, valdes alla arter med Biohazard Safety Level (BSL) -märkning 2 eller högre bort, samt alla filamentösa jästarter, detta för att följa Chalmers restriktioner för eventuella hälsofarliga organismer. För att få en intressant odling, valdes ett brett spektrum av jäst, med blandning av i princip okända jästarter och jästarter som redan har en bred industriell applikation. Se Bilaga 2. för fullständig redovisning över alla jästarter, samt Tabell 1. för de arter som valdes.

Tabell 1. Översikt över de valda jästarterna med kommentar om varför de valdes.

Jästarter	Antal stammar	Växer på vassle/laktos enligt theyeasts.org*	Industriellt känt**	Kommentar om val
<i>Apiotrichum mycotoxinovorans</i>	5	+, -	Nej	Ostuderad art, inte mycket vetenskaplig information om denna.
<i>Candida orthopsilosis</i>	1	0	Nej	Mycket information att utgå ifrån.
<i>Candida pseudointermedia</i>	43	+, -	Nej	Valdes p.g.a. att den är vanligt förekommande i studiens urval och att den har svag tillväxt enligt theyeast.org.
<i>Cutaneotrichosporon curvatum</i>	1	1	Nej	Intressant biokemiskt p.g.a. sina lipidproducerande egenskaper.
<i>Cyberlindnera fabianii</i>	1	0	Ja	Behaglig doft. Många användningsområden industriellt, exempelvis som för arom och biotin-tillverkning.
<i>Kodamaea ohmeri</i>	2	0	Nej	Ovanligt reproduktionssätt.
<i>Meyerozyma caribbica</i>	4	0	Ja	En s.k. "killer yeast" (dödar andra mikroorganismer). Väl använd som pesticid inom frukt och grönsaksodling.
<i>Meyerozyma carpophila</i>	43	-	Ja	Valdes p.g.a. att den är vanligt förekommande i studiens urval, samt bristen på litteratur.
<i>Moesziomyces antarcticus</i>	1	1	Nej	Ovanligt växtsätt och först isolerad från sediment från en sjö i Antarktis.
<i>Papiliotrema flavescens</i>	2	1	Ja	Har visat sig producera ett flertal enzymer.
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	1	0	Ja	En svag röd färg hade tidigare observerats vid odling på agarplatta.
<i>Trichosporon insectorum</i>	1	-	Nej	En s.k. "killer yeast" (dödar andra mikroorganismer). Utöver det fanns mycket lite information om arten.
<i>Vishniacozyma taibaiensis</i>	1	0	Nej	Mycket ostuderad art då den knappt nämns i litteraturen.
<i>Yarrowia lipolytica</i>	9	0	Ja	Väl studerad, har flera industriella appliceringar.

*(+, -) : Svag tillväxt, 0 – ingen tillväxt, 1 – tillväxt, (-) – ingen information.

** Finns studier som stödjer att arten används, eller har stor potential att användas inom olika industrier.

När jästarterna var valts påbörjades en mer grundlig litteratursökning med bestämda sökord. Sökmotorerna Web of Science och PubMed samt onlinedatabasen theyeasts.org användes i första hand. För de arter där information var knapphändig användes även andra sökmotorer så som Google scholar. Sökorden "lactose", "whey", "casein" samt jästarternas artnamn och dess basionym, d.v.s. tidigare namn som använts på samma art, ansågs vara de mest väsentliga vid sökningen. Värt att notera är att "casein" (svenska: kasein) är det huvudsakliga proteinet som finns i mjölk, och där det finns mjölk finns även laktos, alltså ansågs sökordet vara relevant. En sammanställning av sökhistoriken finns i Bilaga 1. I samband med att artiklarna söktes upp och lästes mer noggrant, skrevs en sammanställning av den funna informationen av de olika jästarterna i 5.1.

4.3. Insamling av vild jäst från höbal

Insamlingen av Nigeria-jästkollektionen utfördes långt innan detta projekt startade. För att få erfarenhet och förståelse för hur jäst kan isoleras från naturen utfördes en egen insamling av vild jäst. Provet togs från en nyöppnad, plastad rundbal hösilage på ca 550 kg, från stall Djupevik (Figur 3A.) Alingsås, skördad i juni 2021 i Magra, Alingsås. Hösilage är ett lätt fermenterat helfoder till häst, där fermenteringsgraden främst beror på vattenhalten i den ensilerade grödan [14]. Jäst är relativt vanligt förekommande i hösilage och syns som ca 1–3 mm vita prickar i de yttre lagren av hösilagebalen, se Figur 3B. Särskilt hösilage-strån med många jästkolonier valdes ut, se Figur 3C och D.



(A)



(B)



(C)



(D)

Figur 3. (A) Stallet där provet på den vilda jästkolonin samlades in. (B) Närbild på balen med hösilage med jästkolonier. (C) Provet som togs till laboratoriet för analys. (D) Närbild på provet.

4.4. Tillväxtfenotypning

4.4.1. RotorHDA och Scan-o-matic

Då det från början fanns runt 6000 jäststammar användes först en screeningsrobot, RotorHDA, och en fenotypningsplattform, Scan-o-matic, med hög genomströmning. Samma instrument används även på de 230 laktosväxande stammarna enligt följande. Den förstnämnda fungerar genom att en robotarm med sterila pinning pads plockar upp prov från en matris med färdiga kolonier och stryker det på en ny agar platta [16]. Detta gjordes i olika medium; först från YPD till DELFT glukos och slutligen i DELFT laktos. Därefter fick kolonierna växa i Scan-o-matic som är en automatiserad apparat som ger exakta och högt upplösta tillväxtkurvor av jäststammarna genom att bilder tas var 20:e minut. Utifrån detta skapas kurvor för de olika jäststammarna och resultatet fås i form av fenotyper, tillväxt, utbyte och generationstid, som dessutom visas i ennummerparameter vilket förenklar jämförelse [2].

4.4.2. Aquila

Vid odling av de 15 utvalda jäststammarna användes en celltillväxtkvantifierare från Aquila Biolabs, hädanefter kallad "Aquila", se Figur 4. Maskinen ger möjlighet till övervakning och mätning av biomassa i skakflaskor. Detta sker med hjälp av sensorer under flaskorna som mäter backscatter och möjliggör uppföljning av tillväxt i realtid. Resultatet fås i form av diagram med backscatter i funktion av tiden i timmar [18].



Figur 4. En schematisk bild över "Aquila" [19].

4.5. Odling

En översikt över odling av jäst från Nigeria och den s.k. stalljästen. All renstrykning, sampling och inokulering har av säkerhetsskäl skett i LAF-bänk samt med labbrock och handskar samt glasögon vid behov. Vi tillfällen då arbetet inte kunnat ske i LAF-bänk, så som vid centrifugering och OD-mätningar, har säkerhetsåtgärder tagits: utrustning har regelbundet spritats samt steriliserats med UV-ljus (i LAF-bänkarna), samt ovan nämnda skyddsutrustningar har använts. Allt medium som använts återfinns i Bilaga 4 & 5.

4.5.1. Jäst från Nigeria

Dag 1 gjordes en strykning från frysta stammar på agarplattor. De fick växa i varmrum (30° C) i två dagar inför kommande inokulering. På dag 3 inokulerades 32 st. 10 ml falconrör (15 för YPD och 15 för DELFT laktos) från agarplattorna från dag 1. De inokulerade provrören ställdes sedan på

skakplatta i varmrums för tillväxt. Två provrör användes som referens för respektive YPD- och DELFT laktos-medium för att säkerställa mediets sterilitet. På dag 7 användes 30 autoklaverade e-kolvar med pappstopper, 15 vardera för YPD- och DELFT laktos-medium. För att kunna göra jämförbara växtkurvor mellan jästarterna med hjälp av optisk densitet (OD), hade varje e-kolv samma ursprungliga celldensitet, dvs. OD₆₀₀ 0,1 från början av mätningarna, detta justerades genom spädning i respektive medium. OD mättes sedan kontinuerligt med hjälp av en spektrofotometer på 600 nm fram till dag 18. På dag 8 pipetterades samtliga kulturer (utom stammen Lac196 där kontamination upptäckts) till 10 ml falconrör med 4 ml respektive YPD och DELFT laktos. Dessa placerades i varmrums över helgen. Tillväxten inspekterades dag 11 och kulturerna användes för att starta upp kulturer för användning till mätningar i Aquila (se avsnitt 4.4.2). För att maximera chansen till tillväxt i Aquila användes endast kulturer med tillväxt i falconrören. D.v.s. de stammar som inte haft tillväxt i DELFT laktos från dag 8, pipetterades med DELFT glukos till DELFT laktos-medium i Aquila i stället, se Tabell 2. Samplingar skedde på dag 11, 12, 13, 14, 15 och 18 och de användes i HPLC-analys, enligt avsnitt 4.9. Efter att Lac196 renstrukits, placerades även den i Aquila samt i varmrums på dag 15.

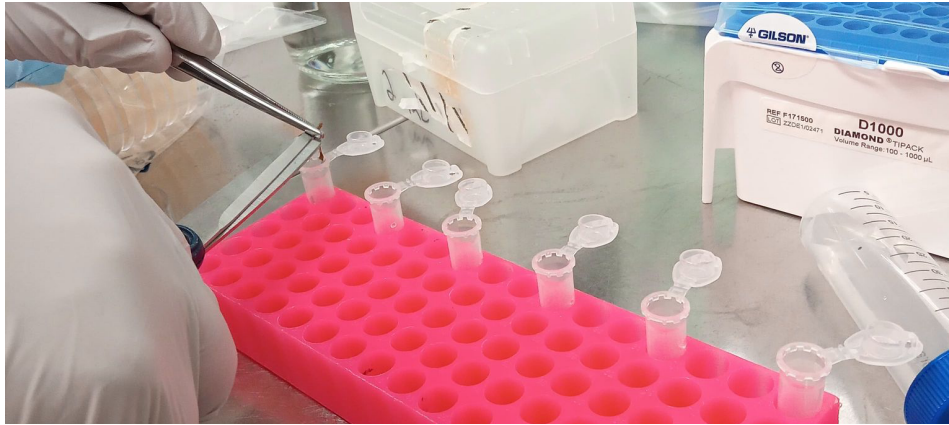
Tabell 2. Urvalet av jäststammar som användes för vidare odling gjordes utifrån denna tabell.

Lac ID	Jästarter	DEFT glukos	DEFT laktos
80	<i>Apiotrichum mycotoxinovorans</i>		L
119	<i>Candida orthopsilosis</i>	G	
46	<i>Candida pseudointermedia</i>		L
196	<i>Clavispora lusitanae</i> *	-	-
3	<i>Cutaneotrichosporon curvatum</i>	G	
111	<i>Cyberlindnera fabianii</i>	G	
51	<i>Kodamaea ohmeri</i>	G	
198	<i>Meyerozyma caribbica</i>	G	
200	<i>Meyerozyma carpophila</i>	G	
237	<i>Moesziomyces antarcticus</i>		L
101	<i>Papiliotrema flavescens</i>		L
127	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	G	
19	<i>Trichosporon insectorum</i>		L
63	<i>Vishniacozyma taibaiensis</i>		L
107	<i>Yarrowia lipolytica</i>	G	

*Kontaminerad - bakterietillväxt.

4.5.2. Isolering av jäst från höbal

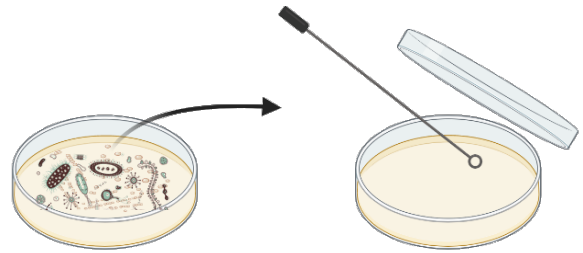
Ett höstrå med en koloni med jäst klipptes ner i ett eppendorf-rör, som ses i Figur 5, med 2 µl DELFT glukose och vortexades. Sedan gjordes en tiofaldig spädning i 6 steg (10^{-5} som lägsta spädning). 50 µl av varje spädning pipetterades och ramlades till varsin YPD agarplatta som inkuberades i 30 °C varmrum. Renstrykning följde enligt avsnitt 4.6.



Figur 5. Isolering av jäst från ett höstrå för spädning i 6 eppsonrör.

4.6. Renstrykning

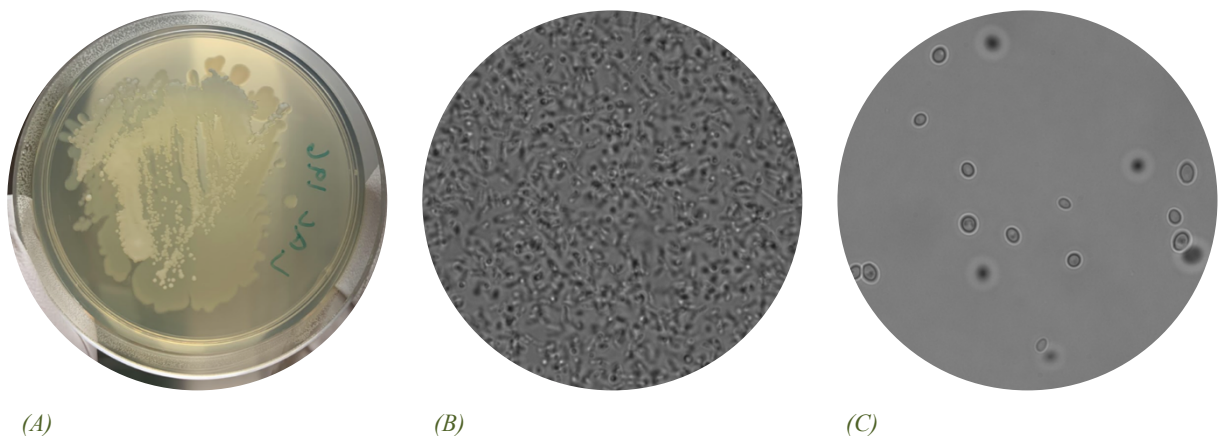
När ett prov från naturen ska odlas upp på labb krävs normalt sett renstrykningar för att få bort oönskade organismer, så som bakterier. Tillvägagångssättet var följande: Det ”smutsiga” provet odlades upp på en agarplatta (Figur 6.), och en enskild koloni valdes ut och fördes över till en ny platta med hjälp av en inokuleringsloop. Detta upprepades så många gånger som behövdes för att få en helt, visuellt ren kultur på plattan.



Figur 6. Renstrykning av en odling [19].

4.6.1. Lac196 – *Clavispora lusitaniae*

I avsnitt 4.5.1, Dag 11, upptäcktes kontaminering i agarplattan med Lac196 - *C. lusitaniae*. Detta syntes som genomskinliga kolonier utanför de gul-vita jästkolornierna och bestod av bakterier, se Figur 7A på agarplatta och Figur 7B i mikroskop. *C. lusitaniae* renstryktes från den kontaminerade agarplattan till nya plattor i två omgångar. Efter andra renstrykningen såg kolonierna rena ut, vilket syns i Figur 7C. När stammen renstrykts, konserverades den rena stammen in i -80°C, i 20% glycerol för bevarande för framtida forskning, se avsnitt 4.8.



Figur 7. (A) Kontaminerad agarplatta med *Clavispora lusitaniae*. (B) Mikroskopbild som visar bakterierna som växte på den kontaminerade agarplattan. (C) Mikroskopbild med prov från den renstrykta plattan med *C. lusitaniae*.

4.6.2. Jäst från höbal

Den s.k. ”stalljäten” som samlades in i avsnitt 4.3 renstryktes inför PCR och sekvensering. Renstrykningen skedde enligt följande; 6 agarplattor ramlades i en spädningsserie enligt 4.5.2, och lämnades för tillväxt i tre dagar. Sedan gjordes en renstrykning från 1:100 000-spädningen till 7 nya agarplattor. Efter ytterligare två dagar renstryktes plattorna igen, och dagen efter renstryktes plattorna en sista gång. Stammen konserverades därefter i -80°C, i 20% glycerol för bevarande för framtida forskning, se avsnitt 4.8.

4.7. PCR

PCR är en förkortning för "Polymerase chain reaction" och är en metod för att föröka en specifik gensekvens. [20]

4.7.1. DNA extraktion med koloni PCR

Genomiskt DNA från jäst extraherades med hjälp av koloni-PCR metoden. För 7 renstrykta kolonier fylldes PCR-rör med 50 µl NaOH (10 mM). Jästkultur motsvarande 1 koloni fördes med loop till röret och blandades runt tills det löst sig i vätskan. Cellerna hettades upp i PCR-maskin till 99°C under 20 minuter och vortexades sedan i 15 sekunder. Cellerna pelleterades genom centrifugering och den transparenta supernatanten användes (2 µl) som templat för PCR, se avsnitt 4.7.2.

4.7.2. Polymeraskedjereaktion (PCR)

PCR gjordes på renstrykta plattor nr 1, 2, 4, 5, 6 från den tredje renstrykningen och 3 & 7 från den andra renstrykningen (Se Tabell 3.) enligt följande protokoll:

Den optimala temperaturen för att initiera ITS1-4 PCR-reaktionen har tidigare bestämts till 60°C. De primrarna som använts var ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') och ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'). Protokollet nedan användes för en reaktion. Siffrorna multiplicerades med antalet avsedda PCR-reaktioner (med extra marginal för att täcka upp eventuell volymförlust under pipetteringen) för att göra en "mastermix" med allt utom DNA-templat tillsatt. Mastermixen dispenserades i PCR-rör och DNA-templat tillsattes manuellt för var och en.

Tabell 3. Ingredienser för recept på PCR-mix av volymen 50µl.

dH2O	34,6 µl
Phusion HF buffer (5x)	10 µl
dNTPs (10mM)	1 µl
Primer F (10µM)	1 µl
Primer R (10µM)	1 µl
DNA-templat	2 µl
Phusionenzym (2U/µl)	0,4 µl
TOTAL reaktionsvolym	50 µl

Efter tillsats av DNA-templat till reaktionen initierades PCR-reaktionen. En initial denaturering (x1) 98 °C i 30 sekunder, 35*[98 °C i 10 sekunder, 60 °C i 30 sekunder och 72 °C i 1 min], följt av ett sista förlängningssteg på 72 °C i 5 minuter. Sedan hölls temperaturen vid 12 °C.

4.7.3. PCR-rening, jäst från höbal

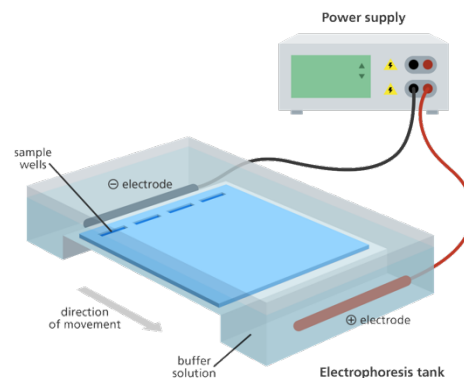
Proven av "stalljäst", se avsnitt 4.6.2, renades enligt instruktioner från Thermo fisher's "GeneJET PCR Purification Kit", katalognummer K0701 [21]. 1:1 volym av "Binding Buffer" för färdig PCR-mix adderas och blandades noggrant med proven. Färgen kontrollerades, där gul indikerade optimalt pH för att lösningen skulle kunna bindas till DNA. (Hade färgen varit orange eller lila hade pH:t fått justeras genom att droppvis tillsätta natriumacetat). 80 µl av vätskan fördes över till en filterkolonn och centrifugerades i 30–60 sekunder och genomflödet hälldes av. Sedan adderades 700 µl av "Wash buffer", som innan spätts med 5:1 delar etanol, till filterkolonnen. Filterkolonnen centrifugerades och genomflödet hälldes av. Detta följdes av ytterligare 1 minuts centrifugering för att få bort det sista av "Wash buffer". Filterkolonnen fördes över till ett ren 1,5 ml mikrocenrifugeringsrör och 50 µl vatten

tillsattes till mitten av filterkolonnen. Efter det centrifugerades filterkolonnen igen i 1 minut. Filterkolonnen kasserades och koncentrationen av DNA:t i den kvarvarande kolonnen mättes med nanodrop. DNA:t förvarades sedan vid -20 °C. Senare späddes provet och det skickades till sekvensering.

4.7.4. Gel-elektrofores

För att bekräfta att PCR:en fungerat och för att få en grov uppfattning av längden av PCR-produkterna från den s.k. ”stalljäten” gjordes en gel-elektrofores. Då DNA är negativt laddat rör det sig mot pluspolen om en elektrisk ström appliceras på det där olika stora molekyler rör sig olika fort genom gelen. Resultatet kan sedan jämföras mot en s.k. DNA-stege, som är en standard man använder som referens med bestämda antal baspar som tydliga markeringar [22]. En schematisk bild över en gel-elektrofores fixtur ses i Figur 8.

DNA-lösningen från avsnitt 4.7.3 kördes i en Gel-elektrofores. Gelen gjöts med 0,8% agaros och 0,1 µl/ml gel ”stain red – safe DNA gel stain”. Sju PCR-rör förbereddes och samtliga laddades med 2 µl färgmedel (loading dye) och 10 µl ”stalljäst”-DNA, som sedan vortexades, och placerades i gelens brunnar. Fixturen ställdes in på 80V och kördes i 30 min.

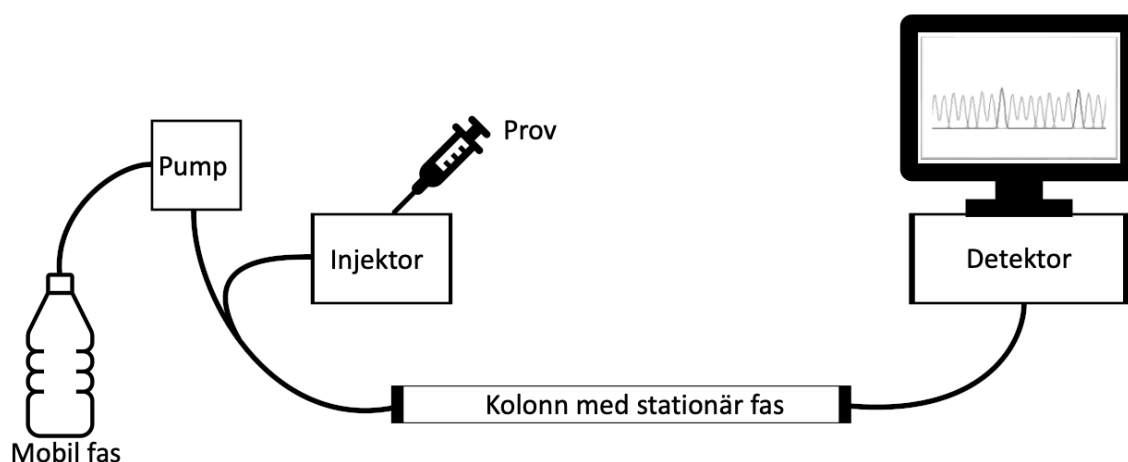


Figur 8. Gel-elektrofores fixtur. [23]

4.8. Arkivering i glycerol

När man önskar spara en jästkultur för framtiden arkiveras den genom frysning i -80°C. Detta görs genom att 20% glycerol tillsätts till den flytande jästkulturen för att förhindra att iskristaller bildas och skär sönder jästartens cellvägg. Genom den här metoden kan kulturer sparas mycket länge. Detta gjordes på både den s.k. ”stalljäten” och Lac196 – *C. lusitaniae*.

4.9. HPLC



Figur 9. Schematisk bild över HPLC.

”Högupplöst vätskekromatografi”, eller HPLC är en avancerad kemisk analysmetod. Dess delar kan beskådas i Figur 9 och Figur 10 och består av den mobila fasen, som kan vara en polär eller opolär vätska, följt av en pump som pumpar vätskan genom hela systemet. Sedan följer en injektor där analyten tillsätts, följt av en kolonn med en stationär fas. Det är i kolonnen separationen sker då olika molekyler kommer att fastna i den stationära fasen olika länge. Kolonnens stationära fas är antingen polär eller opolär men alltid motsatt i förhållande till den mobila fasen. Är den mobila fasen polär är alltså den stationära fasen opolär och vice versa. Efter kolonnen finns en detektor som kommer registrera molekylen retentionstid (tid att ta sig igenom kolonnen) samt koncentrationen, dvs. hur mycket som finns kvar av molekylen som analyserats [24].

I avsnitt 4.5.1 beskrivs hur jästarterna odlats samt samplats för HPLC. Totalt kördes 202 prov från totalt 5 samplings i HPLC med 8 standarder i sex olika koncentrationer som referens, se Tabell 4.



Figur 10. HPLC-utrustningen som användes.

Tabell 4. Standarder som användes i HPLC.

Standard
Galaktos
Glukos
Laktos
Etanol
Dulcitol
Glycerol
Formiat
Acetat

5. Resultat

5.1. Bioinformatisk undersökning av ITS-regionen med BLAST

För att identifiera gensekvensernas arter gjordes en sökning i databasen BLAST [11]. Tabell 5 visar resultatet. "Percent identity" är ett mått på hur väl respektive stam matchar med stammar som redan ligger inlagda i databasen. En "percent identity" på över 98,4% betyder att man kan vara tämligen säker på att identifieringen av jästarten är korrekt. Två olika sökningar gjordes, en med standardinställningar på BLAST och en med inställningar särskilt för ITS, se metod i avsnitt 4.1. Som ses i Tabell 5 hade alla studiens valda arter >99%, vilket innebär att man kan vara säker på att arterna identifierats korrekt. Samma tillvägagångssätt upprepades sedan för den s.k. "stalljäten", *Wickerhamomyces anomalus*, se tabell 6, där "percent identity" var låg (<98,4%) på flera av stammarna som skickades till sekvensering. Detta innebär att vissa av de inskickade stammarna kan vara en annan art än *W. Anomalus*. Eftersom stammarna inte matchat med någon annan art, innebär det att stammen kan vara en hittills oupptäckt art vars närmaste släkting i databasen är *W. anomalus*.

Tabell 5. BLAST-sökningens resultat för de valda jästarterna.

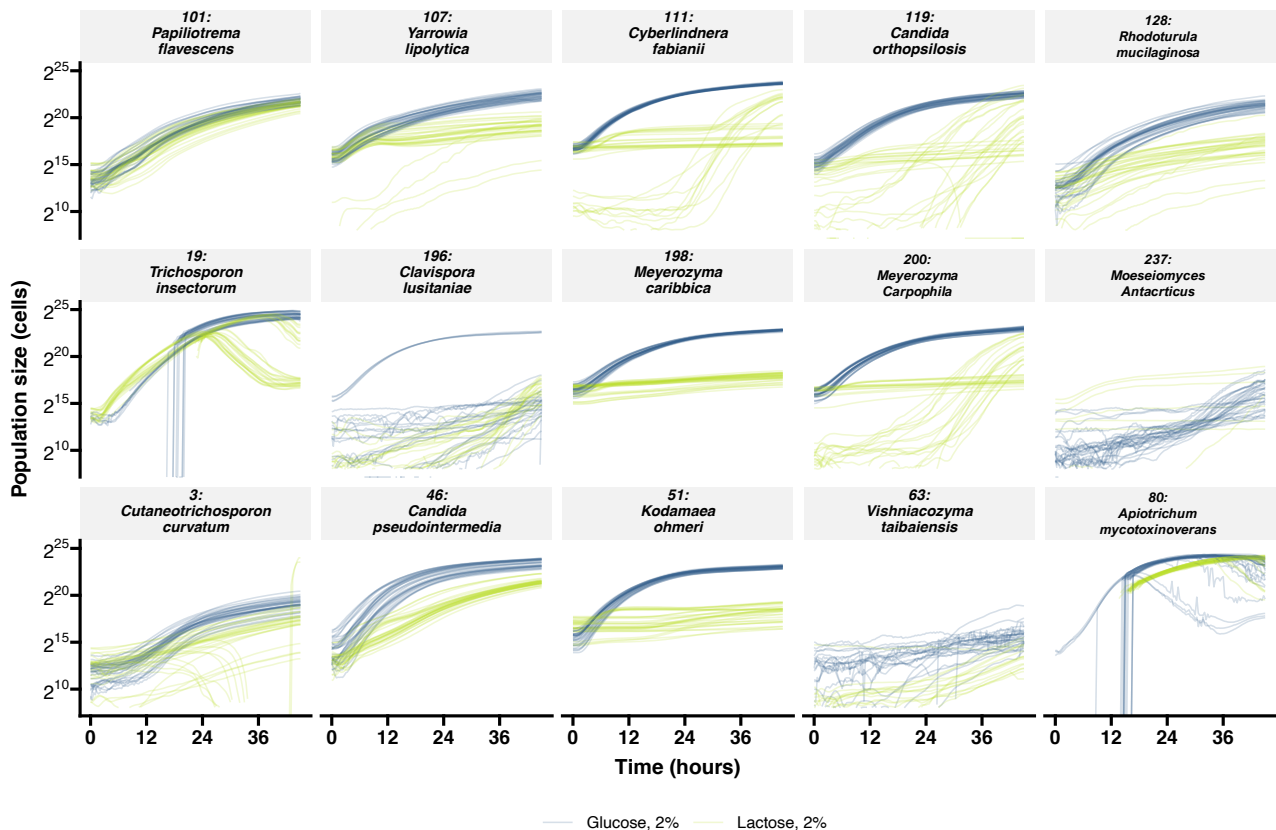
Lac ID	Namn	Percent Identity (%)	Databas	Kommentar
80	<i>Apiotrichum mycotoxinovorans</i>	100	Standard	
119	<i>Candida orthopsilosis</i>	100	Standard	
46	<i>Candida pseudointermedia</i>	100	ITS	
196	<i>Clavispora lusitaniae</i>	100	Standard	
3	<i>Cutaneotrichosporon curvatum</i>	100	Standard	
111	<i>Cyberlindnera fabianii</i>	100	Standard	2: a hit då första svaret var från "uncultured fungus".
51	<i>Kodamaea ohmeri</i>	100	Standard	
198	<i>Meyerozyma caribbica</i>	100	Standard	Obs! <i>M. carpophila</i> på standard BLAST, men " <i>M. caribbica</i> " på ITS-BLAST.
200	<i>Meyerozyma carpophila</i>	100	Standard	
237	<i>Moesziomyces antarcticus</i>	99.14	Standard	
101	<i>Papiliotrema flavescens</i>	100	ITS	2: a hit då alla förutom första hit var " <i>P. flavescens</i> "
128	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	100	ITS	
19	<i>Trichosporon insectorum</i>	100	ITS	
63	<i>Vishniacozyma taibaiensis</i>	99.78	Standard	
107	<i>Yarrowia lipolytica</i>	100	Standard	

Tabell 6. BLAST-sökningens resultat för den s.k. "stalljäten", *Wickerhamomyces anomalus*.

Stall ID	Namn	Percent Identity (%)	Kommentar
1	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	96,37	Låg percent identity.
2	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	98,44	Låg percent identity.
3	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	96,68	Låg percent identity.
4	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	100	
5	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	100	
6	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	100	
7	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	97,1	Låg percent identity.

5.2. Scan-o-matic

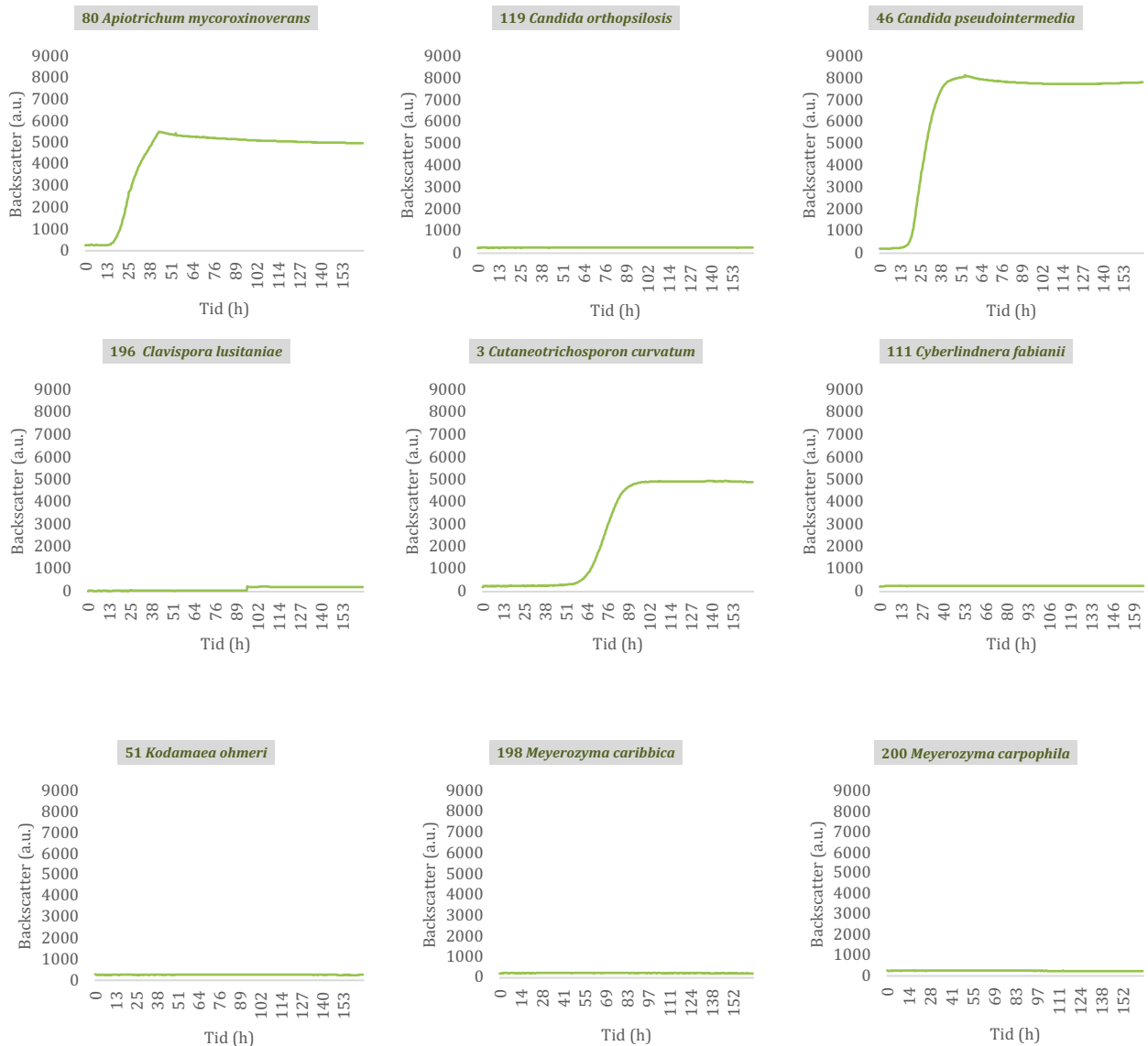
För att få en översyn för hur arterna växer på glukos och laktos utfördes en mätning med scan-o-matic. Graferna i Figur 11. visar tillväxten i Scan-o-matic, som beskrivs i avsnitt 4.4.1, på de utvalda jäststammarna i 2% glukos respektive 2% laktos under 36 timmar. Som syns i Figur 11 har *P. flavescens*, *Y. lipolytica*, *T. insectorum* och *C. curvatum* kurvor som visar en bra, relativt lika tillväxt i både glukos och laktos. I graferna för *C. fabianii*, *C. orthopsilosis*, *M. carpophila* och *V. taibaiensis* syns en lagfas på ungefär 36 timmar tydligt. Det är möjligt att flera av arterna som till synes vuxit dåligt, eller inte alls, så som *Y. lipolytica*, *M. caribbica* och *K. ohmeri* har en lagfas som är längre än 48 timmar vilket gör att senare tillväxt inte syns, alltså kan man inte utesluta att även dessa arter kan växa på laktos.

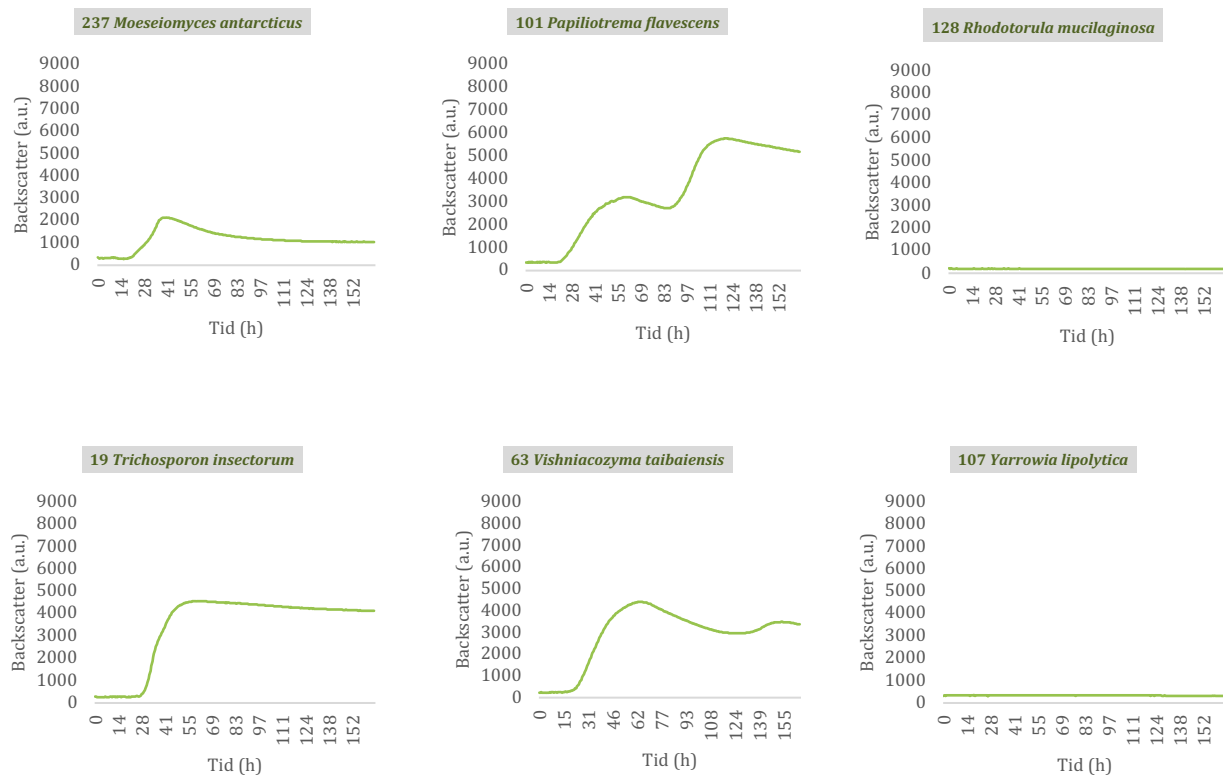


Figur 11. Tillväxten i glukos (blå) och laktos (grön) under 36 timmar i Scan-o-matic.

5.3. Aquila

Tillväxtkurvorna i Figur 12. kommer från Aquila, som beskrivs i avsnitt 4.4.2. I diagrammen syns att cirka hälften av jäststammarna inte växte på laktos dessa inkluderar *C. orthopsilosis*, *C. fabianii*, *K. ohmeri*, *M. caribbica*, *M. carpophila* och *Y. lipolytica*. Motsatsvis ses högst tillväxt hos *C. pseudointermedia*, följt av *A. mycoroxinoverans*, *C. curvatum*, *P. flavescens*, *V. taibaiensis*, *T. insectorum* och slutligen *M. antarcticus*. Observera att diagrammet för *C. lusitaniae* är missvisande på grund av kontaminering, där det renade provet ställdes i Aquila först efter 89h. När det gäller tillväxten av *A. mycorotoxinoverans*, *C. pseudointermedia*, *C. curvatum*, och *T. insectorum* ser vi en tydlig exponentiell ökning upp till cirka 5000–9000 a.u. som sedan planar ut, detta gäller även *M. antarcticus* men denna är mycket minimal jämfört med resterande. Å andra sidan syns en annan trend i graferna för *P. flavescens* och *V. taibaiensis* då tillväxten ökar snabbt för att sedan minska och öka igen, där den andra ökningen är mer drastisk för den förstnämnda jästarten.

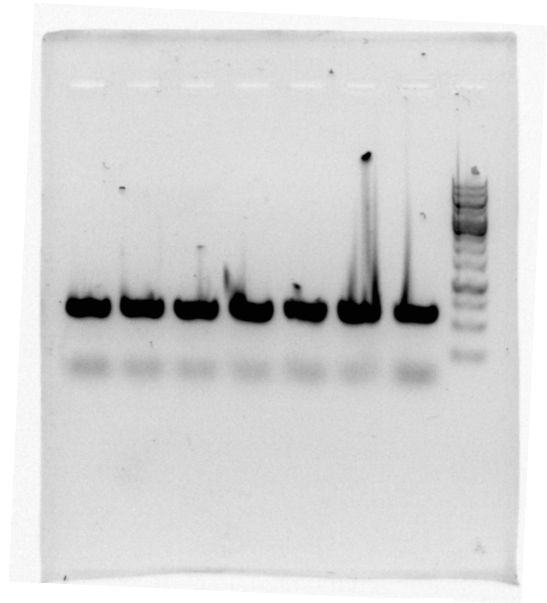




Figur 12. Tillväxtkurvor från Aquila för de valda jäststammarna.

5.4. Gel-elektrofores

Gel-elektrofores gjordes från PCR som utfördes i avsnitt 4.7 på den s.k. "stalljäten" (som efter ITS-sekvensering visade sig vara av arten *Wickerhamomyces anomalus*) och gav följande resultat. Dvs, ca 600 baspar, se Figur 13.



Figur 13. PCR-resultat "stalljäten",
Wickerhamomyces anomalus.

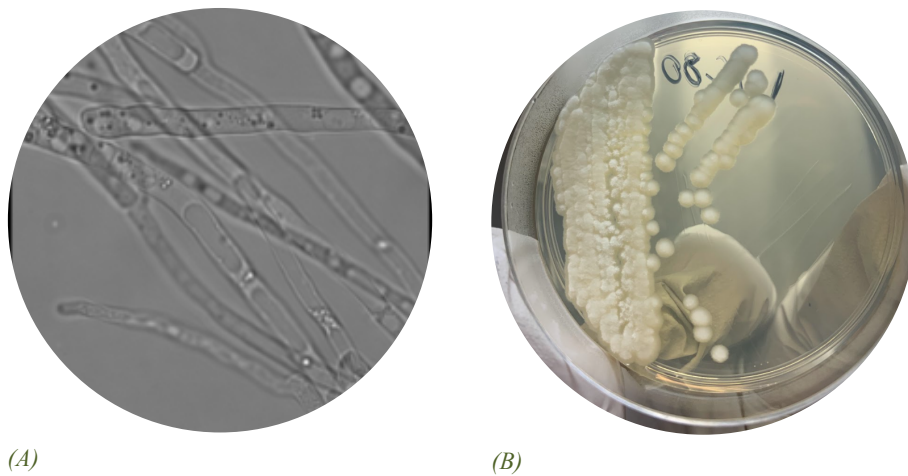
5.5. Litteraturstudie & morfologi

Totalt gjordes en litteraturstudie på 16 arter jäst. Samtliga mikroskopbilder är tagna på kolonier plockade från agarplattor.

5.5.1. *Apiotrichum mycotoxinovorans*

Morfologi

A. mycotoxinovorans har ett unikt växtsätt som påminner om hårstrån när den synas i mikroskop, se Figur 14A. nedan. Kolonierna på agarplattan är stora i en krämvit färg (Figur 14B).



Figur 14. (A) Mikroskopbild. (B) Agarplatta.

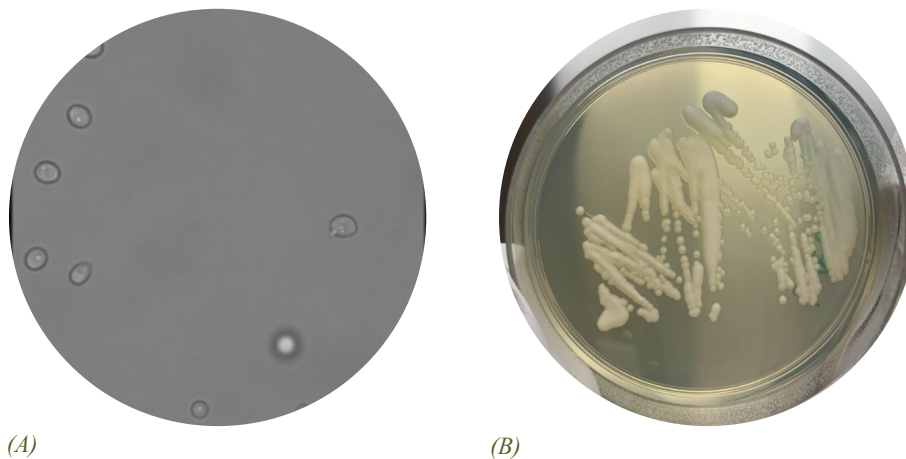
Litteraturstudie

A. mycotoxinovorans, eller *Apiotrichum mycotoxinivorans* [25] tidigare kallad *Trichosporon mycotoxinivorans*, eller *Trichosporon mycotoxinovorans* [26] beskrevs 2004 av Molnár, Schatzmar & Prillinger. Värt att notera är att dessa namn fortfarande används mer flitigt än dess nuvarande namn, *A. mycotoxinovorans*. *A. mycotoxinovorans* hittades först i buken av termiter och används för att oskadliggöra mykotoxiner i djurfoder. Relativt lite forskning på *A. mycotoxinovorans* har genomförts, men den ska kunna växa på laktos [27]. Detta stöds vidare av de positiva resultaten från odlingarna i den här studien som kan ses i avsnitt 5.3 och 5.7.

5.5.2. *Candida orthopsilosis*

Morfologi

C. orthopsilosis ser ut som en klassisk, rund jäst i sitt växtsätt, sett i mikroskop, se Figur 15A. På agarplatta har den små krämvita kolonier (Figur 15B).



Figur 15. (A) Mikroskopbild. (B) Agarplatta.

Litteraturstudie

C. orthopsilosis och *C. metapsilose* ersätter sen 2005 den tidigare gruppen av jäst som kallats *C. parapsilosis*. Detta då betydande skillnader i genomet ansågs anledning nog att ge dem egen artstatus [28]. *C. orthopsilosis* är nära besläktad till *Candida parapsilosis*, vilken är en vanlig mänsklig patogen - den andra vanligaste efter *Candida albicans*. *C. orthopsilosis* står dock för färre fall av infektion än sina släktingar, även om ett antal förekommit i bland annat Sydamerika, Malaysia och Spanien med en uppskattad frekvens på 1,3–28,5% av alla utbrott [29].

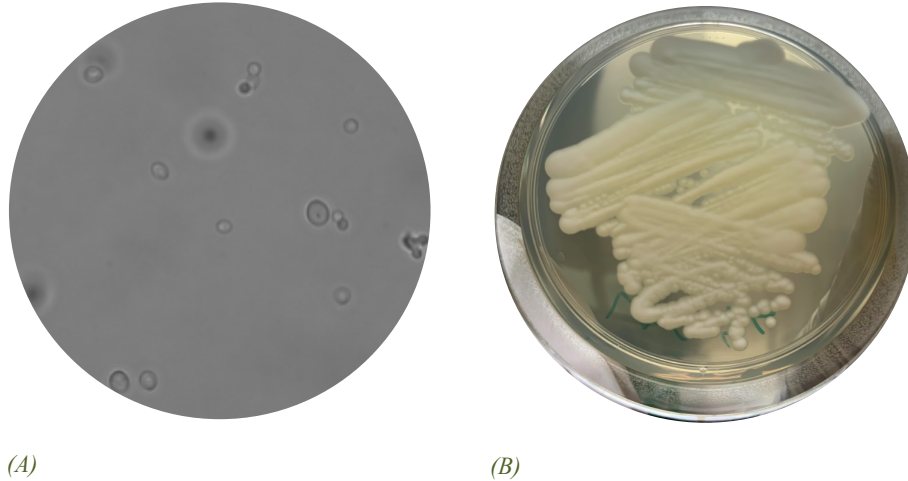
Ett industriellt intresse är jästartens förmåga att framkalla biomineralisering, det vill säga, fånga tungmetaller. Detta har gjort den intressant som ett miljövänligt alternativ till traditionella, mycket giftiga metoder att ytbehandla förorenad betong [30].

C. orthopsilosis växer inte på laktos enligt theyeats.org och detta bekräftas i våra odlingar samt i bristen på litteratur som finns tillgänglig på ämnet.

5.5.3. *Candida pseudointermedia*

Morfologi

C. pseudointermedia ser ut som en klassisk, rund jäst i sitt växtsätt, sett i mikroskop, se Figur 16A. På agarplatta har den kräm vita mycket rikligt växande kolonier, Figur 16B.



Figur 16. (A) Mikroskopbild. (B) Agarplatta.

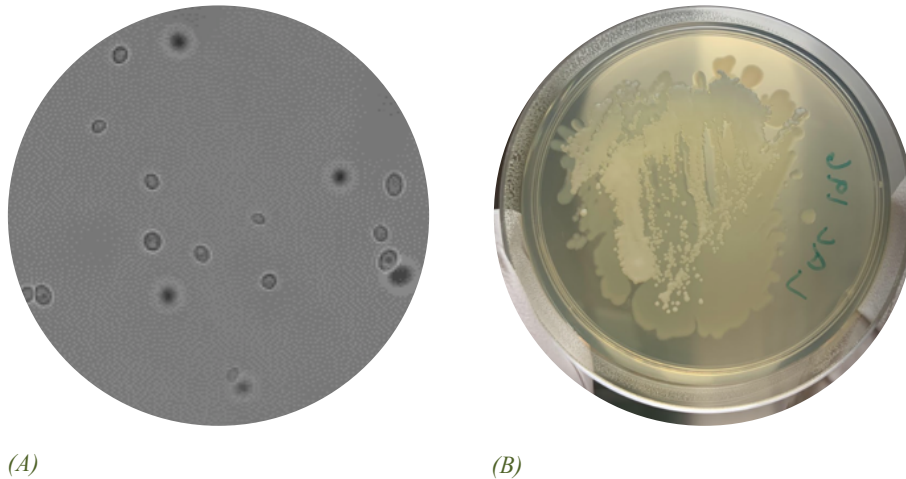
Litteraturstudie

Det finns relativt lite information om *C. pseudointermedia*, namnet dyker endast upp 11 gånger i sökningar från Web of Science. Den upptäcktes först i en traditionell japansk fiskrätt, Kamaboku, i en studie från 1977 [31], och har senare hittats i den atlantiska regnskogen i Brasilien [32], vid samlingar på Brasilianska transmissionstorn [33] och i kaffepröver från Tanzania [34]. Den namngavs efter sin likhet med *Candida Intermedia* [31]. Det finns ingen information om huruvida *C. pseudointermedia* växer på laktos eller på andra mjölkprodukter. Däremot visar våra egna odlingar lovande resultat, se avsnitt 5.3 och 5.7.

5.5.4. *Clavispora lusitaniae*

Morfologi

Clavispora lusitaniae ser ut som en klassisk, rund ganska liten jäst i sitt växtsätt, sett i mikroskop, se Figur 17A. På agarplatta har den kräm vita mycket små individuella kolonier, Figur 17B. Observera att jästkolonin på bilden (B) är förorenad med bakterier och därför missvisande.



Figur 17. (A) Mikroskopbild. (B) Agarplatta.

Litteraturstudie

Clavispora lusitaniae är en teleomorf, d.v.s. det sexuellt könsmogna stadiet, av *Candida lusitaniae* [35]. Den går också under namnet *Clavispora imtechensis* [36] samt ett antal andra tidigare namn. Den har blivit isolerad ett flertal gånger från vassle-dryck eller mjölk, och dominerar ofta bland de jästarter man hittat i mjölk, eller mjölkprodukter [37],[38],[39],[40].

Candida lusitaniae är en jäst som ofta infekterar även friska människor. Det har rapporterats att upp till 19,3 % av alla infektioner som inte orsakas av *Candida albicans*-arter [41] orsakades av *Candida lusitaniae*. Även *Clavispora lusitaniae* orsakar, om än mindre ofta, infektion hos människor, så som i ögon [42], blod och inälvor, men då framför allt hos patienter med nedsatt immunförsvar. Båda dessa varianter av arterna *C. lusitaniae* är dessutom resistent mot svampmedlet amphotericin B vilket orsakar ytterligare problem i behandlingen av jästinfektionen. [43]

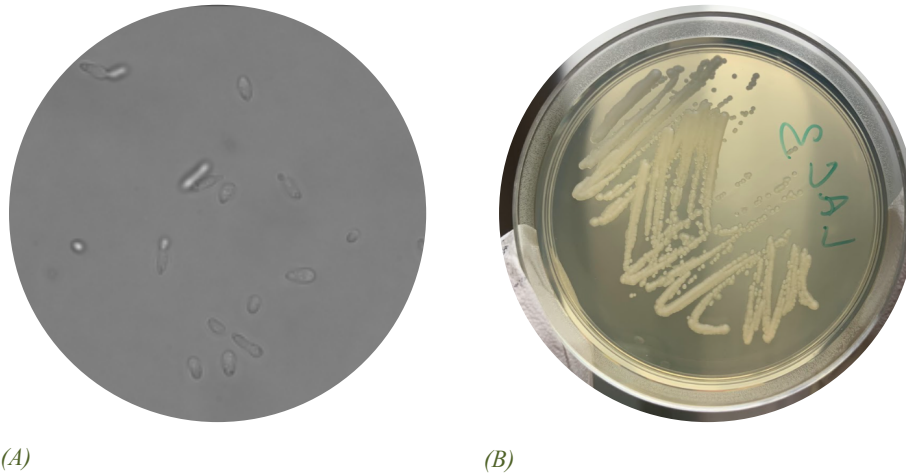
Jäst-isolat av *Clavispora lusitaniae* har använts i lyckade försök att producera α -L-rhamnosidas enzymproduktion för invändning av neutralisering av bitterhet i citrusjuice [38]. *Clavispora lusitaniae* är också en s.k. "killer yeast" och används som anti-mögel-medel på bland annat citrusfrukter. [44]

Då arten är en lipidrik typ av jäst har försök gjorts för att används den i produktion av användbara fetter från restprodukter inom agroindustri [45].

5.5.5. *Cutaneotrichosporon curvatum*

Morfologi

C. curvatum har ett växtsätt där de individuella jästcellerna är smala och avlånga, Figur 18A. På agarplatta bilder den mycket små, kräm vita kolonier, Figur 18B.



Figur 18. (A) Mikroskopbild. (B) Agarplatta.

Litteraturstudie

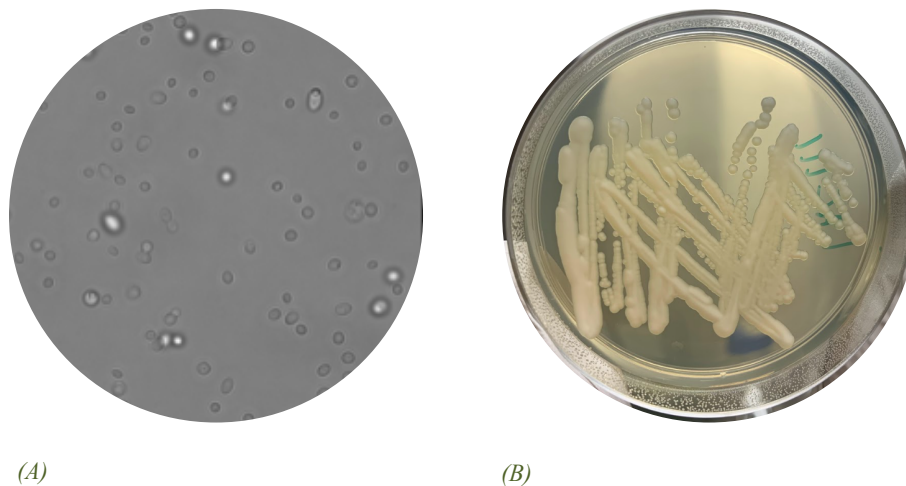
C. curvatum är mest känd under namnet *Cryptococcus curvatus*, men även under namnen *Apiotrichum curvatum*, *Trichosporon oleaginosus* samt *Cutaneotrichosporon oleaginosus*, med flera. Den är mycket vanlig förekommande i naturen och har hittats på alla kontinenter, och i många prov från människors hud, urin, avföring med mera, samt på andra djur. På människor med nedsatt immunförsvar har den ibland orsakat infektion, så som myeloladiculit (inflammation av ryggmärgen och ryggmärgens nervrötter) hos en HIV patient [47]. Den har även isolerats från en stor mängd olika mat och växtlighet [46]. *C. curvatum* är en lipid-producerande typ av jäst, karakteriserad av sin höga ackumulering av lipider [48]. Detta gör den mycket intressant rent biotekniskt då den typen av lipider kan användas för vidare tillverkning av till exempel biodiesel samt till fetter som används inom matindustrin.

I en japansk studie från 2010 studerades bland annat *C. curvatum* i en samling av 81 jäststerter insamlade från mjölk i syfte om att hitta en stabil källa till inhemskt biobränsle. I hela världen används fettsyrametylestrar (FAME, fatty acid methyl esters) som en beståndsdel i biobränsle. FAME tillverkas genom att tillsätta metanol till triacylglycerol i närvaro av en katalysator bestående av ett alkali, syra eller lipas. Triacylglycerol är den dominerande delen av växtolja, men på grund av bristen av inhemska material att tillverka växtolja av i Japan gjordes i stället försök på ostvassle samt betmelass. Båda är biprodukter i osttillverkningsindustrin respektive sockertillverkningsindustrin. Av 81 odlade jäststerter kunde FAME bara upptäckas i någon större mängd i *C. curvatum*, i en stam kallad TYC-19. I studien drogs slutsatsen att man effektivt kan producera FAME med hjälp av *C. curvatum* TYC-19 [49]. En liknande studie gjordes sen i Korea 2014, och även där kom man fram till att *C. curvatum* fungerar som en utmärkt lipid-producent [50]. I den här studiens odlingar påvisar *C. curvatum* en lång laggfase, men växer sedan utmärkt på laktos, se avsnitt 5.3 och 5.7.

5.5.6. *Cyberlindnera fabianii*

Morfologi

C. fabianii bildar små, klassiska jästceller, Figur 19A. På agarplatta växer den i små, krämfärgade kulturer (Figur 19B).



Figur 19. (A) Mikroskopbild. (B) Agarplatta.

Litteraturstudie

C. fabianii går även under namnen *Candida fabianii*, *Lindnera fabianii* och *Pichia fabianii* samt *Hansenula fabianii* och beskrivs sällan som en patogen på människor, även om det förekommer på människor med nedsatt immunförsvar, särskilt då på nyfödda eller för tidigt födda spädbarn [51].

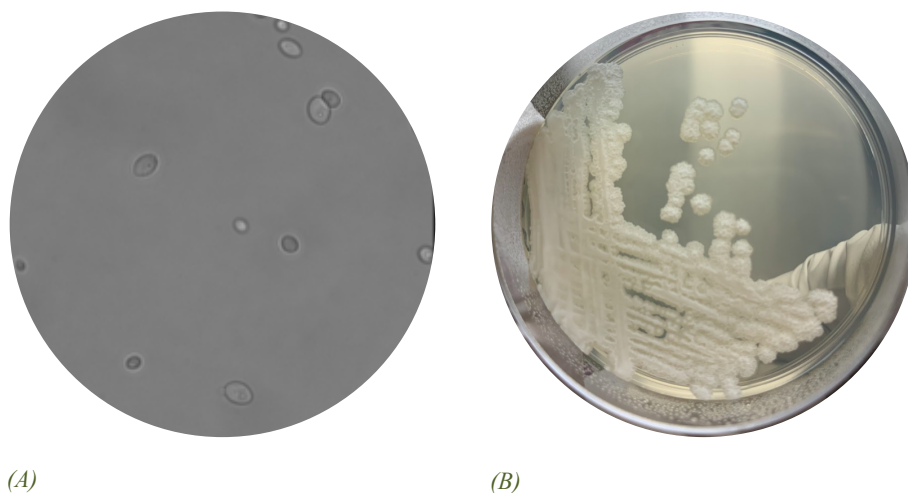
Industriellt har *C. fabianii* ett brett användningsområde. Den är mycket vanlig i vattenreningsanläggningar [52], och används ofta för sin arom, till exempel i öl där försök med okonventionell jäst har gjorts [53], samt i andra livsmedel så som choklad [54]. Lovande försök har också gjorts att dekontaminera azo-färgämnen, en typ av artificiella färgämnen som används i mat, med hjälp av *C. fabianii* [55]. Ett annat intressant användningsområde är lackasrening med i en trestegsprocess med hjälp av *C. fabianii* för användning av nedbrytandet av den östrogenliknande plastkemikalien Bisfenol A (BPA) [56]. Samt i produktionen av platycodin som rapporterats ha många biologiska effekter, så som i behandling mot hyperlipidemi, fetma, inflammation och cancer samt som spermiedödande medel [57],[58].

C. fabianii växer inte på laktos enligt theyeasts.org och det finns heller inga artiklar eller studier att finna som stödjer att *C. fabianii* skulle växa på laktos eller andra mjölkprodukter, vilket stöds vidare av odlingarna i den här studien, se avsnitt 5.3 och 5.7.

5.5.7. *Kodamaea ohmeri*

Morfologi

K. ohmeri har typiska runda celler, Figur 20A. På agarplatta bildar den stora, ljus kräm vita kolonier som påminner om blomkål i sin struktur, Figur 20B.



Figur 20. (A) Mikroskopbild. (B) Agarplatta.

Litteraturstudie

K. ohmeri går också under namnen *Pichia ohmeri* och *Yamadazyma ohmeri*. Den har isolerats i naturen från källor så som sand, saltvatten och frukt. Det senaste årtioendet är den dock mest känd för en ovanlig, men livshotande patogen på människor [59].

K. ohmeri har blivit isolerad från ost ett flertal gånger, bland annat från Brasilien, Mexico [60] och Egypten [61]. Trots detta växer den inte på laktos enligt theyeats.org. Detta stöds vidare då *K. ohmeri* hade mycket dålig tillväxt även i den här studien, se avsnitt 5.3 och 5.7.

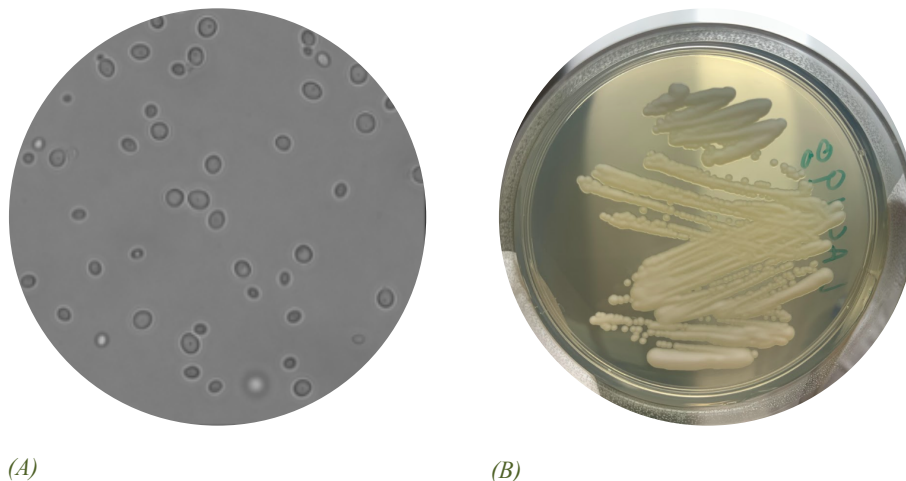
Ett industriellt intresse av *K. ohmeri*, är att den producerar D-arabitol, en sockeralkohol som sin främsta metaboliska produkt vid konsumtion av glukos. Detta används vid tillverkning av Xylitol som är en sockeralkohol med fem kolatomer vilket används som ett naturligt sötningsmedel i livsmedels- och konfektyrindustrin. Nuvarande metod för att producera Xylitol görs genom att man reducerar D-xylose med en nickelkatalysator. Detta leder dock till en risk för nickelkontaminering, så försök har gjorts att använda *K. ohmeri* som ett miljövänligt alternativ till den nuvarande Xylitol-tillverkningen [62].

K. ohmeri bärs av skalbaggen *Aethina tumida*, på svenska, lilla kupskalbaggen som är en patogen på bin i bikupor i södra USA [63]. Den har hittills inte påträffats i Sverige.[64]

5.5.8. *Meyerozyma caribbica*

Morfologi

M. caribbica har typiska, runda celler sett i mikroskop, Figur 21A, och växer i små krämfärgade kolonier på agarplatta, Figur 21B.



Figur 21. (A) Mikroskopbild. (B) Agarplatta.

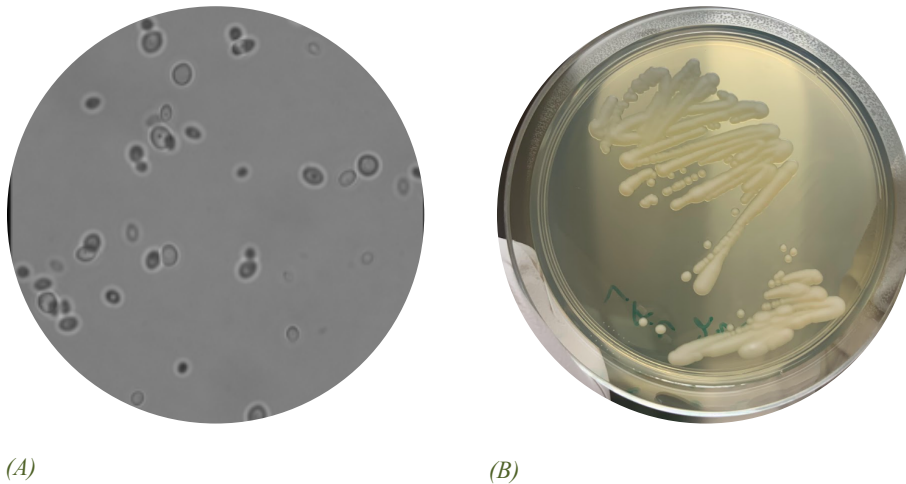
Litteraturstudie

M. caribbica går också under namnen *Candida fermentati* och *Pichia caribbica*. Den tillhör *M. guilliermondii*-complexet som även kallas "killer yeasts". Det namnet kommer av dess antimikrobiella aktivitet mot bakterier, svamp och protozoer [65]. I den här litteraturstudien hittas inga tecken på att den orsakar infektioner i människor. Den har ett potentiellt brett användningsområde i industrin, då särskilt relaterat till dess bakterie, svamp och protozoer-dödande egenskaper [66], *M. caribbica*s vanligaste forskningsområde är nämligen som en pesticid på en rad olika frukt och bär, så som avokado [67], äpplen [68], 220602), mango [69], aprikoser [70], tomater [71] och jordgubbar [72]. Den används också till pentosfermentering [9] och i lovande experimentella försök av mangan (Mn⁺)-reningar av vatten [73]. Det finns ingen information som stödjer att *M. caribbica* kan associeras med mjölk och mjölkprodukter, och den växte inte heller i den här studiens försök, se avsnitt 5.3 och 5.7.

5.5.9. *Meyerozyma carpophila*

Morfologi

M. carpophila har typiska, runda celler sett i mikroskop, Figur 22A, och växer i små krämfärgade kolonier på agarplatta, Figur 22B.



Figur 22. (A) Mikroskopbild. (B) Agarplatta.

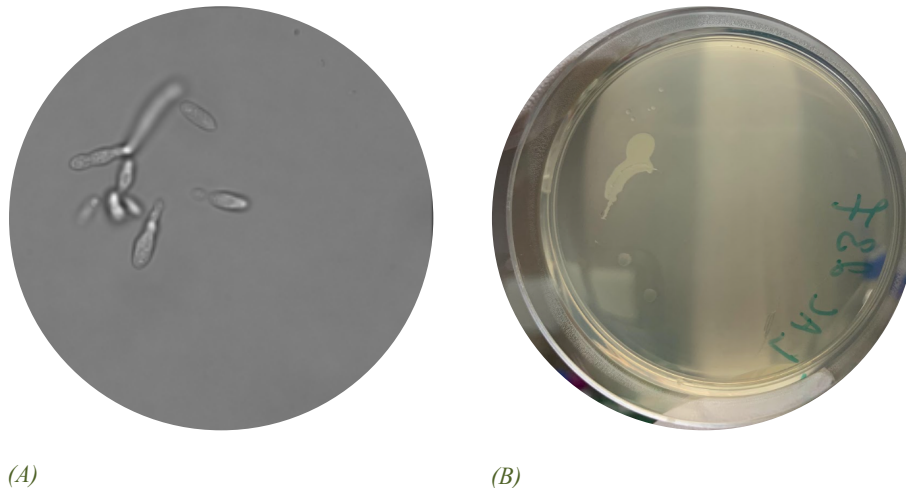
Litteraturstudie

M. carpophila kallas också *Candida carpophila*. I litteraturen finns stora svårigheter att särskilja *M. carpophila* och *Meyerozyma guilliermondi*. Trots detta tycks *M. carpophila* vara mer nära besläktad med *Meyerozyma caribbica* [64]. Enligt theyeasts.org växer den inte på laktos och ingenting i litteraturen stödjer att den skulle göra det. Detta stöds vidare då det inte heller finns någon information som stödjer att den nära släktingen *M. caribbica* skulle växa på laktos, se 4.6.7. Liksom *M. caribbica* växte heller inte *M. carpophila* i laktosmedium i den här studien, se avsnitt 5.3 och 5.7. *M. carpophila* påträffas på ett stort geografiskt område, bland annat ifrån kakaoböns-fermenteringar i Ghana [74], på Boniare (Karibiska Nederländerna) i spillning från duvor [75] samt på vingårdar i Azorerna, Portugal [76].

5.5.10. *Moesziomyces antarcticus*

Morfologi

M. antarcticus har ett avlångt växtsätt till skillnad från de flesta jästarterna, se Figur 23A. På agarplatta växer den mycket dåligt, med nästintill genomskinliga, mycket små kolonier, alternativt i en enda stor koloni som även den är relativt genomskinlig och minimal växande, Figur 23B.



Figur 23. (A) Mikroskopbild. (B) Agarplatta.

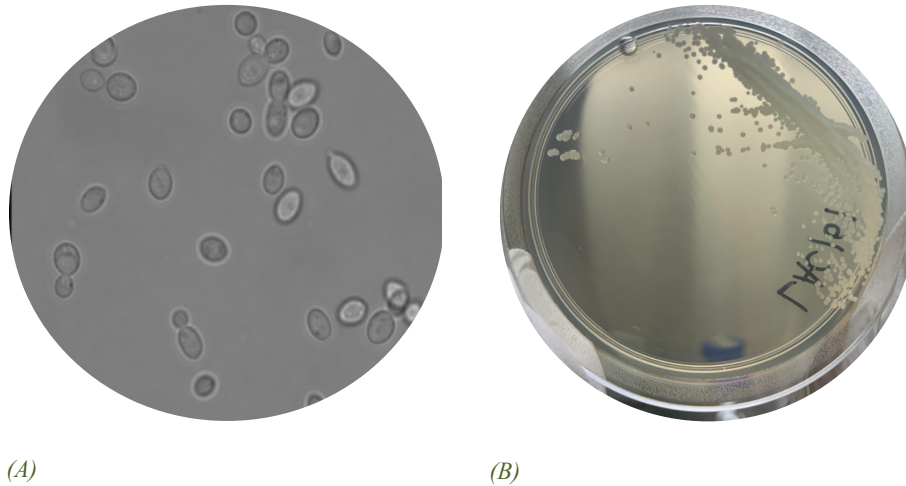
Litteraturstudie

M. antarcticus går även under namnet *Pseudozyma antarctica* och *Candida antartica*, den namngavs utifrån var den först samlades, vilket är Vandasjön på Antarktis [77]. Ett möjligt användningsområde av *M. antarcticus* är vid produktion av biotensider som mannosylerytritollipider (MEL) med lignocellulosahaltiga sockerarter, bland annat D-glukos, som råvaran. Däremot är en nackdel med denna process att koncentrationen med inhibitoriska ämnen inte får överskrida ett visst värde då det istället hämmar jästens tillväxt samt produktion av MEL [78]. Det finns även studier som visar att *M. antarticus* utsöndrar ett esteras med förmågan att bryta ner biologiskt nedbrytbar plast. Det fanns minimala skillnader i nedbrytningseffektivitet mellan olika stammar, men generellt kunde alla bryta ner PBS- och PBSA-film [7]. Det visade även sig att man fick bättre produktion av esteraset genom att odla *P. antarctica* med antingen glukos, galaktos, sackaros eller laktos i kombination med sojabönaolja. Den högsta enzymaktiviteten erhöles från odling på 6% laktos och periodisk tillsats av 0,5% sojabönaolja. [79]. Enligt en annan källa har *M. antarcticus* även visat sig producera itakonsyra med glukos, fruktos, maltos som kolkälla och under begränsning av kväve. Man noterade även en 24 timmars lång laggfase som man tror kan minskas genom att öka volymen för inokulering [80]. I denna studies odlingar noterades en minimal tillväxt av *M. antarcticus* och intressanta resultat på HPLC analysen, se avsnitt 5.3, 5.7 samt 6.3.2.

5.5.11. *Papiliotrema flavescens*

Morfologi

P. flavescens växer som en klassisk jäst, med relativt stora celler, Figur 24A. På agarplatta växer den med mycket små kolonier i krämvit färg, Figur 24B.



Figur 24. (A) Mikroskopbild. (B) Agarplatta.

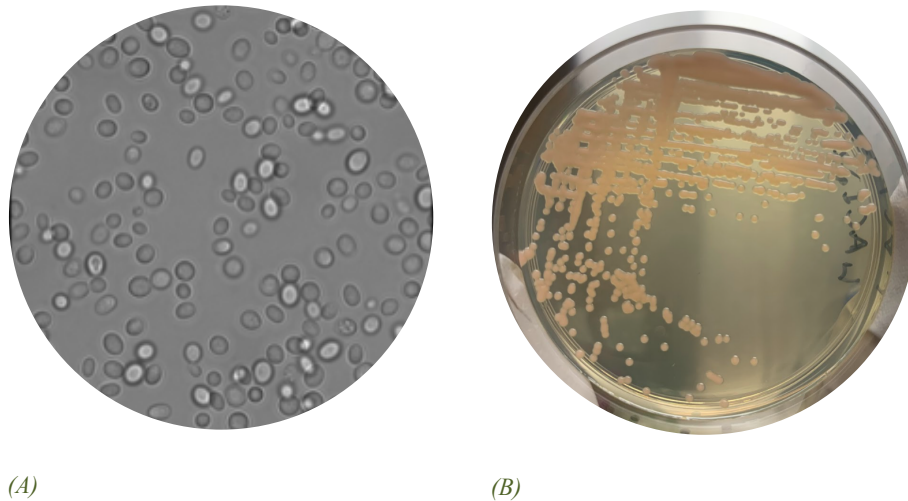
Litteraturstudie

P. flavescens, även tidigare känd som *Cryptococcus flavescens*, isolerades ihop med ett flertal andra stammar från en sumpskog i södra Thailand och tillhör fylan Basidiesvampar. Den visade tillväxt i både glukos och xylos, däremot fanns produktion av etanol endast i den förstnämnda. Man detekterade även produktion av indol-3-ättiksyra samt ett flertal enzymer såsom xylanas, proteas och lipas [81]. Den identifierades även under fermentering av kaffe och den jäststammen visade sig även producera pektinas. Man noterade skillnader i produktionen av enzymer och tror att det kan beror på skillnader i miljöförhållanden såsom pH, population och inkuberingstid [82]. I en annan studie påvisade *P. flavescens* svampdödande effekt på vete genom att konkurrera om näring, utrymme och parasitism. Detta testades på en filamentös svamp vid namn *Fusarium graminearum* och man fick bäst resultat vid pH 3–5 samt i kombination med *Bacillus subtilis* [83]. Enligt theyeasts.org växer inte *P. flavescens* på laktos, och inte heller finns det litteratur som stödjer att den skulle göra det. Dock visar resultaten från den här studiens odlingar att *P. flavescens* växer utmärkt med laktos som medium, se avsnitt 5.3 och 5.7.

5.5.12. *Rhodotorula mucilaginosa*

Morfologi

R. mucilaginosa växer som en klassisk jäst vid avsyning i mikroskop, Figur 25A och på agarplatta växer den med väl avgränsade, relativt små kolonier med en färg av aprikos (Figur 25B).



Figur 25. (A) Mikroskopbild. (B) Agarplatta.

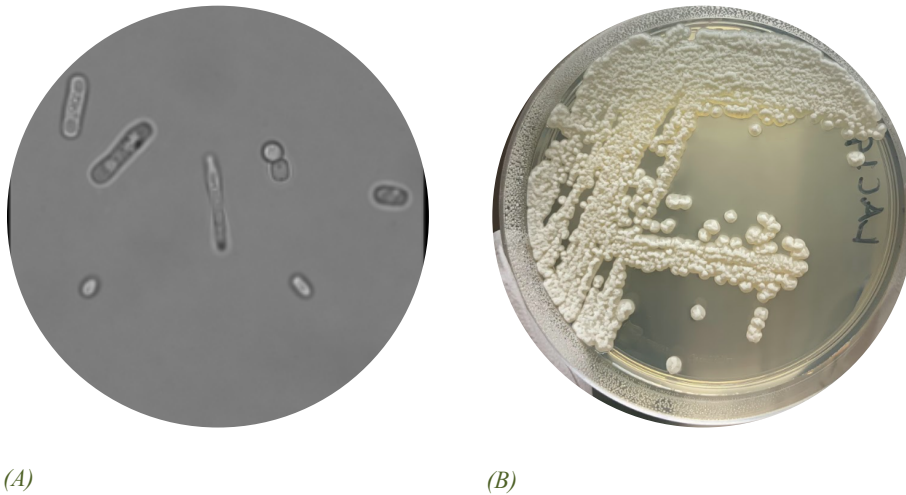
Litteraturstudie

Ett flertal källor rapporterar att *R. mucilaginosa* producerade pigmentämnena karotenoider, bland annat med sockerbetsmelass och vassle som kolkälla. Man konstaterade att de mest optimala förhållandena för tillväxt och produktion var pH 7, temperatur på 30 °C och additionen av ammoniumsulfat [84]. Denna jästar isolerades även från mejeriprodukter såsom yoghurt, men enligt deras resultat kunde det varken fermentera eller assimilera laktos. Däremot visade deras olika jäststammar av denna art varierande resultat vid assimilering av galaktos [85]. *R. mucilaginosa* hittades även i manteca, en italiensk mjölkprodukt, och studien visade att jästarten kunde producera spermidin, putrescin, fenyletylamin samt mycket låga doser histamin [86]. Just för att det har hittats som kontamination på vissa livsmedel har man även undersökt hur *R. mucilaginosas* tillväxt kan hämmas med BSA-kapsaicin nanopartiklar. Även i detta fall varierade resultaten då endast höga koncentrationer av kapsaicin visade hög dödlighet och tillväxthämning, medan låga koncentrationer gav motsatsen och i stället stimulerade tillväxten [87]. Utöver detta har man även funnit att man kan utnyttja glycerol från biodieselproduktion för tillverkning av lipider med hjälp av *R. mucilaginosa*, man noterade att man fick högst utbyte vid tillväxt på 33°C [88]. Den här studien visar att *R. mucilaginosa* har mycket klen tillväxt i medium med laktos, se avsnitt 5.3 samt 5.7.

5.5.13. Trichosporon insectorum

Morfologi

T. insectorum har ett intressant, avlångt växtsätt som varvas med det klassiska jästutseendet, Figur 26A. På platta växer den i relativt stora kolonier som påminner om blomkål i sin struktur, Figur 26B.



Figur 26. (A) Mikroskopbild. (B) Agarplatta.

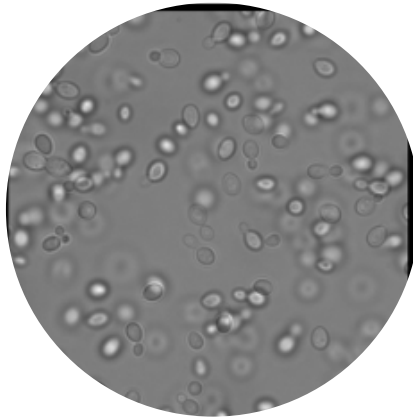
Litteraturstudie

Det är inte mycket känt om *T. insectorum*. Den är en så kallad ”killer yeast” vilket innebär att den dödar andra mikroorganismer [89]. Enligt en annan studie uppvisade den lipolytisk aktivitet i palm- och sojaolja samt att det finns potential för produktion av lipaser [90]. Uppgifter i litteraturen om huruvida arten växer på laktos saknas helt, men den här studiens odlingar visar dock god tillväxt i medium på laktos, se avsnitt 5.3 samt 5.7.

5.5.14. *Vishniacozyma taibaiensis*

Morfologi

V. taibaiensis har ett klassiskt växtsätt, Figur 27A. På platta bildar den mycket små, väl avskilda kolonier i gräddvit färg, Figur 27B.



(A)



(B)

Figur 27. (A) Mikroskopbild. (B) Agarplatta.

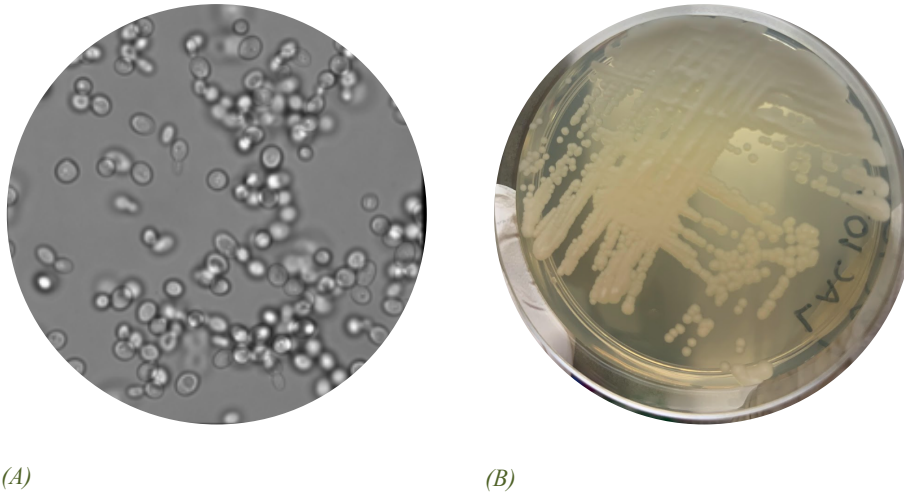
Litteraturstudie

V. taibaiensis är en mycket okänd jästart med endast 3 resultat vid sökning på databasen Web of Science. Den har jämförts med den närbesläktade jästarten *Vishniacozyma alagoana* där man genomförde fysiologiska och biokemiska tester. *V. taibaiensis* har testats positivt för assimilation av bland annat galaktos, maltos, etylamin, negativt för laktos, glycerol, med flera [91], och den växte bra i den här studiens odlingar på laktos, se avsnitt 5.3 samt 5.7.

5.5.15. *Yarrowia lipolytica*

Morfologi

Y. lipolytica har ett klassiskt växtsätt, Figur 28A. På platta bildar den rikligt med små, krämfärgade kolonier, Figur 28B.



Figur 28. (A) Mikroskopbild. (B) Agarplatta.

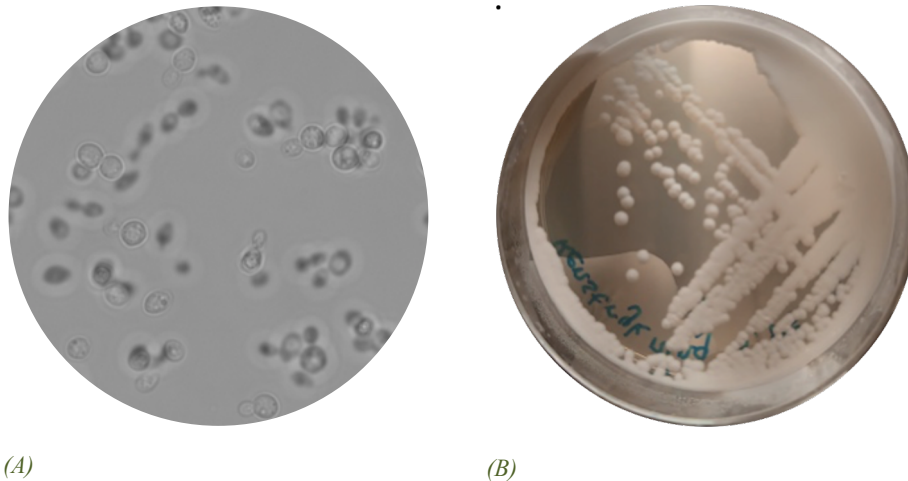
Litteraturstudie

Y. lipolytica har många användningsområden industriellt och är känd för att kontaminera mejeri- och köttprodukter. En nackdel är att en vild typ inte kan assimilera laktos, vilket även bekräftas i den här studiens odlingar, se avsnitt 5.3 och 5.7. Detta är anledningen till att man har hittat alternativa lösningar, exempelvis, genom att genmodifiera jästarten. Detta gjordes genom introduktion av utsöndrad β -galaktosidas för att bryta ner laktos till dess beståndsdelar glukos och galaktos, överuttryckning av fyra adekvata infödda gener från Leloir-vägen för att accelerera galaktos metabolismen. Resultatet blev produktion av 6,61 g/L fettsyror med ett utbyte av 0,146 g-fettsyror per g-substrat. Ytterligare modifiering gjordes för att syntetisera α -linolensyra genom att tilläga ett omega-3-desaturas [92]. En annan undersökning visade att *Y. lipolytica* kan använda vassle till att producera citronsyra, vilket framför allt används som en antioxidant, surgörande och smaksättningsmedel [93].

5.5.16. Jäst från höbal - *Wickerhamomyces anomalus*

Morfologi

W. anomalus har ett klassiskt växtsätt för en jäst, se Figur 29A, och bildar rikligt med fluffiga, gräddvita kolonier på agarplatta, Figur 29B.



Figur 29. (A) Mikroskopbild. (B) Agarplatta.

Litteraturstudie

W. anomales går också under namnet *Saccharomyces anomalus*, samt en rad andra synonym, så som *Hansenula anomala* och *Pichia anomala*. Detta kommer sig av att jästen först beskrevs 1889 och sedan dess har flyttat runt bland klasser och beskrivningar en hel del [94]. Den här jästen är välkänd och vida utforskad inom många olika användningsområden. Likt andra arter i denna studie är *W. anomales* en lipid-producerande jäst vilket gör den intressant för försök att tillverka till exempel biodiesel. Försök för just detta har gjorts, med lovande resultat från avfall från jordbruksnäringen, så som vassle, avfallsvatten från olivoljeindustri och godisfabriker [95]. Dessa positiva resultat stärks av en studie från 2019 där man med mycket goda resultat odlade *W. anomales* på många olika sockerarter, däribland laktos, för användning inom bioetanol-tillverkning [96].

Ett annat mycket aktuellt och intressant område är dess potential som skydd mot mygg-burna sjukdomar, så som malaria och gula febern. Vaccin är inte tillgängliga mot många av dessa sjukdomar, så sjukdomsförhindring sker främst genom användning av en rad olika insektsbekämpningsmedel. Tyvärr följer ofta problem med resistans mot dessa medel, samtidigt som de ofta är mycket skadliga för icke skadliga insekter och miljön i allmänhet. Vissa jästarter, så som *W. anomales* lever i symbios med insekter, i deras inre organ och det finns hopp om att använda den som ett biologiskt bekämpningsmedel mot mygg-burna sjukdomar i en s.k. "symbiotisk kontroll" [97].

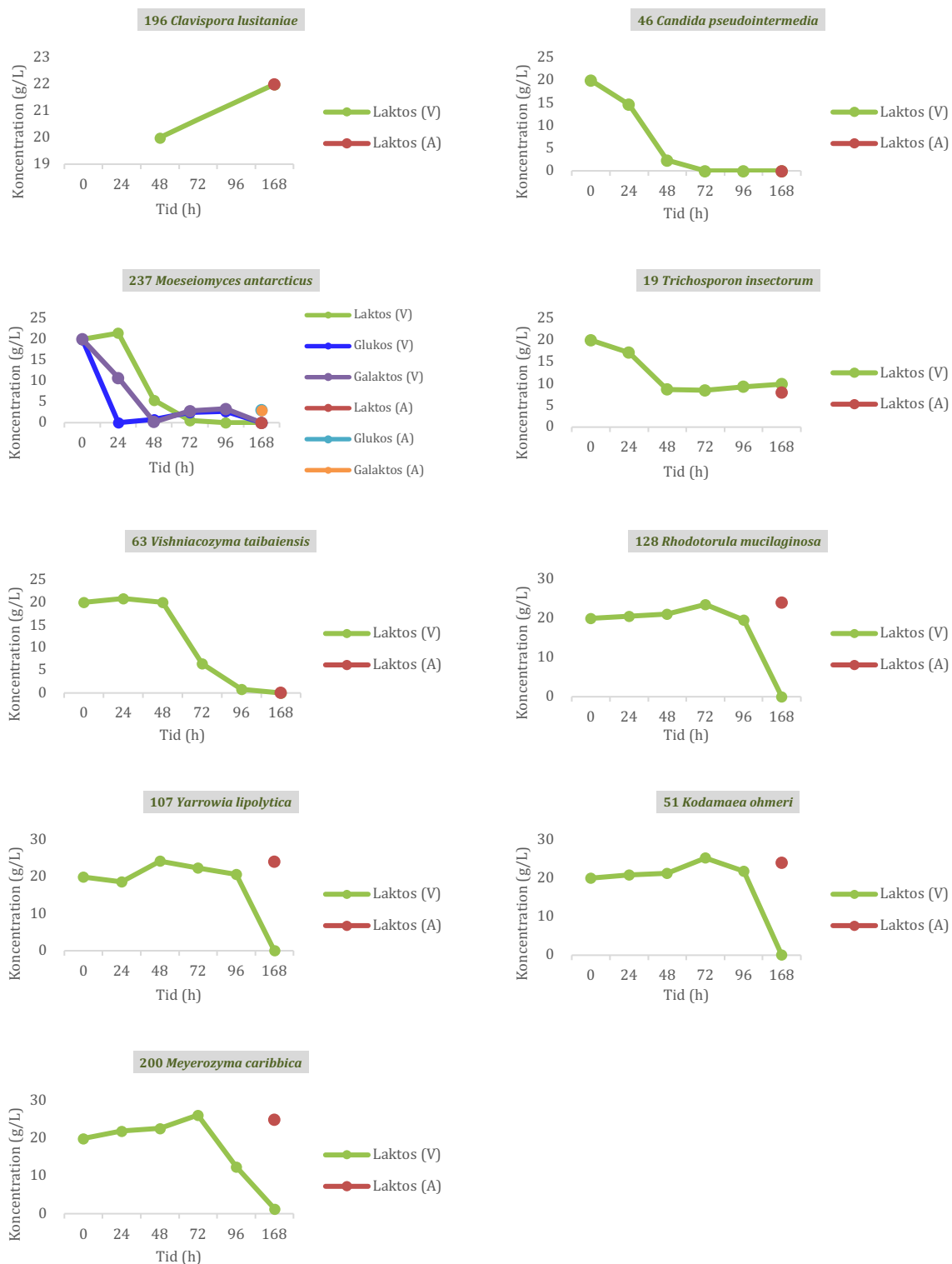
Vidare är *W. anomalus* ofta den dominerande jästarten (I upp till 66% av isolaten) i naturligt fermenterade surdegar, detta kan härledas till dess osmotolerans och högre syratolerans jämför med *S. cerevisiae* (bagerijäst) [98]. Den visar också lovande resultat i användningen mot mögel som uppkommer efter skörd på körsbärstomater vilket kommer av dess egenskaper som "killer yeast". Dvs. den har en naturlig förmåga att tillverka toxiner som effektivt dödar andra jästarter, mögel och andra mikroorganismer [99]. Detta utnyttjas genom att den används till bekämpning mot angrepp av

mikroorganismer på till exempel kakao, ananas och avokado [100] samt på många övriga frukter och grönsaker. *W. anomalous* toxiska effekter är dock verkningslösa mot *S. cerevisiae*, som den enligt upprepade studier gärna samlever med, som i tex en studie där en kombination av dem båda gav en ökad mängd etylacetat i den kinesiska spritdrycken Baiju [101].

5.6. HPLC

I Figur 30. visas hur jästarterna har konsumerat laktos. En sjunkande linje indikerar att laktosen har konsumerats, där den gröna linjen kommer från kontinuerlig sampling från flytande odlingar i varmrum (V) under 8 dagar och de enstaka prickarna kommer från en enda mätning efter 8 dagar i Aquila (A). *C. lusitaniae* visar bara konsumtion från sammanlagt 3 dagar, pga. kontaminering. När det gäller *M. antarcticus* detekterades laktos, glukos och galaktos i både proverna för varmrummet och Aquila; det detekterades 3 g/L galaktos och glukos i Aquila men dessa värden syns inte i diagrammet pga överlappning. Utifrån dessa resultat kan ses att sex stammar, *A. mycoroxinoverans*, *P. flavescens*, *C. pseudointermedia*, *M. antarcticus*, *T. insectorum* och *V. taibaiensis*, konsumerade allt eller större del av laktosen och detta resultat överensstämde med dom från Aquila. Det fanns även en minskning av laktos hos *C. fabianii*, *M. caribbica*, *R. mucilaginosa*, *Y. lipolytica* och *K. ohmeri*, däremot visar resultaten från Aquila att det inte har konsumerats. Detta kan tyda på att det eventuellt har skett kontamination av proverna och möjligtvis är det en annan organism som konsumerat laktosen. Slutligen visade *C. orthopsilosis* och *C. curvatum* att laktoskoncentrationen hade förblivit mer eller mindre densamma och det fanns alltså ingen tillväxt; dock hade laktoshalten för den sistnämnda minskat i Aquila men orsaken är oklar eftersom kontamination är väldigt osannolik då proverna inte togs ut för sampling.





Figur 30. Resultat från HPLC analys för de valda jäststammarna som växte i varmrum (V) respektive Aquila (A)

6. Diskussion

6.1. Bioinformatiks undersökning av ITS-regionen med BLAST

Som kan observeras i Tabell 5, avsnitt 5.1, har många av jästarterna 100 % identitetsträff, eller väldigt nära det, vilket innebär att vi har en självklar matchning för vår jäststam. Däremot finns det tio jäststammar (se Bilaga 3.) där identitetsträffen ligger mellan 94,14%-98,38 %, vilket innebär, som nämnts tidigare, att de kan vara nya arter. För att säkerställa att vi har rätt matchning har DNA-sekvenserna även laddats upp på ITS-databasen utöver den generella, där de allra flesta gav samma resultat och de som var olika har noterats i Bilaga 3. Där det har ansetts nödvändigt har vi valt att utgå ifrån ITS-resultatet, vilket innefattar fyra utav de som valdes för litteraturstudien, dvs. *C. pseudointermedia*, *R. mucilaginosa*, *P. flavescens* och *V. taibaiensis*. Detta har gjorts i enstaka fall då det ibland är mer tillförlitligt med ITS-databasen eftersom man endast får i resultat i form av typstammar, alltså matchningar mot en säkerställd art. I den generella databasen kan man få resultat i form av kompost, dvs man har inte undersökt vilken art det är, dock är det ofördelaktigt att endast söka i ITS-databasen då man riskerar att få närmaste släkting som översta hit om arten inte är registrerad där.

6.2. Litteraturstudie

Även om alla jästarter som undersökts naturligtvis är intressanta för framtida studier är vissa mer intressanta än andra för just vårt syfte - att hitta laktosväxande jästarter för framtida industriell applicering. Enligt litteraturstudien kan det bekräftas att åtminstone 6 av jästarterna växer på laktos eller återfinns i mjölkprodukter så som vassle, yoghurt, ost eller dylikt, nämligen: *A. mycotoxinovorans*, *C. lusitaniae*, *C. curvatum*, *K. ohmeri*, *M. antarcticus*, *R. mucilaginosa* samt *W. anomalus*. Även *Y. lipolytica* återfinns i litteraturen som laktosväxande, men då som en genmodifierad stam. En stam som skiljer sig från litteraturen jämfört med våra egna tillväxtförsök, nämligen *P. flavescens*. Arten ska den enligt litteraturen och theyeasts.org inte växa på laktos men vår stam gav fina tillväxtresultat i både varmrum och Aquila.

I flera fall är de arter som undersökts mycket outforskade vilket betyder att mycket lite information finns tillgänglig. *C. pseudointermedia*, *M. carpophila* och *V. taibaiensis* är exempel på jästarter där ingen, eller knapphändig information fanns. Detta betyder naturligtvis inte att dessa jästarter inte skulle kunna användas till någon industriell applicering, utan snarare att mer forskning behövs.

Gemensamt för de jästarterna där försök redan gjorts för tillverkning av biodiesel eller etanol tycks vara att jästarterna har förmågan att tillverka lipider, dvs fett. Av de jästarter som undersökts tycks särskilt *C. curvatum*, *R. mucilaginosa*, *T. insectorum* och *W. anomalus* vara kapabla till detta. Av dessa fyra växer *C. curvatum*, *R. mucilaginosa* och *W. anomalus* på laktos enligt litteratur.

6.3. Tillväxtkurvor

6.3.1. Scan-o-matic

Scan-o-matic är en utmärkt utrustning när man vill analysera väldigt många prov på en gång. Nackdelen är dock att man missar viss information som annars kan ses med blotta ögat, så som färg och konsistens av jäststammen. En annan faktor att ta med i beräkningen är att scan-o-matic-resultaten kommer från en enda koloni odlad på agarplatta, så resultaten kan skilja sig när samma jäststam odlas

i flytande medium. Enligt scan-o-matic växer samtliga jäststammar utom *R. mucilaginosa*, *M. caribbica* och *K. ohmeri* på laktos, som möjligen kan ses ha en blygsam tillväxt. Allra bäst tycks *P. flavescens* och *T. insectorum* växa, som har en kort laggfase och ordentlig tillväxt. Några arter är tvetydiga, så som *C. fabianii*, *C. orthopsilosis* och *M. carpophila*. Den enda arten som tycks växa bättre på laktos än glukos är *Ms antarcticus*, vilket naturligtvis är mycket intressant. En annan faktor att ha i åtanke är att mätningen i scan-o-matic bara utfördes under 36 timmar. Man skulle kunna tänka sig att de arter som inte har tillväxt här har en laggfase som är längre än så. Värt att notera är att vi inte har några odlingsresultat av *W. anomalus*.

6.3.2. HPLC

Aquila/Varmrum

HPLC-diagrammen för laktos följer tillväxtkurvorna från Aquila relativt bra, med ett fåtal undantag. Man kan se att mängden laktos minskade för de stammar som växte väl på laktos och kvarstod för de som inte växte på laktos. Detta är ett positivt tecken då det visar att proven från Aquila och HPLC inte har kontaminerats, vilket i sin tur betyder att våra resultat är trovärdiga. Å andra sidan kan resultaten anses vara väldigt begränsade då HPLC endast identifierar ämnen som det finns standard för. I vårt fall hade vi, utöver de som finns med på diagrammen, standarder för glycerol, etanol, dulcitol, formiat och acetat (se Tabell 4 i avsnitt 4.9). Dessa gav dock inte utslag i någon odling. Genom samplingen som utfördes i avsnitt 4.5.1 kan vi se hur laktos förbrukats när jäststammarna har vuxit. Redan från början gjordes här ett misstag: Mätningarna påbörjades först dag 2, när jästarterna redan vuxit ett dygn. En mätning dag 1 borde ha gjorts för att vi skulle veta exakt hur mycket laktos som fanns i flaskorna från början ifall några misstag begicks. Nu kan vi endast utgå ifrån halten vi själva mätte upp vilket borde ha varit 20 g/L.

Enligt HPLC växte endast ett fåtal av stammarna som förväntat, dvs *A. mycotoxinovorans*, *C. pseudointermedia*, *C. curvatum*, *M. antarcticus*, *P. flavescens*, *T. insectorum* och *V. taibaiensis*, som hade en tydlig tillväxt i både varmrums och Aquila. Intressant nog tycks *C. curvatum* haft tillväxt utan att ha förbrukat laktos enligt laktos-mätningarna från HPLC. *C. curvatum* var den enda stammen som inte vuxit i varmrums, men som hade tillväxt i Aquila. *C. orthopsilosis* och *C. lusitaniae* var två jäststammar som inte växte alls, i varken Aquila eller varmrums. Observera att *C. lusitaniae*'s tillväxtkurva är missvisande då provet inte sattes in i Aquila fören efter 96 timmar. *W. anomalus* odlades inte, dels på grund av tidsbrist och del eftersom den inte selekterats för odling i det ursprungliga steget i avsnitt 4.2.

Sedan följde en lång rad tvetydiga resultat bestående av *C. fabianii*, *K. ohmeri*, *M. caribbica*, *M. carpophila*, *R. mucilaginosa*, *Y. lipolytica* där ingen växte i Aquila, men samtliga växte i varmrums 8 dagar in i odlingen. Det hade ju kunnat vara möjligt att samtliga av dessa 6 stammar har en 8 dagar lång laggfase men det troliga är att samtliga av dessa flaskor blivit kontaminerade av andra organismer, vilket ytterligare stöds av att alla vuxit ungefär lika mycket, och hade ungefär samma OD-värde. Aquilas värden bedöms vara mer pålitliga då dess flaskor hållits stängda under hela mätningens gång, medan varmrums flaskor öppnats för sampling och OD-mätning varje vardag.

Avslutningsvis har vi två jästarter som betedde sig annorlunda än de övriga. *T. insectorum* tycktes förbruka ungefär hälften av laktosen, för att sedan avstanna, samtidigt som den hade en mycket stark tillväxt enligt mätningar från Aquila. *M. antarcticus* var den enda arten som tycktes producera helt andra saker än de övriga arterna. HPLC gav utslag för galaktos och glukos, vilket inte är orimligt då dessa är beståndsdelarna för laktos, dock är mängden är inte trovärdig då galaktos försvinner dag 3 och återfinns dag 4. Detta kan bero på att systemet inte är känsligt nog att detektera så låga koncentrationer som fanns, eller att andra ämnen som liknar galaktos och glukos producerats, men

som vi inte hade standarder för. I detta fall hade man behövt sampla kontinuerligt från odlingen i aquila för HPLC analys och på så sätt kunna jämföra produktionen av olika ämnena för de olika dagarna. Alternativt kan det vara andra okända ämnen som har sina toppar på samma ställen som galaktos och glukos, eller andra standarder, men det är ingen slutsats man kan dra utan vidare undersökning.

6.3.3. Faktorer som påverkar tillväxt

Som ses på tillväxtkurvorna på avsnitt 5.3 växte endast ungefär hälften av stammarna på laktos, vilket är oväntat då tidigare odlingar har vuxit på laktos med gott resultat. Tillvägagångssättet för hur stammarna odlades tidigare jämfört med hur de odlades i det här arbetet skiljer sig åt en hel del och det finns ett flertal faktorer som skulle kunna påverka resultat. En av de största skillnaderna är volymstorleken på odlingarna; tidigare odlingar skedde i flytande kulturer på 250 µl, till skillnad från odlingarna i det här arbetet som var på 50 ml. Under odlingens gång användes två olika batcher av medium och det är möjligt att det finns en minimal, men betydelsefull skillnad för jästarternas tillväxt. Utöver detta fanns skillnader i odlingsmedium som användes i den här och tidigare studier. Stammarna renstryktes tidigare på mediet YNB medan det som användes i den här studien var DELFT, som är näringsfattigare. Man bör också ha i åtanke att generella medium oftast är framtagna för *S. cerevisiae*, vars behov i form av exempelvis näring och pH-värde, kan skilja sig från de vilda stammarna. Det finns även en korrelation mellan de stammar vars förkulturer odlades på DELFT glukos och de som inte visade tillväxt på Aquila. Ingen jästart förutom *C. curvatum* växte på laktos efter att de hade odlats på glukos (se avsnitt 5.3 och Tabell 2). En av anledningarna till att de senare växte dåligt i laktos kan bero på att det tar längre tid för stammarna att ställa om sig från att metabolisera en annan kolkälla eftersom uttryck av specifika gener krävs, lagfasen kan alltså vara längre än odlingens varaktighet.

Det finns också en liten risk att tillväxten i tidigare studier varit dåligt men ändå detekterats som tillväxt på grund av till exempel sediment på botten av 96-brunnsplattan som studien utfördes i. Dessutom finns det självklart alltid risk för kontamination, som skulle ha gett ett falskt, positivt utslag. Risken anses dock låg då odlingarna utfördes med största försiktighet. Dessutom verkar det inte troligt med så många falska positiv på en gång. Slutligen så finns en möjlighet att arterna faktiskt inte alls kan växa på laktos. Detta kan kontrolleras genom sekvensering av arternas genom för att se om de har de gener för att hydrolysera laktos. Anledningen att detta inte utförts är p.g.a. begränsade ekonomiska resurser.

6.4. Förbättringsförslag

Det finns del förbättringar som kan göras för att få mer tillförlitliga resultat och för att kunna dra tydligare slutsatser utifrån syftet. En av de främsta, som kan göras med utgångspunkt i vårt arbete, är att undersöka jästarterna vidare utifrån litteraturstudien. Exempelvis baserades vårt urval av jäststammar beroende på huruvida de växte på laktos, men man bör ha fler faktorer med i urvalet. Är fokus tex biodieseltillverkning, eller tillverkning av matfetter bör man i första hand söka efter arter som producerar lipider, för att sedan undersöka i andra hand, vilka av dessa som växer på laktos. Ett förslag för att undersöka vilka arter som producerar lipider är att odla arterna på laktos, undersöka om lipider finns genom infärgning av dessa och observation i mikroskop, vilket sedan kan bekräftas med tex HPLC.

Man kan även basera standarderna för HPLC på de metaboliter man hittade att de olika jästarterna producerade, enligt litteraturstudien. Utöver detta borde det ha tagits prover till HPLC redan på dag 1 innan tillväxt av jäststammar för att se mängden metaboliter från början.

Generellt sätt bör alla olika moment repeteras ett par gånger för att vidare undersöka fynden, exempelvis *M. antarcticus* som nämndes tidigare för HPLC och även odlingen för att försäkra sig att kontaminering inte skett. Risker av kontamination kan även minimeras genom att upprepa odlingarna med stängda dubbletter av odlingarna. Man skulle även behövt genomföra de olika momenten över en längre period. Hälften av våra jäststammar växte inte, vilket kan bero på att de har mycket lång lagfas.

Slutligen, skulle man även behövt undersöka tillväxtfaktorerna noggrannare, så som pH värde, temperatur samt koncentration av inokulering och val av medium. Ett alternativt sätt till odling vore att odla stammarna på agar plattor med laktos för att möjliggöra en mer kontrollerad avsyning av tillväxten.

7. Slutsats

Sammanfattningsvis, litteraturstudien visar att många, om inte samtliga av jästarterna är intressanta. De som bedömts vara mest intressanta för just vårt syfte, enligt litteraturstudien är *C. curvatum*, *R. mucilaginosa* och *W. anomalus* då de både växer på laktos och producerar användbara lipider som skulle kunna användas i tillverkningen av till exempel biodiesel. Noterbart är dock att *R. mucilaginosa* växte mycket dåligt i alla våra odlingsförsök på laktos. Scan-o-matic visar att *P. flavescens* och *T. insectorum* är de jästarter som växer mest effektivt på laktosplattor, medan *M. antarcticus* faktiskt tycks växa bättre i laktosmedium än i glukosmedium. Från resultaten av de flytande kulturerna genom HPLC ser vi att *A. mycotoxinovorans*, *C. pseudointermedia*, *C. curvatum*, *M. antarcticus*, *P. flavescens*, *T. insectorum* och *V. taibaiensis* hade tillväxt i både Aquila och Varmrum. Noterbart här är tillväxt av *P. flavescens* trots att arten enligt litteratur inte växer på laktos. *C. curvatum* tycks ha haft tillväxt utan att ha förbrukat laktos enligt laktos-mätningarna från HPLC och var också den enda stammen som inte vuxit i varmrummet, men som hade tillväxt i Aquila. *M. antarcticus* den enda arten som producerade något annat än vad de övriga jästarterna gjorde, och här behövs fler standarder och upprepade odlingsförsök för att kunna få en tydlig bild av vad jästarten producerar.

Källförteckning

1. Hur mjölk blir ost [Internet]. Hjärta mjölk. 2019 [citerad 2022 Apr 25]. Tillgänglig från: <https://mjolk.se/hur-mjolk-blir-ost/>
2. Mesost och andra vassleprodukter [Internet]. www.matkult.se. [citerad 2022 Apr 25]. Tillgänglig från: <https://www.matkult.se/mjolk/olika-sorters-mjolkprodukter/mesost-och-andra-vassleprodukter.html>
3. Kullberg J. Vassle: sammansättning, process och användningsområden [Internet]. stud.epsilon.slu.se. Sveriges lantbruksuniversitet; 2021 [citerad 2022 Apr 25]. Tillgänglig från: <https://stud.epsilon.slu.se/17119/>
4. Xu J, Hao J, Guzman JLL, Spirito CM, Harroff LA, Angenent LT. Temperature-Phased Conversion of Acid Whey Waste Into Medium-Chain Carboxylic Acids via Lactic Acid: No External e-Donor. *Joule*. 2018 Feb;2(2):280–95.
5. Lahue C, Madden AA, Dunn RR, Smukowski Heil C. History and Domestication of *Saccharomyces cerevisiae* in Bread Baking. *Frontiers in Genetics*. 2020 Nov 11;11.
6. Hakim A. Yeast FAQ's [Internet]. Phaff Yeast Culture Collection. 2019 [citerad 2022 Apr 25]. Tillgänglig från: <https://phaffcollection.ucdavis.edu/yeast-faqs>
7. Watanabe T, Shinozaki Y, Suzuki K, Koitabashi M, Yoshida S, Sameshima-Yamashita Y, et al. Production of a biodegradable plastic-degrading enzyme from cheese whey by the phyllosphere yeast *Pseudozyma antarctica* GB-4(1)W. *Journal of Bioscience and Bioengineering* [Internet]. 2014 Aug 1 [citerad 2022 Apr 25];118(2):183–7. Tillgänglig från: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1389172314000255?via%3Dihub>
8. Johnson EA, Echavarri-Erasun C. Chapter 3 - Yeast Biotechnology [Internet]. Kurtzman CP, Fell JW, Boekhout T, editors. ScienceDirect. London: Elsevier; 2011 [citerad 2022 Apr 25]. p. 21–44. Tillgänglig från: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780444521491000033>
9. Rebello S, Abraham A, Madhavan A, Sindhu R, Binod P, Babu AK, et al. Non-conventional Yeast cell factories for sustainable bioprocesses. *FEMS Microbiology Letters*. 2018 Sep 13;

10. Bellemain E, Carlsen T, Brochmann C, Coissac E, Taberlet P, Kauserud H. ITS as an environmental DNA barcode for fungi: an in silico approach reveals potential PCR biases. *BMC Microbiology*. 2010;10(1):189.
11. National Center for Biotechnology Information. BLAST: Basic Local Alignment Search Tool [Internet]. Nih.gov. 2018 [citerad 2022 Jun 15]. Tillgänglig från: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
12. Vu D, Groenewald M, Szöke S, Cardinali G, Eberhardt U, Stielow B, et al. DNA barcoding analysis of more than 9 000 yeast isolates contributes to quantitative thresholds for yeast species and genera delimitation. *Studies in Mycology*. 2016 Sep 1;85(1):91–105.
13. Federhen S. Type material in the NCBI Taxonomy Database. *Nucleic Acids Research*. 2014 Nov 14;43(D1):D1086–98.
14. Muhonen S. Skillnader i konserveringsmetod [Internet]. Grovfoder till häst. 2015 [citerad 2022 Jun 5]. Tillgänglig från: <https://www.grovfodertillhast.se/2015/10/30/ho-hosilage-ensilage-vad-ar-skillnaden/>
15. Hösilage - GreenFeed [Internet]. www.greenfeed.se. [citerad 2022 Jun 5]. Tillgänglig från: <https://www.greenfeed.se/startsidea/hosilage>
16. Bean GJ, Jaeger PA, Bahr S, Ideker T. Development of Ultra-High-Density Screening Tools for Microbial “Omics.” Hoheisel JD, editor. *PLoS ONE*. 2014 Jan 21;9(1):e85177.
17. Zackrisson M, Hallin J, Ottosson L-G, Dahl P, Fernandez-Parada E, Ländström E, et al. Scan-omatic: High-Resolution Microbial Phenomics at a Massive Scale. *G3: Genes|Genomes|Genetics* [Internet]. 2016 Jun 30 [citerad 2022 Jun 18];6(9):3003–14. Tillgänglig från: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5015956/>
18. Cell Growth Quantifier (CGQ) - Online Biomass Monitoring in Shake Flasks [Internet]. aquila biolabs GmbH. [citerad 2022 Jun 19]. Tillgänglig från: <https://aquila-biolabs.de/cgq/>
19. Biorender. BioRender [Internet]. BioRender. biorender-marketing-site; 2019 [citerad 2022 Jul 11]. Tillgänglig från: <https://biorender.com/>

20. National Human Genome Research Institute. Polymerase chain reaction (PCR) fact sheet [Internet]. Genome.gov. 2020 [citerad 2022 Jun 22]. Tillgänglig från: <https://www.genome.gov/about-genomics/fact-sheets/Polymerase-Chain-Reaction-Fact-Sheet>
21. GeneJET PCR Purification Kit [Internet]. www.thermofisher.com. [citerad 2022 Jun 17]. Tillgänglig från: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/K0701>
22. Gelelektrofores - Hur gelelektrofores fungerar. [Internet]. StuDocu. StuDocu; 2020 [citerad 2022 Jun 17]. Tillgänglig från: <https://www.studocu.com/sv/document/gymnasieskola-sverige/kemi-2/gelelektrofores-hur-gelelektrofores-fungerar/9556675>
23. Yourgenome.org. 2020 [citerad 2022 Jun 17]. Tillgänglig från: https://www.yourgenome.org/sites/default/files/illustrations/diagram/gel_electrophoresis_dna_tank_yourgenome.png
24. Dahrén N. Kortfilm - Högupplösande vätskekromatografi HPLC [Internet]. www.youtube.com. 2018 [citerad 2022 Jun 2]. Tillgänglig från: <https://www.youtube.com/watch?v=gHkfgaRe0I>
25. Liu X-Z ., Wang Q-M ., Göker M, Groenewald M, Kachalkin AV, Lumbsch HT, et al. Towards an integrated phylogenetic classification of the Tremellomycetes. Studies in Mycology [Internet]. 2015 Jun 1 [citerad 2022 May 3];81(1):85–147. Tillgänglig från: <https://www.ingentaconnect.com/content/wfbi/sim/2015/00000081/00000001/art00006>
26. taxonomy. Taxonomy browser (*Apiotrichum mycotoxinovorans*) [Internet]. www.ncbi.nlm.nih.gov. [citerad 2022 May 5]. Tillgänglig från: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=252803>
27. Molnar O, Schatzmayr G, Fuchs E, Prillinger H. *Trichosporon mycotoxinivorans* sp. nov., A New Yeast Species Useful in Biological Detoxification of Various Mycotoxins. Systematic and Applied Microbiology. 2004 Dec;27(6):661–71.
28. Tavanti A, Davidson AD, Gow NAR, Maiden MCJ, Odds FC. *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp. nov. To Replace *Candida parapsilosis* Groups II and III. Journal of Clinical Microbiology [Internet]. 2005 Jan 1 [citerad 2022 May 25];43(1):284–92. Tillgänglig från: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC540126/>

29. Riccombeni A, Vidanes G, Proux-Wéra E, Wolfe KH, Butler G. Sequence and Analysis of the Genome of the Pathogenic Yeast *Candida orthopsilosis*. Ravel J, editor. PLoS ONE. 2012 Apr 26;7(4):e35750.
30. Leong S, Wong, Kong Y, Farid A, Oweida M, Iqbal D, et al. Surface Treatment of Concrete by Calcium Carbonate Biodeposition Using *Candida orthopsilosis*. Jordan Journal of Civil Engineering [Internet]. 2022 [citerad 2022 May 25];16(1):2022. Tillgänglig från: <https://jjce.just.edu.jo/issues/paper.php?p=6072.pdf>
31. Nakase T, Komagata K, Fukazawa Y. *CANDIDA PSEUDINTERMEDIA* SP. NOV., ISOLATED FROM "KAMABOKO, " A TRADITIONAL FISH-PASTE PRODUCT IN JAPAN. The Journal of General and Applied Microbiology [Internet]. 1976 [citerad 2022 May 30];22(4):177–82. Tillgänglig från: https://www.jstage.jst.go.jp/article/jgam1955/22/4/22_4_177/article
32. Barrilli ÉT, Tadioto V, Milani LM, Deoti JR, Fogolari O, Müller C, et al. Biochemical analysis of cellobiose catabolism in *Candida pseudointermedia* strains isolated from rotten wood. Archives of Microbiology. 2020 Apr 23;202(7):1729–39.
33. Sette LD, Passarini MRZ, Rodrigues A, Leal RR, Simioni KCM, Nobre FS, et al. Fungal diversity associated with Brazilian energy transmission towers. Fungal Diversity. 2010 Jul 27;44(1):53–63.
34. Masoud W, Bjørg Cesar L, Jespersen L, Jakobsen M. Yeast involved in fermentation of *Coffea arabica* in East Africa determined by genotyping and by direct denaturing gradient gel electrophoresis. Yeast. 2004 May;21(7):549–56.
35. Gargeya IB, Pruitt WR, Simmons RB, Meyer SA, Ahearn DG. Occurrence of *Clavispora lusitaniae*, the teleomorph of *Candida lusitaniae*, among clinical isolates. Journal of Clinical Microbiology. 1990 Oct;28(10):2224–7.
36. taxonomy. Taxonomy browser (*Clavispora lusitaniae*) [Internet]. www.ncbi.nlm.nih.gov. [citerad 2022 Jun 14]. Tillgänglig från: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=info&id=36911>

37. Jairath S, Sahota P, Pandove G. Preparation of non-alcoholic naturally carbonated beverage using yeast isolate from whey beverage. Czech Journal of Food Sciences. 2012 Mar 9;30(No. 2):135–43.
38. Singh P, Sahota PP, Singh RK. Evaluation and characterization of new α -L-rhamnosidase-producing yeast strains. The Journal of General and Applied Microbiology. 2015;61(5):149–56.
39. Chaves-López C, Tofalo R, Serio A, Paparella A, Sacchetti G, Suzzi G. Yeasts from Colombian Kumis as source of peptides with Angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory activity in milk. International Journal of Food Microbiology. 2012 Sep;159(1):39–46.
40. Boekhout T, Robert V. Yeasts in Food [Internet]. Google Books. Elsevier; 2003 [citerad 2022 Jun 15]. Tillgänglig från:
<https://books.google.se/books?id=XqmjAgAAQBAJ&pg=PA232&lpg=PA232&dq=YEAST+FLO+RA+OF+RAW-MILK+IN+EL-MINIA-CITY>
41. Wawrysiuk S, Rechberger T, Futyma K, Miotła P. Candida lusitaniae – a case report of an intraperitoneal infection. Menopausal Review. 2018;17(2):94–6.
42. Zhang H, Ran Y, Li D, Liu Y, Xiang Y, Zhang R, et al. Clavispora lusitaniae and Chaetomium atrobrunneum as Rare Agents of Cutaneous Infection. Mycopathologia. 2009 Dec 18;169(5):373–80.
43. Atkinson BJ, Lewis RE, Kontoyiannis DP. Candida lusitaniae fungemia in cancer patients: risk factors for amphotericin B failure and outcome. Medical Mycology [Internet]. 2008 Sep 1 [citerad 2022 Jun 15];46(6):541–6. Tillgänglig från:
<https://academic.oup.com/mmy/article/46/6/541/1019884?login=false>
44. Díaz MA, Pereyra MM, Santander FFS, Perez MF, Córdoba JM, Alhussein M, et al. Protection of Citrus Fruits from Postharvest Infection with Penicillium digitatum and Degradation of Patulin by Biocontrol Yeast Clavispora lusitaniae 146. Microorganisms [Internet]. 2020 Oct 1 [citerad 2022 Jun 15];8(10):1477. Tillgänglig från: <https://www.mdpi.com/2076-2607/8/10/1477>
45. Moran-Mejía AF, Guillén-Garcés RA, Moeller-Chávez GE, Hernández-Romano J, Chávez-Béjar MI, Olvera-Carranza C, et al. Potencial de la levadura oleaginosa Clavispora lusitaniae Hi2 en la conversión de residuos agroindustriales a lípidos. Revista Iberoamericana de Micología

[Internet]. 2022 Jan 1 [citerad 2022 Jun 15];39(1):6–15. Tillgänglig från:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1130140621000541?via%3Dihub>

46. Dromer F, Moulignier A, Dupont B, Guého E, Baudrimont M, Improvisi L, et al.

Myeloradiculitis due to *Cryptococcus curvatus* in AIDS. AIDS (London, England) [Internet]. 1995

Apr 1 [citerad 2022 Jul 13];9(4):395–6. Tillgänglig från: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7794545/>

47. *Cryptococcus curvatus* - an overview | ScienceDirect Topics [Internet]. www.sciencedirect.com.

[citerad 2022 May 21]. Tillgänglig från: <https://www.sciencedirect.com/topics/biochemistry-genetics-and-molecular-biology/cryptococcus-curvatus>

48. Gujjari P, Suh S-O, Coumes K, Zhou JJ. Characterization of oleaginous yeasts revealed two novel species: *Trichosporon cacaoliposimilis* sp. nov. and *Trichosporon oleaginosus* sp. nov.

Mycologia. 2011 Sep;103(5):1110–8.

49. Takakuwa N, Saito K. Conversion of beet molasses and cheese whey into fatty acid methyl

esters by the yeast *Cryptococcus curvatus*. *Journal of Oleo Science* [Internet]. 2010 [citerad 2022

May 31];59(5):255–60. Tillgänglig från: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20431242/>

50. Seo YH, Lee I, Jeon SH, Han J-I. Efficient conversion from cheese whey to lipid using

Cryptococcus curvatus. *Biochemical Engineering Journal*. 2014 Sep;90:149–53.

51. Al-Sweih N, Ahmad S, Khan S, Joseph L, Asadzadeh M, Khan Z. *Cyberlindnera fabianii*

fungaemia outbreak in preterm neonates in Kuwait and literature review. *Mycoses*. 2018 Oct

15;62(1):51–61.

52. Kato M, Iefuji H, Miyake K, Iimura Y. Transformation system for a wastewater treatment yeast,

Hansenula fabianii J640: isolation of the orotidine-5'-phosphate decarboxylase gene (*URA3*) and

uracil auxotrophic mutants. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1997 Nov 25;48(5):621–5.

53. van Rijswijck IMH, van Mastrigt O, Pijffers G, Wolkers – Rooijackers JCM, Abee T,

Zwietering MH, et al. Dynamic modelling of brewers' yeast and *Cyberlindnera fabianii* co-culture

behaviour for steering fermentation performance. *Food Microbiology*. 2019 Oct;83:113–21.

54. Meersman E, Steensels J, Struyf N, Paulus T, Saels V, Mathawan M, et al. Tuning Chocolate

Flavor through Development of Thermotolerant *Saccharomyces cerevisiae* Starter Cultures with

Increased Acetate Ester Production. Cullen D, editor. Applied and Environmental Microbiology. 2015 Nov 20;82(2):732–46.

55. Danouche M, Ferioun M, Bahafid W, El Ghachtouli N. Mycoremediation of azo dyes using *Cyberlindnera fabianii* yeast strain : Application of designs of experiments for decolorization optimization. Water Environment Research. 2020 Dec 17;

56. Olajuyigbe FM, Adetuyi OY, Fatokun CO. Characterization of free and immobilized laccase from *Cyberlindnera fabianii* and application in degradation of bisphenol A. International Journal of Biological Macromolecules. 2019 Mar;125:856–64.

57. Lee NK, Nyakudya E, Jeong Y-S. Bioconversion of Platycodon Grandiflorum Saponins by the Platycodin D-Converting Microorganism, Yeast *Cyberlindnera Fabianii*. Journal of Food Biochemistry. 2015 Nov 23;40(3):358–65.

58. Lu Z, Wang L, Zhou R, Qiu Y, Yang L, Zhang C, et al. Evaluation of the spermicidal and contraceptive activity of Platycodin D, a Saponin from *Platycodon grandiflorum*. PloS One [Internet]. 2013 [citerad 2022 Jun 1];8(11):e82068. Tillgänglig från: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24303079/>

59. Ioannou P, Papakitsou I. *Kodamaea ohmeri* infections in humans: A systematic review. Mycoses. 2020 May 6;63(7):636–43.

60. Cardoso VM, Borelli BM, Lara CA, Soares MA, Pataro C, Bodevan EC, et al. The influence of seasons and ripening time on yeast communities of a traditional Brazilian cheese. Food Research International [Internet]. 2015 Mar 1 [citerad 2022 Jun 1];69:331–40. Tillgänglig från: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996914008291?via%3Dihub>

61. Chombo-Morales P, Kirchmayr M, Gschaedler A, Lugo-Cervantes E, Villanueva-Rodríguez S. Effects of controlling ripening conditions on the dynamics of the native microbial population of Mexican artisanal Cotija cheese assessed by PCR-DGGE. LWT - Food Science and Technology [Internet]. 2016 Jan 1 [citerad 2022 Jun 1];65:1153–61. Tillgänglig från: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0023643815302152?via%3Dihub>

62. Zhu H-Y, Xu H, Dai X-Y, Zhang Y, Ying H-J, Ouyang P-K. Production of d-arabitol by a newly isolated *Kodamaea ohmeri*. Bioprocess and Biosystems Engineering. 2009 Sep 19;33(5):565–71.

63. Benda ND, Boucias D, Torto B, Teal P. Detection and characterization of *Kodamaea ohmeri* associated with small hive beetle *Aethina tumida* infesting honey bee hives. *Journal of Apicultural Research*. 2008 Jan;47(3):194–201.
64. Kristiansen P. Lilla kupskalbaggen – Biodlarna [Internet]. www.biodlarna.se. [citerad 2022 Jun 1]. Tillgänglig från: <https://www.biodlarna.se/bin-och-biodling/bihalsa/bisjukdomar-och-parasiter/lilla-kupskalbaggen/>
65. De Marco L, Epis S, Capone A, Martin E, Bozic J, Crotti E, et al. The Genomes of Four *Meyerozyma caribbica* Isolates and Novel Insights into the *Meyerozyma guilliermondii* Species Complex. *G3: Genes|Genomes|Genetics* [Internet]. 2018 Jan 8 [citerad 2022 Jun 2];8(3):755–9. Tillgänglig från: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5844296/>
66. Zhao L, Zhang H, Li J, Cui J, Zhang X, Ren X. Enhancement of Biocontrol Efficacy of *Pichia caribbica* to Postharvest Diseases of Strawberries by Addition of Trehalose to the Growth Medium. *International Journal of Molecular Sciences* [Internet]. 2012 Mar 1 [citerad 2022 Jun 2];13(3):3916–32. Tillgänglig från: <https://www.mdpi.com/1422-0067/13/3/3916>
67. Iñiguez-Moreno M, González-Gutiérrez KN, Ragazzo-Sánchez JA, Narváez-Zapata JA, Sandoval-Contreras T, Calderón-Santoyo M. Morphological and molecular identification of the causal agents of post-harvest diseases in avocado fruit, and potential biocontrol with *Meyerozyma caribbica*. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*. 2020 Oct 19;54(7-8):411–30.
68. Cao J, Zhang H, Yang Q, Ren R. Efficacy of *Pichia caribbica* in controlling blue mold rot and patulin degradation in apples. *International Journal of Food Microbiology* [Internet]. 2013 Mar 15 [citerad 2022 Jun 2];162(2):167–73. Tillgänglig från: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0168160513000366?via%3Dihub>
69. Aguirre-Güitrón L, Calderón-Santoyo M, Bautista-Rosales PU, Ragazzo-Sánchez JA. Application of powder formulation of *Meyerozyma caribbica* for postharvest control of *Colletotrichum gloeosporioides* in mango (*Mangifera indica* L.). *LWT* [Internet]. 2019 Oct 1 [citerad 2022 Jun 2];113:108271. Tillgänglig från: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0023643819306115>
70. Xu B, Zhang H, Chen K, Xu Q, Yao Y, Gao H. Biocontrol of Postharvest *Rhizopus* Decay of Peaches with *Pichia caribbica*. *Current Microbiology*. 2013 Mar 28;67(2):255–61.

71. Zhang X, Zhou Y, Li J, Gu X, Zhao L, Li B, et al. *Pichia caribbica* improves disease resistance of cherry tomatoes by regulating ROS metabolism. *Biological Control* [Internet]. 2022 Jun 2 [citerad 2022 Jul 13];169:104870. Tillgänglig från:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1049964422000354?via%3Dihub>
72. Sukpipat W, Komeda H, Prasertsan P, Asano Y. Purification and characterization of xylitol dehydrogenase with l-arabitol dehydrogenase activity from the newly isolated pentose-fermenting yeast *Meyerozyma caribbica* 5XY2. *Journal of Bioscience and Bioengineering* [Internet]. 2017 Jan 1 [citerad 2022 Jun 2];123(1):20–7. Tillgänglig från:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1389172316301827?via%3Dihub>
73. Amorim SS, Ruas FAD, Barboza NR, de Oliveira Neves VG, Leão VA, Guerra-Sá R. Manganese (Mn²⁺) tolerance and biosorption by *Meyerozyma guilliermondii* and *Meyerozyma caribbica* strains. *Journal of Environmental Chemical Engineering* [Internet]. 2018 Aug 1 [citerad 2022 Jun 2];6(4):4538–45. Tillgänglig från:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S2213343718303701?via%3Dihub>
74. Daniel H-M, Vrancken G, Takrama JF, Camu N, De Vos P, De Vuyst L. Yeast diversity of Ghanaian cocoa bean heap fermentations. *FEMS Yeast Research*. 2009 Aug;9(5):774–83.
75. Gugnani HC, Hagen F, Meis JF, Chakrabarti A. Occurrence of *Cryptococcus neoformans* and other yeast-like fungi in environmental sources in Bonaire (Dutch Caribbean). *Germes*. 2020 Sep;10(3):195–200.
76. Drumonde-Neves J, Franco-Duarte R, Lima T, Schuller D, Pais C. Association between Grape Yeast Communities and the Vineyard Ecosystems. Cocolin L, editor. *PLOS ONE*. 2017 Jan 13;12(1):e0169883.
77. Tanaka E, Koitabashi M, Kitamoto H. A teleomorph of the ustilaginalean yeast *Moesziomyces antarcticus* on barnyardgrass in Japan provides bioresources that degrade biodegradable plastics. *Antonie van Leeuwenhoek*. 2018 Oct 27;112(4):599–614.
78. Santos MV, Faria NT, Fonseca C, Ferreira FC. Production of mannosylerythritol lipids from lignocellulose hydrolysates: tolerance thresholds of *Moesziomyces antarcticus* to inhibitors. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*. 2018 Nov 29;94(4):1064–72.

79. Kitamoto HK, Shinozaki Y, Cao X, Morita T, Konishi M, Tago K, et al. Phyllosphere yeasts rapidly break down biodegradable plastics. *AMB Express* [Internet]. 2011 Nov 29 [cited 2022 May 25];1:44. Tillgänglig från: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3293741/#:~:text=Isolation%20of%20phyllosphere%20yeast%20strains%20capable%20of%20degrading%20biodegradable%20plastic%20film>
80. Levinson WE, Kurtzman CP, Kuo TM. Production of itaconic acid by *Pseudozyma antarctica* NRRL Y-7808 under nitrogen-limited growth conditions. *Enzyme and Microbial Technology*. 2006 Aug;39(4):824–7.
81. Jaiboon K, Lertwattanasakul N, Limtong P, Limtong S. Yeasts from peat in a tropical peat swamp forest in Thailand and their ability to produce ethanol, indole-3-acetic acid and extracellular enzymes. *Mycological Progress*. 2016 Jun 29;15(7):755–70.
82. Haile M, Kang WH. Isolation, Identification, and Characterization of Pectinolytic Yeasts for Starter Culture in Coffee Fermentation. *Microorganisms*. 2019 Sep 28;7(10):401.
83. Liu Z, Li X, Sun Z, Wang Z, Li G. *Papiliotrema flavescens* colonized in biochars inhibits wheat crown rot and *Fusarium* head blight. *Biochar*. 2021 Sep 14;3(4):625–39.
84. Aksu Z, Eren AT. Carotenoids production by the yeast *Rhodotorula mucilaginosa*: Use of agricultural wastes as a carbon source. *Process Biochemistry*. 2005 Sep;40(9):2985–91.
85. ROHM H, LECHNER F, LEHNER M. Microflora of Austrian Natural-Set Yogurt. *Journal of Food Protection*. 1990 Jun 1;53(6):478–80.
86. SUZZI G, SCHIRONE M, MARTUSCELLI M, GATTI M, FORNASARI M, NEVIANI E. Yeasts associated with Manteca. *FEMS Yeast Research*. 2003 Apr;3(2):159–66.
87. Sánchez-Arreguin A, Carriles R, Ochoa-Alejo N, López MG, Sánchez-Segura L. Generation of BSA-capsaicin Nanoparticles and Their Hormesis Effect on the *Rhodotorula mucilaginosa* Yeast. *Molecules*. 2019 Aug 1;24(15):2800.
88. Liang C-M, Yang C-F, Du J-S. Lipid Production and Waste Reutilization Combination Using Yeast Isolate *Rhodotorula mucilaginosa* LP-2. *BioEnergy Research*. 2021 Jan 7;14(4):1184–95.

89. Fuentefria AM, Suh S-O, Landell MF, Faganello J, Schrank A, Vainstein MH, et al. *Trichosporon insectorum* sp. nov., a new anamorphic basidiomycetous killer yeast. *Mycological Research*. 2008 Jan;112(1):93–9.
90. Kuncharoen N, Techo S, Savarajara A, Tanasupawat S. Identification and lipolytic activity of yeasts isolated from foods and wastes. *Mycology*. 2020 Mar 26;11(4):279–86.
91. Félix CR, Andrade DA, Almeida JH, Navarro HMC, Fell JW, Landell MF. *Vishniacozyma alagoana* sp. nov. a tremellomycetes yeast associated with plants from dry and rainfall tropical forests. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2020 May 1;70(5):3449–54.
92. Mano J, Liu N, Hammond JH, Currie DH, Stephanopoulos G. Engineering *Yarrowia lipolytica* for the utilization of acid whey. *Metabolic Engineering*. 2020 Jan;57:43–50.
93. Carsanba E, Papanikolaou S, Fickers P, Agirman B, Erten H. Citric Acid Production by *Yarrowia lipolytica*. *Non-conventional Yeasts: from Basic Research to Application*. 2019;91–117.
94. taxonomy. Taxonomy browser (*Wickerhamomyces anomalus*) [Internet]. [www.ncbi.nlm.nih.gov](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=4927). [citerad 2022 Jun 21]. Tillgänglig från: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=4927>
95. Daniel H-M, Moons M-C, Huret S, Vrancken G, De Vuyst L. *Wickerhamomyces anomalus* in the sourdough microbial ecosystem. *Antonie van Leeuwenhoek*. 2010 Oct 21;99(1):63–73.
96. Haq IU, Manzoor Z, Rehman AU, Mukhtar H. A NEW MULTI-STRESS RESISTANT WICKERHAMOMYCES ANOMALUS: ISOLATION, IDENTIFICATION AND BIOETHANOL FERMENTATION POTENTIAL. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. 2019 Jun 1;18(3):841–9.
97. Cappelli A, Favia G, Ricci I. *Wickerhamomyces anomalus* in Mosquitoes: A Promising Yeast-Based Tool for the “Symbiotic Control” of Mosquito-Borne Diseases. *Frontiers in Microbiology*. 2021 Jan 21;11.
98. Arous F, Atitallah IB, Nasri M, Mechichi T. A sustainable use of low-cost raw substrates for biodiesel production by the oleaginous yeast *Wickerhamomyces anomalus*. *3 Biotech*. 2017 Jul 29;7(4).

99. Raynaldo FA, Dhanasekaran S, Ngea GLN, Yang Q, Zhang X, Zhang H. Investigating the biocontrol potentiality of *Wickerhamomyces anomalus* against postharvest gray mold decay in cherry tomatoes. *Scientia Horticulturae* [Internet]. 2021 Jul 27 [citerad 2022 Jun 21];285:110137.

Tillgänglig från:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0304423821002442?via%3Dihub>

100. Zepeda-Giraud LF, Olicón-Hernández DR, Pardo JP, Villanueva MGA, Guerra-Sánchez G. Biological Control of *Thielaviopsis paradoxa* and *Colletotrichum gloeosporioides* by the Extracellular Enzymes of *Wickerhamomyces anomalus*. *Agriculture*. 2020 Aug 2;10(8):325.

101. Fan G, Teng C, Xu D, Fu Z, Minhazul KAHM, Wu Q, et al. Enhanced production of ethyl acetate using co-culture of *Wickerhamomyces anomalus* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2019 Nov;128(5):564–70.

Bilaga 1: Sökhistorik

Jästart	Datum	Databas*	Sökord/Limits/ Booleska operatorer (or, and... samt filter)	Antal träffar
<i>Apiotrichum mycotoxinovorans</i>	2022-04-26	WOS	Apiotrichum mycotoxinovorans	0
	2022-04-26	PubMed	Apiotrichum mycotoxinovorans	0
	2022-04-26	TheYeasts	Apiotrichum mycotoxinovorans	1
	2022-04-26	NCBI	Apiotrichum mycotoxinovorans	1
	2022-05-03	WOS	Trichosporon mycotoxinovorans	0
	2022-05-03	Pubmed	Trichosporon mycotoxinovorans	0
	2022-05-03	WOS	Trichosporon mycotoxinivorans	70
	2022-05-03	Pubmed	Trichosporon mycotoxinivorans	38
	2022-05-03	WOS	Trichosporon mycotoxinivorans AND (lactose OR whey OR casein OR dairy)	3
	2022-05-03	Pubmed	Trichosporon mycotoxinivorans AND (lactose OR whey OR casein OR dairy)	1
	2022-05-03	TheYeasts	Apiotrichum mycotoxinovorans	1
<i>Candida orthopsilosis</i>	2022-04-26	WOS	Candida orthopsilosis AND (lactose OR whey)	0
	2022-04-26	WOS	Candida orthopsilosis AND (lactose OR whey OR casein)	1
	2022-04-26	WOS	Candida orthopsilosis	357
	2022-04-26	PubMed	Candida orthopsilosis AND (lactose OR whey)	8
	2022-04-26	PubMed	Candida orthopsilosis AND (lactose OR whey OR casein)	1
<i>Candida pseudointermedia</i>	2022-04-26	WOS	Candida pseudointermedia AND (lactose OR whey OR casein)	0
	2022-04-26	WOS	Candida pseudointermedia	10
	2022-04-26	PubMed	Candida pseudointermedia AND (lactose OR whey OR casein)	0
	2022-04-26	PubMed	Candida pseudointermedia	8
<i>Clavispora lusitaniae</i>	2022-06-14	WOS	Clavispora lusitaniae AND (lactose OR whey OR casein)	4
	2022-06-14	PubMed	Clavispora lusitaniae AND (lactose OR whey OR casein)	1
	2022-06-15	WOS	Clavispora lusitaniae OR Candida lusitaniae OR Clavispora imtechensis AND (lactose OR whey OR casein)	819
<i>Cutaneotrichosporon curvatum</i>	2022-04-26	WOS	Cutaneotrichosporon curvatum AND (lactose OR whey OR Casein)	0
	2022-04-26	WOS	Cutaneotrichosporon curvatum	2
	2022-04-26	PubMed	Cutaneotrichosporon curvatum AND (lactose OR whey OR Casein)	0
	2022-04-26	PubMed	Cutaneotrichosporon curvatum	5
	2022-05-30	WOS	Cutaneotrichosporon curvatum AND (lactose OR whey OR Casein)	25
	2022-05-30	PubMed	Cutaneotrichosporon curvatum AND (lactose OR whey OR Casein)	6

<i>Cyberlindnera fabianii</i>	2022-04-26	WOS	Cyberlindnera fabianii AND (lactose OR whey OR Casein)	0
	2022-04-26	WOS	Cyberlindnera fabianii	28
	2022-04-26	PubMed	Cyberlindnera fabianii AND (lactose OR whey OR Casein)	0
	2022-04-26	PubMed	Cyberlindnera fabianii	26
	2022-01-06	WOS	Cyberlindnera fabianii OR Candida fabianii OR Lindnera fabianii OR Pichia fabianii OR Hansenula fabianii	80
	2022-06-01	WOS	Cyberlindnera fabianii OR Candida fabianii OR Lindnera fabianii OR Pichia fabianii OR Hansenula fabianii AND (lactose OR whey OR Casein)	0
<i>Kodamaea ohmeri</i>	2022-04-26	WOS	Kodamaea ohmeri AND (lactose OR whey OR Casein)	1
	2022-04-26	WOS	Kodamaea ohmeri	128
	2022-04-26	PubMed	Kodamaea ohmeri AND (lactose OR whey OR Casein)	0
	2022-04-26	PubMed	Kodamaea ohmeri	93
	2022-06-01	WOS	Kodamaea ohmeri AND cheese	4
<i>Meyerozyma caribbica</i>	2022-04-26	WOS	Meyerozyma caribbica AND (lactose OR whey OR casein)	2
	2022-04-26	WOS	Meyerozyma caribbica	84
	2022-04-26	PubMed	Meyerozyma caribbica AND (lactose OR whey OR casein)	1
	2022-04-26	PubMed	Meyerozyma caribbica	53
	2022-06-02	WOS	Meyerozyma caribbica OR Pichia caribbica	146
	2022-06-02	WOS	Meyerozyma caribbica OR Pichia caribbica AND (lactose OR whey OR casein)	0
<i>Meyerozyma carpophila</i>	2022-04-26	WOS	Meyerozyma carpophila AND (lactose OR whey OR casein)	0
	2022-04-26	WOS	Meyerozyma carpophila	6
	2022-04-26	PubMed	Meyerozyma carpophila AND (lactose OR whey OR casein)	0
	2022-04-26	PubMed	Meyerozyma carpophila	5
	2022-06-02	Pubmed	Meyerozyma carpophila OR Candida carpophila	18
	2022-06-02	Pubmed	Meyerozyma carpophila OR Candida carpophila AND (lactose OR whey OR casein)	0
<i>Moesziomyces antarcticus</i>	2022-04-26	WOS	Moesziomyces antarcticus AND (lactose OR whey OR casein)	0
	2022-04-26	WOS	Moesziomyces antarcticus	17
	2022-04-26	PubMed	Moesziomyces antarcticus AND (lactose OR whey OR casein)	1
	2022-04-26	PubMed	Moesziomyces antarcticus	58
	2022-05-25	WOS	Pseudozyma antarctica AND (lactose OR whey OR casein)	
<i>Papiliotrema flavescens</i>	2022-04-26	WOS	Papiliotrema flavescens AND (lactose OR whey OR casein)	1
	2022-04-26	WOS	Papiliotrema flavescens	17
	2022-04-26	PubMed	Papiliotrema flavescens AND (lactose OR whey OR casein)	1

	2022-04-26	PubMed	Papiliotrema flavescens	9
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	2022-04-26	WOS	Rhodotorula mucilaginosa AND (lactose OR whey OR casein)	11
	2022-04-26	PubMed	Rhodotorula mucilaginosa AND (lactose OR whey OR casein)	5
<i>Trichosporon insectorum</i>	2022-04-26	WOS	Trichosporon insectorum AND (lactose OR whey)	0
	2022-04-26	WOS	Trichosporon insectorum	6
	2022-04-26	PubMed	Trichosporon insectorum	5
	2022-04-26	PubMed	Trichosporon insectorum AND (lactose OR whey OR casein)	0
<i>Vishniacozyma taibaiensis</i>	2022-04-26	WOS	Vishniacozyma taibaiensis AND (lactose OR whey OR)	0
	2022-04-26	PubMed	Vishniacozyma taibaiensis	3
<i>Yarrowia lipolytica</i>	2022-04-26	WOS	Yarrowia lipolytica AND (lactose OR whey OR casein)	92
	2022-04-26	PubMed	Yarrowia lipolytica AND (lactose OR whey OR casein)	48
	2022-06-02	WOS	Yarrowia lipolytica AND production AND (lactose OR whey OR casein)	
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	2022-06-20	WOS	Wickerhamomyces anomalus	400
	2022-06-21	WOS	Wickerhamomyces anomalus AND (lactose OR casein OR whey)	4

* Förkortningar: WOS – Web of Science, TheYeasts – theyeasts.rog, PubMed – pubmed.ncbi.nlm.nih.gov

Bilaga 2: Jästöversikt

Jäststammar	Antal	Clade	BSL- märknin g	Laktos (Assimilation)	Industriellt känd	Litteraturstudi e
<i>[Candida] intermedia</i>	22	CUG-Ser1 clade	1	1	1	0
<i>[Candida] palmioleophila</i>	5	CUG-Ser1 clade	1	0	0	0
<i>[Candida] pseudointermedia</i>	43	CUG-Ser1 clade	1	(+,-)	0	0
<i>Apiotrichum mycotoxinovorans</i>	5	Opisthokonta	1	(+,-)	0	1
<i>Candida orthopsilosis</i>	1	CUG-Ser1 clade	1	0	0	1
<i>Candida parapsilosis</i>	1	CUG-Ser1 clade	1	0	1	0
<i>Candida sp. (in: Saccharomycetales)</i>	3		0	-	?	0
<i>Candida tropicalis</i>	2	CUG-Ser1 clade	1	1	1	0
<i>Clavispora lusitaniae</i>	1	CUG-Ser1 clade	1	0	1	1
<i>Cutaneotrichosporon curvatum</i>	1	Opisthokonta	1	1	0	1
<i>Cyberlindnera fabianii</i>	1	Saccharomyceta	2	0	1	1
<i>Debaryomyces nepalensis</i>	4	CUG-Ser1 clade	2	(+,-)	1	0
<i>Kodamaea ohmeri</i>	2	CUG-Ser1 clade	1	0	0	1
<i>Meyerozyma caribbica</i>	4	CUG-Ser1 clade	1	0	1	1
<i>Meyerozyma carpophila</i>	43	CUG-Ser1 clade	0	-	1	1
<i>Meyerozyma smithsonii</i>	1	CUG-Ser1 clade	1	0	0	0
<i>Moesziomyces antarcticus</i>	1	Opisthokonta	1	1	0	1
<i>Neurospora crassa</i>	1	Sordariomyceta	1	-	1	0
<i>Papiliotrema cf. rajasthanensis</i>	1	Opisthokonta	0	-	0	0
<i>Papiliotrema laurentii</i>	2	Opisthokonta	2	(+,-)	0	0
<i>Rhodospiridiobolus sp.</i>	2	Opisthokonta	0	-	0	0
<i>Rhodotorula dairenensis</i>	1	Opisthokonta	0	0	0	0
<i>Rhodotorula sp.</i>	1	Opisthokonta	1	-	0	0
<i>Saccharomycetales sp.</i>	1	Saccharomyceta	0	-	0	0
<i>Trichosporon asahii</i>	6	Opisthokonta	2	1	1	1
<i>Trichosporon faecale</i>	1	Opisthokonta	2	1	1	0
<i>Ustilaginoidea virens</i>	1	Sordariomyceta	1	-	0	0
<i>Vishniacozyma aff. taibaiensis</i>	1	Opisthokonta	0	-	0	0
<i>Yarrowia galli</i>	2	Saccharomyceta	0	-	0	0
<i>Yarrowia lipolytica</i>	9	Saccharomyceta	1	0	1	0
<i>Debaryomyces prosopidis</i>	1	CUG-Ser1 clade	1	0	0	0
<i>Trichosporon insectorum</i>	1	Opisthokonta	1	1	0	1
<i>Vishniacozyma taibaiensis</i>	1	Opisthokonta	0	0	0	0
<i>Papiliotrema flavescens</i>	1	Opisthokonta	1	1	1	0
<i>Rhodospiridiobolus ruineniae</i>	2	Opisthokonta	1	0	0	0

<i>Neurospora dictyophora</i>	1	Sordariomyceta	0	-	-	0
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	1	Opisthokonta	2	0,w	1	1

Bilaga 3: BLAST

Lac. ID	Scientific Name	Per. Ident	Databas
2	<i>[Candida] pseudointermedia</i>	100.00%	Standard
3	<i>Cutaneotrichosporon curvatum</i>	100.00%	Standard
4	<i>[Candida] pseudointermedia</i>	100.00%	Standard
5	<i>[Candida] intermedia</i>	100.00%	Standard
6	<i>Debaryomyces nepalensis</i>	100.00%	Standard
6	<i>Debaryomyces prosopidis</i>	98.96%	ITS
7	<i>[Candida] pseudointermedia</i>	100.00%	Standard
8	<i>Papiliotrema laurentii</i>	100.00%	Standard
9	<i>[Candida] pseudointermedia</i>	100.00%	Standard
10	<i>Trichosporon asahii</i>	100.00%	Standard
11	<i>Trichosporon asahii</i>	100.00%	Standard
12	<i>Trichosporon asahii</i>	100.00%	Standard
13	<i>[Candida] intermedia</i>	100.00%	Standard
14	<i>[Candida] intermedia</i>	100.00%	Standard
15	<i>Meyerozyma carpophila</i>	100.00%	Standard
16	<i>Apiotrichum mycotoxinovorans</i>	100.00%	Standard
17	<i>Apiotrichum mycotoxinovorans</i>	100.00%	Standard
18	<i>Trichosporon asahii</i>	100.00%	Standard
19	<i>Trichosporon faecale</i>	100.00%	Standard
19	<i>Trichosporon insectorum</i>	100.00%	ITS
20	<i>[Candida] pseudointermedia</i>	99.68%	Standard
21	<i>[Candida] pseudointermedia</i>	99.68%	Standard
22	<i>[Candida] intermedia</i>	98.75%	Standard
23	<i>[Candida] pseudointermedia</i>	100.00%	Standard
25	<i>[Candida] pseudointermedia</i>	100.00%	Standard
26	<i>[Candida] pseudointermedia</i>	100.00%	Standard
28	<i>Apiotrichum mycotoxinovorans</i>	100.00%	Standard
29	<i>[Candida] intermedia</i>	100.00%	Standard
30	<i>[Candida] intermedia</i>	100.00%	Standard
31	<i>[Candida] pseudointermedia</i>	100.00%	Standard
32	<i>[Candida] pseudointermedia</i>	98.41%	Standard
35	<i>[Candida] pseudointermedia</i>	98.40%	Standard
36	<i>[Candida] pseudointermedia</i>	100.00%	Standard
38	<i>[Candida] pseudointermedia</i>	100.00%	Standard
39	<i>[Candida] intermedia</i>	98.05%	Standard
40	<i>[Candida] intermedia</i>	98.06%	Standard
41	<i>[Candida] intermedia</i>	100.00%	Standard
42	<i>[Candida] pseudointermedia</i>	100.00%	Standard
43	<i>[Candida] pseudointermedia</i>	100.00%	Standard
44	<i>[Candida] intermedia</i>	100.00%	Standard
45	<i>Candida intermedia</i>	100.00%	Standard
46	<i>Candida sp. (in: Saccharomycetales)</i>	100.00%	Standard
46	<i>[Candida] pseudointermedia</i>	100.00%	ITS

47	<i>[Candida] pseudointermedia</i>	100.00%	Standard
48	<i>[Candida] pseudointermedia</i>	100.00%	Standard
49	<i>[Candida] intermedia</i>	100.00%	Standard
50	<i>Yarrowia lipolytica</i>	100.00%	Standard
51	<i>Kodamaea ohmeri</i>	100.00%	Standard
52	<i>[Candida] pseudointermedia</i>	99.68%	Standard
54	<i>[Candida] intermedia</i>	100.00%	Standard
57	<i>[Candida] pseudointermedia</i>	98.73%	Standard
58	<i>[Candida] pseudointermedia</i>	100.00%	Standard
59	<i>[Candida] pseudointermedia</i>	100.00%	Standard
60	<i>Kodamaea ohmeri</i>	100.00%	Standard
61	<i>Candida tropicalis</i>	100.00%	Standard
63	<i>Vishniacozyma aff. taibaiensis</i>	99.78%	Standard
63	<i>Vishniacozyma taibaiensis</i>	94.14%	ITS
64	<i>[Candida] pseudointermedia</i>	100.00%	Standard
65	<i>[Candida] pseudointermedia</i>	100.00%	Standard
66	<i>[Candida] pseudointermedia</i>	100.00%	Standard
67	<i>[Candida] pseudointermedia</i>	100.00%	Standard
68	<i>[Candida] pseudointermedia</i>	100.00%	Standard
69	<i>[Candida] pseudointermedia</i>	100.00%	Standard
70	<i>[Candida] pseudointermedia</i>	100.00%	Standard
71	<i>[Candida] pseudointermedia</i>	98.40%	Standard
72	<i>[Candida] pseudointermedia</i>	98.40%	Standard
73	<i>[Candida] pseudointermedia</i>	98.38%	Standard
74	<i>[Candida] intermedia</i>	98.69%	Standard
75	<i>[Candida] intermedia</i>	97.20%	Standard
76	<i>Apiotrichum mycotoxinovorans</i>	100.00%	Standard
77	<i>[Candida] pseudointermedia</i>	98.71%	Standard
78	<i>[Candida] intermedia</i>	100.00%	Standard
79	<i>Trichosporon asahii</i>	100.00%	Standard
80	<i>Apiotrichum mycotoxinovorans</i>	100.00%	Standard
81	<i>[Candida] pseudointermedia</i>	100.00%	Standard
83	<i>[Candida] pseudointermedia</i>	100.00%	Standard
84	<i>[Candida] intermedia</i>	100.00%	Standard
85	<i>[Candida] pseudointermedia</i>	100.00%	Standard
86	<i>[Candida] intermedia</i>	100.00%	Standard
87	<i>[Candida] intermedia</i>	96.46%	Standard
88	<i>Candida parapsilosis</i>	100.00%	Standard
89	<i>[Candida] intermedia</i>	100.00%	Standard
90	<i>[Candida] pseudointermedia</i>	100.00%	Standard
91	<i>[Candida] pseudointermedia</i>	100.00%	Standard
93	<i>Meyerozyma carpophila</i>	100.00%	Standard
94	<i>[Candida] intermedia</i>	99.36%	Standard
95	<i>[Candida] intermedia</i>	98.06%	Standard
96	<i>Meyerozyma caribbica</i>	100.00%	Standard
97	<i>[Candida] pseudointermedia</i>	100.00%	Standard

98	<i>[Candida] pseudointermedia</i>	100.00%	Standard
99	<i>[Candida] pseudointermedia</i>	100.00%	Standard
100	<i>[Candida] intermedia</i>	98.06%	Standard
101	<i>Rhodotorula dairenensis</i>	100.00%	Standard
101	<i>Papiliotrema flavescens</i>	99.78%	ITS
103	<i>Trichosporon asahii</i>	100.00%	Standard
105	<i>Candida sp. (in: Saccharomycetales)</i>	100.00%	Standard
105	<i>[Candida] pseudointermedia</i>	95.91%	ITS
106	<i>Yarrowia lipolytica</i>	100.00%	Standard
107	<i>Yarrowia lipolytica</i>	100.00%	Standard
108	<i>Rhodospiridiobolus sp.</i>	100.00%	Standard
108	<i>Rhodospiridiobolus ruineniae</i>	99.25%	ITS
110	<i>Neurospora crassa</i>	97.05%	Standard
110	<i>Neurospora dictyophora</i>	95.87%	ITS
111	<i>Cyberlindnera fabianii</i>	100.00%	Standard
114	<i>Meyerozyma carpophila</i>	100.00%	Standard
117	<i>Meyerozyma carpophila</i>	100.00%	Standard
118	<i>Meyerozyma carpophila</i>	100.00%	Standard
119	<i>Candida orthopsilosis</i>	100.00%	Standard
120	<i>Meyerozyma smithsonii</i>	100.00%	Standard
123	<i>Meyerozyma carpophila</i>	100.00%	Standard
125	<i>Meyerozyma carpophila</i>	100.00%	Standard
128	<i>Rhodotorula sp.</i>	100.00%	Standard
128	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	99.26%	ITS
134	<i>Yarrowia lipolytica</i>	100.00%	Standard
136	<i>Yarrowia lipolytica</i>	100.00%	Standard
137	<i>Yarrowia galli</i>	100.00%	Standard
139	<i>Papiliotrema laurentii</i>	100.00%	Standard
141	<i>Meyerozyma carpophila</i>	100.00%	Standard
142	<i>Yarrowia lipolytica</i>	100.00%	Standard
143	<i>Yarrowia lipolytica</i>	100.00%	Standard
144	<i>[Candida] palmioleophila</i>	100.00%	Standard
145	<i>[Candida] palmioleophila</i>	100.00%	Standard
146	<i>[Candida] palmioleophila</i>	100.00%	Standard
148	<i>Papiliotrema cf. rajasthanensis</i>	100.00%	Standard
148	<i>Papiliotrema rajasthanensis</i>	99.75%	ITS
149	<i>Meyerozyma carpophila</i>	100.00%	Standard
150	<i>Meyerozyma carpophila</i>	100.00%	Standard
151	<i>Meyerozyma carpophila</i>	100.00%	Standard
152	<i>Meyerozyma carpophila</i>	100.00%	Standard
153	<i>Meyerozyma carpophila</i>	100.00%	Standard
154	<i>Meyerozyma carpophila</i>	100.00%	Standard
155	<i>Rhodospiridiobolus sp.</i>	100.00%	Standard
155	<i>Rhodospiridiobolus ruineniae</i>	99.20%	ITS

156	<i>Debaryomyces nepalensis</i>	100.00%	Standard
157	<i>Meyerozyma carpophila</i>	100.00%	Standard
158	<i>Meyerozyma caribbica</i>	100.00%	Standard
159	<i>Meyerozyma carpophila</i>	100.00%	Standard
161	<i>Debaryomyces nepalensis</i>	100.00%	Standard
162	<i>Meyerozyma carpophila</i>	100.00%	Standard
163	<i>Meyerozyma carpophila</i>	100.00%	Standard
165	<i>Meyerozyma carpophila</i>	100.00%	Standard
169	<i>Candida tropicalis</i>	100.00%	Standard
170	<i>Meyerozyma carpophila</i>	100.00%	Standard
171	<i>Meyerozyma carpophila</i>	100.00%	Standard
173	<i>Meyerozyma carpophila</i>	100.00%	Standard
174	<i>Meyerozyma caribbica</i>	100.00%	Standard
175	<i>Meyerozyma caribbica</i>	100.00%	Standard
177	<i>Debaryomyces nepalensis</i>	100.00%	Standard
178	<i>Meyerozyma carpophila</i>	100.00%	Standard
181	<i>Meyerozyma carpophila</i>	100.00%	Standard
183	<i>Meyerozyma carpophila</i>	100.00%	Standard
184	<i>Meyerozyma carpophila</i>	100.00%	Standard
187	<i>Meyerozyma carpophila</i>	100.00%	Standard
192	<i>Ustilaginoidea virens</i>	100.00%	Standard
193	<i>Meyerozyma carpophila</i>	100.00%	Standard
194	<i>Meyerozyma carpophila</i>	100.00%	Standard
196	<i>Clavispora lusitaniae</i>	100.00%	Standard
198	<i>Meyerozyma carpophila</i>	100.00%	Standard
200	<i>Meyerozyma carpophila</i>	100.00%	Standard
201	<i>Meyerozyma carpophila</i>	100.00%	Standard
204	<i>Meyerozyma carpophila</i>	100.00%	Standard
205	<i>Meyerozyma carpophila</i>	100.00%	Standard
214	<i>Meyerozyma carpophila</i>	100.00%	Standard
215	<i>Meyerozyma carpophila</i>	100.00%	Standard
216	<i>Meyerozyma carpophila</i>	100.00%	Standard
217	<i>Meyerozyma carpophila</i>	99.81%	Standard
222	<i>Limtongozyma siamensis</i>	95.97%	ITS
222	<i>Saccharomycetales sp.</i>	100.00%	Standard
225	<i>[Candida] palmioleophila</i>	100.00%	Standard
227	<i>Yarrowia lipolytica</i>	100.00%	Standard
228	<i>Meyerozyma carpophila</i>	100.00%	Standard
229	<i>Meyerozyma carpophila</i>	100.00%	Standard
233	<i>Meyerozyma carpophila</i>	100.00%	Standard
234	<i>Meyerozyma carpophila</i>	100.00%	Standard
235	<i>[Candida] palmioleophila</i>	100.00%	Standard
237	<i>Moesziomyces antarcticus</i>	99.14%	Standard
240	<i>Meyerozyma carpophila</i>	100.00%	Standard
253	<i>Yarrowia lipolytica</i>	100.00%	Standard

255	<i>[Candida] pseudointermedia</i>	100.00%	Standard
261	<i>Yarrowia galli</i>	100.00%	Standard
265	<i>[Candida] pseudointermedia</i>	98.40%	Standard

Bilaga 4: Recept för YPD-medium, samt agarplattor

YPD	medium	(complete	medium	–	non	defined)
Glucose*	20		g			(2%)
Peptone	20					g
Yeast Extract (YE)	10					g
dH ₂ O	to		1			L

*Autoclave glucose separately

For **YPD plates**, add **20 g of Agar** to the above mixture. When you prepare plates with Agar, put a magnetic bar in the flask with the medium before autoclavation. In this way you will be able to stir the medium while it is cooling before pouring it into plates.

Making	YPD	plates	(example)
1. <i>Bottle</i>			1:
Peptone	20		g
Yeast Extract (YE)	10		g
Agar	20		g
dH ₂ O	fill	to 900	mL
2. <i>Bottle</i>			2:
Prepare	a	20% glucose	solution.
3. Now autoclave both bottles and add 100 mL of 20% glucose (bottle 2) to the 900 mL agar solution (bottle 1).			

Antibiotic selection for yeast
Filter sterilize the antibiotics solution and add to the warm agar. Let the agar cool down first to about 50 degrees ¹. Use the following concentrations for YPD plates:

G418/Kanamycin/Neomycin ^{1,2}	200 - 300 µg/ml		
Phleomycin ²	10 µg/ml		
Hygromycin B ^{1,3}	200	–	450 µg/ml
Nourseothricin (Nat) ³	100	–	200 µg/ml
Blasticidin ⁴	20		µg/ml
Geneticin(G-418) ⁴	200		µg/ml
Hygromycin B ⁴	200		µg/ml
Mycophenolic Acid ⁴	25		µg/ml
Puromycin ⁴	5		µg/ml
Zeocin ⁴	50	–	400 µg/ml

Sources

1. https://research.fhcrc.org/content/dam/stripe/hahn/methods/yeast_genetics/Yeast%20Plates.pdf
2. <https://microbialcellfactories.biomedcentral.com/articles/10.1186/1475-2859-12-96>
3. <https://www.babraham.ac.uk/files/download/f0a5bf39cb5867d>
4. <https://www.thermofisher.com/se/en/home/life-science/cell-culture/transfection/selection.html>

Bilaga 5: Recept för DELFT lactose & DELFT glucose medium

DELFT medium

Final medium composition

Carbon source (glucose)	20	[g]
Ammonium Sulfate (NH ₄) ₂ SO ₄	5	[g]
Potassium Phosphate KH ₂ PO ₄	3.0	[g]
Magnesium Sulfate MgSO ₄ · 7H ₂ O	1.0	[g]
Trace metals (1000X)	1.0	[ml]
Vitamins (1000X)	1.0	[ml]
K-Phthalate (5X)*	200	[ml]
Antifoam (SIGMA)**	0.1	[ml]
Adjust pH to 5.0 with 2-5M KOH		
Add Water (or fill up to V _{total})	1000	[ml]

*You use K-Phthalate only for cultivations in shake flasks

** You use Antifoam only for cultivations in fermentors

STOCK SOLUTIONS

Delft medium salts 2X

C-source (500 g/L)

Trace metals (1000X)

Vitamin solution (1000X)

250 mM Potassium Phthalate pH 5.5 (5X) (FILTER STERILIZED)

Trace Metal Solution 1000X (autoclaved separately)

EDTA	15	[g]
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	4.5	[g]
MnCl ₂ · 4H ₂ O	0.8	[g]
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.3	[g]
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.3	[g]
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.4	[g]
CaCl ₂ · 2H ₂ O	4.5	[g]
FeSO ₄ · 7H ₂ O	3.0	[g]
H ₃ BO ₃	1.0	[g]
KI	0.1	[g]

Vitamin Solution 1000X (sterilefiltered separately)

d-Biotin	0.05	[g]
Calcium D(+) pantothenate	1.0	[g]
Nicotinic acid	1.0	[g]
myo-Inositol	25	[g]
Thiamine HCL	1.0	[g]
Pyridoxine HCL	1.0	[g]
para-aminobenzoic acid	0.2	[g]

INSTITUTIONEN FÖR BIOLOGI OCH BIOTEKNIK
CHALMERS TEKNISKA HÖGSKOLA
Göteborg, Sverige 2022
www.chalmers.se



CHALMERS