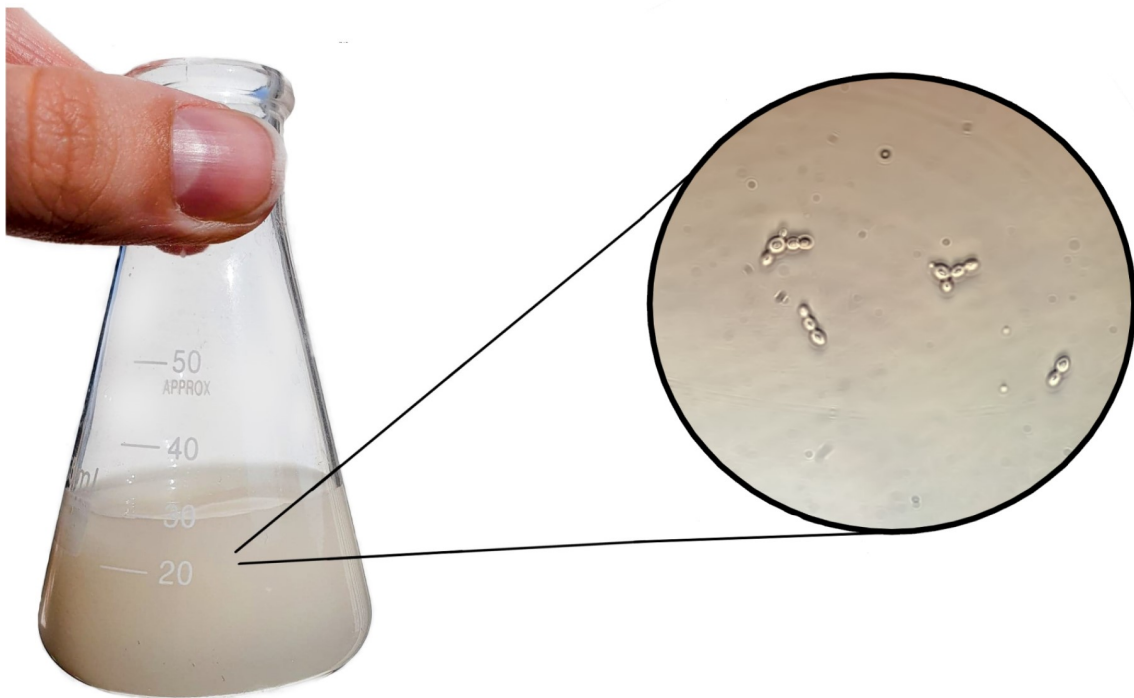


Vassle, från miljöproblem till mervärdesprodukt via *Candida intermedia*?

Optimering av odlingsförhållanden för produktion av jästbiomassa



Författare

Iris Gold Rodal, Anton Johansson,
Julia Johansson, Cornelia Nielsen-Munk,
Alice Schiller och Johanna Svensson

Handledare

Cecilia Geijer och
Kameshwara Venkata Ramana Peri

Examinator

Anna Martinelli

Kandidatarbete BBTX01-21-05

Institutionen för Biologi och Bioteknik

Chalmers Tekniska Högskola

Göteborg, Sverige 2021-05-14



CHALMERS
UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

Förord

Vi vill rikta ett särskilt tack till våra handledare Cecilia Geijer och Kameshwara Venkata Ramana Peri som stöttat och väglett oss under projektets gång. Ert engagemang och er tilltro till våra resonemang och beslut har varit viktiga för oss.

Vidare vill vi tacka Chaeho Im samt Fabio Caputo för hjälp med utförande av HPLC och efterföljande analys. Slutligen vill vi tacka Industrial Biotechnology Division på Chalmers för att vi fått använda deras lokaler och utrustning.

Cheese Whey, from Environmental Concern to Value-Added Product with *Candida intermedia*?

Optimization of Growth Conditions for Production of Yeast Biomass

Abstract

In the endeavor of making the dairy industry more environmentally sustainable, a resource with potential is cheese whey, a high nutrient and low monetary valued by-product of cheese manufacturing. This study explores the potential for the utilization of cheese whey as a nutrient source for microbial cultivation of the yeast *Candida intermedia*. The aim is to optimize batch growth conditions for *C. intermedia* with regard to maximization of the yeast biomass titer, by means of experimental design. Employing synthetic cheese whey of varying composition as culture media, factors related to growth conditions were screened against the response in yeast concentration. This was done using a Definitive Screening Design as experimental setup. The most influential factors, lactose and vitamin concentrations as well as temperature, were then optimized by response surface methodology applying a Central Composite Orthogonal Design. After 72 h of growth under the predicted optimal conditions, a 12% higher biomass titer was attained in comparison to the initially proposed growth conditions. The recorded specific growth rates were similar. However, the yeast biomass yield for the optimized growth conditions were lower than for the original. In conclusion, these results show the great potential of combining experimental design and wet lab yeast cultivations for optimizing yeast biomass production. The project has resulted in an increased understanding of factors influencing *C. intermedia*'s capacity to convert nutrients in whey to yeast biomass and is thereby one step towards a future industrial implementation.

Sammandrag

Ett steg mot att göra mejeriindustrin mer miljömässigt hållbar är att ta tillvara på dess restprodukter. En till stora delar outnyttjad resurs är vassle, vilken är en restprodukt från osttillverkning med ett högt näringsinnehåll och lågt ekonomiskt värde. I det här arbetet undersöks potentialen för användning av vassle som näringskälla vid satsvis odling av jästen *Candida intermedia*. Syftet är att, med hjälp av designade experiment, optimera odlingsförhållandena för *C. intermedia* med avseende på maximering av jästbiomassatiter. Screening av faktorer relaterade till odlingsförhållanden utfördes i försök uppställda enligt en Definitive Screening Design, där syntetisk vassle av varierande komposition användes som odlingsmedia. De mest inflytelserika faktorerna, laktos- och vitaminkoncentrationen samt temperaturen, optimerades sedan med hjälp av responsytemetodik genom användning av en Central Composite Orthogonal Design. Efter odling i 72 timmar vid de förutspådda optimala förhållandena uppnåddes en 12% högre jästbiomassatiter jämfört med de ursprungliga tillväxtförhållandena. De uppmätta specifika tillväxthastigheterna var liknande, däremot var jästbiomassutbytet för de optimerade tillväxtförhållandena lägre än för de ursprungliga förhållandena. Sammanfattningsvis visar resultatet på effektiviteten i att använda experimentell design för kultivering av jäst i syfte att optimera jästbiomassatitern. Projektet har resulterat i en ökad förståelse av faktorer som påverkar *C. intermedias* kapacitet att omvandla näringsämnen i vassle till biomassa och är därmed ett litet steg på vägen mot en framtida industriell produktion.

Innehåll

1	Inledning	1
1.1	Bakgrund	1
1.2	Syfte	2
1.3	Uppgiftsbeskrivning och tillvägagångssätt	2
1.4	Avgränsningar	3
2	Teori	4
2.1	Vassle	4
2.2	Mikrobiell omvandling	5
2.3	Jästtillväxt	5
2.3.1	Makronäringsämnen	5
2.3.2	Mikronäringsämnen	6
2.3.3	Spårämnen	7
2.3.4	Ytterligare faktorer	7
2.4	Experimentell design	7
2.4.1	Faktorer och nivåer	8
2.4.2	Screening och optimeringsdesigner	8
2.4.3	Utvärdering av experiment	9
3	Material och metod	10
3.1	Mikroorganism och förkultur	10
3.2	Utvärdering kring behovet av jästextrakt	10
3.3	Skakflaskexperiment med syntetiskt medium	10
3.3.1	Screening	11
3.3.2	Optimering	11
3.3.3	Validering av modellen	12
3.4	Analysmetoder	13
3.4.1	OD ₆₀₀ -mätningar	13
3.4.2	HPLC	13
3.4.3	Analys i MODDE	13
4	Resultat	14
4.1	Screening	14
4.2	Optimering	17
4.3	Validering av modellen	21
5	Diskussion	22
5.1	Resultatbaserad diskussion	22
5.2	Felkällor	24
5.3	Förbättringar och framtidsutsikter	25
6	Slutsats	26
	Referenser	27

Bilagor	I
A Delft medium, spårämneslösning, vitaminlösning,	I
B Laborationsmanual - Screening	II
B.1 Förberedelser av stamlösningar	II
B.2 Initialt experiment kring inkludering av jästextrakt	III
B.3 Förkultur	IV
B.4 Screeningsexperimentet	IV
B.4.1 Tillredning av medium till screeningförsök 1-17	V
B.4.2 Inokulation	VI
B.4.3 Provtagning av jästbiomassakoncentration	VII
C Laborationsmanual - Optimering	VIII
C.1 Förberedelser av stamlösningar	VIII
C.2 Förkultur	VIII
C.3 Optimeringsexperiment	VIII
C.3.1 Tillredning av medium till optimeringsförsök 1-19	IX
C.3.2 Inokulation	XI
C.3.3 Provtagning av jästbiomassakoncentration	XI
D Laborationsmanual - Validering	XII
D.1 Introduktion	XII
D.2 Stamlösningar	XII
D.3 Mediekomposition	XII
D.4 Förberedelse av medium	XIII
D.5 Provtagning	XIII
E ANOVA-tabeller	XV
E.1 Screening	XV
E.2 Optimering	XVII
F Kalibreringskurva	XVIII
G Validering	XIX

1 Inledning

Osttillverkning är sammantaget en industri av enorma mått (1). En omfattande biprodukt vid osttillverkning är vassle, eftersom det vid produktionen bildas en approximativt nio gånger större mängd vassle än ost (2). Under 2015 uppskattades den globala årliga produktionen av vassle till 200 miljoner ton (3), med en uppåtgående trend som resultat av mjölkprodukters fortsatt ökande efterfrågan (4). Vassle används idag inom flera olika områden, såsom produktion av djurfoder och livsmedelsprodukter (2), vilka båda är exempel på mervärdesprodukter som har ett högre värde på marknaden än den ursprungliga vasslen. Framställningen av mervärdesprodukter från vassle är än så länge mindre än tillgången på vassle (2). Till följd av icke utnyttjad vassle har nya användningsområden och utveckling av dessa blivit av allt större behov. Strävan är att uppnå en mer cirkulär och hållbar bioekonomi, vilket innebär att tillgängliga biologiska resurser används på ett hållbart sätt (5).

1.1 Bakgrund

Vassle har gått från att ses som avfall från ostindustrin till en användbar råvara, tack vare dess höga näringsinnehåll (6). Det är bland annat vanligt att vassle utnyttjas inom matindustrin, där en möjlig produkt är single cell protein (SCP), vilket är ätbara proteiner extraherade från mikrobiell biomassa (7)(6). Det är därmed möjligt att biomassa odlad på vassle skulle kunna vara ett framtida alternativ till animalier och proteinrika grödor.

I samband med en ökad användning och tillvaratagande av näringsinnehållet i vassle har flera positiva effekter följt, däribland att mängden vassle som släpps ut som avfall i naturen har minskat (8). Vassle har ett högt biologiskt och kemiskt syrebehov (på engelska Biological Oxygen Demand respektive Chemical Oxygen Demand, hädanefter förkortat BOD samt COD) (2), vilka ger ett mått på mängden syre som krävs för oxidationen i en biologisk respektive kemisk nedbrytningsprocess av organiskt material (9). De höga BOD- och COD-värdena innebär att utsläpp av vassle är ett kritiskt föroreningsproblem (6). Tidigare kunde vassle släppas ut direkt på åkrar eller i hav, vilket vanligen tillämpades då det var ekonomiskt fördelaktigt att inte behöva behandla biprodukter till miljöns fördel (3). Idag är det däremot viktigare att eftersträva minimerade skadliga miljöeffekter och att dessutom ta vara på de tillgängliga kolkällorna. I många länder finns numera bestämmelser kring föroreningar som gör att obehandlad vassle inte tillåts släppas ut (3). För att minska BOD och COD i vassle behöver orsaken till de höga värdena reduceras, vilket främst är det höga laktosinnehållet (2). Det är således ytterst relevant att användningen av vassle utvecklas, samt att dess näringsinnehåll kan utnyttjas så effektivt som möjligt.

Vassle är en god kolkälla på grund av dess höga innehåll av laktos (6). Det är gynnsamt att använda mikroorganismer för omvandling av vassle eftersom det, utöver de eventuella produkter som kan bildas, även finns ett värde i den mikrobiella biomassa som produceras vid omvandlingen (10). Det finns dock en viss begränsning i att utnyttja mikroorganismer, eftersom de flesta industriellt använda mikroorganismerna inte kan bryta ner laktos på ett effektivt sätt (6). Därför finns ett stort behov av att

hitta nya industriellt intressanta kandidater som kan leva och växa på laktos. Den jäststart som idag används i störst utsträckning vid mikrobiell omvandling är modellorganismen *Saccharomyces cerevisiae*, men även den saknar ett nedbrytningssystem för laktos (11). Likväl finns det några kända jästarter som kan bryta ner laktos naturligt, till exempel jästen *Candida intermedia* (12). *C. intermedia* har tidigare visat sig kunna växa på vasslemedium för produktion av mervärdesprodukten jästbiomassa. Därmed är det intressant att studera *C. intermedia* och dess odlingsförhållanden för att uppnå en hög förbrukning av laktos, vilket i sig kan leda till att BOD- och COD-värdena i vassle minskas (12).

För att en omvandlingsprocess framtagna i laboratoriet ska kunna implementeras i större skala industriellt utförs det vanligen optimering av titer, produktivitet och utbyte (på engelska titer, rate och yield, förkortat TRY)(13). Titer är ett mått på mängden slutprodukt som erhålls, produktivitet anger produktion av slutprodukt per tidsenhet och utbyte beskriver mängd slutprodukt per tillsatt eller förbrukad mängd råmaterial (13). Optimering med avseende på TRY påverkas av en mängd olika faktorer och kan således vara ett komplext problem. För att effektivt undersöka möjliga faktorer som påverkar jästtillväxt är användning av experimentell design ett alternativ. En anledning till att en optimering vanligen är nödvändigt bottenar i industrins behov av att de implementerade processerna uppnår lönsamhet.

1.2 Syfte

Projektets huvudsyfte är att med avseende på titer optimera *C. intermedias* tillväxt på restprodukten vassle för omvandling till mervärdesprodukten jästbiomassa. Det övergripande syftet delas upp i två delsyften som tillsammans bidrar till att uppfylla huvudsyftet:

1. Designa laborativa experiment som ska ge information om olika tillväxtförhållandens påverkan, för att kunna maximera jästbiomassatiter av *C. intermedia*. Delsyftet uppnås genom användning av mjukvaruprogrammet MODDE[®] som verktyg. I MODDE sker experimentplanering av de laborativa experimenten såväl som utvärdering av resultat.
2. Utföra laborativt arbete för att odla *C. intermedia* på syntetiskt vasslemedium, där sammansättningen kan kontrolleras och varieras mer exakt än i verklig vassle. Odlingen utförs för att undersöka olika faktorer påverkan på jästbiomassatiter och hitta jästens optimala tillväxtförhållanden, samt att analysera substratförbrukning och produktutbyte.

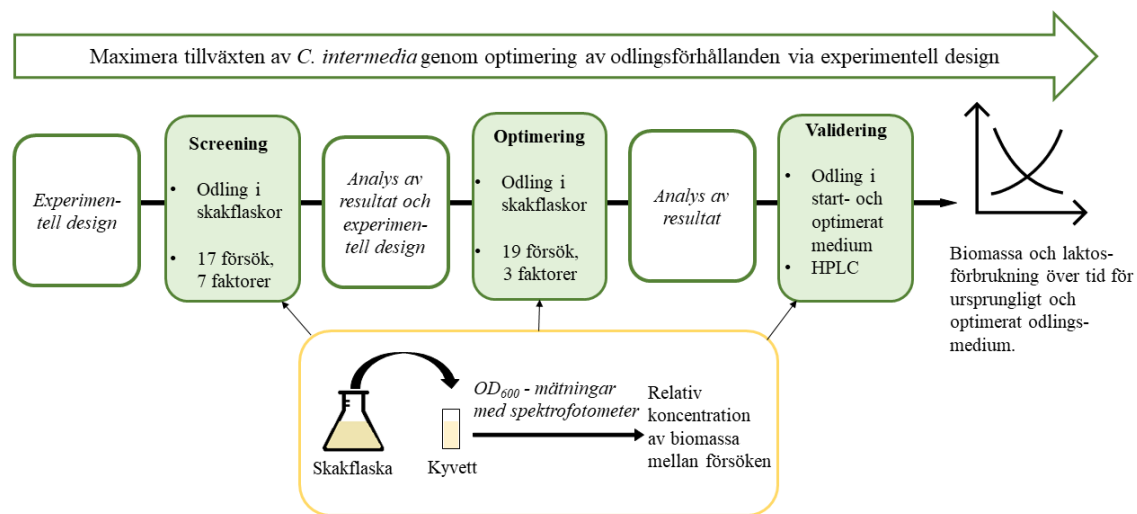
1.3 Uppgiftsbeskrivning och tillvägagångssätt

Den laborativa delen av projektet innefattar ett screeningexperiment, ett optimeringsexperiment samt en omgång för validering av resultatet. Mjukvaruprogrammet MODDE används för experimentplanering och resultatanalys. I screeningexperimentet testas signifikansen av sju utvalda faktorer, där målet är att förstå hur stor inverkan respektive faktor har på tillväxten med avseende på slutprodukten jästbiomassa. I optimeringsexperimentet optimeras de tre erhållna betydelsefulla faktorerna

från screeningexperimentet och således även tillväxtförhållandena för att uppnå en maximal jästbiomassatiter. Slutligen valideras resultaten och de optimerade odlingsförhållandena jämförs med de ursprungliga förhållandena.

Initialt väljs en lämplig experimentell design, anpassad efter antalet valda faktorer och vilken typ av information som eftersöks. Under det laborativa arbetet utförs därefter den framtagna försöksuppställningen. Laborationsarbetet innefattar beredning av odlingsmedium, odling av förkulturer, satsvisa odlingar av *C. intermedia*, samt provtagning för analys av jästbiomassa- och substratkoncentration. Metoder som används är sterilteknik, pipettering, autoklivering, inkubering, optiska densitetsmätningar vid 600 nm (fortsättningsvis förkortat OD₆₀₀-mätningar) och HPLC-mätningar (High-performance liquid chromatography). Påföljande moment är att resultatet av det laborativa arbetet utvärderas med hjälp av MODDE. Därmed skapas en översikt över mätvärdena, vilka består av uppmätt jästbiomassa för de testade odlingsförhållandena. Vidare tas en statistiskt signifikant modell fram som beskriver faktorernas effekter på responsen jästbiomassakoncentration inom det undersökta området. Slutligen används den framtagna modellen för att förutspå vilket odlingsförhållande som leder till maximal jästbiomassatiter.

En överblick av projektets arbetsgång kan ses nedan i figur 1.1.



Figur 1.1: Flödesschema över projektet.

1.4 Avgränsningar

Projektets fokus är att maximera koncentrationen av jästceller odlade på vassle, därigenom avgränsas andra fokusområden vad gäller tillvaratagandet av vasslen. Ett exempel på ett annat fokusområde som hade kunnat studeras är bildandet av metaboliter vid omvandling av vassle. Den främsta anledningen till de avgränsningar som görs är tidsbegränsningen projektet innehar. Då ett moment anses för omfattande relativt tidsbegränsningen sätts det som en avgränsning, vilka presenteras vidare i detta avsnitt tillsammans med avgränsningar gjorda på andra grunder.

En avgränsning är att antalet faktorer, som varierar i experimenten, begränsas till maximalt åtta stycken. Anledningen är att för många faktorer leder till fler försök än vad som är hanterbart under det laborativa arbetet. På grund av liknande praktiska begränsningar utesluts fortsättningsvis även pH som faktor.

Vidare är en avgränsning att endast satsvisa odlingar utförs, delvis på grund av tillgänglighet vad gäller utrustning. Avgränsningen leder till att det förblir okänt huruvida en annan typ av odling hade kunnat ge bättre resultat. Rapporten behandlar heller inte hur *C. intermedia* växer på riktig vassle vid de framtagna optimala förhållandena. Därför görs ingen jämförelse mellan hur jästen växer på syntetisk vassle gentemot riktig vassle. Vidare begränsas även antalet möjliga iterationer av laborativa experiment.

Den slutgiltiga avgränsningen som görs är att optimeringen endast sker med avseende på titer och inte en övergripande optimering kring TRY. Däremot bestäms utbytet och tillväxthastigheten trots att optimeringen inte sker med avseende på dem.

2 Teori

Den teoretiska bakgrund som ges nedan innehåller förklaringar om generell experimentell design med tillhörande nyckelbegrepp, samt information om de särskilda designer som används för screening respektive optimering i detta projekt. För en djupare förståelse om ämnet behövs även en genomgång av jästtillväxt, vilket tas upp genom en beskrivning av vilka ämnen som krävs för att uppnå tillväxt, respektive vilka som kan hämma tillväxten. Av samma anledning beskrivs även temperaturens påverkan på jästtillväxt. Närmast följer information om vassles innehåll samt mikrobiell odling.

2.1 Vassle

Vassle är en restprodukt från det steg i osttillverkningen då mjölken koaguleras till ostmassa (6). Den är en vätska som innehåller lösliga proteiner, lipider, salter (2) och laktos, vilken är den huvudsakliga kol- och energikällan i vassle (6). Sammansättningen i vasslen kan dock variera beroende på olika faktorer såsom vilket djur mjölken tagits från, vilket foder djuret fått, om vasslen är av söt eller sur karaktär samt tidpunkt på året (6). Vasslens karaktär beror på vilken typ av ost som tillverkas. Den procentuella ämnesfördelningen för söt vassle är vanligtvis följande: 93-94 % vatten, 4,5-5,0 % laktos, 0,8-1,0 % proteiner, 0,1 % citronsyra och slutligen 0,5-0,7 % mineraler. För sur vassle är den procentuella fördelningen istället 94-95 % vatten, 3,8-4,3 % laktos, lika stor andel proteiner, citronsyra och mineraler som söt vassle, samt 0,8 % mjölksyra. Även pH-värdet varierar stort mellan sur och söt vassle, där den sura vasslen ofta har ett pH kring 5 medan den söta vasslen har ett pH på ungefär 6,3 (6).

2.2 Mikrobiell omvandling

Mikrobiell omvandling är det förlopp då mikroorganismer konverterar exempelvis restprodukter till mervärdesprodukter (14). Till skillnad från mikrobiell fermentation sker här en omvandling i närvaro av syre, medan fermentation sker i en syrefattig miljö (14). Vilka mervärdesprodukter som bildas vid en mikrobiell omvandling av laktos beror på flera olika faktorer, bland annat vilka reaktionsvägar som är aktiva i mikroorganismen.

Som tidigare nämnts är *C. intermedia* en mikroorganism som kan omvandla laktos. Trots att *C. intermedia* har mycket gemensamt med *S. cerevisiae* är en utmärkande skillnad mellan dem att *C. intermedia* är en Crabtree-negativ jäst medan *S. cerevisiae* är motsatsen (15). Crabtree-effekten innebär, för positiva jästarter, att ett substratöverskott leder till att fermentation föredras istället för aerob respiration (16). I närvaro av en hög substratkoncentration kommer således mer produkt att bildas istället för att jästen växer. För Crabtree-negativa jäster sker det motsatta, det vill säga att vid ett överskott av substrat kommer *C. intermedia* ändå att växa (16). Tvärtom leder ett underskott av substrat till att produktproduktionen hos *C. intermedia* ökar.

2.3 Jästtillväxt

För att tillgodose det grundläggande behovet för överlevnad hos jäst krävs generellt ett antal olika typer av ämnen. Dessa ämnen delas upp i makronäringsämnen, mikronäringsämnen samt spårämnen. Vidare kommer det i det här avsnittet redogöras för vilka dessa ämnen är, samt för andra externa faktorer såsom temperatur.

2.3.1 Makronäringsämnen

Grundämnena kol, kväve, syre, svavel, fosfor och väte räknas som makronäringsämnen, vilka behövs för att jästceller ska växa (17). Generellt är makronäringsämnen de grundämnen som krävs i gramkvantiteter, räknat på en liter medium (17). Tillväxten hos jästen sker genom uppbyggnad av makronäringsämnena till proteiner, nukelinsyror samt lipider. Nedan ges en mer ingående beskrivning av dessa ämnen.

2.3.1.1 Kol

Jäst är en kemoheterotrof organism (16), vilket innebär att dess kol-, energi-, syre- och vätekälla är densamma (17). För jäst är det vanligast att kolkällan är en organisk kolförening bestående av en eller flera sorters kolhydrater (16). Som ovannämnt är laktos den huvudsakliga kolkällan i vassel; i sin tur bryts laktos ned intracellulärt till de två monosackariderna glukos och galaktos. När sockerarter metaboliseras utvinns energi som används till att få cellen att växa (18). Kolkällan är därav en av de viktigaste komponenterna i ett medium.

2.3.1.2 Kväve

För att tillväxt ska ske är det viktigt att en jäst har tillgång till en kvävekälla, eftersom kväve är den huvudsakliga komponenten i de nukleotider som bygger upp

nukleinsyror, samt en viktig komponent i aminosyror (17). Alla jästarter kan använda oorganiska kväveföreningar som kvävekällor, men enbart vissa arter kan använda sig av organiska kväveföreningar (16) (19). Därav är det mest tillförlitligt att använda sig av en oorganisk kvävekälla för att försäkra att tillväxt kommer att uppnås.

Vid ett underskott av kväve i ett medium kommer tillväxten att avta, vilket leder till att tillväxtfasen blir längre (16). Vid ett extremt kväveunderskott kan tillväxten till och med avstanna helt. Däremot påverkar ett överskott av kväve inte jästen på något särskilt sätt, utan den kan då generellt sett växa normalt.

2.3.1.3 Syre

För att maximera produktion av jästbiomassa krävs det vanligen att jästen får växa i ett syresatt medium (20). Det är viktigt att jästen har tillgång till syre eftersom det vid en aerob omvandling konverteras en avsevärt större mängd ATP än vid en anaerob odling (21). Vid en satsvis anaerob odling kan den intracellulära oxidativa stressen som uppstår medföra att utbytet för jästbiomassa minskar markant, däremot ökar produktionen av eventuella produkter vid en sådan odling (20). Mer detaljerat medför en aerob omvandling att jästcellen istället bildar fler lipider som kan stimulera uppbyggnad av exempelvis viktiga cellmembrankomponenter, såsom ergosterol, jästens motsvarighet till kolesterol (20).

I övrigt behövs syre i centrala delar av cellen och ingår i många livsviktiga föreningar. Syrebehovet brukar vanligtvis täckas upp genom att det ingår i kolkällan (17), vilket är fallet i det här projektet eftersom laktos har den kemiska sammansättningen $C_{12}H_{22}O_{11}$. Oftast finns det även syre tillgängligt externt, till följd av att tillväxten sker i en icke-syrebegränsad miljö.

2.3.1.4 Fosfor, svavel och väte

En oorganisk fosforkälla i form av ett salt brukar räcka för att tillfredsställa det fullständiga fosforbehovet för cellerna (19). I brist på fosfor kommer tillväxten att begränsas på grund av att ämnet ingår som komponent i ATP, kofaktorer och fosfolipider (17).

Vidare behövs också en svavelkälla för att tillväxt ska uppnås eftersom svavel krävs i proteinsyntesen och ingår i vissa aminosyror (17). Svavelkällan förekommer oftast i form av sulfatjoner i ett salt.

Det behövs ingen särskild vätekälla, utan precis som syrebehovet tillfredsställs behovet genom att väte ingår i det substrat som organismen utnyttjar (17). Anledningen är att jäst är kemoheterotrofa organismer (16). Väte är en grundläggande förutsättning för liv och fyller därav flertalet viktiga funktioner; väte har bland annat en avgörande roll i elektrontransportkedjan (17).

2.3.2 Mikronäringsämnen

Mikronäringsämnen utgörs av grundämnena järn, kalcium, kalium och magnesium. De förekommer i celler som katjoner och behövs i milligram-kvantiteter per liter medium (17). Mikronäringsämnen krävs för att celltillväxt ska uppnås. Diverse roller

innehas av mikronäringsämnen, till exempel krävs magnesium för att bilda komplex med ATP och ingå i kofaktorer. Kalium å andra sidan behövs bland annat i proteinsyntesen för att upprätthålla enzymaktivitet (17).

2.3.3 Spårämnen

Andra ämnen som är viktiga för mikrobiell tillväxt är så kallade spårämnen. Även dessa är metaller. Till skillnad från mikronäringsämnen behövs spårämnen däremot endast i mikrogram-kvantiteter per liter medium (17). De metaller som räknas som spårämnen är kobolt, koppar, mangan, molybden, nickel och zink. Spårämnen förekommer som katjoner i cellen och fyller ett flertal olika funktioner, exempelvis ingår de ofta i enzymer och kofaktorer. Övriga tillämpningar är bland annat att kobolt förekommer som en komponent i vitamin B12, samt att molybden krävs för att fixera kväve (17). Till följd av att de mängder spårämnen som tillförs ett medium är tämligen små, är den exakta mängden som behövs ännu inte helt fastställt. Spårämnen måste dock närvara i ett medium, i tillräcklig koncentration, för att tillväxt ska ske (17).

2.3.4 Ytterligare faktorer

Det är inte enbart mediumkompositionen som påverkar jästtillväxt, utan även andra faktorer såsom omrörning, temperatur och pH-värde har en inverkan. De flesta jästarter växer bäst vid en temperatur omkring 20-30 °C, dock varierar det exakta temperaturintervallet där tillväxt kan förekomma beroende på vilken art som studeras (19). Den övre gränsen ligger vanligtvis mellan 24 °C och 48 °C, och den undre gränsen omkring fryspunkten (19). En högre temperatur ger snabbare reaktioner och högre tillväxthastighet, medan en lägre temperatur medför motsatsen (18). Om jästceller utsätts för en för hög temperatur blir cellmembranen icke-funktionella och enzym denaturerar, vilket leder till att jästcellerna dör. Vid en minimal temperatur är anledningen till avstannad tillväxt inte helt känd men troligtvis beror det på att cellmembranen förlorar sin funktion (18). Temperaturintervallet där tillväxt sker påverkas även av andra faktorer, såsom pH, vilket i sin tur kan medföra att tillväxthastigheten påverkas (19). Vid en temperatur som inte är optimal kan jästcellerna också enklare påverkas av andra stressorer.

2.4 Experimentell design

Experimentplanering är ett essentiellt moment i den generella experimentella processen. Undermåligt planerade experiment riskerar att vara tids- och kostnadsineffektiva, samt potentiellt svåra att utvärdera (22). Efter att känd information om försöksobjektet inhämtats i planeringssteget kan en försöksuppställning göras, vilket är en plan för hur ett visst antal utvalda faktorerers påverkan ska studeras i experimentet. Inom forskningsområdet experimentell design utvecklas och etableras strategier för att försöksuppställningar ska bli så effektiva som möjligt för att uppnå experimentets målsättningar. Bearbetade strategier kallas vanligen för designer. Många olika designer finns tillgängliga och de är ämnade att användas i olika situationer.

2.4.1 Faktorer och nivåer

De varierade parametrarna i ett experiment kallas för faktorer, vilka om de är kvantitativa kan undersökas på olika nivåer. Effekten av faktorerna och deras nivåer testas mot en eller flera gemensamma responsvariabler, som exempelvis skulle kunna vara hållbarhet av ett material eller biomassa i en cellodling. Ett exempel på en faktor är temperaturen, vilken förslagsvis kan varieras på nivåerna 25 °C, 30 °C och 35 °C. Den här typen av nivåer kallas för naturliga nivåer, vilket innebär att de har en naturlig storlek och enhet. I försöksuppställningar kan så kallade kodade nivåer utnyttjas, vilka är de naturliga nivåerna enhetsskalade och centrerade kring noll (22). Den kodade nollnivån är faktorns centervärde, vilket här motsvaras av den naturliga nivån 30 °C. Punkten i vilken alla faktorerers nollnivåer sammanfaller är experimentets centerpunkt (22). I ovanstående exempel motsvarar ett kodat enhetssteg den naturliga steglängden 5 °C, vilket ger att exempelvis den kodade nivån -1,5 motsvaras av den naturliga temperaturen 22,5 °C ($30\text{ °C} - 1,5 \cdot 5\text{ °C} = 22,5\text{ °C}$). I experiment med ett flertal faktorer kan de kodade nivåerna med fördel användas i försöksuppställningen för att ge ökad överskådlighet.

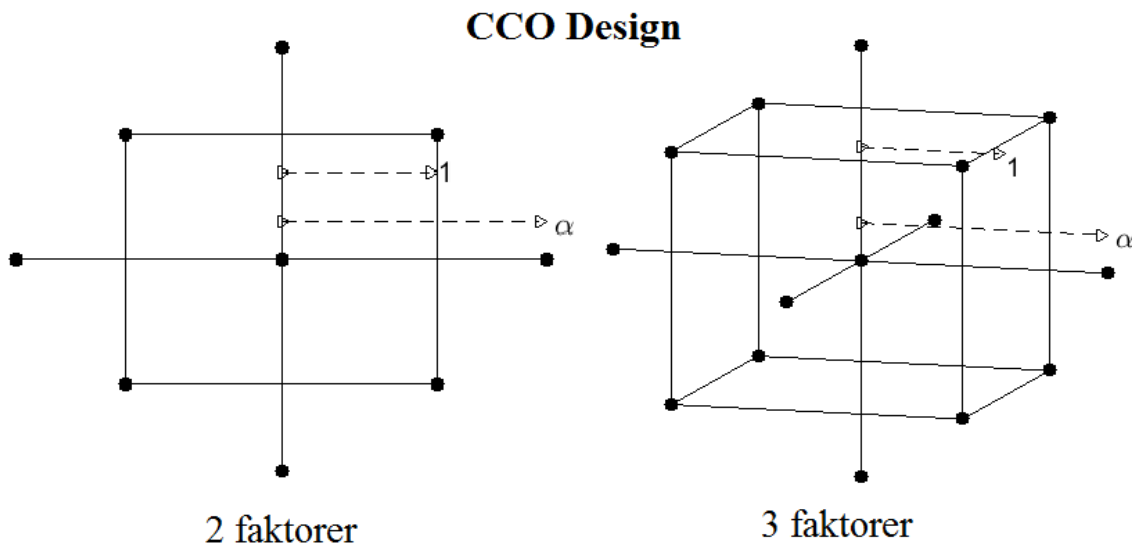
Varje faktor som varieras utgör en dimension i experimentets faktorrymd. Om faktorerna som varieras exempelvis är temperatur, NaCl- och laktoskoncentration har systemet en tredimensionell faktorrymd. Från litteratur samt tidigare experiment kan rimliga värden tas fram för den högsta respektive lägsta nivån för alla varierade faktorer i försöksuppställningen, med andra ord sätts faktorrymdens begränsningar. Den experimentella designen är därmed ett upplägg för hur det avgränsade området i faktorrymden kring centerpunkten ska undersökas.

2.4.2 Screening och optimeringsdesigner

Screening av ett flertal faktorer görs vanligen i början av undersökningsarbetet för att få en översikt över faktorerers relevans. En design avsedd för användning i screening är Definitive Screening Design, i vilken varje faktor testas på tre nivåer där nollnivån är inräknad (23). Designen har flera fördelar gentemot klassiska ofullständiga faktorförsöksdesigner (på engelska fractional factorial design), däribland Plackett-Burmandesignen som vanligen används vid screeningexperiment (23). Exempelvis blir första ordningens effekt av varje enskild faktor på responsen oberoende av varandra samt av interaktionseffekter mellan två faktorer. Designen kan även ge information om enskilda faktorerers kvadratiske effekter, men de är dock till en viss grad korrelerade med varandra. Dessutom kan antalet kombinationer av faktorer på olika nivåer som måste testas laborativt begränsas till ett plus antalet faktorer i experimentet.

När faktorerna har screenats kan de mest inflytelserika sedan selekteras för en mer detaljerad utredning. Om målsättningen är att maximera responsen, exempelvis jästtillväxt eller produktutbyte, kan det klassas som ett optimeringsproblem. Vid optimering av ett fåtal faktorer kan designen Central Composite Orthogonal Design (CCO) vara ett möjligt alternativ (22). I figur 2.1 visas en schematisk representation av CCO-designen för experiment med två respektive tre varierade faktorer. Som kan ses i figuren är responsvariabelns utvärderingspunkter i en CCO-design ortogonala

och symmetriskt utspridda kring centerpunkten. Att designen är ortogonal är en fördel vid utvärdering av resultatet eftersom det innebär att responsen av varje försök kommer vara okorrelerade med varandra. Varje faktor testas på fem nivåer: $0, \pm 1$ och $\pm \alpha$, där $\pm \alpha$ är de så kallade stjärnpunkterna vars kodade nivåer sätts till minst \pm roten ur antalet faktorer (22). Placeringen av faktornivåer möjliggör för upptäckt av potentiella interaktionseffekter mellan faktorer samt kvadratisk beteende hos enskilda faktorer inom det undersökta området.



Figur 2.1: Schematisk skiss över placeringen av utvärderingspunkter för en Central composite orthogonal (CCO) design för två respektive tre faktorer. De ifyllda cirklarna representerar de kodade faktornivåerna vid vilka responsvariabeln utvärderas.

2.4.3 Utvärdering av experiment

För att kunna utvärdera ett experiment krävs att laborativa försök genomförs för att erhålla data på storleken av responsvariabeln i de punkter som utgör den experimentella designen. En modell för hur faktorerna var för sig och eventuella interaktioner mellan faktorer påverkar responsen kan sedan tas fram. Via de upprepade försöken i centerpunkten kan andelen mellan den oförklarade och den av modellen förklarade avvikelserna beräknas, vilket är ett sätt att utvärdera modellens tillämpbarhet (24). Utveckling av modellen kan sedan göras genom att ta bort insignifikanta modelltermer och åter utvärdera variansen. Med hjälp av den framtagna modellen kan sedan en responsyta (på engelska response surface), tas fram över faktorernas effekt på responsen inom det avgränsade området i faktorrymden (22). För att slutligen hitta kombinationen av faktorerens nivåer som ger responsens högsta värde eftersöks områdets maximipunkt på responsytan.

3 Material och metod

I det här avsnittet presenteras de metoder som användes under projektets gång, samt använda komponenter och koncentrationer. En genomgång görs av hur de tre experimentomgångarna utfördes, samt det initiala experimentet för jästextrakts signifikans. Slutligen redogörs det för de specifika analysmetoder som användes.

3.1 Mikroorganism och förkultur

Den mikroorganism som använts är en stam av *Candida intermedia* som heter CBS 141442. Sterilt arbete i dragskåp med laminärt flöde har tillämpats vid hantering av *C. intermedia* och dess olika odlingsmedium genom hela projektet för att undvika kontaminering. *C. intermedia* ströks initialt på agarplattor för att få väl separerade jästkolonier. En tydligt separerad koloni förkultiverades sedan i 50 ml Delft medium bestående av 1 X Delft medium salter, 20 g/l glukos, 1 X spårämneslösning samt 1 X vitaminlösning. Se bilaga A för exakt innehåll i Delft medium, spårämneslösning och vitaminlösning. Förkulturen inkuberades över natten i 30 °C och 180 rpm i 100 ml E-kolvar, fortsatt refererade till som skakflaskor.

3.2 Utvärdering kring behovet av jästextrakt

Ett initialt screeningexperiment gjordes med syftet att utvärdera huruvida jästextrakt, vilket är torkad och uppmald jäst i lösning, var signifikant för tillväxt. Tre stycken 100 ml skakflaskor innehållande 35 g/l laktos ($C_{12}H_{22}O_{11}$), 13 g/l ammoniumsulfat ($(NH_4)_2SO_4$), 9 g/l kaliumdivätefosfat (KH_2PO_4), 1,25 X spårämneslösning, 1,25 X vitaminlösning, 0,3 g/l natriumklorid (NaCl) och 0,2 g/l magnesiumsulfat ($MgSO_4$) blandades. Till de tre flaskorna adderades jästextrakt sådant att koncentrationerna blev 0 g/l, 1,00 g/l respektive 2,00 g/l. Den totala mediumvolymen i respektive skakflaska var 26 ml. Skakflaskorna inkuberades över natten i 30 °C och 180 rpm. OD₆₀₀-mätningar gjordes efter 24 timmar för att utvärdera tillväxten. För en vidare beskrivning av metoden se laborationsmanualen i bilaga B.2.

3.3 Skakflaskexperiment med syntetiskt medium

Nedan följer metoden för projektets huvudsakliga moment: screening, optimering och validering av framtagen modell. Inledningsvis utfördes ett screeningexperiment i syfte att undersöka signifikansen hos sju olika faktorer och deras nivåer. Vidare användes MODDE för att evaluera vilka faktorer som ansågs relevanta att testa i optimeringen. I valideringen jämfördes slutligen tillväxten av *C. intermedia* i det optimerade mediet med det ursprungliga mediet. För mer utförlig beskrivning av det laborativa arbetet under screeningexperimentet, optimeringen och valideringen, se laborationsmanualer för dessa i bilaga B, C respektive D.

3.3.1 Screening

Definitive Screening Design användes för att screena sju faktorer: laktos, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, KH_2PO_4 , spårämneslösning, vitaminlösning, NaCl och temperatur, mot responsvariablerna OD_{600} uppmätt 24 respektive 48 timmar efter inokulering. I experimentet utvärderades kombinationer av faktorerna på tre nivåer i sammanlagt 17 försök, varav 3 i centerpunkten. I tabell 3.1 presenteras faktorernas naturliga nivåer för respektive kodad nivå. Även MgSO_4 och jästextrakt ingick i mediet men hölls på en konstant nivå på 0,2 g/l respektive 1,00 g/l.

Tabell 3.1: Naturliga nivåer för faktorer och konstanta mediekomponenter för screening.

Komponent/Faktor	Nivå			Enhet
	-1	0	+1	
Temperatur	25,0	30,0	35,0	°C
Laktos	15,0	35,0	55,0	g/l
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	10,0	13,0	16,0	g/l
KH_2PO_4	7,00	9,00	11,0	g/l
Spårämneslösning	0,500	1,25	2,00	X
Vitaminlösning	0,500	1,25	2,00	X
NaCl	0,000	0,300	0,600	g/l
MgSO_4	0,200			g/l
Jästextrakt	1,00			g/l

Totalt 25 ml av vardera mediumkomposition blandades i sterila 100 ml skakflaskor. De inokulerades därefter med den flytande förkulturen av *C. intermedia*. Beräknat OD_{600} vid start var 0,1. Innan inokuleringen studerades förkulturen under mikroskop för att undersöka om kontaminering skett. Jästcellerna är ovala och knoppiga till skillnad från långsmala sporer och bakterier, som är stavformade eller runda och betydligt mindre än jästcellerna. Kontaminering av någon annan jästart än *C. intermedia* kunde ej kontrolleras med mikroskop. Skakflaskorna inkuberades sedan i 25, 30 eller 35 °C och 180 rpm i 48 timmar.

3.3.2 Optimering

Optimeringen av faktorerna temperatur, laktos och vitaminlösning gjordes enligt en CCO design. Faktorerna varierades över nivåerna 0, ± 1 och $\pm 1,47$ (stjärnpunkterna) i sammanlagt 19 försök, varav 5 i centerpunkten. I tabell 3.2 listas de naturliga nivåerna för laktos, vitaminlösning och temperatur samt koncentrationerna för resterande mediekomponenter som hölls på konstant nivå.

Tabell 3.2: Naturliga nivåer för faktorer och konstanta mediekomponenter för optimering.

Komponent/Faktor	Nivå					Enhet
	-1,47	-1	0	+1	+1,47	
Temperatur	24,1	26,0	30,0	34,0	35,9	°C
Laktos	27,9	35,0	50,0	65,0	72,7	g/l
Vitaminlösning	1,76	2,00	2,50	3,00	3,24	X
(NH ₄) ₂ SO ₄	10,0					g/l
KH ₂ PO ₄	7,00					g/l
Spårämneslösning	0,500					X
MgSO ₄	0,200					g/l
Jästextrakt	1,00					g/l

De 19 försöken förbereddes i skakflaskor och inokulerades enligt samma metod som vid screeningexperimentet. Flaskorna inkuberades sedan i 24,1, 26,0, 30,0, 34,0 eller 35,9 °C och 180 rpm i 72 timmar. OD₆₀₀-mätningar togs vid 24, 48 och 72 timmar. Anledningen till att fler provtagningar gjordes under optimeringen var för att undersöka huruvida tillväxten fortsatte eller planande ut efter 48 timmar.

3.3.3 Validering av modellen

I valideringen jämfördes tillväxten hos *C. intermedia* i den framtagna optimerade mediumkompositionen med det ursprungliga mediet. Startmediets komposition motsvarade det för centerpunkten i screeningexperimentet. Kompositionen av det optimerade mediet var den som modellen framtagna vid optimeringen förutspådde ge högst OD₆₀₀. I tabell 3.3 listas koncentrationer för samtliga komponenter och odlingstemperatur för respektive medium. Tre 100 ml skakflaskor av vardera medium blandades och inokulerades med förkulturen av *C. intermedia*. Den totala medievolymer var 25 ml för respektive försök och beräknat OD₆₀₀ vid start var 0,1. Odlingarna inkuberades sedan under 72 timmar.

Tabell 3.3: Naturliga nivåer för komponenter och faktorer i det ursprungliga respektive optimerade mediet.

Komponent/Faktor	Startmedium	Optimerat medium	Enhet
Temperatur	30,0	24,1	°C
Laktos	35,0	48,2	g/l
(NH ₄) ₂ SO ₄	13,0	10,0	g/l
KH ₂ PO ₄	9,00	7,00	g/l
Spårämneslösning	1,25	0,500	X
Vitaminlösning	1,25	1,76	X
NaCl	0,300	0,000	g/l
MgSO ₄	0,200	0,200	g/l
Jästextrakt	1,00	1,00	g/l

OD₆₀₀-mätningar gjordes vid 18, 20, 22, 24, 48 samt 72 timmar efter inokulation. Mätningar gjordes vid fler tidpunkter för att kunna följa odlingen kontinuerligt och därmed göra tillväxtkurvor som ett komplement till titer. HPLC-prover togs vid samtliga tidpunkter för att mäta laktoskoncentrationen över tid för respektive medium.

3.4 Analyismetoder

Här presenteras de metoder som användes genomgående för att analysera resultat från det laborativa arbetet. De metoder som användes var OD-mätningar vid 600 nm, analys av prover med HPLC-teknik samt analys av OD₆₀₀-resultaten i programmet MODDE.

3.4.1 OD₆₀₀-mätningar

Samtliga OD₆₀₀-mätningar gjordes i spektrofotometern Genesys 10 vid 600 nm. Mätningarna gav den relativa tillväxten av jästbiomassa mellan de olika mediumkompositionerna. Vid samtliga provtagningar togs först ett mindre prov ur skakflaskorna under sterila förhållanden, för att sedan spädas i kyvetter. Proverna spädades i syfte att göra mätningarna i spektrofotometerens linjära mätintervall, vilket motsvaras av ett OD₆₀₀ mellan 0,1 och 0,4. Motsvarande mediumkomposition för centerpunkterna användes som blankprover i samtliga mätningar.

3.4.2 HPLC

För HPLC-analysen användes JASCO UV-IR och analysprogrammet ChromNAV. Varje prov analyserades av HPLC:n i 18 minuter och injektionsvolymen var 5 µl. För att erhålla laktoskoncentrationerna från de olika medierna under valideringen skapades en standardkurva. Spädningsserien för standardkurvan för laktos var 50, 25, 12,5, 6,25 och 3,125 g/l. Det linjära sambandet mellan topparea och koncentration i standardkurvan användes sedan för beräkning av laktoskoncentrationerna i proverna från valideringen.

3.4.3 Analys i MODDE

Programmet MODDE användes för att generera försöksuppställningar för valda experimentella designer till screening- och optimeringsexperimentet. För att ta fram försöksuppställningen angavs först antalet faktorer och responser, därpå specificerades vilken design samt antalet upprepade försök som skulle göras i centerpunkten.

Efter att experiment utförts laborativt användes även MODDE som hjälpmedel i resultatanalysen. För att få en översikt över responsvariabelns varians samt för att upptäcka mönster plottades storleken på responsen mot försöksnumret. En visuell jämförelse gjordes mellan spridningen på de upprepade centerpunktsförsöken och de övriga försöken. Vidare anpassades en modell till datan genom linjär regression med avseende på modellens koefficienter. Det första utkastet av modellen innehöll alla modelltermer vars effekt potentiellt skulle kunna upptäckas av den valda designen, det vill säga exempelvis första ordningens, kvadratiska och interaktionseffekter. Därefter utvecklades modellen genom att insignifikanta koefficienter, för ett 95% konfidensintervall, till modelltermer successivt togs bort tills endast signifikanta termer återstod. Resultatet av ett F-test (95%), med nollhypotesen att modellen hade god passning, samt en analys av modellens varians sammanställdes i en variansanalys-tabell (på engelska analysis of variance table, fortsättningsvis förkortat ANOVA-tabell).

För att avgöra centerpunktens faktornivåer för optimeringsexperimentet användes den framtagna modellen från screeningexperimentet för att hitta nivåerna som gav högst respons för de signifikanta faktorerna. Övriga faktorer som varierades i screeningen, vilka inte visade sig ha tillräckligt stor effekt på responsvariablerna för att ingå i modellen, sattes i optimeringsdesignen till den lägsta nivån som testades i screeningexperimentet. Den framtagna modellen efter optimeringsexperimentet användes slutligen för att plotta en responsyta och förutspå de optimala odlingsförhållandena för att maximera jästbiomassatitern.

4 Resultat

Nedan följer de resultat som erhöles under projektets gång. Resultatet presenteras enligt en kronologisk uppdelning i screening-, optimerings- och valideringsexperiment. Varje delsteg genererade resultat som analyserades i MODDE och därefter användes som grund till planeringen och utförandet av nästföljande steg.

4.1 Screening

Innan screeningexperimentet kunde påbörjas utfördes ett initialt experiment där jästextrakts betydelse för tillväxten undersöktes. Resultatet av det initiala experimentet visas i tabell 4.1, där det syns att försök nummer 1, som inte innehöll jästextrakt, gav mycket mindre jästbiomassa än de som innehöll 1,00 respektive 2,00 g/l. Följaktligen beslutades det att jästextrakt skulle inkluderas i receptet för det syntetiska mediet. Eftersom jästextrakt är dyrt och en dubbling av koncentrationen inte gav en dubbling av OD_{600} valdes vidare koncentrationen 1,00 g/l av jästextrakt till att inkluderas i mediet hädanefter.

Tabell 4.1: Experimentella OD_{600} -värden från det initiala jästextraktsexperimentet.

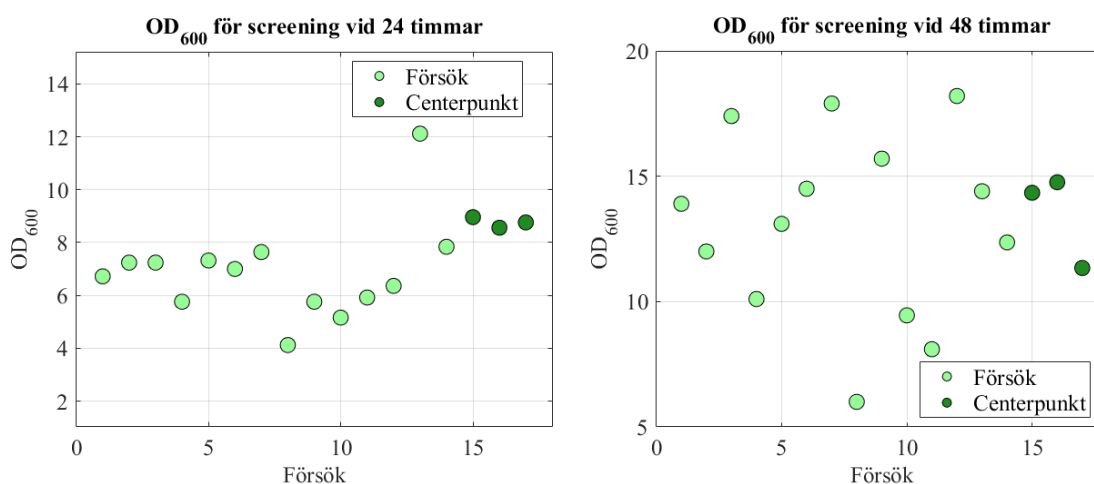
Försök	Koncentration jästextrakt (g/l)	OD_{600} efter 24 timmar
1	0,00	0,5
2	1,00	6,2
3	2,00	8,9

Efter det initiala experimentet med jästextrakt påbörjades screeningexperimentet. Sju faktorer testades i en försöksuppställning enligt Definitive Screening Design, se tabell 4.2. Resultatet från screeningen erhöles i form av OD_{600} -värden uppmätta 24 respektive 48 timmar efter inokulering, vilket inkluderats i tabell 4.2. De kodade nivåerna finns översatta till naturliga nivåer i tabell 3.1.

Tabell 4.2: Försöksuppställning framtagen för screeningexperimentets 17 försök med de sju faktorernas kodade nivåer samt resultat av OD₆₀₀-mätningar vid 24 respektive 48 timmar.

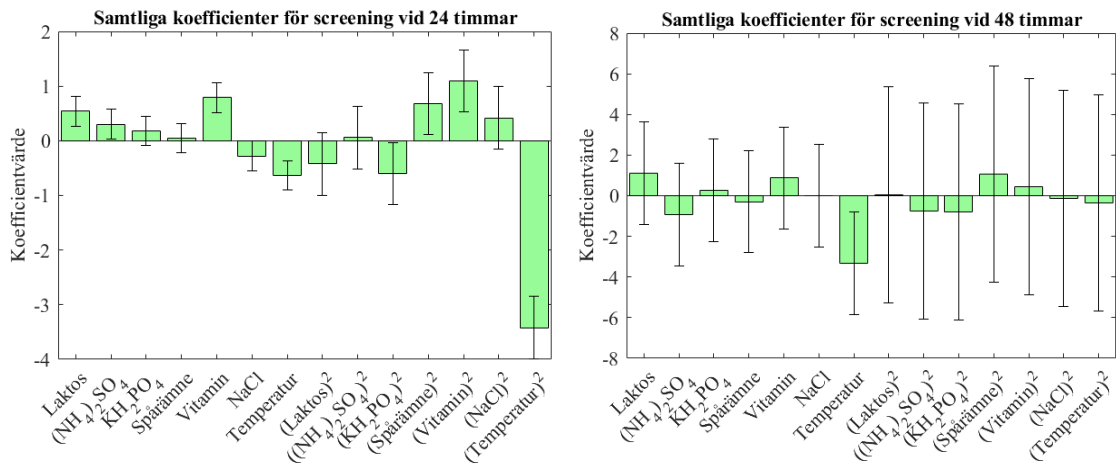
Nr.	Laktos	(NH ₄) ₂ -SO ₄	KH ₂ -PO ₄	Spårämne	Vitamin	NaCl	Temperatur	OD ₆₀₀ 24 timmar	OD ₆₀₀ 48 timmar
1	0	1	-1	1	-1	1	-1	6,7	13,9
2	0	-1	1	-1	1	-1	1	7,2	12,0
3	-1	0	1	-1	1	1	-1	7,2	17,4
4	1	0	-1	1	-1	-1	1	5,8	10,1
5	1	-1	0	1	1	1	1	7,3	13,1
6	-1	1	0	-1	-1	-1	-1	7,0	14,5
7	1	-1	-1	0	1	-1	-1	7,6	17,9
8	-1	1	1	0	-1	1	1	4,1	6,0
9	-1	-1	1	1	0	-1	-1	5,8	15,7
10	1	1	-1	-1	0	1	1	5,2	9,5
11	-1	1	-1	1	1	0	1	5,9	8,1
12	1	-1	1	-1	-1	0	-1	6,4	18,2
13	1	1	1	1	1	-1	0	12,1	14,4
14	-1	-1	-1	-1	-1	1	0	7,8	12,4
15	0	0	0	0	0	0	0	9,0	14,3
16	0	0	0	0	0	0	0	8,6	14,8
17	0	0	0	0	0	0	0	8,8	11,3

I figur 4.1 nedan ges en visualisering av OD₆₀₀-resultaten. Där syns det att vid 24 timmar fanns ingen stor spridning mellan försöken, utan att de flesta hade ett OD₆₀₀ mellan 5 och 10. Vid 24 timmar var även variansen mellan försöken i centerpunkten låg, vilket syns eftersom de tre centerpunkterna har nästintill samma OD₆₀₀-värde. Efter 48 timmar fanns en större spridning av punkterna och i det fallet låg OD₆₀₀-värdena mellan 6 och 18. Vid 48 timmar hade de tre försöken i centerpunkten även en större varians.



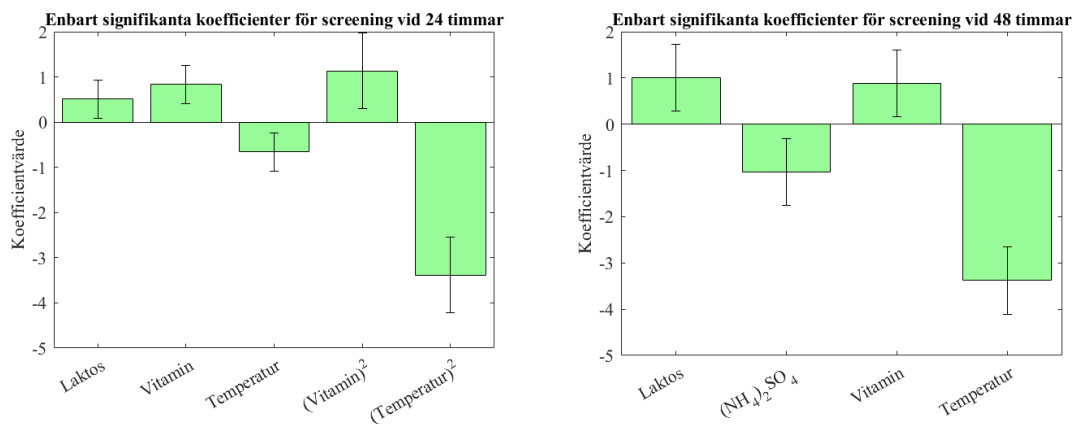
Figur 4.1: Resultat av OD₆₀₀ för vardera försök, numrerade enligt tabell 4.2. Vänster: OD₆₀₀-mätningar vid 24 timmar. Höger: OD₆₀₀-mätningar vid 48 timmar.

Resultatet bearbetades i MODDE genom att OD_{600} -värdena vid de två tidpunkterna matades in som responsvariabler. Därigenom togs två initiala modeller fram, en för vardera mätserie, se figur 4.2. De gröna staplarna i figuren visar påverkan på jästbiomassakoncentrationen av första ordningens effekter av faktorerna samt av faktorernas kvadratiska effekter. De grå strecken, felstaplarna, visar varje koefficients konfidensintervall. Om konfidensintervallet inkluderar noll är modelltermen insignifikant och den plockas därmed bort från modellen.



Figur 4.2: Koefficientvärden för modelltermerna, vilka visar faktorer och interaktioners effekt på jästbiomassatitern. Felstaplar visar konfidensintervallet för respektive koefficient. Vänster: modell baserad på mätvärden vid 24 timmar. Höger: modell baserad på mätvärden vid 48 timmar.

Efter att insignifikanta modelltermer exkluderats i turordning erhöles två nya modeller, en för varje mätserie, se figur 4.3. De signifikanta faktorerna för responsen OD_{600} vid 24 timmar var temperaturen samt laktos- och vitaminkoncentrationen. Därtill ingick även $(vitamin)^2$ och $(temperatur)^2$, som är kvadratiska effekter av motsvarande faktor, i modellen. I modellen anpassad till mätvärdena tagna vid 48 timmar var istället de signifikanta faktorerna laktos, $(NH_4)_2SO_4$, vitamin och temperatur.



Figur 4.3: De två modellerna där enbart signifikanta modelltermer behövs. Felstaplar visar konfidensintervall för respektive koefficient. Vänster: modell baserad på mätdata vid 24 timmar. Höger: modell baserad på mätdata vid 48 timmar.

Eftersom de två mätserierna gav olika resultat på signifikanta faktorer studerades båda modellerna genom att två separata ekvationer togs fram. Den första modellen, motsvarande resultatet vid 24 timmar, beskrivs av ekvation 4.1.

$$y = 8,794 + 0,511 * L + 0,831 * V - 0,657 * T - 3,395 * T^2 + 1,13 * V^2 \quad (4.1)$$

där y är jästbiomassa, L är laktos, V är vitamin och T är temperatur. Modellens R^2 - och Q^2 -värde var 0,913 respektive 0,771. Koefficienterna i modellen togs fram i MODDE och är beräknade för kodade nivåer på ingående modelltermer, för variananalys se ANOVA-tabell i tabell E.1 i bilaga E.

Den andra modellen, motsvarande resultatet vid 48 timmar, beskrivs av ekvation 4.2.

$$y = 13,15 + 1,002 * L - 1,033 * N + 0,877 * V - 3,38 * T \quad (4.2)$$

där y är jästbiomassa, L är laktos, N är $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, V är vitamin och T är temperatur. Likt tidigare beräknades koefficienterna även i denna modell för kodade nivåer på modelltermerna. Modellens Q^2 -värde var 0,864 och dess R^2 -värde var 0,922, se tabell E.2 i bilaga E för ANOVA-tabell.

De två modellerna jämfördes för att besluta vilka faktorer som skulle testas i nästa experiment. Eftersom laktos, vitamin och temperatur var signifikanta i båda modellerna valdes dessa tre till att studeras vidare. Resterande faktorer sattes således till konstanta värden i optimeringsexperimentet. Utifrån resultatet av analysen i MODDE togs beslutet att de faktorer som ej inkluderades i modellen kunde sättas till den lägsta nivån, vars motsvarande koncentrationer hittas i tabell 3.2.

4.2 Optimering

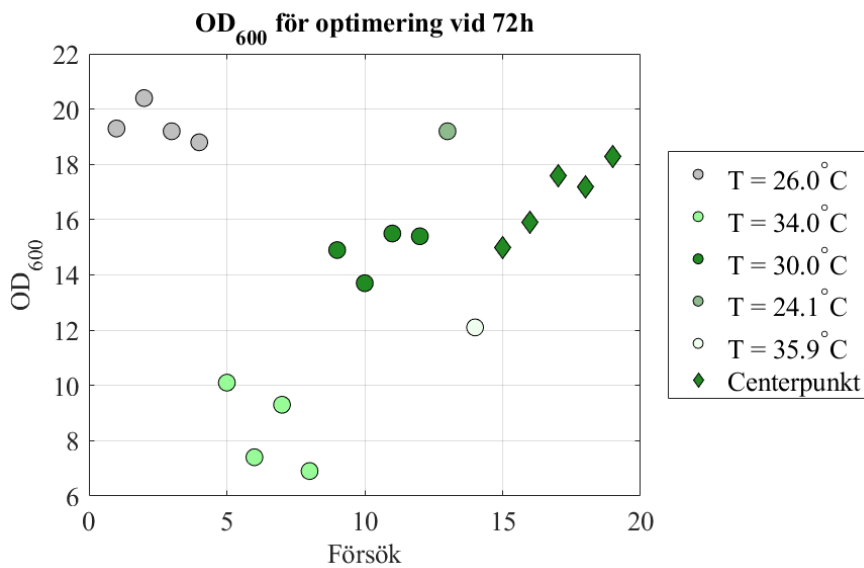
Då resultatet av screeningexperimentet visade att signifikant påverkan på tillväxten av *C. intermedia* gavs av faktorerna laktos, vitamin och temperatur, testades dessa faktorer vidare i optimeringsexperimentet. Syftet med experimentet var att optimera förhållandena genom att eftersöka den kombination av nivåer hos faktorerna som gav den maximala jästbiomassatitern. Den experimentella design som användes var CCO.

OD_{600} -mätningar gjordes vid 24, 48 och 72 timmar för de 19 försöken. De mätningar som genomfördes vid 24 och 48 timmar gjordes enbart som kontroll för att följa tillväxten. Därav baserades analysen endast på resultatet av OD_{600} -mätningarna vid 72 timmar. Resultaten redovisas i tabell 4.3. Tabellen innehåller även försöksupställningen med kodade nivåer för respektive försök i experimentet. För översättning till naturliga nivåer, se tabell 3.2.

Tabell 4.3: Försöksuppställning framtagen för optimering av faktorerna laktos, vitamin och temperatur, samt varje försöks tillhörande resultat från OD₆₀₀-mätningar vid 72 timmar.

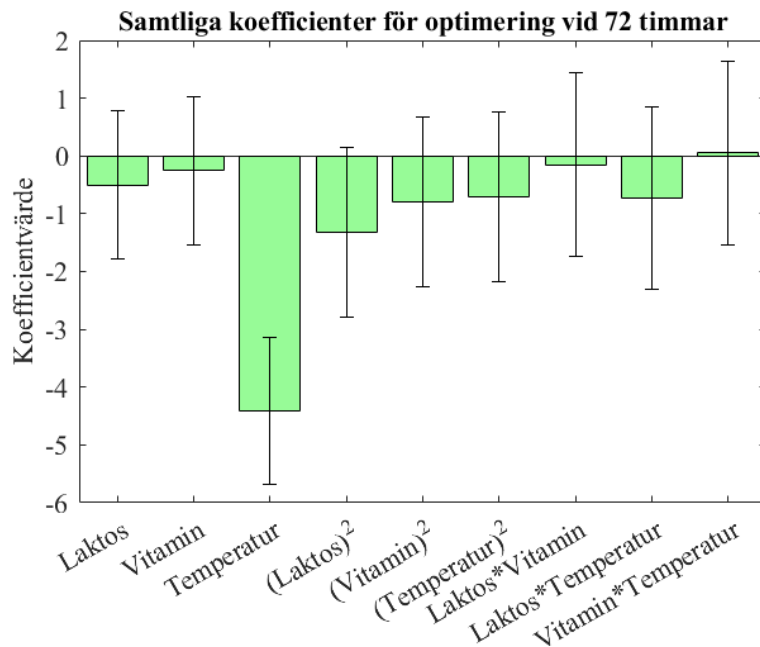
Försök	Laktos	Vitamin	Temperatur	OD ₆₀₀ 72 timmar
1	-1	-1	-1	19,3
2	1	-1	-1	20,4
3	-1	1	-1	19,2
4	1	1	-1	18,8
5	-1	-1	1	10,1
6	1	-1	1	7,4
7	-1	1	1	9,3
8	1	1	1	6,9
9	-1,47	0	0	14,9
10	1,47	0	0	13,7
11	0	-1,47	0	15,5
12	0	1,47	0	15,4
13	0	0	-1,47	19,2
14	0	0	1,47	12,1
15	0	0	0	15,0
16	0	0	0	15,9
17	0	0	0	17,6
18	0	0	0	17,2
19	0	0	0	18,3

OD₆₀₀-värdena från mätningen vid 72 timmar visas även i figur 4.4, där de plottats mot försöksnummer. I figuren är punkterna färgkodade efter odlingstemperatur. Det kan utläsas ur figuren att punkterna följer ett mönster baserat på temperatur och att en lägre temperatur verkar påverka jästbiomassatitern positivt. Genom att studera försök 15-19 i figuren, som alla hade samma mediumkomposition och växte vid samma temperatur, syns det tydligt att faktorerna som varierats i experimentet hade en högre inverkan på jästbiomassatiter än variationen som förekommer naturligt bland odlingarna.



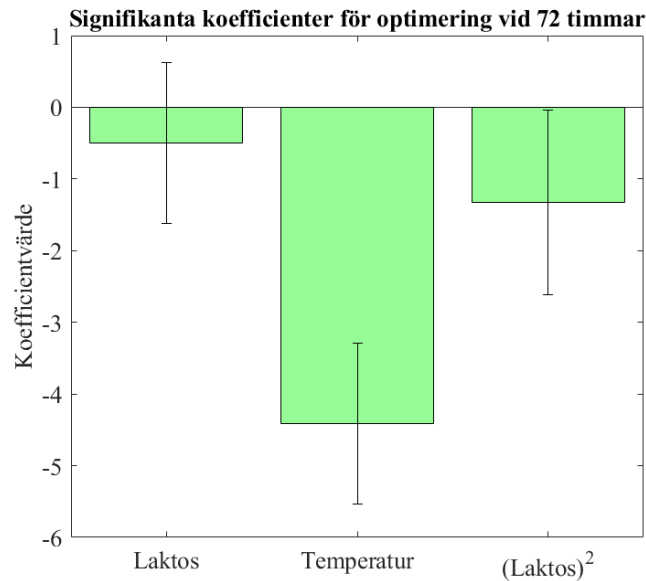
Figur 4.4: Resultat från optimeringsexperimentet, där OD₆₀₀ plottats mot försöksnummer. Punkterna är färgade efter temperatur och centerpunkterna särskiljs av annan form.

Likt tidigare bearbetades resultatet i MODDE genom att OD₆₀₀ från mätningen vid 72 timmar matades in som responsvariabel. En initial modell erhöles som resultat, där endast temperatur visade sig vara signifikant, se figur 4.5.



Figur 4.5: Koefficientvärden för modelltermerna framtagna för mätvärden av OD₆₀₀ vid 72 timmar, vilken visar faktorer och interaktioners effekt på jästbiomassatiter. Felstaplar visar konfidensintervallet för respektive koefficient.

En modell togs därefter fram där koefficienterna för de insignifikanta modelltermerna plockats bort i turordning. I den nya modellen var de enda signifikanta termerna temperatur och (laktos)², se figur 4.6. Dock behölls laktos i modellen, trots att den inte visades ha någon signifikant effekt på jästbiomassan. Anledningen var att MODDE inte tillät borttagningen av faktorn laktos om effekten av (laktos)² önskades behållas i modellen, eftersom det stred mot hierarkiprincipen att ha kvar en kvadratisk effekt i modellen utan första ordningens effekt.



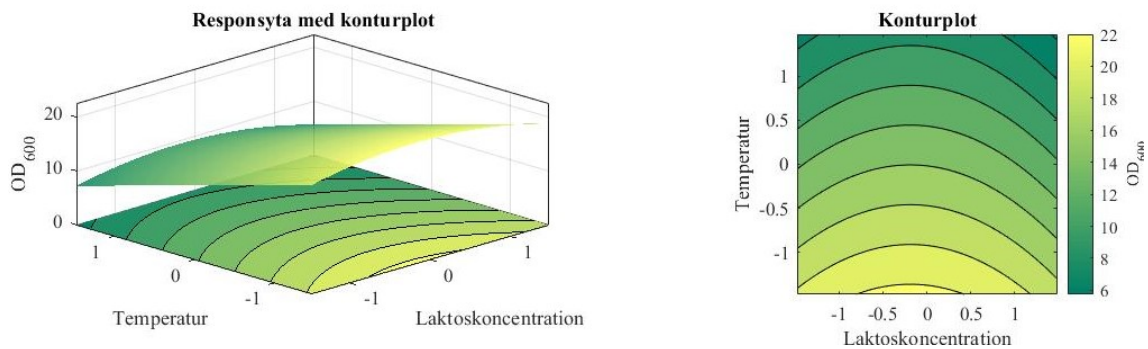
Figur 4.6: Koefficientvärden för modelltermerna baserade på mätvärden av OD₆₀₀ vid 72 timmar, där ickesignifikanta modelltermer exkluderats. Felstaplar visar konfidensintervallet för respektive koefficient.

Den slutgiltiga modellen beskrivs av ekvation 4.3.

$$y = 15,92 - 0,5 * L - 4,42 * T - 1,32 * L^2 \quad (4.3)$$

där y är jästbiomassa, L är laktos och T är temperatur. Koefficienterna i modellen är beräknade för de kodade nivåerna på modelltermerna. Modellen har R²-värdet 0,836 samt Q²-värdet 0,710, se tabell E.3 i bilaga E för modellens ANOVA-tabell.

Den framtagna modellen visas även grafiskt till vänster i figur 4.7. Där är responsvariabeln OD₆₀₀ plottad som en responsyta mot laktos och temperatur. Till höger i figur 4.7 visas också en konturplot där temperaturen och laktoskoncentrationen ingår. Utifrån responsytan går det att se att den maximala jästbiomassatitern förutspådd av modellen fås vid en låg temperatur och en laktoskoncentration kring centerpunkten. I samma graf går det även att se att modellens förutspådda maximum på OD₆₀₀ var ett värde kring 22.



Figur 4.7: Responsyta med konturplot, samt fristående konturplot. OD_{600} är färgkodat, från grönt till gult, vilket representerar högt respektive lågt värde på OD_{600} .

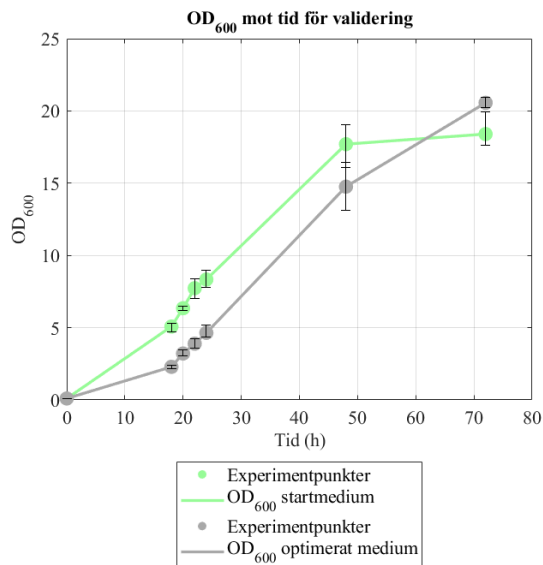
4.3 Validering av modellen

Modellen som togs fram vid optimeringen utvärderades vidare i ett valideringsexperiment. I experimentet testades den mediumkomposition som enligt modellen från optimeringen förutspåddes ge den maximala för jästbiomassatitern. För att kunna göra en jämförelse mellan startmedium och optimerat medium utfördes en ytterligare odling i förhållanden motsvarande centerpunkten från screeningexperimentet, eftersom titer ej uppmättes vid 72 timmar under screeningen. Innehållet i de två mediekompositionerna hittas i tabell 3.3.

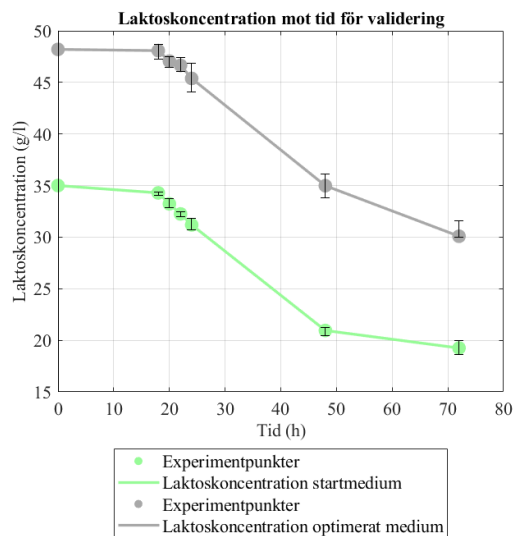
Resultaten från valideringsexperimentet visade att det optimerade mediet gav en signifikant ökning av jästbiomassatiter efter 72 timmar, vilket styrktes med ett t-test (95 %). Ett medelvärde för slutgiltigt OD_{600} beräknades till 20,6 för det optimerade mediet och 18,4 för startmediet. Skillnaden motsvarar en ökning på cirka 12 % för det optimerade mediet. Resultaten från samtliga OD_{600} - och HPLC-mätningar presenteras i tabell G.1 respektive G.2 i bilaga G.

Vidare visade resultaten att tillväxten av jästcellerna i startmediet initialt sett var snabbare än den hos cellerna i det optimerade odlingsmediet, vilket kan ses i tillväxtkurvorna i figur 4.8. Däremot planade startmediets tillväxtkurva av inom 72 timmar. Tillväxten för det optimerade mediet planade inte av på samma sätt, vilket tyder på att cellerna fortfarande var i växande tillstånd då experimentet avslutades.

I figur 4.9, där laktoskoncentrationen plottats mot tiden, syns det att det optimerade mediet, vilken startade på en koncentration av 48,2 g/l, minskade till 26,0 g/l. Startmediet började istället vid koncentrationen 35 g/l och slutade på 14,2 g/l. I figuren avtar de två kurvorna ungefär lika fort mellan flertalet tidpunkter. Likt fallet med tillväxtkurvorna planar endast kurvan för startmediet av, vilket tyder på att jästcellernas laktoskonsumtion avstannat i det fallet.



Figur 4.8: Uppmätta OD₆₀₀-värden plottade mot tiden för de två testade medierna, där grön kurva är startmediet och grå kurva är det optimerade mediet. Felstapeln visar spridningen kring medelvärdet.



Figur 4.9: Laktoskoncentrationen i de två medierna plottad mot tiden, där grön kurva är startmediet och grå kurva är det optimerade mediet. Felstapeln visar spridningen kring medelvärdet.

Avslutningsvis beräknades utbytet för de båda odlingarna, både som OD₆₀₀ per gram förbrukad och per gram tillsatt laktos. Utbytet av OD₆₀₀ per gram förbrukad laktos var 29,5 för startmediet och 27,8 för det optimerade mediet. På samma sätt var utbytet av OD₆₀₀ per tillsatt mängd laktos 21,0 för startmediet och 17,1 för det optimerade mediet. Vidare beräknades även den specifika tillväxthastigheten, μ , för de båda odlingarna, vilket resulterade i $0,08 \text{ h}^{-1}$ för startmediet och $0,12 \text{ h}^{-1}$ för det optimerade mediet.

5 Diskussion

Projektet lyfter att mikrobiell omvandling av vassle har ett potentiellt stort användningsområde men kräver mikroorganismer som kan metabolisera laktos, istället för de vanligare glukosväxande organismerna. *C. intermedia*, som är en relativt outforskad jästart, har i tidigare studier visat sig kunna växa på laktos. Syntetiskt vasslemedium används i det här projektet med syftet att optimera odlingsförhållanden för *C. intermedia*, med målet att maximera biomassatiter. Projektet görs dels för att ge en djupare förståelse av *C. intermedia* och dess tillväxtparametrar, dels för att ge en grund till framtida utveckling för att odla *C. intermedia* industriellt på naturligt vassle.

5.1 Resultatbaserad diskussion

Den huvudsakliga metoden använd i projektet var att med hjälp av experimentellt designade försök utföra satsvisa odlingar av *C. intermedia* i skakflaskor. Jästbiomassa- och laktoskoncentrationen bestämdes via OD₆₀₀- respektive HPLC-mätningar. Re-

sultatet visar att de två faktorer som har störst påverkan på jästbiomassatitern är laktoskoncentration och temperatur, enligt modellen i ekvation 4.3. En validering genomfördes slutligen, där det optimerade mediet jämfördes mot en ursprunglig mediumkomposition. Tillväxtkurvor och grafer över laktosförbrukningen baseras på de erhållna mätvärdena från valideringsexperimentet, se figur 4.8 samt 4.9. Genom en analys av kurvorna identifieras troligen både lagfas och stationär fas; resonemang kring faktorernas potentiella påverkan på tillväxtfaserna följer närmast.

Figur 4.8 visar att jästcellerna växer snabbare initialt i startmediet i jämförelse med det optimerade mediet, vilket tyder på att jästcellerna i startmediet har en kortare lagfas. En förklaring till skillnaden i den initiala tillväxten skulle kunna vara att cellerna växer vid en högre temperatur i startmediet, eftersom en högre temperatur får enzymatiska reaktioner att ske snabbare (18). Skillnaden skulle även kunna förklaras av att jästcellerna upplever en högre osmotisk stress i det optimerade mediet. Jästcellerna utsätts för en större skillnad i sockerkoncentration i det optimerade mediet än cellerna i startmediet vid inokulering, då koncentrationen var 48,2 respektive 35,0 g/l, i jämförelse med 20,0 g/l i förkulturen. Differensen i den initiala tillväxten skulle kunna vara resultatet av både osmotisk stress och temperaturskillnad, men inga slutsatser kan dras utifrån erhållna resultat.

Vidare går det att se att den slutgiltiga jästbiomassatitern är högre i det optimerade mediet och till skillnad från startmediet ser tillväxten inte ut att avstanna inom 72 timmar, se figur 4.8. Således hade skillnaden mellan det optimerade mediet och startmediet troligen varit ännu större om odlingen hade fortsatt längre än 72 timmar. Det är möjligt att tillväxten avstannar på grund av att någon komponent i mediet är begränsande. I startmediet avtar tillväxten trots att det finns 15 g/l laktos kvar, se figur 4.9, vilket tyder på att laktos inte är begränsande för tillväxten. Däremot skulle kväve kunna vara den begränsande komponenten. Vid högre temperaturer förbrukas kväve snabbare i jämförelse med vid lägre temperaturer, vilket kan leda till kvävebrist (25). Långsammare kväveförbrukning skulle kunna förklara det faktum att det optimerade mediet, som växer vid en lägre temperatur, ser ut att växa även efter 72 timmar. Dock innehåller startmediet 30 % mer kväve än det optimerade mediet; att kvävet tagit slut i startmediet under samma tidsintervall kan därav ifrågasättas. Utifrån resultaten från screeningen kan inga interaktioner mellan kväve och temperatur påvisas, eftersom den använda experimentdesignen inte kan påvisa interaktionseffekter. Då förbrukning av kväve samt andra komponenter inte undersöks går det dock inte att dra några slutsatser kring huruvida de är begränsande för tillväxt.

I en tidigare studie odlades *C. intermedia* i ett syntetiskt vasslemedium i syfte att optimera tillväxthastighet och laktosförbrukning, vilket skedde genom utvärdering av olika faktorerens signifikans (12). Även där var de två signifikanta faktorerna laktoskoncentration och temperatur, med optimala värden på 18,4 g/l laktos och 32,4 °C. Värdena för temperatur och laktos skiljer sig markant från de erhållna värdena i vårt projekt, vilket skulle kunna förklaras med att projekten optimerat med olika syften och använt olika stammar av *C. intermedia*. Till följd av att både temperatur och laktoskoncentration är signifikanta faktorer i båda studierna är de förmodligen viktiga faktorer vid odling av *C. intermedia* i syntetiskt vasslemedium.

Efter screeningen visade sig nivåerna för de övriga faktorerna, utöver temperatur, laktos- och vitaminkoncentration, vara insignifikanta för tillväxt. Resultatet innebär däremot inte att komponenterna kan uteslutas ur mediet, utan endast att de inom det valda intervallet inte har någon betydelse för tillväxten av jästbiomassa. Huruvida det är trovärdigt att alla faktorer utom temperatur, laktos- och vitaminkoncentration är insignifikanta kan dock diskuteras. Delvis medför användningen av jästextrakt att mediet inte är helt definierat, eftersom jästextrakt innehåller bland annat kväve och NaCl (26). Då resultatanalysen utgår från de kända nivåerna av kväve och NaCl, exklusive jästextrakt, finns det en risk att resultatet kan vara något missvisande. Å andra sidan är mängden jästextrakt relativt liten och därmed bör den ej ha någon större inverkan på resultatet. Vidare är kvävekällan signifikant vid 48 timmar i screeningexperimentet, men ej vid 24 timmar. Begränsningen på tre faktorer som fanns inför optimeringen gjorde att kvävekällan valdes bort eftersom den, till skillnad från de tre valda faktorerna, inte var signifikant vid båda tidpunkterna. Att kväve ansågs vara en insignifikant faktor redan efter screeningen kan ha gett en missvisande bild om dess påverkan. Risken finns exempelvis att kväve ej var signifikant vid 24 timmar på grund av eventuella felkällor. En jämförelse med en liknande studie, med resultatet att kvävekällan inte haft en signifikant påverkan på tillväxten (12), styrker dock möjligheten att kvävet är insignifikant.

5.2 Felkällor

Till att börja med har odlingstiden i experimenten blivit en oavsiktlig faktor under projektets gång. Initialt ansågs 48 timmar vara tillräckligt med tid för tillväxten av *C. intermedia*. Efter screeningen pekade resultaten däremot på att tillväxten fortsatte efter 48 timmar och odlingstiden förlängdes därmed till 72 timmar under optimeringen. Den ändrade odlingstiden medför att resultaten från screeningen är baserade på en annan tidpunkt och således ett annat stadie av tillväxten än för optimeringen och valideringen, där titer enbart baseras på OD₆₀₀ vid 72 timmar. De olika odlingstiderna är en felkälla eftersom tiden inte ansågs vara en av faktorerna under projektets gång. Till exempel visar valideringen att cellerna i det optimerade mediet når en högre slutgiltig titer efter 72 timmar. I figur 4.8 syns det däremot att den slutgiltiga titern hade blivit högst för startmediet om odlingen istället avslutats efter 48 timmar. Problemet hade kunnat åtgärdas genom att göra initiala odlingar och ta fram tillväxtkurvor, för att ta reda på hur länge jästcellerna växer. Därmed hade en rimlig odlingstid kunnat tas fram och använts för varje experiment.

Vidare är mätteknik, såsom pipettering och spädning, en trolig felkälla. Det skulle kunna medfört slumpmässiga eller systematiska fel vid mätningarna. Dessutom kan variationen av personer som gjort mätningar under projektets gång ha påverkat resultatet på samma sätt. För att minimera variation och gardera för felmätningar hade upprepning av varje försökspunkt eller hela experiment kunnat utföras. Under screeningen och optimeringen gjordes endast en OD₆₀₀-mätning för varje försökspunkt, då det annars hade blivit för många mätningar inom tidsramen. En förbättring gjordes under valideringen, där tre upprepningar av respektive försök utfördes.

5.3 Förbättringar och framtidsutsikter

Mikrobiell odling i skakflaskor medför vissa begränsningar och en möjlig förbättringspotential för projektet är att skala upp odlingarna och istället odla *C. intermedia* i bioreaktorer. Användning av bioreaktorer ger större möjligheter att kontrollera viktiga parametrar mer exakt. Syrehalten är ett exempel på en parameter som har stort inflytande på tillväxt (20) och som med en bioreaktor hade kunnat kontrolleras. Andra faktorer såsom CO₂-produktion och pH kan också kontrolleras med odling i bioreaktorer.

Syntetiska vasslemedia används i projektet, då det medför kontroll över samtliga komponenter i mediet. I det slutgiltiga, optimerade mediet är laktoskoncentrationen 48,2 g/l, vilket motsvarar cirka 5 torrviktsprocent och liknar halten i naturlig vassle, se avsnitt 2.1. I startmediet är laktoskoncentrationen 35,0 g/l, motsvarande 3,5 torrviktsprocent. Jästbiomassatitern från startmediet visar att *C. intermedia* växer ungefär lika bra vid den lägre laktoskoncentrationen. Resultatet tyder därmed på att *C. intermedia* skulle kunna växa på naturlig vassle, eftersom laktoshalten i naturlig vassle kan variera. Ett rimligt fortsatt steg i processen är att jämföra resterande mediumkomponenter för att i framtiden kunna odla *C. intermedia* på naturlig vassle.

Projektet ämnade, som tidigare nämnt, enbart att optimera den slutgiltiga jästbiomassatitern. Exempel på produkt som utvinns från jästbiomassa är single cell protein (SCP), en proteinkälla som kan komma att bli en viktig del av lösningen till en hållbar matproduktion (7). För att produktionen av SCP och andra produkter ska bli tillämpbar är det däremot viktigt att inte enbart optimera med avseende på titer. Det krävs en vidareutveckling av omvandling av vassle med *C. intermedia* för att göra det industriellt samt ekonomiskt gångbart. I framtiden är det viktigt att optimera även med avseende på produktivitet och utbyte för att förbättra processens lönsamhet.

Framöver är det även av intresse att undersöka andra möjliga produkter än jästbiomassa, såsom organiska syror och metaboliter som jästen kan producera. Det finns däremot en etisk problematik i att sträva efter att öka antalet värdefulla produkter som kan komma från en miljöskadlig industri. Om framtida studier, baserade på projektets resultat, visar att *C. intermedia* effektivt kan omvandla vassle till värdefulla produkter finns en risk att ökad ekonomisk vinst leder till ökad ostproduktion. Därmed är det möjligt att en ökad användning av vassle i sin tur driver på överlevnaden av mejeriindustrin, eller till och med leder till en ökning av den. Risken finns då att den positiva miljöpåverkan beskriven tidigare minskar eller nollställs på grund av att mjölkindustrin fortlever.

6 Slutsats

Det här projektet bidrar till en djupare förståelse av *C. intermedia* och dess optimala odlingsförhållanden. Laktos och temperatur är de viktigaste faktorerna för jästtillväxt. Experimentell design är ett effektivt sätt att uppnå projektets syfte – att maximera jästbiomassatiter. Genom att utföra ett fåtal experiment uppnåddes en ökning med 12 % med avseende på jästbiomassatiter. För att uppnå det långsiktiga målet, att effektivt omvandla vassle till mervärdesprodukter med *C. intermedia* industriellt, krävs vidare studier som undersöker odling på naturlig vassle samt andra möjliga mervärdesprodukter än jästbiomassa.

Referenser

- [1] Canellada F, Laca A, Laca A, Díaz M. Environmental impact of cheese production: A case study of a small-scale factory in southern Europe and global overview of carbon footprint. *Sci Total Environ.* 2018;635:167–77. doi: 10.1016/j.scitotenv.2018.04.045.
- [2] González-Siso MI. The biotechnological utilization of cheese whey: A review. *Bioresour Technol.* 1996;57(1). doi: 10.1016/0960-8524(96)00036-3.
- [3] Smithers GW. Whey-ing up the options – Yesterday, today and tomorrow. *Int Dairy J.* 2015;48. doi: 10.1016/j.idairyj.2015.01.011.
- [4] Ahmad T, Aadil RM, Ahmed H, Rahman UU, Soares BCV, Souza SLQ, et al. Treatment and utilization of dairy industrial waste: A review. *Trends Food Sci Technol.* 2019;88. doi: 10.1016/j.tifs.2019.04.003.
- [5] Keswani C. *Bioeconomy for sustainable development.* Singapore: Springer Nature Singapore; 2019. doi: 10.1007/978-981-13-9431-7.
- [6] Pescuma M, de Valdez GF, Mozzi F. Whey-derived valuable products obtained by microbial fermentation. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2015;99(15):6183–96. doi: 10.1007/s00253-015-6766-z.
- [7] Anupama, Ravindra P. Value-added food: Single cell protein. *Biotechnol Adv.* 2000;18(6):459–79. doi: 10.1016/S0734-9750(00)00045-8.
- [8] Choi HS, Yang X, Kim DS, Yang JH, Han SO, Park C, et al. Power generation from cheese whey using enzymatic fuel cell. *J Clean Prod.* 2020;254. doi: 10.1016/j.jclepro.2020.120181.
- [9] Viana da Silva AME, Bettencourt da Silva RJN, Camões MFGFC. Optimization of the determination of chemical oxygen demand in wastewaters. *Anal Chim Acta.* 2011;699(2). doi: 10.1016/j.aca.2011.05.026.
- [10] Yadav JSS, Bezawada J, Ajila CM, Yan S, Tyagi RD, Surampalli RY. Mixed culture of *Kluyveromyces marxianus* and *Candida krusei* for single-cell protein production and organic load removal from whey. *Bioresour Technol.* 2014;164:119–27. doi: 10.1016/j.biortech.2014.04.069.
- [11] Domingues L, Guimarães PMR, Oliveira C. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for lactose/whey fermentation. *Bioeng Bugs.* 2010;1(3). doi: 10.4161/bbug.1.3.10619.
- [12] Yönten V, Aktaş N. Exploring the optimum conditions for maximizing the microbial growth of *Candida intermedia* by response surface methodology. *Prep Biochem Biotechnol.* 2014;44(1):26–39. doi: 10.1080/10826068.2013.782044.
- [13] Nielsen J, Keasling JD. *Engineering Cellular Metabolism.* Cell. 2016;164(6):1185–97. doi: 10.1016/j.cell.2016.02.004.

- [14] Mamatha D. A Note on Microbial Fermentation. *J Microb Biochem Technol.* 2020;12(6).
- [15] Moreno AD, Tomás-Pejó E, Olsson L, Geijer C. *Candida intermedia* CBS 141442: A novel glucose/xylose co-fermenting isolate for lignocellulosic bioethanol production. *Energies.* 2020;13(20). doi: 10.3390/en13205363.
- [16] Broach JR. Nutritional Control of Growth and Development in Yeast. *Genetics.* 2012;192(1):73–105. doi: 10.1534/genetics.111.135731.
- [17] Prescott LM, Harley JP, Klein DA. *Microbiology.* 3:e uppl. Dubuque, IA: Wm.C. Brown Publishers; 1996.
- [18] Madigan MT, Bender KS, Buckley DH, Sattley WM, Stahl DA. *Brock Biology of Microorganisms.* 15:e uppl. London: Pearson; 2019.
- [19] Péter G, Rosa C, redaktörer. *Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts.* 3:e uppl. Dr Schreck S, redaktör. Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag; 2006. doi: 10.1007/3-540-30985-3_8.
- [20] Pérez-Torrado R, Gamero E, Gómez-Pastor R, Garre E, Aranda A, Matallana E. Yeast biomass, an optimised product with myriad applications in the food industry. *Trends Food Sci Technol.* 2015;46(2):167–75. doi: 10.1016/j.tifs.2015.10.008.
- [21] Alberts B, Johnson A, Lewis J, Morgan D, Raff M, Roberts K, et al. *Molecular Biology of the Cell.* 6:e uppl. New York City, NY: Garland Science; 2015.
- [22] Montgomery D. *Design and Analysis of Experiments.* 8:e uppl. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons; 2013.
- [23] Jones B, Nachtsheim CJ. A class of three-level designs for definitive screening in the presence of second-order effects. *J Qual Technol.* 2011;43(1):1–15. doi: 10.1080/00224065.2011.11917841.
- [24] Sartorius Stedim Data Analytics. *User Guide to MODDE [broschyr].* Umeå: Sartorius Stedim Data Analytics; 2017.
- [25] Beltran G, Rozès N, Mas A, Guillamón JM. Effect of low-temperature fermentation on yeast nitrogen metabolism. *World J Microbiol Biotechnol.* 2007;23(6). doi: 10.1007/s11274-006-9302-6.
- [26] Yukihiro Nakajo S, Hiroyuki Sano M, uppfinnare; Japan Tobacco Inc, patentinnehavare. Yeast extract composition, yeast for obtaining the same, and process for producing yeast extract composition. *Amerikanskt patent US 6,344,231 B1.* 2002-02-05.

A Delft medium, spårämneslösning, vitaminlösning,

Recepten på lösningarna erhöles från Industrial Biotechnology Division på Chalmers.

Delft medium användes till en del mediumkompositioner i det laborativa arbetet. I tabell A.1 listas innehållet i Delft medium.

Tabell A.1: Komposition av Delft medium.

Komposition Delft medium		
Kolkälla, glukos	20	[g]
Ammoniumsulfat, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	5	[g]
Kaliumdivätefosfat, KH_2PO_4	3,0	[g]
Magnesiumsulfat, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1,0	[g]
Spårämnen (1000 X)	1,0	[ml]
Vitamin (1000 X)	1,0	[ml]
Kaliumväteftalat, $\text{C}_8\text{H}_5\text{KO}_4$ (5 X)	200	[ml]
Justera pH till 5,0 med 2-5 M KOH		
Addera vatten (eller fyll upp till V_{total})	1000	[ml]

Vidare användes spårämneslösning som en stamlösning i projektet. Nedan i tabell A.2 presenteras innehållet i spårämneslösningen.

Tabell A.2: Komposition av spårämneslösning 1000 X (*autoklaverad separat*).

Spårämneslösning 1000 X (<i>autoklaverad separat</i>)		
EDTA	15	[g]
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	4,5	[g]
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,8	[g]
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,3	[g]
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,3	[g]
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,4	[g]
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	4,5	[g]
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	3,0	[g]
H_3BO_3	1,0	[g]
KI	0,1	[g]

En vitaminlösning nyttjades också som stamlösning i projektet. Nedan i tabell A.3 presenteras innehållet i vitaminlösningen.

Tabell A.3: Komposition av vitaminlösning 1000 X (*sterilfiltrerad separat*).

Vitaminlösning 1000 X (<i>sterilfiltrerad separat</i>)		
d-Biotin	0,05	[g]
Kalcium-D(+)-pantotenat	1,0	[g]
Nikotinsyra	1,0	[g]
<i>myo</i> -Inositol	25	[g]
Tiamin HCL	1,0	[g]
Pyridoxin HCL	1,0	[g]
<i>para</i> -aminobensoesyra	0,2	[g]

B Laborationsmanual - Screening

Den här laborationsmanualen täcker förberedelse av stamlösningar, det initiala experimentet för att avgöra om jästextrakt är nödvändigt att inkludera i mediet och screeningexperimentet enligt Definitive screening design.

B.1 Förberedelser av stamlösningar

Tabell B.1 nedan ger överblick över stamlösningens koncentrationer samt totalvolym som behövs för den initiala screeningen av jästextrakt och screeningexperimentet.

Tabell B.1: Koncentrationer och volymer av stamlösningar som ska förberedas och steriliseras enligt listad metod.

Komponent	Stamlösningens koncentrationer	Volymer som behövs (ml)	Volym att bereda (ml)	Metod för sterilisering
Laktos	125 (g/l)	141	200	Filtrering
(NH ₄) ₂ SO ₄	100 (g/l)	65,7	200	Autoklivering
KH ₂ PO ₄	125 (g/l)	36,4	200	Autoklivering
Spårämneslösning*	20,0 X	81,6	100	Autoklivering
Vitaminlösning*	20,0 X	81,6	100	Filtrering
NaCl	15,0 (g/l)	10,1	100	Autoklivering
MgSO ₄	10,0 (g/l)	10,1	100	Autoklivering
Jästextrakt	25,0 (g/l)	83,0	150	Autoklivering
Delft medium**	2,00 X	500	550	Autoklivering
Glukos	200 (g/l)	100	150	Filtrering
mQ-vatten	-	-	1000	Autoklivering

*Spårämneslösningen och vitaminlösningen (1000 X) ska sedan tidigare vara steriliserade. Vid blandning med autokliverat mQ-vatten för spädning till 20 X är inte ytterligare sterilisering nödvändig.

**Kontrollera att stamlösning har steriliserats.

Vid beredning av stamlösningarna, följ angiven procedur vad gäller uppvägning av massa till vikten given i tabell B.2. Lägg den uppvägd massan i en värmetålig kolv av lämplig storlek. Fyll därefter upp med mQ-vatten till respektive volym presenterad i tabell B.2.

Tabell B.2: Mängd av kemikalierna samt mQ-vatten för beredning av stamlösningar, vilka ska uppnå koncentrationerna givna i tabell B.1. Kemikaliernas förvaringsplats är även listad.

Komponent	Massa (g)	Volym mQ-vatten (ml)	Förvaringsplats av kemikalie
Laktos	25,0	200	6145 Balansrum 2, skåp 08 socker A-M.
(NH ₄) ₂ SO ₄	20,0	200	6145 Balansrum 2, skåp 01 A-B.
KH ₂ PO ₄	25,0	200	6145 Balansrum 2, skåp 05 P-R.
NaCl	1,50	100	6145 Balansrum 2, skåp 06 S.
MgSO ₄	1,00	100	6145 Balansrum 2, skåp 04 M-O.
Jästextrakt	3,75	150	6145 Balansrum 2.
Glukos	30,0	150	6145 Balansrum 2.

Då originalstamlösningarna för spårämneslösning och vitaminlösning är 1000X behöver dessa spädas till 20X, som är koncentrationen av stamlösning som används här. Notera att originalstamlösningarna redan steriliserats, därav ska även steriliserat mQ-vattnet användas vid spädningen. Denna spädning korresponderar till en spädning om 50 gånger; ta således 2 ml av originalstamlösningen 1000X och späd med autoklaverat mQ-vatten upp till 100 ml. Spädningen ska göras för spårämneslösningen respektive vitaminlösningen.

När alla stamlösningar är gjorda och etiketterade ska dessa steriliseras enligt listad metod i tabell B.1.

B.2 Initialt experiment kring inkludering av jästextrakt

Förbered tre media i ett laminärflödesdragskåp enligt tabell B.3 i 100 ml E-kolvar (vidare refererade till som flaskor) med gasgenomsläppande propp. Etikettera flaskorna med 1, 2 respektive 3, tillsammans med nödvändig information som datum, innehåll och namn. Tillsätt mQ-vatten till varje flaska tills en totalvolym på 26 ml uppnåtts. Notera att 1 ml från varje volym kommer användas som blankprov vid OD₆₀₀-mätningar för respektive prov. Pipettera därefter 1 ml av varje färdigställd media till separata Eppendorfrör, etikettera och förvara kallt i kylskåp.

Tabell B.3: Volymerna av stamlösningar för varje komponent att addera vid förberedelse av media för experimenten 1-3. Totalvolymen av respektive media 1-3 är 26 ml.

För-sök	Laktos (125 g/l) (ml)	(NH ₄) ₂ SO ₄ (100 g/l) (ml)	KH ₂ PO ₄ (125 g/l) (ml)	Spårämne (20,0 X) (ml)	Vitamin (20,0 X) (ml)	Nacl (15,0 g/l) (ml)	MgSO ₄ (10,0 g/l) (ml)	Jästex- trakt (25,0 g/l) (ml)	mQ- vatten (ml)
1	7,30	3,40	1,87	1,63	1,63	0,520	0,520	0,000	9,13
2	7,30	3,40	1,87	1,63	1,63	0,520	0,520	1,04	8,90
3	7,30	3,40	1,87	1,63	1,63	0,520	0,520	2,08	7,50

Under sterila förhållanden, pipettera 1 ml av media 1 till ett Eppendorfrör. Använd därefter en inokuleringsögla för att skrapa av en koloni från en agarplatta utstrykt med *C. intermedia* och placera kolonin i Eppendorfröret. Vortexa tuben i några sekunder tills cellklumpen är upplöst. Addera därefter 1 ml av mediet med celler tillbaka till den större volymen av mediet 1. Återupprepa samma procedur för 2 och 3. Inkubera därefter flaskorna vid 30 °C och 180 rpm approximativt 24 timmar.

Avlägsna flaskorna från inkubatorn efter 24 h för OD₆₀₀-mätningar. Se till att kulturen är väl omblandad och att cellerna inte sjunkit ner till botten innan provtagningen utförs. Pipettera 1 ml direkt i en kyvett, eller om spädning krävs först i ett Eppendorfrör.

För blankproverna, överför den tidigare avsatta volymen för respektive media (1 ml) till kyvetter. Mät OD₆₀₀ för blankproven mot dess tillhörande prov. Om mätvärdet för OD₆₀₀ överstiger 0,4 måste provet spädas vidare tills att ett OD₆₀₀ inom det linjära intervallet (0,1-0,4) uppnås. Beräkna vad det ursprungliga OD₆₀₀ var innan spädning och notera resultatet.

B.3 Förkultur

Förbered förkultur dagen innan inokuleringen av media i screeningexperimentet är planerad. Förkulturerna ska odlas på Delft medium med glukos som kolkälla samt adderat jästextrakt. Tillred först 1000 ml förkulturmedium genom att tillsätta volymer av de steriliserade stamlösningarna till en flaska med skruvlock enligt tabell B.4.

Tabell B.4: Volymer av varje komponent att addera vid förberedelse av startkulturmediet, samt slutkoncentrationen av respektive komponent.

Komponent	Volym stamlösning (ml)	Slutkoncentration
Delft medium salter (20,0X)	500	1,00 X
Glukos (200 g/l)	100	20,0 g/l
Spårämne (20,0 X)	50,0	1,00 X
Vitamin (20,0 X)	50,0	1,00 X
Jästextrakt (25,0 g/l)	40,0	1,00 g/l
mQ-vatten*	260	-
Totalvolym	1000	-

*Steriliserad i förhand.

Tillsätt 50 ml vardera av det förberedda förkulturmediet till två steriliserade flaskor. Förvara återstående mängd av Delft medium i kylskåp, för vidare användning i senare experiment. Notera att en viss mängd också kommer att behövas till blankprover senare vid OD₆₀₀-mätningarna.

Pipettera därefter 1 ml av mediet från en av flaskorna till ett Eppendorfrör. Använd en steril inokuleringsögla för att skrapa av en koloni med *C. intermedia* från en agarplatta och placera kolonin i Eppendorfröret. Vortexa i några sekunder tills cellklumpen är upplöst. Addera därefter 1 ml av mediet med celler tillbaka till flaskan. Återupprepa samma procedur för en andra koloni. Märk flaskorna exempelvis "Koloni 1" respektive "Koloni 2".

Förslut de två flaskorna med gasgenomsläppande propp. Inkubera flaskorna i en skakande inkubator inställd på 30 °C och 180 rpm i approximativt 24 timmar. Mät OD₆₀₀ för båda förkulturerna, om båda tillväxt välj en och använd den för inokulering av alla försöksflaskor i screeningexperimentet.

B.4 Screeningexperimentet

Screeningexperimentet består av 17 försök, vilka i denna sektion är namngivna 1 till 17. Alla försök är unika, förutom 15, 16 och 17 som är upprepade centerpunktsförsök med alla faktorer vid nollnivån. Alla momenten utförs i laminärflödesdragskåp förutom inkuberingen.

Den experimentella planen, framtagen i MODDE, presenteras i tabell B.5. I tabellen används de kodade faktornivåerna. Ingen randomiserad körordning har listats eftersom alla försök förbereds och körs mer eller mindre samtidigt. I tabell B.6 är de naturliga nivåerna listade för faktorerna ihop med den beräknade mängden stamlösning som krävs för att uppnå de indikerade nivåerna. Notera att även MgSO₄ och

jästextrakt ingår i media men inte är varierade faktorer utan hålls på en konstant nivå och är därför inte listade i försöksuppställningen (tabell B.5).

Tabell B.5: Försöksuppställning med kodade nivåer framtagen för screeningförsöket av MODDE enligt Definitve Screening Design.

Försök	Laktos	(NH ₄) ₂ SO ₄	KH ₂ PO ₄	Spårämne	Vitamin	NaCl	Temperatur
1	0	1	-1	1	-1	1	-1
2	0	-1	1	-1	1	-1	1
3	-1	0	1	-1	1	1	-1
4	1	0	-1	1	-1	-1	1
5	1	-1	0	1	1	1	1
6	-1	1	0	-1	-1	-1	-1
7	1	-1	-1	0	1	-1	-1
8	-1	1	1	0	-1	1	1
9	-1	-1	1	1	0	-1	-1
10	1	1	-1	-1	0	1	1
11	-1	1	-1	1	1	0	1
12	1	-1	1	-1	-1	0	-1
13	1	1	1	1	1	-1	0
14	-1	-1	-1	-1	-1	1	0
15	0	0	0	0	0	0	0
16	0	0	0	0	0	0	0
17	0	0	0	0	0	0	0

Tabell B.6: Volymerna att addera av komponenterna motsvarande de kodade nivåerna, tillsammans med de naturliga nivåerna för varje komponent (koncentration av komponent i färdigt medium).

Komponent	Volym stamlösning (ml)			Koncentration i medium			Enhet
	-1	0	1	-1	0	1	
Laktos	3,00	7,00	11,0	15,0	35,0	55,0	g/l
(NH ₄) ₂ SO ₄	2,50	3,25	4,00	10,0	13,0	16,0	g/l
KH ₂ PO ₄	1,40	1,80	2,20	7,00	9,00	11,0	g/l
Spårämne	0,625	1,56	2,50	0,50	1,25	2,00	X
Vitamin	0,625	1,56	2,50	0,500	1,25	2,00	X
NaCl	0,000	0,500	1,00	0,000	0,300	0,600	g/l
MgSO ₄	0,500			0,200			g/l
Jästextrakt	1,00			1,00			g/l

B.4.1 Tillredning av medium till screeningförsök 1-17

Börja med att märka 17 stycken 100 ml E-kolvar (vidare refererat till som flaskor) från 1 till 17 samt tillägg nödvändig information som datum, innehåll och namn. Tillred därefter medium till försök 1-14 enligt tabell B.7, där volymen stamlösning av komponenterna som behöver adderas till varje försöksflaska är listad.

Tabell B.7: Volymerna som ska tas från stamlösningarna till skakflaskor på 100 ml. Se till att den slutgiltiga totalvolymen är 25 ml för respektive flaska.

Försök	Laktos (125 g/l) (ml)	(NH ₄) ₂ SO ₄ (100 g/l) (ml)	KH ₂ PO ₄ (125 g/l) (ml)	Spårämne (20,0 X) (ml)	Vitamin (20,0 X) (ml)	NaCl (15,0 g/l) (ml)	MgSO ₄ (10,0 g/l) (ml)	Jästextrakt (25,0 g/l) (ml)	mQ-vatten (ml)
1	7,00	4,00	1,40	2,50	0,625	1,00	0,500	1,00	6,98
2	7,00	2,50	2,20	0,625	2,50	0,000	0,500	1,00	8,68
3	3,00	3,25	2,20	0,625	2,50	1,00	0,500	1,00	10,9
4	11,0	3,25	1,40	2,50	0,625	0,000	0,500	1,00	4,73
5	11,0	2,50	1,80	2,50	2,50	1,00	0,500	1,00	2,20
6	3,00	4,00	1,80	0,625	0,625	0,000	0,5	1,00	13,5
7	11,0	2,50	1,40	1,56	2,50	0,000	0,500	1,00	4,54
8	3,00	4,00	2,20	1,56	0,625	1,00	0,500	1,00	11,1
9	3,00	2,50	2,20	2,50	1,56	0,000	0,500	1,00	11,7
10	11,0	4,00	1,40	0,625	1,56	1,00	0,500	1,00	3,91
11	3,00	4,00	1,40	2,50	2,50	0,500	0,500	1,00	9,60
12	11,0	2,50	2,20	0,625	0,625	0,500	0,500	1,00	6,05
13	11,0	4,00	2,20	2,50	2,50	0,000	0,500	1,00	1,30
14	3,00	2,50	1,40	0,625	0,625	1,00	0,500	1,00	14,4

För försök 15-17, som har samma mediumkomposition, förbered 80 ml av mediet i en flaska genom att addera mängderna presenterade i tabell B.8. Överför sedan 25 ml vardera till flaska 15-17. Spara de 5 ml som återstår av mediet i kylskåp för senare användning som blankprover vid OD₆₀₀-mätningar.

Tabell B.8: Volymerna av stamlösningar för varje komponent att addera vid gemensam förberedelse av medium till försök 15-17. Totalvolymen kommer bli 80 ml.

Komponent	Volym (ml)
Laktos (125 g/l)	22,4
(NH ₄) ₂ SO ₄ (100 g/l)	10,4
KH ₂ PO ₄ (125 g/l)	5,76
Spårämne (20,0 X)	5,00
Vitamin (20,0 X)	5,00
NaCl (15,0 g/l)	1,60
MgSO ₄ (10,0 g/l)	1,60
Jästextrakt (25,0 g/l)	3,20
mQ-vatten	25,0

B.4.2 Inokulation

Mät OD₆₀₀ på förkulturen som förberetts dagen innan för att avgöra volymen förkultur som media i flaska 1-17 ska inokuleras med. Se till att kulturen är väl omblandad före pipettering av 1 ml från förkulturen till kyvett, eller till Eppendorfrör om spädning krävs. För blankproverna, pipettera 1 ml av mediet som användes till förkulturen, vilket förvarats i kylskåp. Mät först OD₆₀₀ på blankprovet och sedan förkulturen. Om OD₆₀₀ överstiger 0,4 måste provet spädas vidare tills en OD₆₀₀-analys inom det linjära intervallet 0,1-0,4) uppnås.

Beräkna volymen av celllösning som krävs vid inokulering för att uppnå en slutgiltig OD₆₀₀ av 0,1 i flaskorna 1-17 som innehåller 25 ml medium. Tillsätt den beräknade mängd till alla 17 flaskor och förslut med gasgenomsläppande propp.

Dela upp försöken i tre grupper enligt vilken temperatur som flaskorna ska inkuberas i, se tabell B.9. Se till att alla flaskor är väl förslutna och transportera de sedan till rätt inkubator och ställ in 180 rpm. Kom ihåg att kolla om inkubatorerna behöver förvärmas innan användning.

Tabell B.9: Försök uppdelade enligt temperatur.

Försök	Temperatur	
	Kodad	Naturlig
1, 3, 6, 7, 9, 12	-1	25,0 °C
13, 14, 15, 16, 17	0	30,0 °C
2, 4, 5, 8, 10, 11	1	35,0 °C

B.4.3 Provtagning av jästbiomassakoncentration

Mät jästbiomassakoncentrationen i flaskorna 1-17 genom OD_{600} vid 24 timmar och 48 timmar efter inokulering. Förbered först blankprovet genom att pipettera 1 ml av mediet som användes till flaska 15-17 (5 ml rest förvarad i kylskåp) till en kyvett och mät sedan OD_{600} .

Kontrollera att vätskan i flaskorna är väl omblandad och att cellerna inte sjunkit till botten innan provtagning. Pipettera 1 ml från flaska 1-17 direkt i en kyvett, eller om spädning krävs först i ett Eppendorfrör. Om OD_{600} överstiger 0,4 späd tills det uppmätta OD_{600} ligger inom det linjära intervallet. Beräkna vad den ursprungliga OD_{600} var innan spädning och notera resultatet.

C Laborationsmanual - Optimering

C.1 Förberedelser av stamlösningar

Tabell B.1 nedan ger en överblick över stamlösningskoncentrationer samt totalvolymen som krävs för optimeringsexperimentet. Det bör finnas tillräckligt med stamlösningar förberedda sedan tidigare, kontrollera detta före start.

Tabell C.1: Koncentrationer och volymer av stamlösningar som ska förberedas och steriliseras enligt listad metod.

Komponent	Stamlösningskoncentrationer	Volymer som behövs (ml)	Metod för sterilisation
Laktos	125 (g/l)	190	Filtrering
(NH ₄) ₂ SO ₄	100 (g/l)	62,5	Autoklavering
KH ₂ PO ₄	125 (g/l)	35,0	Autoklavering
Spårämneslösning*	20,0 X	15,6	Autoklavering
Vitaminlösning*	20,0 X	59,4	Filtrering
MgSO ₄	10,0 (g/l)	12,5	Autoklavering
Jästextrakt	25,0 (g/l)	15,6	Autoklavering

*Spårämneslösningen och vitaminlösningen (1000X) ska sedan tidigare vara steriliserade. Vid blandning med autoklaverat mQ-vatten för spädning till 20X är inte ytterligare sterilisering nödvändig.

**Kontrollera att stamlösning har steriliserats.

C.2 Förkultur

Förbered förkultur dagen innan inokuleringen av försöksmedia i optimeringsexperimentet. Förkulturerna ska odlas på Delft medium med glukos som kolkälla samt adderat jästextrakt. Tillsätt 50 ml vardera av det förberedda förkulturmediet till två steriliserade flaskor.

Pipettera därefter 1 ml av mediet från en av flaskorna till ett Eppendorfrör. Använd en steril inokuleringsögla för att skrapa av en koloni med *C. intermedia* från en agarplatta och placera kolonin i Eppendorfröret. Vortexa i några sekunder tills cellklumpen är upplöst. Addera därefter 1 ml av mediet med celler tillbaka till flaskan. Återupprepa samma procedur för en andra koloni. Märk flaskorna exempelvis "Koloni 1" respektive "Koloni 2".

Förslut de två flaskorna med gasgenomsläppande propp. Inkubera flaskorna i en skakande inkubator inställd på 30 °C och 180 rpm i approximativt 24 timmar. Mät OD₆₀₀ för båda förkulturerna, om båda tillväxt välj en och använd den för inokulering av alla försöksflaskor i experimentet.

C.3 Optimeringsexperiment

I denna del är försöken namngivna 1 till 19. Alla försök är unika, förutom 15-19, som är upprepade centerpunktsförsök med alla faktorer vid nollnivån.

Försöksuppställningen för en CCO-design given av MODDE presenteras i tabell C.2. Ingen randomiserad körordning har listats eftersom alla experimenten förbereds och körs mer eller mindre samtidigt.

Tabell C.2: Faktorernas kodade nivåer för CCO-design framtagen av MODDE.

Försök	Laktos	Vitamin	Temperatur
1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1
3	-1	1	-1
4	1	1	-1
5	-1	-1	1
6	1	-1	1
7	-1	1	1
8	1	1	1
9	-1,47	0	0
10	1,47	0	0
11	0	-1,47	0
12	0	1,47	0
13	0	0	-1,47
14	0	0	1,47
15	0	0	0
16	0	0	0
17	0	0	0
18	0	0	0
19	0	0	0

I tabell C.3 är de naturliga nivåerna listade för faktorerna ihop med den beräknade volymen stamlösning som krävs för att uppnå de indikerade nivåerna. Endast laktos, vitaminlösning och temperaturen är varierade faktorer medan resterande mediekomponenter hålls på en konstant nivå bestämd med hjälp av resultatet av screeningen.

Tabell C.3: Volymerna att addera av komponenterna motsvarande de kodade nivåerna, tillsammans med de naturliga nivåerna för varje komponent (koncentration av komponent i färdigt medium).

Komponent	Volym stamlösning (ml)					Koncentration i medium					Enhet
	-1,47	-1	0	1	1,47	-1,47	-1	0	1	1,47	
Laktos	5,59	7,00	10,0	13,0	14,4	27,9	35,0	50,0	65,0	72,7	g/l
Vitamin	2,21	2,50	3,13	3,75	4,04	1,80	2,00	2,50	3,00	3,20	X
(NH ₄) ₂ SO ₄	2,50					10,0					g/l
KH ₂ PO ₄	1,40					7,00					g/l
Spårämne	0,625					0,500					X
MgSO ₄	0,500					0,200					g/l
Jästextrakt	1,00					1,00					g/l

C.3.1 Tillredning av medium till optimeringsförsök 1-19

Börja med att förbereda en blandning av de mediumkomponenter som hålls konstanta genom att addera volymerna, presenterade i tabell C.4, av varje stamlösning till en flaska. Totalvolymen kommer bli 141,25 ml.

Tabell C.4: Volymer av varje komponent för att göra blandning av komponenter med konstanta nivåer.

Komponent	Volym (ml)
(NH ₄) ₂ SO ₄ (100 g/l)	62,5
KH ₂ PO ₄ (125 g/l)	35,0
Spårämneslösning (20,0 X)	15,6
MgSO ₄ (10,0 g/l)	12,5
Jästextraktlösning (25,0 g/l)	15,6

Märk 19 stycken 100 ml flaskor (Erlenmeyerkolvar) från 1 till 19 samt tillägg nödvändig information som datum, innehåll och namn. Tillred försök 1-14 enligt tabell C.5, där volymen stamlösning som ska adderas för respektive komponent listas.

Tabell C.5: Volymer att tillsätta till respektive flaska.

Nr.	Laktos (125 g/l) (ml)	Vitaminlösning (ml)	Temperatur	Blandning med konstanta komponenter (ml)	Vatten att tillsätta (ml)
1	7,00	2,50	26,0	5,65	9,85
2	13,0	2,50	26,0	5,65	3,85
3	7,00	3,75	26,0	5,65	8,60
4	13,0	3,75	26,0	5,65	2,60
5	7,00	2,50	34,0	5,65	9,85
6	13,0	2,50	34,0	5,65	3,85
7	7,00	3,75	34,0	5,65	8,60
8	13,0	3,75	34,0	5,65	2,60
9	5,59	3,13	30,0	5,65	10,6
10	14,4	3,13	30,0	5,65	1,81
11	10,0	2,21	30,0	5,65	7,14
12	10,0	4,04	30,0	5,65	5,31
13	10,0	3,13	24,1	5,65	6,23
14	10,0	3,13	35,9	5,65	6,23

Förbered mediet för försök 15-19 gemensamt. Bered 130 ml genom att tillsätta volymer av stamlösningar listade i tabell C.6 och överför sedan 25 ml till vardera av flaskorna 15-19. Spara de 5 ml som återstår av mediet i kylskåp för senare användning som blankprover vid OD₆₀₀-mätningar.

Tabell C.6: Volymerna av stamlösningar för varje komponent att addera vid gemensam förberedelse av medium till försök 15-19. Totalvolym 130 ml.

Komponent	Volym (ml)
Laktos (125 g/l) (ml)	52,0
Vitaminlösning (20,0 X) (ml)	16,3
Blandning av komponenter på konstant nivåer (ml)	29,4
mQ-vatten (ml)	32,4

C.3.2 Inokulation

Mät OD_{600} på förkulturen som förberetts dagen innan för att avgöra volymen förkultur som medierna i flaska 1-19 ska inokuleras med. Se till att kulturen är väl omblandad före pipettering av 1 ml från förkulturen till kyvett, eller till Eppendorfrör om spädning krävs. För blankproverna, pipettera 1 ml av mediet som användes till förkulturen, vilket förvarats i kylskåp. Mät först OD_{600} på blankprovet och sedan förkulturen. Om OD_{600} överstiger 0,4 måste provet spädas vidare tills en OD_{600} -analys inom det linjära intervallet (0,1-0,4) uppnås.

Beräkna volymen av celllösning som krävs vid inokulering för att uppnå en slutgiltig OD_{600} av 0,1 i flaskorna 1-19 som innehåller 25 ml medium. Tillsätt den beräknade mängden till alla 19 flaskor och förslut med gasgenomsläppande propp.

Dela upp försöken i fem grupper enligt vilken temperatur som flaskorna ska inkuberas i, se tabell C.7. Inkubera sedan gruppvis med cirka 10 minuters mellanrum i inkubatorer inställda på 180 rpm. Kom ihåg att kolla om inkubatorerna behöver förvärmas innan användning.

Tabell C.7: Uppdelning av försök 1-19 enligt temperatur.

Försök	Temperatur	
	Kodad	Naturlig
13	-1,47	24,1 °C
1, 2, 3, 4	-1	26,0 °C
9, 10, 11, 12, 15, 16, 17, 18, 19	0	30,0 °C
5, 6, 7, 8	1	34,0 °C
14	1,47	35,9 °C

C.3.3 Provtagning av jästbiomassakoncentration

Mät jästbiomassakoncentrationen i flaskorna 1-19 genom OD_{600} vid 24, 48 och 72 timmar efter inokulering. Förbered först blankprovet genom att pipettera 1 ml av mediet som användes till flaska 15-19 (rest förvarad i kylskåp) till en kyvett och mät sedan OD_{600} .

Kontrollera att vätskan i flaskorna är väl omblandad och att cellerna inte sjunkit till botten innan provtagning. Pipettera 1 ml från flaskorna 1-19 direkt i en kyvett, eller om spädning krävs först i ett Eppendorfrör. Om OD_{600} överstiger 0,4 späd tills det uppmätta OD_{600} ligger inom det linjära intervallet (0,1-0,4). Beräkna vad det ursprungliga OD_{600} var innan spädning och notera resultatet.

D Laborationsmanual - Validering

D.1 Introduktion

Vid detta laborationstillfälle kommer aspekter som jästbiomassakoncentration, specifik tillväxthastighet och utbyte att testas för två olika tillväxtförhållanden. Jämförelsen av tillväxtförhållanden, som består av både mediumkomposition och inkubationstemperatur, är mellan startpunktsförhållandena baserade på information från litteratur och de från förgående experiment förutspådda optimala förhållandena för att maximera jästbiomassatitern.

De moment som ska utföras i valideringen sker genom samma procedurer som tidigare experiment, vilka beskrivs utförligt i appendix B. Här återges därför endast information om stamlösningar och mediumkompositionen i de två testade medierna, samt metod att följa för förberedelsen av de två media som testas i tre upprepade försök vardera.

D.2 Stamlösningar

I tabell D.1 anges vilka koncentrationer på stamlösningar som behövs under valideringsexperimentet. Stamlösningarna bereds på samma sätt som tidigare, se appendix B. I tabellen anges också totalvolymen som behövs av varje komponent för experimentet.

Tabell D.1: Koncentrationer och volymer av stamlösningar.

Komponent	Stamlösningsskoncentrationer	Volym som behövs (ml)	Metod för sterilisering
Laktos	125 (g/l)	53,3	Filtrering
(NH ₄) ₂ SO ₄	100 (g/l)	18,4	Autoklavering
KH ₂ PO ₄	125 (g/l)	10,2	Autoklavering
Spårämneslösning	20,0 X	7,00	Autoklavering
Vitaminlösning	20,0 X	12,1	Filtrering
NaCl	15 (g/l)	1,60	Autoklavering
MgSO ₄	10,0 (g/l)	3,20	Autoklavering
Jästextrakt	25,0 (g/l)	4,00	Autoklavering
mQ-vatten	-	50,2	Autoklavering

D.3 Mediekomposition

I tabell D.2 ges en överblick på de komponenter som ingår i de två medierna som testas. Tabellen anger också vilka koncentrationer som de olika komponenterna har i varje medium.

Tabell D.2: Koncentrationer av komponenter i startmediet och optimerat medium.

Komponent	Koncentration startmedium	Koncentration optimerat medium	Enhet
Laktos	35,0	48,2	g/l
(NH ₄) ₂ SO ₄	13,0	10,0	g/l
KH ₂ PO ₄	9,00	7,00	g/l
Spårämneslösning	1,25	0,500	X
Vitaminlösning	1,25	1,76	X
NaCl	0,300	0,000	g/l
MgSO ₄	0,200	0,200	g/l
Jästextrakt	1,00	1,00	g/l

D.4 Förberedelse av medium

1. Förbered startmediet och det optimerade mediet genom att addera de volymerna av stamlösningar som listas i tabell D.3.
2. Tillsätt 25 ml av startmediet till tre separata 100 ml flaskor märkta "S1", "S2" och "S3". Gör på samma sätt med det optimerade mediet, men märk flaskorna exempelvis "F1", "F2" och "F3" istället. Spara den återstående volymen av respektive medium till blankprover samt till HPLC-mätningen vid 0 timmar efter inokulering.
3. Inokulera flaskorna till ett startvärde på OD₆₀₀ av 0,1 med hjälp av förkultur förberedd dagen innan. Utför OD₆₀₀-mätningar för varje flaska för att försäkra att OD₆₀₀ verkligen har värdet 0,1.
4. Inkubera de tre flaskorna med startmedium vid 30,0 °C och de tre flaskorna med det optimerade mediet vid 24,1 °C.

Tabell D.3: Volymer av stamlösningar av mediekomponenter att addera för startmediet respektive det optimerade mediet.

Komponent stamlösning	Volym (ml) för startmediet	Volym (ml) för optimerat medium
Laktos (125 g/l)	22,4	30,9
(NH ₄) ₂ SO ₄ (100 g/l)	10,4	8,00
KH ₂ PO ₄ (125 g/l)	5,76	4,48
Spårämne (20,0 X)	5,00	2,00
Vitamin (20,0 X)	5,00	7,10
NaCl (15,0 g/l)	1,60	0,000
MgSO ₄ (10,0 g/l)	1,60	1,60
Jästextrakt (25,0 g/l)	2,00	2,00
mQ-vatten	26,2	24,0

D.5 Provtagning

Vid tidpunkterna 0, 18, 20, 22, 24, 48 samt 72 timmar efter inokulering, ta 1 ml prov från respektive flaska för OD₆₀₀-mätningar. Följ därefter samma procedur som

tidigare, se appendix B. För HPLC-mätningar, tag prover vid 0 timmar och 72 timmar efter inokulering. Kom ihåg att filtrera först om det är celler i mediet.

E ANOVA-tabeller

E.1 Screening

Följande förkortningar gäller samtliga ANOVA-tabeller. SS står för sum of squares, MS för mean square. F, P och SD står för F-statistika, P-värde respektive standardavvikelse. RSD innebär residual standardavvikelse.

Tabell E.1 utgör den ANOVA-tabell som togs fram vid analys av resultatet vid 24 timmar under screeningen.

Tabell E.1: ANOVA-tabell för modellen för responsvariabeln OD₆₀₀ vid 24 timmar från screeningen.

Jästbiomassa 24 timmar	Frihetsgrader	SS	MS (varians)	F	P	SD
Total	17	935	55,0			
Konstant	1	882	882			
Total korrigerad	16	52,6	3,29			1,81
Regression	5	48,0	9,61	23,0	0,000	3,10
Residual	11	4,59	0,417			0,646
Lack of fit	9	4,51	0,501	12,5	0,076	0,708
Pure error	2	0,089	0,040			0,200
	N=17	Q2=	0,771			
	DF=11	R2=	0,913	RSD=	0,646	
		R2 adj.=	0,873			

Tabell E.2 är ANOVA-tabellen för modellen anpassad efter resultatet vid 48 timmar från screeningen.

Tabell E.2: ANOVA-tabell screening 48 timmar.

Jästbiomassa 48 timmar	Frihetsgrader	SS	MS (varians)	F	P	SD
Total	17	3130	184			
Konstant	1	2940	2940			
Total korrigerad	16	185	11,6			3,40
Regression	4	171	42,7	35,3	0,000	6,54
Residual	12	14,5	1,21			1,10
Lack of fit	10	7,56	0,756	0,217	0,962	0,870
Pure error	2	6,96	3,48			1,87
	N=17	Q2=	0,864			
	DF=12	R2=	0,922	RSD=	1,1	
		R2 adj.=	0,896			

E.2 Optimering

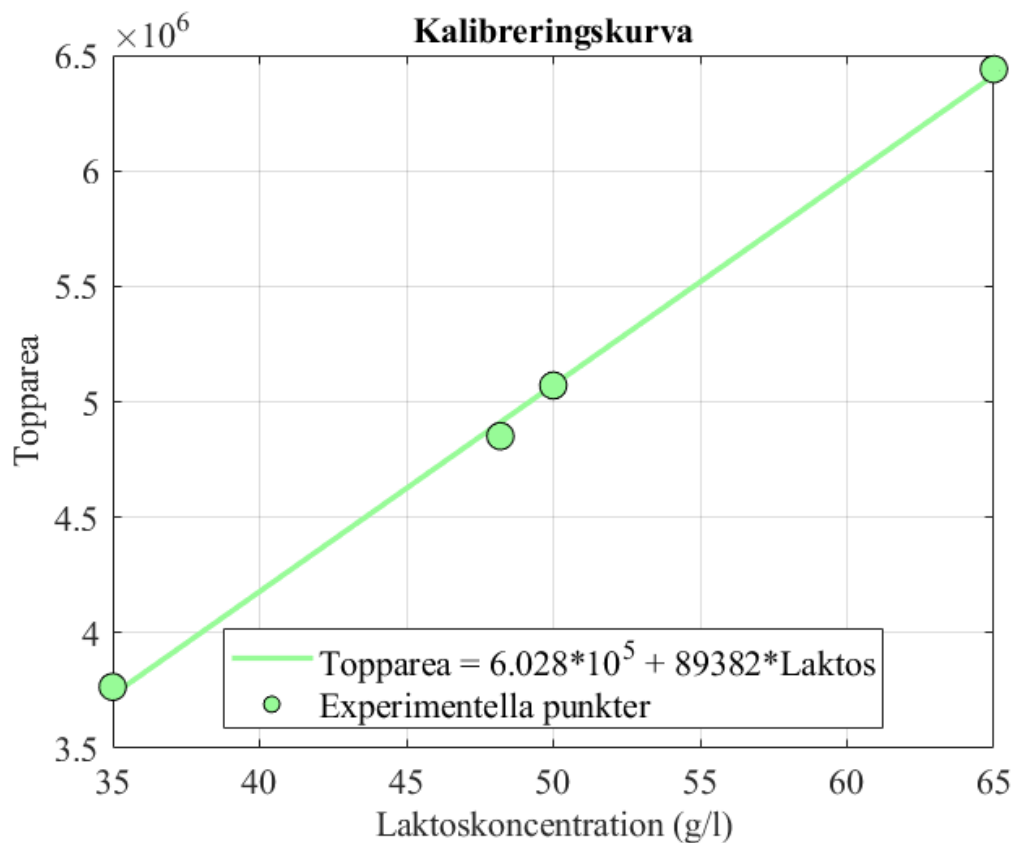
ANOVA-tabellen som togs fram vid analysen av modellen för responsvariabeln vid 72 timmar under optimeringsomgången visas nedan i tabell E.3

Tabell E.3: ANOVA-tabell optimering vid 72 timmar.

Jästbiomassa 72 timmar	Frihetsgrader	SS	MS (varians)	F	P	SD
Total	19	4620	243			
Konstant	1	4310	4310			
Total korrigerad	18	311	17,3			4,16
Regression	3	260	86,7	25,5	0,000	9,31
Residual	15	51,0	3,40			1,84
Lack of fit	11	43,9	3,99	2,25	0,226	1,10
Pure error	4	7,1	1,78			1,33
	N=19	Q2=	0,710			
	DF=15	R2=	0,836	RSD=	1,84	
		R2 adj.=	0,803			

F Kalibreringskurva

I figur F.1 nedan har topparean plottats mot kända laktoskoncentrationer från HPLC-mätningarna. En linjär regression utfördes och visas även i figuren, vilken hade ekvationen $y = 89382 * x + 6,028 * 10^5$, där y motsvarar topparean och x laktoskoncentrationen. Den linjära regressionen hade ett R^2 -värde på 0,9962. Grafen och ekvationen till den linjära regressionen användes vid beräkning av laktoskoncentration i supernatanten; resultatet av beräkningen finnes i avsnitt 4.3.



Figur F.1: Kalibreringskurva för beräkning av laktos, där topparean plottas på y-axeln mot känd laktoskoncentration på x-axeln.

G Validering

Nedan i tabell G.1 redovisas uppmätta OD₆₀₀-värden för samtliga prover från valideringsexperimentet.

Tabell G.1: Experimentellt erhållna OD₆₀₀-värden från valideringsförsöket.

Försök	OD ₆₀₀ 0 timmar	OD ₆₀₀ 18 timmar	OD ₆₀₀ 20 timmar	OD ₆₀₀ 22 timmar	OD ₆₀₀ 24 timmar	OD ₆₀₀ 48 timmar	OD ₆₀₀ 72 timmar
S1	0,1	5,3	6,4	7	7,8	16,1	17,6
S2	0,1	5,2	6,2	7,8	8,2	18,0	19,9
S3	0,1	4,7	6,5	8,4	9,0	19,0	17,7
F1	0,1	2,2	3,1	3,6	4,4	13,1	20,2
F2	0,1	2,4	3,0	3,8	4,4	14,7	20,5
F3	0,1	2,3	3,5	4,2	5,2	16,4	21,0

I tabell G.2 redovisas beräknade laktoskoncentrationer vid vardera tidpunkt där mätningar togs under valideringen. Koncentrationerna beräknades med hjälp av kalibreringskurvan som togs fram efter HPLC-mätningarna, vilken visas i figur F.1 i appendix F

Tabell G.2: Experimentellt erhållna laktoskoncentrationer från valideringsförsöket.

Försök	Laktos 0 timmar	Laktos 18 timmar	Laktos 20 timmar	Laktos 22 timmar	Laktos 24 timmar	Laktos 48 timmar	Laktos 72 timmar
S1	35,0	34,0	32,8	32,0	31,8	21,3	20,0
S2	35,0	34,4	33,7	32,5	30,7	21,1	19,2
S3	35,0	34,5	33,1	32,3	31,0	20,5	18,6
F1	48,2	48,7	47,5	47,4	46,8	36,1	30,0
F2	48,2	48,4	47,3	46,5	44,1	33,8	31,6
F3	48,2	47,2	46,4	46,1	45,2	35,1	28,7