

CHALMERS TEKNISKA HÖGSKOLA

**Utvecklandet av värmeresistenta
jäststammar med hjälp av pulsstress
BBTX01-17-03**

av

Tage Berdenius Norström, Anders Häger, Axel Norberg,
Jacob Sjölin

Kandidatarbete
inom bioteknik

För
Industriell bioteknik
Biologi och bioteknik

12 maj 2017

“Enthusiasm is the yeast that raises the dough.”

Paul J Meyer

CHALMERS UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

Abstract

Development of thermotolerant yeast strains through pulse stress

Industrial Biotechnology
Biology and Biological Engineering

Bachelor's thesis in biotechnology

by Tage Berdenius Norström, Anders Häger, Axel Norberg, Jacob Sjölin

When producing ethanol through fermentation, heat can be a major problem as a lot of energy is consumed by cooling the bioreactors in order to keep the temperature at optimum range for the yeast. By engineering a more heat resistant strain of yeast the bioreactors will not have to be cooled as much. Additionally, the product won't have to be heated as much during the distillation process, the higher temperature could also increase the rate of which ethanol is produced, saving both energy and money. This project aims to produce a heat resistant strain of yeast using Adaptive Laboratory Evolution. By exposing the strains CEN.PK113-7D and S288C to regular five hour periods of heating (38°C-45°C), a more heat resistant strain is favored. The progress was monitored by taking OD samples after the yeast had recovered from the shocks and by regularly using microscopy to check for abnormal morphology or contamination. The properties of the end product were measured against the wild types, as well as the heat resistant strain TT11 in a bioscreen as well as a HPLC. The results are inconclusive as to whether the approach actually had any major effects on the strains, and thus no conclusion can be drawn on whether this pulse based Adaptive Laboratory Evolution has been effective or not. Further research and genomic studies has to be done to say anything conclusive about this type of Adaptive Laboratory Evolution method.

CHALMERS TEKNISKA HÖGSKOLA

Sammanfattning

Industriell bioteknik

Biologi och bioteknik

Kandidatarbete inom bioteknik

av Tage Berdenius Norström, Anders Häger, Axel Norberg, Jacob Sjölin

När etanol framställs genom fermentation kan värme vara ett stort problem då mycket energi går till att kyla bioreaktorerna för att hålla dem på en optimal temperatur för jästen. Genom att designa en mer värmeresistent jäststam så behöver inte bioreaktorerna kylas lika mycket och inte lika mycket energi kommer behöva tillföras i nästa steg för att destillera produkten. Ytterligare en fördel är att processer sker snabbare vid högre temperaturer vilket leder till högre produktion av etanol. Allt detta resulterar i att mer produkt erhålls samtidigt som både energi och pengar sparas. Målet med detta arbete var att tillverka en mer värmeresistent jäststam med hjälp av metoden kallad Adaptive Laboratory Evolution. Genom att utsätta två kända laboriestammar CEN.PK113-7D och S288C för stress i form av värmepulschocker över perioder om fem timmar (38°C-45°C) vilket selekterar för en mer värmeresistent stam. Hela den laborativa processen dokumenterades genom att ta OD-mätningar efter att stammarna fått återhämta sig från chocken samt att med jämna mellanrum undersöka dem med hjälp av ett mikroskop. Detta för att söka efter förändringar i cellernas morfologi samt potentiell kontamination. De modifierade stammarnas egenskaper jämfördes mot sina vildtyper samt en tidigare framtagen värmeresistent stam TT11 med hjälp av en bioscreen och en HPLC. Resultaten är ofullständiga om huruvida denna metod givit några större förändringar eller ej hos stammarna. Tyvärr kan det från detta inte dras några konkreta slutsatser om en pulsbaserad Adaptive Laboratory Evolution varit effektiv eller inte. Framtida studier, framförallt tester på genomet, måste genomföras för att några konkreta slutsatser ska kunna dras om denna applikation av Adaptive Laboratory Evolution.

Förord

Vi vill tacka vår handledare Vijayendran Raghavendran för att ha hjälpt och väglett oss genom detta arbete, Luis Caspeta et al. för att ha försett oss med deras värmeresistenta *Saccharomyces cerevisiae* TT11-jäststam och Carl Johan Franzén för att ha kommit med tankar och idéer kring arbetet och rapporten. Vi vill avslutningsvis tacka Chalmers Tekniska Högskola och Industriell bioteknik för att ha låtit oss låna deras lokaler och utrustning.

Innehåll

Abstract	ii
Sammanfattning	iii
Förord	iv
Förkortningar	vii
1 Inledning	1
1.1 Bakgrund	1
1.1.1 Historia	1
1.1.2 Arbetets betydelse för industri och samhälle	1
1.2 Introduktion till arbetet	3
1.3 Hypotes	3
1.4 Syfte och Mål	3
1.5 Överblick av rapporten i sin helhet	4
2 Teori	5
2.1 ALE - Adaptive Laboratory Evolution	5
2.2 Satsvis odling	6
2.3 CEN.PK113-7D och S288C	7
2.4 Cellkoncentration	7
3 Metod	9
3.1 ALE - Adaptive Laboratory Evolution	9
3.1.1 Värmechocker	9
3.1.2 Tillväxt övernatt	9
3.1.3 Nedfrysning	9
3.2 Tester under arbetets gång	10
3.2.1 Kontamineringskontroll	10
3.2.2 Bioscreen	11
3.2.3 HPLC	11

4	Resultat	13
4.1	Test av ursprunglig temperaturrestans hos CEN.PK113-7D och S288C . . .	13
4.2	Anpassning hos S288C och CEN.PK113-7D under temperaturchocker . . .	14
4.3	OD-mätningar från aeroba satsodlingar i 39°C och 45°C	15
4.4	Mätning av glukoskonsumtion, tillväxt och produktbildning i satsvisa od- lingar	17
4.5	Tillväxtkurvor, generationstid och etanoltolerans	20
4.6	Kors-kontaminationstest	25
4.7	Mikroskopi	27
5	Diskussion	30
5.1	Till vilken utsträckning lyckades ALE-processen?	30
5.2	Problem kring det laborativa arbetet	32
5.3	Bioscreen	33
5.4	Kontamination	34
5.4.1	Korskontamination	34
5.4.2	Okänd kontamination	35
5.5	Felkällor och framtida forskning	36
5.6	Slutsats	37
A	Bilaga 1 - Uträkningar	41
A.1	Beräkning av exoterm energiutveckling vid fermentation	41
A.2	Beräkning av medelvikten hos en jästcell	42
A.3	Beräkning av hur OD kopplas till biomassakoncentration (g/L)	42
A.4	Beräkning av Specifik Tillväxtfaktor	43
A.5	Bioscreen: OD-beräkning	43
B	Bilaga 2 - Protokoll	44
B.1	Värmechockar	44
B.2	Förberedning av YPD-medium	45
B.3	Värmeresistensstest i övernatssodling	46
B.4	Förberedning av biotinfritt medium	47
B.5	Förberedning av YP-medium	49

Förkortningar

ALE	A daptive L aborative E volution
OD	O ptical D ensity
HPLC	H igh- P erformance Liquid C hromatography
CX	Jäststam CEN.PK113-7D cykel X
SX	Jäststam S288C cykel X
T11	Jäststam TT11
WT	W ild T ype
YPD	Y east extract P eptone D extrose
YP	Y east extract P eptone
W/W	Vikt per vikt procent

Inledning

1.1 Bakgrund

1.1.1 Historia

Jäst som redskap för att processera mat och dryck har använts av människor i runt 6000 år, men kan ha upptäckts tidigare än så, med ursprung i Mesopotamien, nuvarande Irak. Man tror att det var i dessa områden som den första ölen bryggdes.[1, 2] Detta upptäcktes troligtvis då spannmål tilläts ligga och fermentera, jäsa, vilket omvandlade sockret till etanol. På den tiden fanns inte kunskap kring hur den kemiska processen fungerade och vad i jäsningsen som orsakade fermentationen, detta upptäcktes mycket senare av en fransk kemist vid namn Louis Pasteur. Pasteur upptäckte att det var mikroorganismen jäst som stod bakom fermentationen av socker till alkohol då den tilläts tillväxa utan tillgång till syre från den omgivande luften.[3, 4]

1.1.2 Arbetets betydelse för industri och samhälle

I dagens samhälle har vikten av biobränslen som alternativ bränslekälla vuxit sig allt starkare. Främst bland dessa är bioetanol, vilket idag står för en produktion av närmare 100 miljarder liter per år[5]. För framställning av detta biobränsle finns flera olika metoder där den mest framstående är fermentation av olika sockerarter. Detta görs främst genom två olika processer kallade "Wet milling" och "Dry milling"[6]. Dessa används för att separera de olika komponenterna av det material som processeras med hjälp storleksskillnader i "dry-mill" medan "wet-mill" separerar med avseende på densitetsskillnader[6]. I båda fermentationsprocesserna tillsätts en jäst, vanligen *Saccharomyces cerevisiae*, hädanefter även benämnd *S. cerevisiae*, vilken fermenterar sockret till etanol samt koldioxid. Anledningen till att *S. cerevisiae* används är på grund av dess höga tolerans mot utomstående faktorer som varierande pH-värden, höga etanolkoncentrationer samt relativt höga temperaturer. Efter fermentationen skiljs bioetanolen från det övriga innehållet genom destillation. Detta

görs genom att öka temperaturen på blandningen och på detta sätt separeras de olika delarna av fermenteringsprodukten med avseende på komponenternas skilda kokpunkter. Det är i detta steg som störst del av energi går åt i framställningen av bioetanol[7]. En viktig faktor för att sänka kostnaderna är att minska mängden energi som tillförs. Ett sätt att åstadkomma detta skulle kunna hittas i en mer värmeresistent jäststam.

Det är inte bara i destillationsprocessen som intresset kring utvecklandet av en mer värmeresistent jäst finns. Då fermentationsprocessen av socker är en exoterm reaktion krävs det ofta att det finns kylningssystem kring fermentationsreaktorer för att bibehålla temperaturen på optimala nivåer så inte jästen tappar produktivitet. För fullständig uträkning för värmeutveckling för denna process, se bilaga A.1. Nedkylning är den vanligaste lösningen på detta i varmare länder där temperaturerna ofta överstiger optimala förhållanden. Idag är 32°C den vanligaste temperaturen för fermentation vilket blir problematiskt i länder som till exempel Brasilien, en av världens största etanolproducenter, där temperaturen lätt överstiger detta[8]. Genom att utveckla en jäststam med bättre värmetolerans blir behovet av att kyla fermentationsreaktorer inte lika stort och mindre energikrävande. Detta skulle betyda att mindre resurser läggs på nedkylning av reaktorer vilket gör processen bättre ur både ett ekonomiskt och miljömässigt perspektiv. För länder där klimatet är mildare är kylningen av reaktorer inte ett lika stort problem men även här finns intresset av en mer värmetolerant jäststam för fermentationen. Då reaktioner ofta går snabbare vid högre temperaturer kan reaktorer värmas upp längre för en effektivare produktion utan att riskera att jästen dör.

Om fermentationen skulle kunna köras vid en temperatur som är 5°C högre än 35°C, en temperatur vilken också förekommer i bioreaktorer för etanolproduktion, beräknas ett företag med en sammanlagd reaktorvolym på 30 000m³ kunna spara in 30 000 US\$ per år[9]. Om ett hjälp-enzym med optimum vid högre temperaturer skulle kunna användas vid fermentationen så behöver mindre enzym tillsättas till följd av att reaktorn kan köras på högre temperatur vilket skulle spara in pengar i enzymkonstnader. Ett annat återkommande problem i bioreaktorer är kontamination vilket kan leda till kostnader upp emot 50 000 US\$ för reaktorer på 260m³[9]. Om reaktorn kan köras på högre temperaturer minskar risken för kontamination[9]. Avslutningsvis så betyder en ökad temperatur på produktlösningen att mindre energi behöver tillföras för att nå nästa steg i produktionskedjan, destillation,

vilket också minskar kostnaderna på processen[10]. För att förbättra etanolproduktionen skulle alltså utvecklingen av en mer värmetålig jäststam även här vara av intresse.

1.2 Introduktion till arbetet

Med detta arbete görs ett försök att utveckla en ökad värmeresistens hos jäststammar med metoden kallad Adaptive Laboratory Evolution, (ALE). Denna appliceras genom att utsätta jästen för stress i form av stegrande värmechocker som upprepas flera gånger under en lång tid med en vilo-/återhämnings-period mellan varje chock. En liknande metod vilken visat sig effektiv på att introducera nya mutationer är kemisk stress där mutationer uppkommer slumpartat i jästens genom till följd av stressen. Skillnaden mellan den och vår metod är att istället för att ge upphov till slumpartade mutationer vill vi selektera för de stammar vilka bäst anpassar sig till den ökade temperaturen i chockerna.

1.3 Hypotes

Genom att utsätta jäst för stress i form av värmechocker förväntas en ökad tolerans mot värme erhållas. Dock kan det ej förutsägas om värmechockerna enbart förbättrar tolerans mot kortare stressmoment eller även gör stammarna mer tåliga mot kontinuerliga chocker över längre perioder. Jästen kan även tänkas förlora andra egenskaper i samband med nya mutationer såsom till exempel tolerans mot etanol i högre koncentrationer.

1.4 Syfte och Mål

I detta arbete används en pulsstressmetod för att genom ALE tvinga jäst att utveckla mutationerna för ökad tolerans mot högre temperaturer än de vanligtvis föredrar. Tanken är att utföra dessa pulser med ökande temperaturer för att skapa ett allt hårdare klimat. Detta ökar det selektiva trycket mot en högre värmetolerans i cellernas evolutionära utveckling. Med denna metod hoppas vi kunna nå målet att utveckla en stam vilken överlever och tillväxer vid 40°C som samtidigt, förhoppningsvis, behåller sin höga omsättning av

glukos till etanol genom fermentation. Ett annat mål är att även se om denna pulsmetod visar sig vara bättre än ett tidigare testat tillvägagångssätt där jästen utsattes för en kontinuerligt ökande värmestress.

1.5 Överblick av rapporten i sin helhet

- För mer information kring de metoder och jäststammar som använts finns detta beskrivet i kapitlet Teori.
- För att undersöka om ALE är en effektiv och praktisk metod för att ta fram en ny tolerans hos en jäststam utfördes en laborativ studie vars tillvägagångssätt återfinns i kapitlet Metod.
- För att finna resultatet utav de undersökningar som gjordes, däribland OD samt biomassa koncentrationer i (g/L), bioscreen för att finna ett laborativt $\mu_{\max}$ samt en HPLC studie över hur koncentrationer i odlingen förändrades över tiden ligger detta samlat under kapitlet Resultat.
- Avslutningsvis finns en diskussion över hur arbetet fungerat, vad resultaten har gett för insikt i hur ALE fungerar som utvecklingsmetod. I diskussionen finns även en slutsats huruvida arbetets syfte har uppnåtts och hur vidare forskning på denna jäststam skulle kunna fortsätta genomföras. Diskussionen reflekterar över om denna metod kan appliceras i utvecklandet av framtida industriella jäststammar samt vad som kunnat göras bättre i genomförandet.

Teori

2.1 ALE - Adaptive Laboratory Evolution

ALE är en metod där man utsätter en organism för en yttre påverkan, i arbetets fall värmechocker, vilken den tvingas utveckla en ökad tolerans mot. Detta görs genom mutationer vilka förs vidare till nästkommande och framtida generationer av organismen. De som inte klarar av att anpassa sig dör ut och kvar blir de vilka lyckats utveckla tolerans. Genom att upprepa chocker över längre tid med större yttre påfrestning förväntas de sämre anpassade organismerna selekteras bort. Metoden kan inte enbart användas för att få fram till exempel värmetålig jäst utan man kan även titta på förändringar hos organismerna i fråga för att se på vad som ändrats i deras genom. Detta kan bidra med en större förståelse för värmetålighet, eller annan resistens, hos organismer och cellkomponenter såsom proteiner. Framtida organismer kan sedan genmodifieras om mutationen sekvenserats för att snabbare få fram den önskade egenskapen, funnen med hjälp av ALE.

I en studie gjord av Luis Caspeta et al. odlades värmerestistenta stammar fram som kunde växa vid 39,5°C i 90 dagar under kontinuerlig stress. Stammen, efter 300 generationer, visade på en högre specifik tillväxthastighet, en högre glukoskonsumtion, högre etanol- och glycerolproduktion samt ett högre biomassautbyte. De fann även att flertalet mutationer samt ändringar i kromosom III hade inträffat vilka är delaktiga inom respiration och DNA-reparation. För att få fram dessa mutationer användes ALE. Jäststammen som togs fram erhöles från chocker på vildtyp jäststammen *S. cerevisiae* CEN.PK113-7D.[11, 12]

Skillnaden mellan pulsstress och kontinuerlig stress är hur lång tid stressen läggs på organismerna. En pulsstress är kortare och gärna kraftigare mot organismen medan en kontinuerlig stress är mer konstant och över flertalet generationer. Genom att använda pulsstress ges cellerna även en tid att återhämta sig mellan pålagd stress till skillnad från kontinuerlig stress där ingen återhämtning tillåts. Genom att frånta cellernas kolkälla under pulsstressen förväntas de inte dela sig under chocktiden, istället förväntas en respons mot stressen i form av adaption för att klara chocken. En annan liknande experimentell process, likt den

som utförs i detta arbete, med pulsstress nämns i boken ”Yeast Metabolic Engineering”. Skillnaden mellan denna process och den som behandlas i rapporten var en kemisk stress snarare än en temperaturbaserad stress.[2]

Studier visar på att då *S. cerevisiae* modifierats för att klara specifika stressförhållanden, via ALE eller liknande metoder, har ofta andra egenskaper gått förlorade. En jäststam som utsattes för kontinuerlig koboltstress fick bättre förmåga att klara av höga kobaltkoncentrationer men en sämre förmåga att klara etanol- och väteperoxidbaserad stress.[13] Liknande resultat har setts på jäst som anpassats för att växa på xylos under anaeroba förhållanden då de fick en sämre tillväxt på glukos.[14] Ett tredje exempel på förlorade egenskaper hos jäst efter kontinuerlig stress är en jäststam som togs fram att klara att leva på begränsad kolkälla. Jästen fanns klara av att leva bättre på låga koncentrationer av kolkällan i jämförelse med dess vildtyp men visade sämre resultat då kolkällan inte längre var begränsande. Orsaken till detta visade sig vara, efter analys av genomet, att jästen fått sämre glukosdetektion och -transport.[15] Att använda en riktad evolutionär metod verkar alltså fungera men kan även bidra med andra egenskaper, positiva och negativa, samtidigt som den erhåller den önskade egenskapen.

2.2 Satsvis odling

I detta projekt odlas jästen i en satsvis odling. Satsvisa odlingar karaktäriseras av att jästen får växa i en sluten behållare med finit mängd näringsämnen. Som en följd av detta sker mikrobiell tillväxt allmänt i tre olika faser: lagfas, logfas samt stationärfas. I lagfasen sker minimal tillväxt och produktion då jästen anpassar sig till sin nya omgivning. I logfasen sker exponentiell tillväxt tills all glukos är förbrukad och stationärfasen inleds. I stationärfasen har tillväxt stannat, vanligtvis på grund av substratbrist eller höga koncentrationer av en toxisk produkt. En viktig effekt av satsvis odling är att cellerna selekteras för snabbast tillväxt, medan en kontinuerlig odling selekterar för de celler som har högst affinitet till det begränsande substratet. Detta på grund av att i en kontinuerlig odling tillförs det kontinuerligt en viss mängd kolkälla. Denna kolkälla blir snabbt konsumerad av de celler som befinner sig i odlingen, vilket håller kolkällekoncentrationen låg men konstant. Det innebär att de celler som bäst kan ta till vara på den kolkälla som tillförs, i

denna kolfattiga miljö, är de celler som överlever och tillväxer. I en satsvis odling finns all kolkälla tillgänglig i överflöd från start, och tillväxt kan ske tills denna tagit slut. Då miljön till en början är rik på substrat är en långsam men effektiv användning av kolkällan inte lika gynnsam som en ineffektiv men snabb tillväxt.[16].

2.3 CEN.PK113-7D och S288C

De två jäststammar vilka använts i arbetet tillhör båda arten *Saccharomyces cerevisiae* vilket är den vanligast förekommande jästarten. Stammarna som används, S288C samt CEN.PK113-7D, är vanligt förekommande laboriestammar. De två är mycket lika varandra, då CEN.PK113-7D är en stam som utvecklats från S288C. Skillnaden mellan dem är att CEN.PK113-7D har 83 gener som inte finns i S288C, samt runt 1400 proteiner som skiljer sig i struktur från dess motparter i S288C. Stammen S288C designades av Robert Mortimer för att ha ett minimalt näringsbehov.[17, 18] En skillnad mellan de två stammarna är att CEN.PK113-7D genmodifierats till att kunna tillväxa bra vid avsaknaden av biotin vilket är något S288C inte gör. Då jäststammarna varit i biotinmedium så skapas en biotinreserv, detta för att kunna överleva bättre i avsaknaden av biotin om så bara under en kort period.[17] Båda stammarna har en regelbunden form och volym runt $30\text{-}100\text{ }\mu\text{m}^3$ och en densitet runt $1,08\text{-}1,10\text{ g/cm}^3$ vilket ger en genomsnittlig jästcell en massa på $7,1 \cdot 10^{-14}\text{ kg}$ om de räknas ha en medelvolum på $\approx 65\text{ }\mu\text{m}^3$ [19]. För uträkning om cellernas medelvikt, se bilaga A.2

2.4 Cellkoncentration

Koncentrationen av celler är viktig att kunna beräkna för att kunna få ett resultat på hur väl cellerna anpassat sig till en ny miljö. Denna kan beräknas med hjälp av bland annat OD-mätning, cell dry weight samt med räknekammare via mikroskop, vilka är de tre metoder som använts under laborationsarbetet. OD-mätning, den metod som använts mest och haft störst betydelse för arbetet, mäter hur mycket cellerna hindrar ljus från att färdas genom lösningen. Fler celler bidrar till att mindre ljus färdas rakt igenom, vilket

spektrofotometern uppmäter som ett högre absorptionsvärde. För uträkning av biomassakonzentration, se bilaga A.3 Cell dry weight i sin tur mäter torrvikten på ett prov celler och använder sig av en känd torrsvikt per cell. En räknecammare används med hjälp av ett mikroskop där antalet celler i kammaren räknas på en bestämd yta med bestämd volym. Räknecammare och cell dry weight kan användas för att bestämma hur många celler som finns för ett visst OD. Tack vare att koncentrationen är proportionell mot optiska densiteten inom vissa betingelser kan Lambert Beers lag utnyttjas genom OD-mätningar för att beräkna cellkoncentrationen. Då OD används för att bestämma cellkoncentration så kan ett möjligtvis inkorrekt resultat uppstå om cellernas storlek eller form ändrar sig. Detta då ljuset från spektrofotometern får lättare eller svårare att färdas genom lösning per cell från vad som tidigare beräknats. Det har påvisats att jästcellers storlek kan variera kraftigt då de utsätts för temperaturschocker[20]. För att undvika detta missvisande resultat kan proverna undersökas med mikroskopi för att observera avvikelser hos cellstorlek, -form och -beteende.

Metod

3.1 ALE - Adaptive Laboratory Evolution

3.1.1 Värmechocker

Från stammarna som användes togs två kulturer av varje stam. För *S. cerevisiae* CEN.PK113-7D delades stammarna upp i C1 och C2, och för *S. cerevisiae* S288C i S1 och S2.

Pulschocker utfördes enligt bilaga B.1. De första chockerna utfördes på 38°C i 4 timmar, efterkommande chocker ökade i temperatur i steg av 0,5°C tills 45°C nåddes. Chocktiden ökades till 5 timmar efter cykel 3. När chocktemperaturen nådde 45°C chockades resterande cykler på 45°C.

3.1.2 Tillväxt övernatt

Efter chocken odlades jästen i en satsvis odling under aeroba förhållanden i komplext medium (YPD), se bilaga B.2. Odlingen skedde övernatt i 15 mL kulturtuber som placerades i en 30°C skakinkubator.

3.1.3 Nedfrysning

För att spara de framsteg som gjordes användes cryotuber som förvarades i en -80°C frys. För att tillåta jäst att överleva nedfrysningen till -80°C användes en glycerollösning, som i cryotuben hade en koncentration på 30% W/W. För att åstadkomma detta användes en stock av 60% W/W glycerol som blandades med lika delar jästkultur.

3.2 Tester under arbetets gång

För att undersöka hur de framodlade stammarna uppförde sig gentemot redan existerande värmetoleranta stammar söktes information från tidigare studier. I en studie av Luis Caspeta et al. togs jäststammen T11 fram, vilken har använts som jämförelse för framtagna jäststammar vid flera tester i denna rapport.[11]

En värmegradient gjordes från 35°C till 41°C för att få en bild av hur väl stammarna överlever olika temperaturer. Detta utfördes enligt bilaga B.1 med skillnad att PCR-maskinen var inställd på gradientläge, där de olika brunnarna varierade i temperatur mellan 35°C och 41°C.

Samtidigt gjordes en övernattsodling vid 39°C och senare en på 45°C för att testa cellernas värmetålighet i höga temperaturer. Detta utfördes enligt bilaga B.3.

Under fortgången av det laborativa arbetet undersöktes de olika stammarna med mikroskop. Både 1000x förstoring med oljeimmersion och 400x förstoring användes.

3.2.1 Kontamineringskontroll

Stammen S1 började att bete sig annorlunda gentemot S2 då pulschockerna närmades 45°C. Detta antogs vara en naturlig utveckling då de två stammarna varit åtskilda och upptinade under totalt tre veckors tid. Experiment utfördes för att avgöra om orsaken till skillnaden mellan dem var från kontamination eller evolution hos jäststammarna.

En vitaminblandning förbereddes utan biotin, se bilaga B.4. Stammarna S1/S2 samt C1/C2 odlades sida vid sida med och utan biotin närvarande i mediet. För att få ett bättre resultat odlades kulturerna med och utan biotin över ett spann av två dagar, eftersom cellerna har biotinreserver de kan överleva på[17].

För att kunna dra ett slutgiltigt beslut om huruvida kontamination av stammen S1 hade skett användes mikroskopi. Bilderna togs vid 1000x förstoring.

3.2.2 Bioscreen

En bioscreen används för att studera tillväxten av jäst i realtid. Maskinen består av en inkubationskammare där två vaxkakplattor är placerade. Ett avläsningsinstrument läser av ljusabsorptionen från brunnarna i inkubatorn. Ett program följer utvecklingen genom att ta OD-prover över utsatta tidsintervall vilka plottas i en graf för att göra det lättare att följa tillväxten i brunnarna. Detta OD behandlas med en korrektionsformel för att få det egentliga OD-värdet[21]. Med hjälp av den data som uppmäts kan specifik tillväxtfaktor beräknas, se bilaga A.4.

För att få en överblick över hur jästen har förändrats över cyklerna så förbereddes en bioscreen med 90 prover som kördes vid 39,5°C. De cykler som valdes var de som uppvisat en stor skillnad i OD mellan chockerna, se figur 4.1. De jäststammar som användes för S1 och S2 var de som utsätts för 18, 11 samt 3 pulschocker. För C1 och C2 användes stammar som utsätts för 16, 11 samt 3 pulschocker. Utöver S1, S2, C1 och C2 användes även vildtyp-stammarna för båda jästerna, samt T11. Varje stam placerades i tre brunnar var på plattan, varje brunn innehållandes 145 µL med en initial-OD på 0,1.

För att få ytterligare information om hur jästen förändrats av chockerna gjordes även samma tester fast med 50 g/L etanol i varje brunn. Detta eftersom det visat sig att när jäst utvecklas med avseende på en stressfaktor så kan stammen förlora respektive erhålla större motståndskraft mot andra stresstyper. Då etanol är en viktig del av jästens funktion i industrin valdes att testa mot just denna. Bioscreenproverna var därmed 45 prover utan etanol, 45 prover med etanol samt en blank. Efter att en bioscreen utförts gjordes manuella OD-mätningar av tio stycken brunnar, se tabell 4.3 för en jämförelse med bioscreen-uppmätta värden.

3.2.3 HPLC

HPLC, high performance liquid chromatography, är en metod där ett prov separeras beroende på specifika egenskaper. Provet tvingas genom en kromatografikolumn under högt tryck vilket separerar innehållet i provet som sedan samlas upp i slutet av kolumnen. Andelen av ett visst ämne i ett prov kan bestämmas med hjälp av att jämföra provet mot

en standardkurva med kända koncentrationer. Ämnen såsom glukos, etanol, glycerol och acetat med mera kan undersökas[22].

För att få insikt i hur metabolismen hos de framtagna stammarna förhöll sig till vildtyperna gjordes en undersökning med hjälp av en HPLC. De mest utvecklade stammarna, 16 för CEN.PK113-7D och 18 för S288C, testades gentemot T11-stammen samt vildtyperna för S288C och CEN.PK113-7D. Satsvisa odlingar med volym på 50 mL och initial-OD på 0,1 förbereddes och placerades i en skakinkubator inställd på 39,5°C. Prover a 1 mL togs varje timme, förutom första timman då inget prov togs. Proverna sparades i frys för HPLC-mätning efter att OD mätts samt celler filtrerats bort. Detta gjordes med hjälp av ett 0,2 µm cellulosafilter för att eliminera spår av biomassa från proverna.

Resultat

4.1 Test av ursprunglig temperaturrestans hos CEN.PK113-7D och S288C

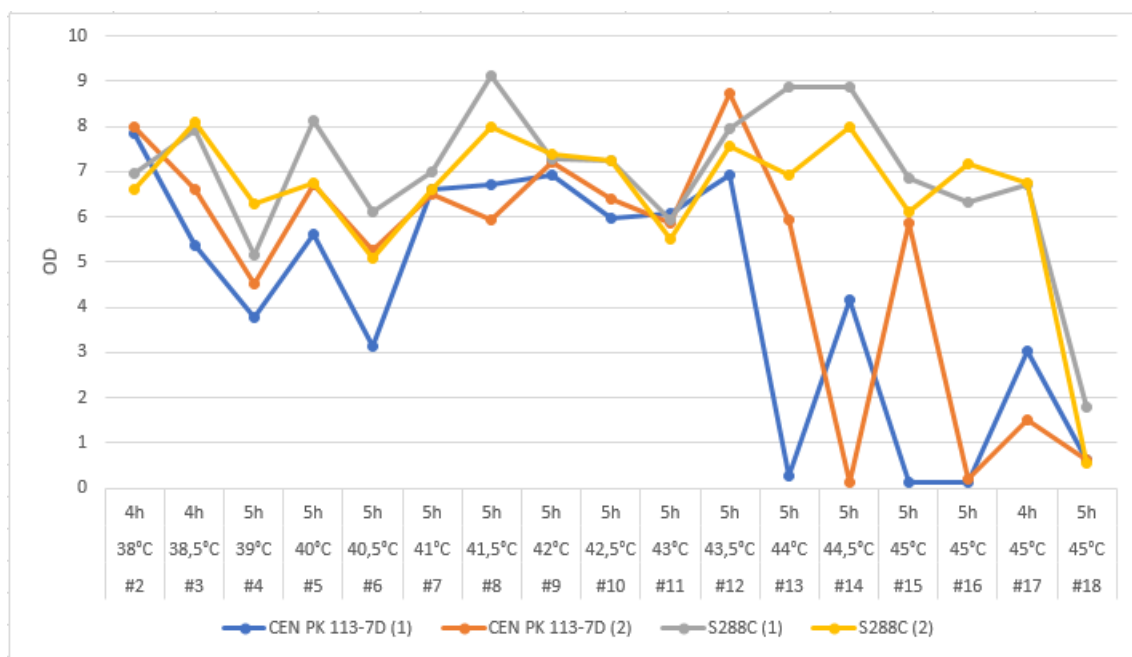
För att hitta en bra begynnelsestemperatur gjordes försöket med en värmegradienten i en PCR-maskin. Det som söktes var en temperatur där stora delar av populationerna dog och anledningen att detta gjordes i en PCR-maskin var eftersom samma maskin skulle användas som värmekälla för chockerna i de framtida testerna. Värmegradienten varierade mellan 35°C och 41°C på 32 kulturer av CEN.PK113-7D- och S288C-vildtyper. Värmegradientchocken kördes i fem timmar med återhämtning i övernattsodling. Från odlingarna kunde ingen konkret slutsats dras då tillförlitlig data saknades. Avsaknaden av data kom från att proverna haft olika start-OD, så uppmätt OD efter testerna gav inte någon information om skillnaden mellan stammarnas resistens vid olika temperaturer. Det enda som kunde erhållas var om de överlevt chocken eller ej vilket alla observerades ha gjort, se tabell 4.1. Alla prover visade höga OD med ingen klar nedgång utefter ökande temperatur. Därmed beslutades att en temperatur högre än 41°C var lämplig som mål då inget prov hade stort fall av cellkoncentration efter gradientförsöket.

TABELL 4.1: Ett försök med 32 stycken prover som chockats i fem timmar. Temperaturen på chocken stiger med provnummret, från 35°C vid prov ett till 41°C vid prov åtta. Visar OD-värdena för vildtyp-stammarna för C1, C2, S1 och S2.

Provnummer	OD CWT 1	OD CWT 2	OD SWT 1	OD SWT 2	Temperatur
1	7,04	7,42	7,14	7,52	35,00
2	6,54	6,50	6,78	7,28	35,86
3	6,76	6,34	7,24	8,50	36,72
4	7,34	6,66	7,32	7,18	37,58
5	7,50	6,60	7,00	7,04	38,44
6	7,22	6,42	7,00	6,44	39,30
7	7,04	6,54	7,06	8,10	40,16
8	6,58	6,26	7,08	7,24	41,00

4.2 Anpassning hos S288C och CEN.PK113-7D under temperaturchocker

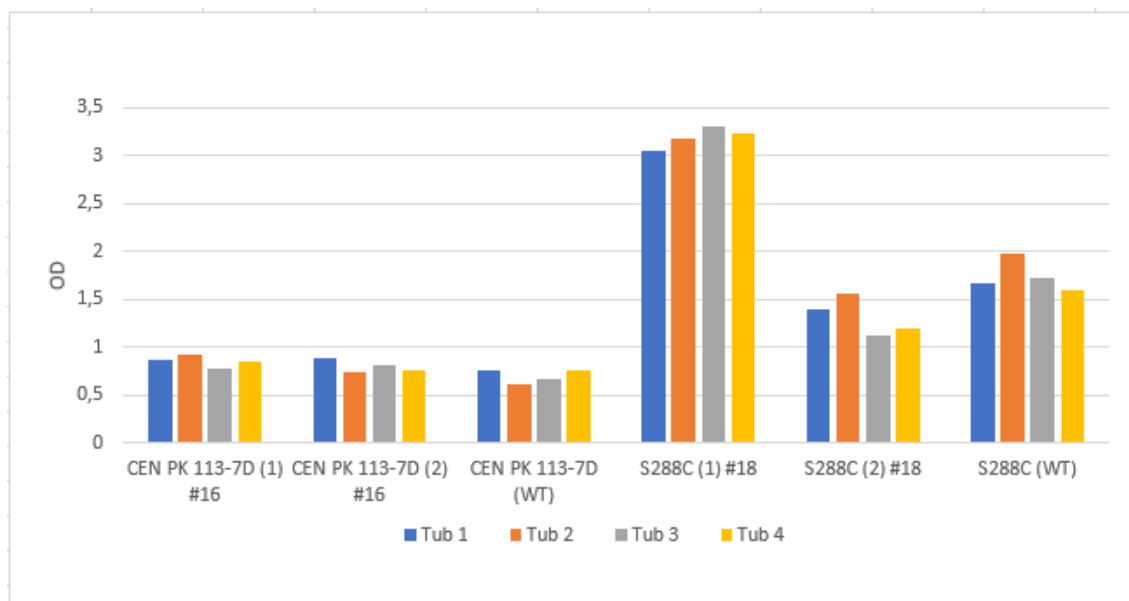
18 pulschocker utfördes vilket resulterade i 18 cykler, i numrerad ordning för att selektera för hög värmeresistens hos jäststammarna. Resultatet påvisade att S288C klarade sig bättre än CEN.PK113-7D som vid 44°C och uppåt observerades ha oregelbundna och nedåtgående OD-värden. De fyra sista chockerna genomfördes alla på 45°C. Medan C1 och C2 visade på svårigheter i att fortsätta tillväxa vid högre temperaturer så klarade både S1 och S2 detta väl fram tills den sista chocken. Vid den sista chocken erhöles ett markant lägre OD för både S1 och S2 vilket visade på att större delen av cellerna dött av chocken, se figur 4.1.



FIGUR 4.1: OD-mätningar för alla chocker under utvecklingen. Varje punkt motsvarar OD-värdet för en övernattskultur som odlats från ett tidigare chockat prov. Numreringen talar om vilken cykel som kulturerna tillhörde.

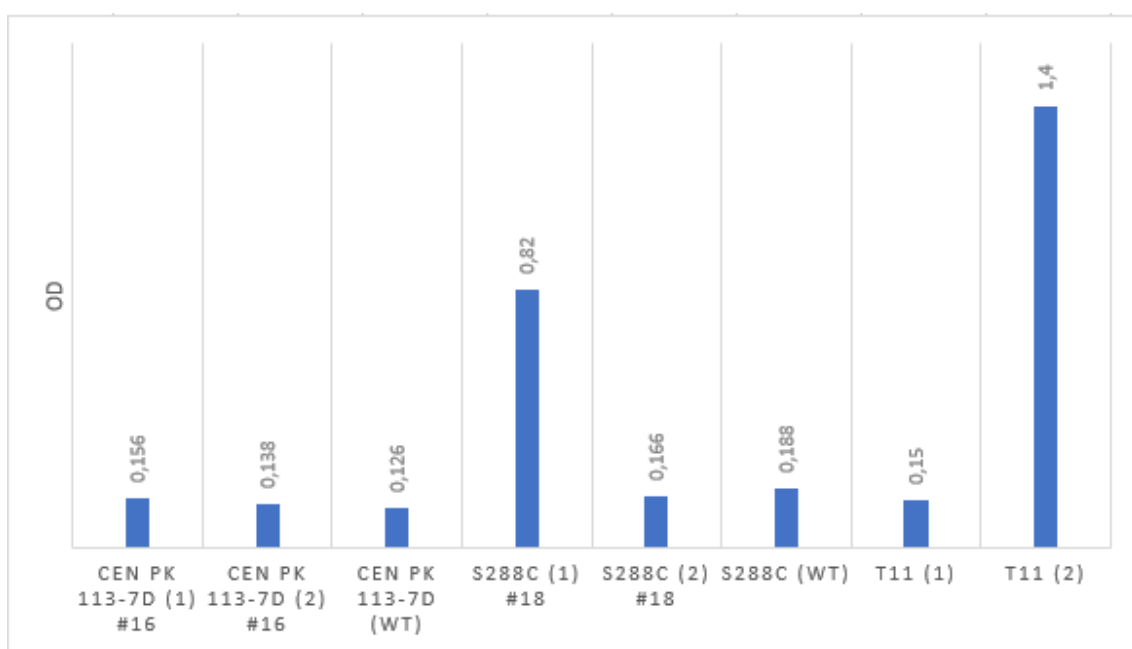
4.3 OD-mätningar från aeroba satsodlingar i 39°C och 45°C

OD-mätningar utfördes på stammar som fått tillväxa i förhöjda temperaturer i en övernattsodling. Detta för att undersöka hur värmetåligheten, under långvarig exponering, hos de olika stammarna förändrats av pulschockerna. Initial-OD för varje kultur var 0,1. Testet gjordes parallellt i fyra tuber av varje stam för stammarna C1, C2, CWT, S1, S2 och SWT. S288C observerades prestera bättre än CEN.PK113-7D varav S1 visade på högst OD efter 18 timmar med ett OD runt 3. S2 gav ett något lägre OD än SWT men båda runt OD 1,5. CEN.PK113-7D i sin tur gav OD-värden mindre än 1, se figur 4.2.



FIGUR 4.2: OD-mätningar tagna efter 18 timmar från övernattskultur i 3 mL kulturtuber som odlats vid 39°C i shaker.

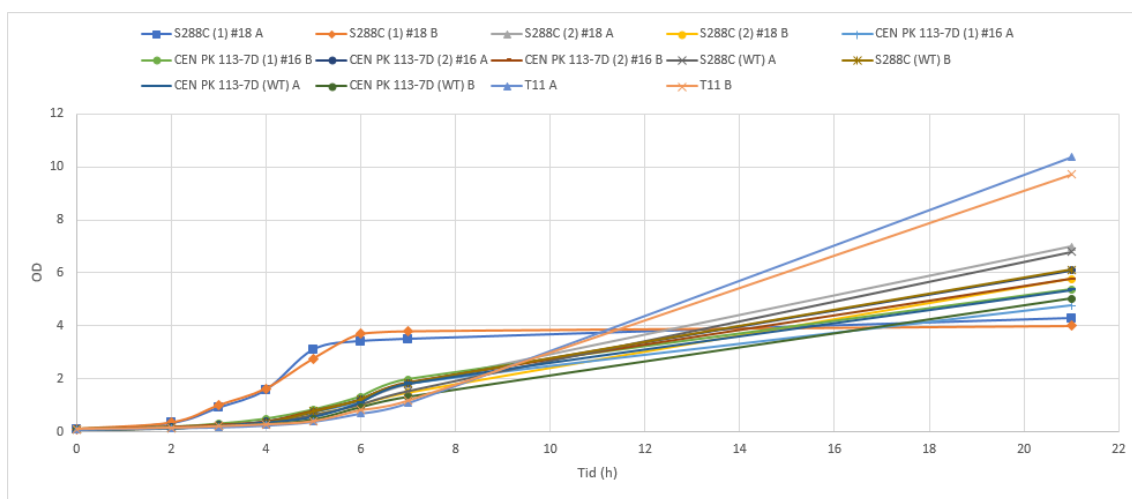
Ett liknande test gjordes för 45°C. Detta för att se hur väl de olika jäststammarna klarade sig på en högre temperatur än 39°C. Resultatet visade att alla stammar överlevde 45°C men S1 och T11, prov 2, klarade sig markant bättre än resterande jäststammar. Medan ingen CEN.PK113-7D-stam visade på någon egentlig tillväxt och stannade på 0,1 OD så tillväxte S1 sig 8 gånger så stor och T11 14 gånger så stor från start-OD 0,1, se figur 4.3. Resultatet visade att S1 och T11 verkade kunna tillväxa vid 45°C. Två olika prover av T11 gav väldigt olika resultat vilket tyder på ett felaktigt utförande eller en variation inom stammen. Då proverna togs från olika kolonier från agarplatta är båda en möjlighet.



FIGUR 4.3: OD-mätningar tagna efter 17 timmar från övernattskultur i 3 mL kulturtuber odlade vid 45°C i shaker. Försöket utfördes med en kultur per stam för C1, C2, CWT, S1, S2, SWT, T11 (1) samt T11 (2)

4.4 Mätning av glukoskonsumption, tillväxt och produktbildning i satsvisa odlingar

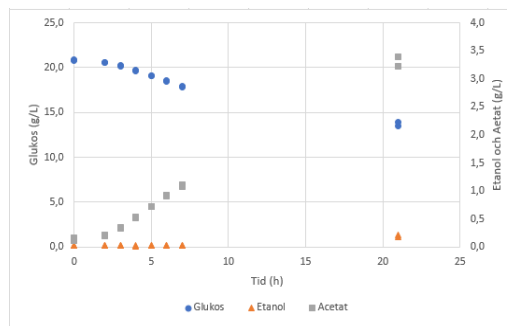
Metabolismen hos de framchockade stammarna undersöktes genom användning av en HPLC. De metaboliter som mättes var glukos, etanol, glycerol och acetat. OD-mätningar gjordes i samband med provtagningen, testet kördes över 21 timmar. Från OD-mätningarna observerades att S1-stammen uppvisade otroligt snabb tillväxt under de första fyra timmarna av försöket för att sedan i stort sätt avstanna helt. Detta tros bero på att provet varit kontaminerat vilket även övrig data visade på. Hos de övriga stammarna erhöles en normal tillväxt fram tills att alla prover lämnades över natten. När sista provet togs morgonen efter observerades att T11 stammen ökat mycket kraftigt under natten medan övriga stammarnas OD stadigt ökat dock inte med samma hastighet.



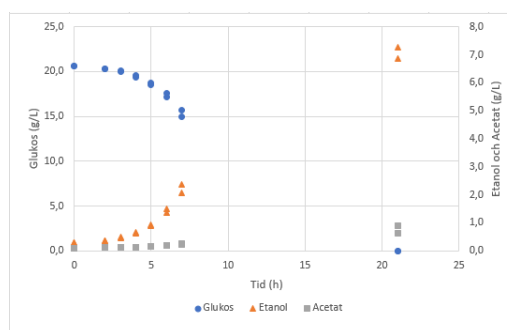
FIGUR 4.4: OD-mätningar tagna från kulturerna C1, C2, CWT, S1, S2, SWT och T11. Testet utfördes på två kulturer från varje stam. Alla stammar odlades i 50 mL YPD i 100 mL E-kolvar vid 39,5°C i skakinkubator.

Mätdata från HPLC-experimentet användes för att jämföra bildandet av etanol mot förbrukningen av glukos. Från detta erhöles att T11 var bäst på etanolproduktion över 21 timmar då den konsumerade all glukos och bildade runt 7,5 g/L etanol. Men även många av de stammar som odlades fram genom ALE erhöles goda värden på etanolproduktion samt konsumerade all glukos. Som exempel visade S2 på en god produktion med en slutkoncentration av etanol på 7 g/L, se figur 4.6.

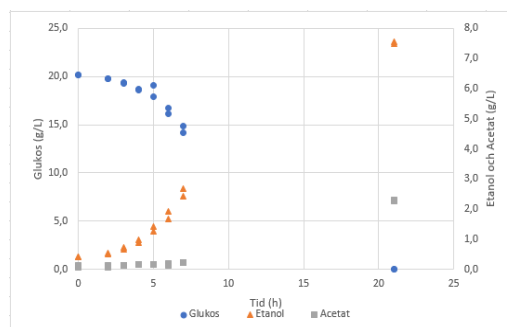
Dock uppvisade inte alla stammar samma beteende. S1 avvek kraftigt från den normala utvecklingskurvan som observerades hos de övriga stammarna då den inte förbrukade all glukos, det fanns närmare 13 g/L kvar efter 21 timmar och erhöll en etanolkoncentration på endast 0,2 g/L. Det observerades även att både S1 och T11 producerade en stor mängd acetat, 3,3 och 2,25 g/L vardera medan S2 endast producerade en observerad koncentration på 0,75 g/L. S2:s uppmätta acetatvärde var ungefär lika med alla de övriga stammarnas, samtliga låg mellan 0,7-1,0 g/L. Den låga mängden etanol vilken observerades i S1 misstänktes bero på kontamination från en okänd mikroorganism. Experimentets resultat visade att T11 stammen erhåller den högsta mängden etanol. S2 erhöll nästan samma mängd men producerade en mindre mängd acetat. Detta tillsammans med de observerade storlekarna på cellkoncentrationen från OD-mätningarna ger att S2 fortfarande producerade en stor mängd etanol, trots att den slutgiltiga cellkoncentration var betydligt mindre än den som observerades för T11-stammen.



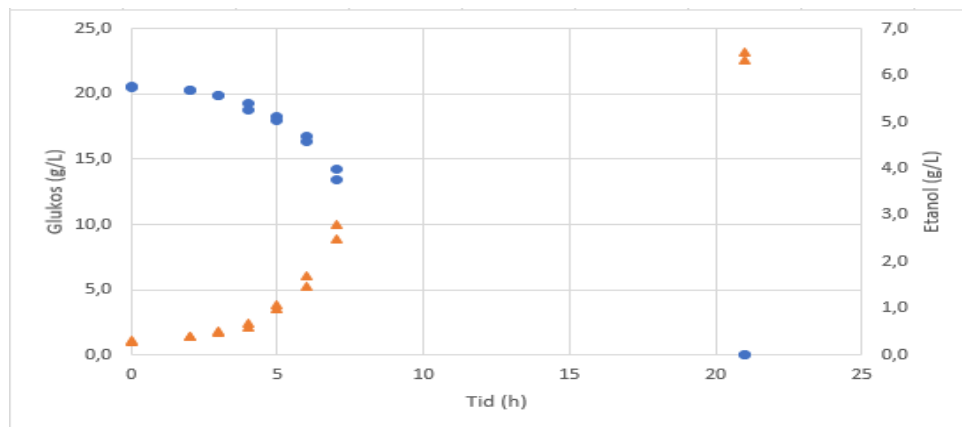
FIGUR 4.5: Glukoskoncentration (g/L) mot etanol (g/L) och acetatproduktion (g/L) hos S1. Antas vara kontaminerad



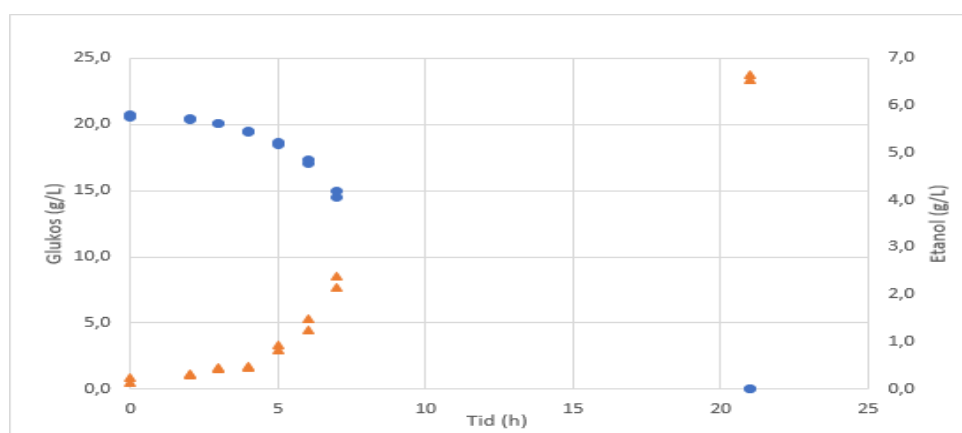
FIGUR 4.6: Glukoskoncentration (g/L) mot etanol (g/L) och acetatproduktion (g/L) hos S2



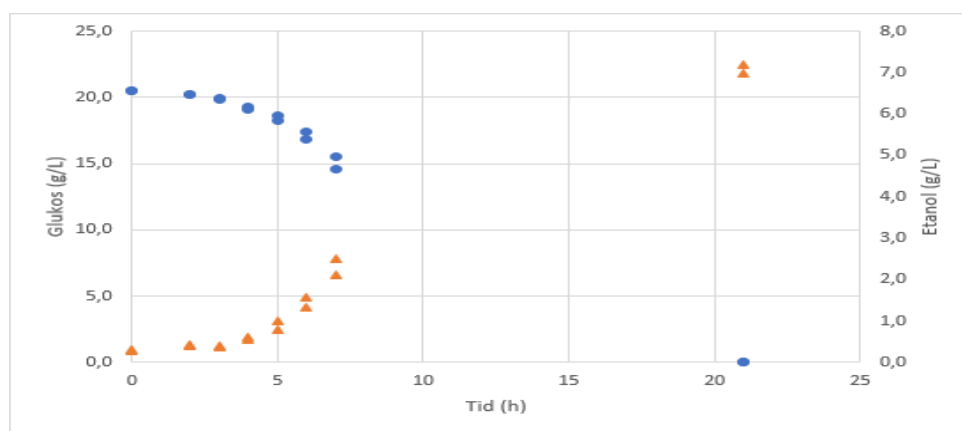
FIGUR 4.7: Glukoskoncentration (g/L) mot etanol (g/L) och acetatproduktion (g/L) hos T11



((A)) C1:s Glukoskoncentration (g/L) mot produktion av etanol (g/L)



((B)) CWT:s Glukoskoncentration (g/L) mot produktion av etanol (g/L)



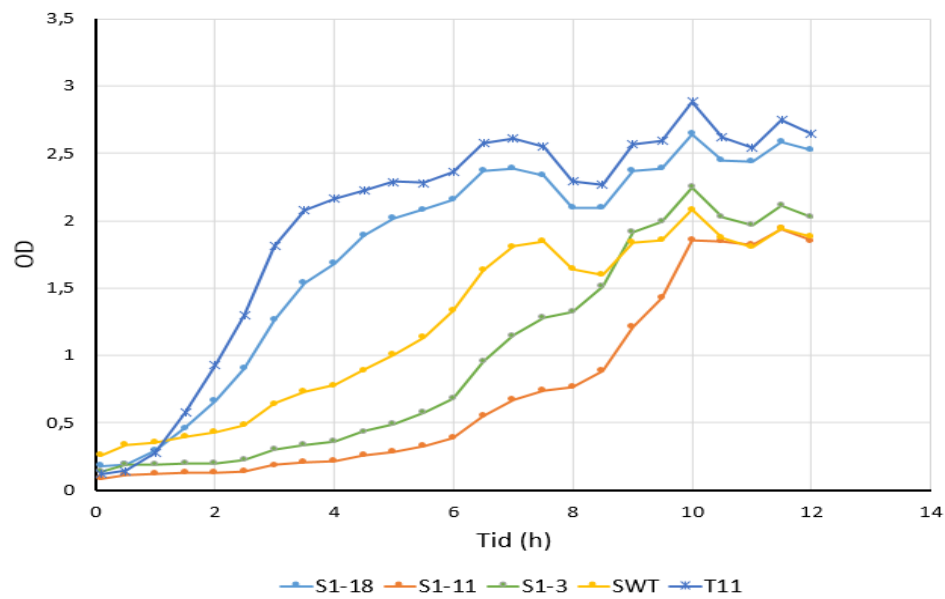
((C)) SWT:s Glukoskoncentration (g/L) mot produktion av etanol (g/L)

FIGUR 4.8: Resultaten av HPLC experimentet för C1, CWT samt SWT. Från dessa erhöles att alla förbrukade allt glukos provet innehöll från start samt att de producerade en etanolvänt enligt följande, C1 6,4 g/L, CWT 6,5 g/L och SWT 7,0 g/L.

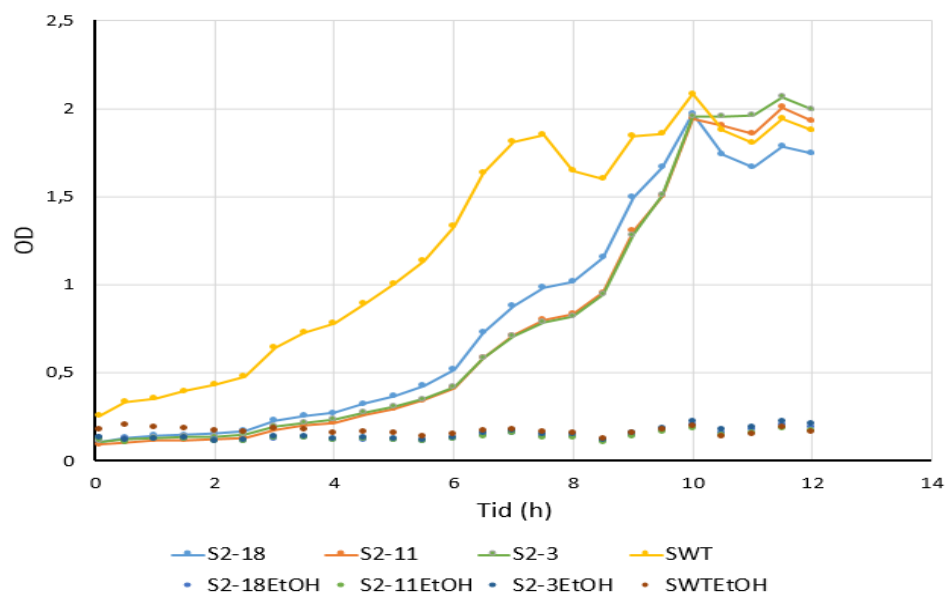
Från odlingarna av C1, CWT och SWT observerades det att alla tre förbrukade allt glukos över de 21 timmarna som odling fortgick. Produktionen av etanol varierade något mellan CEN.PK113-7D och S288C men var väldigt lika mellan C1 och CWT. Resultatet från CWT och SWT visade på att även om stammarna ej blivit chockade klarade av att tillväxa i en batchodling med förhöjd temperatur under 21 timmarna med god etanolproduktion. Att SWT erhöll bättre resultat än båda CEN.PK113-7D-stammarna gav ytterligare indikationer på att stammen har en bättre adaptiv förmåga än CEN.PK113-7D.

4.5 Tillväxtkurvor, generationstid och etanoltolerans

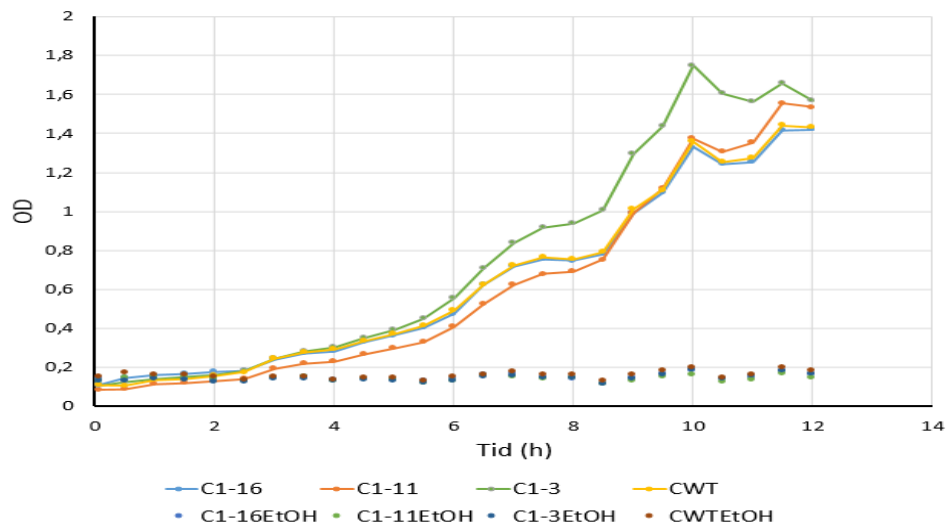
För att beräkna tillväxthastighet över olika cykler och samtidigt kunna jämföra utvecklingen av jästen över olika antal chocker gjordes en bioscreen. Efter att bioscreendata korrigerats enligt bilaga A.5 kunde tillväxtkurvor plottas för de olika stammarna. Dessa tillväxtkurvor presenteras som medelvärdena för de tre olika proverna som gjordes för varje stam vilka sedan plottats över tid, se figur 4.9. Då etanol var närvarande i lösning observerades att nästan alla jäststammar ej tillväxte. T11 kan ses nå ett OD över två redan innan fyra timmar, något ingen av de andra stammarna gör. S1, cykel 18, vilken nådde näst högst OD strax under det av T11 hade ett OD-värde på över två vid ungefär fem timmar, se figur 4.9(a). S2 i sin tur visade sig växa sämre än sin vildtyp efter både 3, 11 och 18 cykler, då vildtypen snabbare når ett maximalt OD, se figur 4.9(b). C1 visar ingen större förändring gentemot vildtyp samt över cykler men gav ett något bättre värde efter 3 cykler. Liknande resultat kan observeras för C2 där den efter 16 cykler samt vildtyp visar väldigt lika värden men de med färre antal cykler, 3 och 11, visar på en något bättre tillväxt, se figur 4.9(c) och 4.9(d).



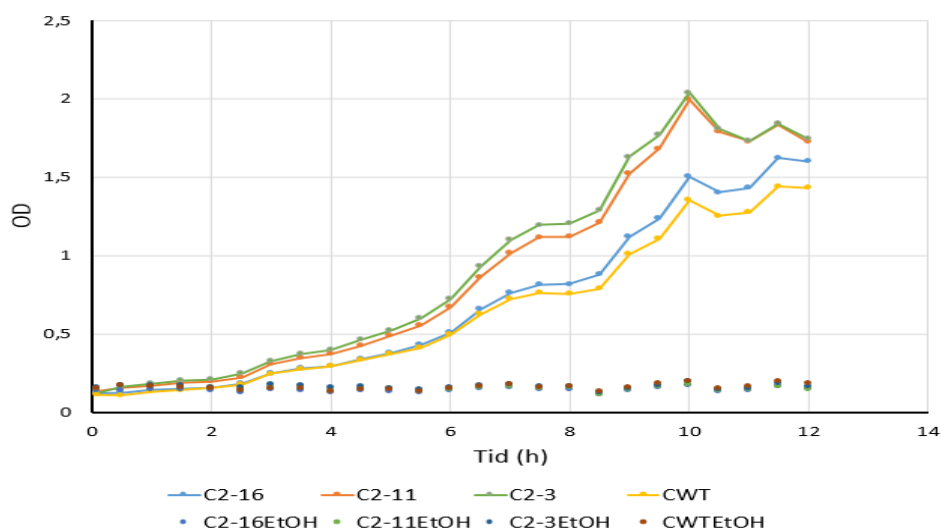
((A)) Bioscreendata med tillväxtkurvor för S1-stammar samt T11. Numret efter S1 visar på vilken cykel provet gjordes på, alltså hur många pulschocker provet utsattes för.



((B)) Bioscreendata med tillväxtkurvor för S2-stammar.



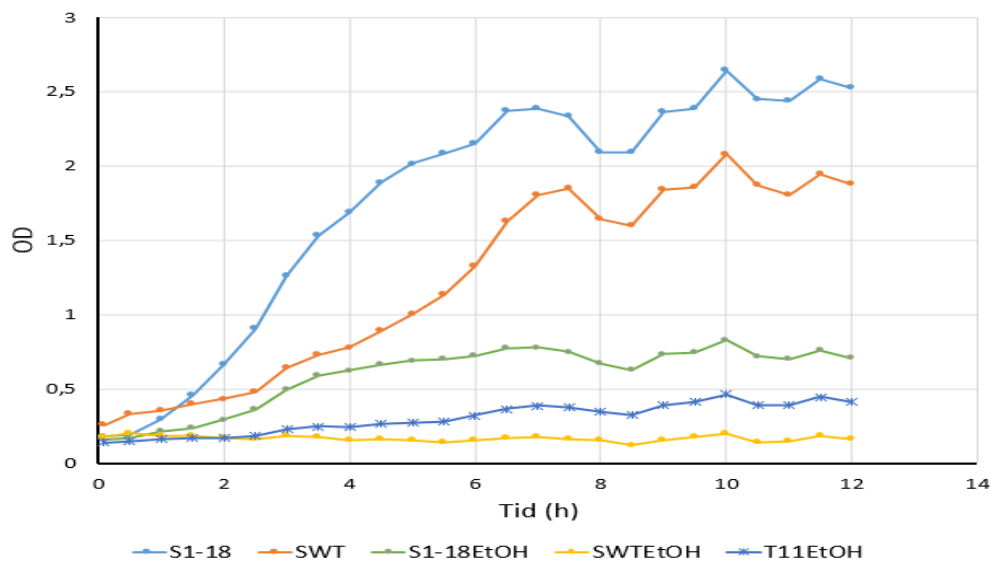
((C)) Bioscreendata med tillväxtkurvor för C1-stammar.



((D)) Bioscreendata med tillväxtkurvor för C2-stammar.

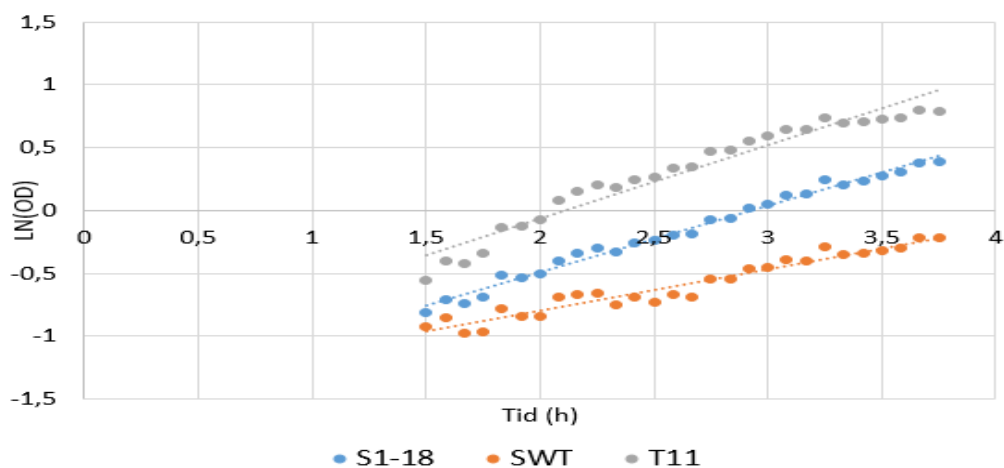
FIGUR 4.9: Plottarna visar tillväxtkurvor för S1, S2, C1 samt C2. Alla stammar, förutom S1 som plottas med T11, plottas med sin vildtyp, olika cykler i chockandet samt hur närvaron av etanol påverkade tillväxten.

S1 samt T11 visade på viss tillväxt vid närvarande av tillsatt etanol vilket presenteras i figur 4.10. S1 kan ses växa bättre än T11 med tillsatt etanol men sämre än SWT utan tillsatt etanol.

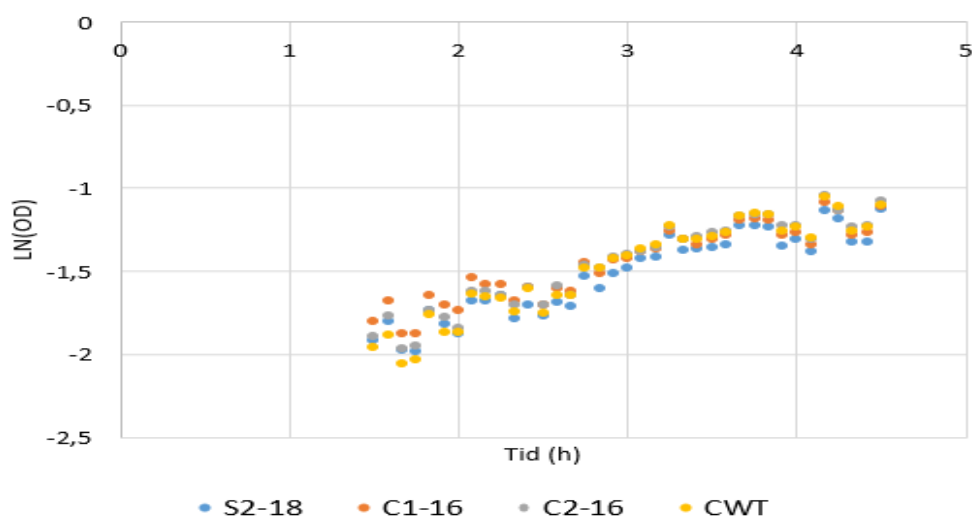


FIGUR 4.10: Figuren visar hur S1 förhåller sig gentemot sin vildtyp. Grafen visar även tillväxten hos S1, SWT och T11 vid närvaro av etanol.

Med hjälp av tillväxtkurvorna och OD över tid kan generationstiden beräknas genom att ta logaritmen av OD-data. Generationstider för S1 och S2, cykel 18, C1 och C2, cykel 16, SWT, CWT och T11 beräknades. Alla utan extra tillförd etanol, se figur 4.11. Generationstider från graferna beräknades till 1 timme och 12 minuter för T11, 1 timme och 18 minuter för S1, 2 timmar och 6 minuter för SWT samt en approximativ generationstid för resterande på 2 timmar och 42 minuter, se tabell 4.2. Detta stödde teorin att S1 blivit kontaminerad, dock var den snabba tillväxten hos T11 ett oväntat resultat.



((A)) Approximation av tillväxthastigheten för S1, T11 samt SWT.



((B)) Approximation av tillväxthastigheten för S2, C1, C2 samt CWT. Alla fyra stammar observeras ha liknande tillväxthastighet.

FIGUR 4.11: Approximation av tillväxthastigheten för S1, S2, C1, C2, SWT, CWT samt T11.

TABELL 4.2: Beräknade μ -värden för stammarna C1, C2, S1, S2, CWT, SWT och T11. Beräknat utifrån tillväxtkurva erhållna från bioscreen-försöket. Generationstid beräknad från specifik tillväxtfaktor.

Storheter	T11	S1	SWT	Resterande
$\mu \text{ (h}^{-1}\text{)}$	0,58	0,53	0,33	0,26
G (h)	1,2	1,3	2,1	2,7

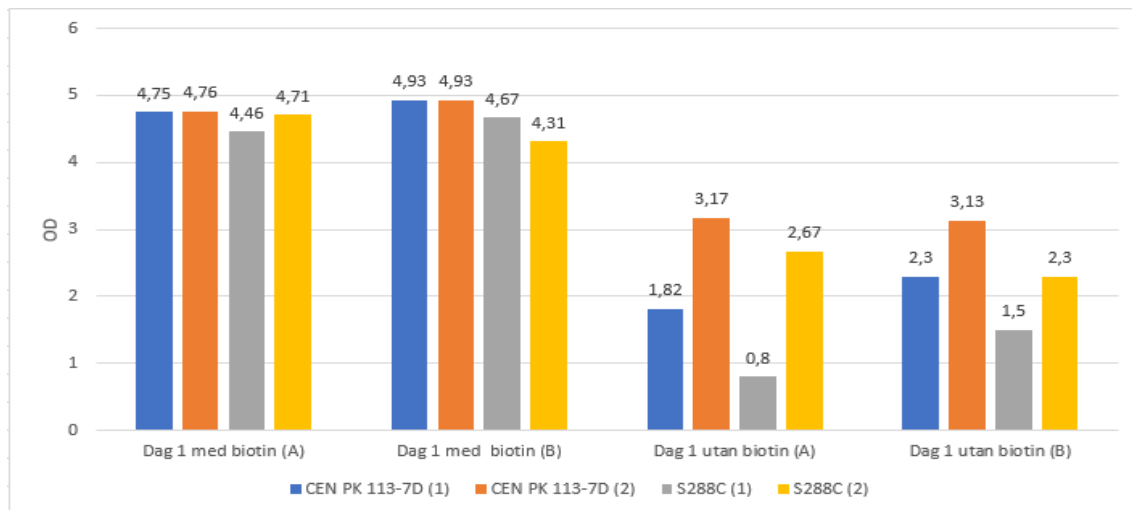
Mycket stor skillnad fanns mellan de manuellt uppmätta och de beräknade OD-värdena från bioscreenproverna. Alla de manuella värdena mättes mot en blank som togs från bioscreenen. De manuella OD-mätningarna gjordes som en kontroll men gav inget tydligt resultat, se tabell 4.3.

TABELL 4.3: En manuell OD-mätning jämförs med det sista uppmätta OD-värdet från bioscreenen. De manuella OD-värdena uppmättes 1 timme efter sista mätningen från bioscreenen.

Stam	Cykel	OD från spektrofotometer	OD-mätningen från Bioscreenen
S1	18	3,38	2,170
S2	18	0,94	1,632
C1	16	2,20	1,336
C2	16	0,72	1,539
Swt	-	0,86	1,712
S1 +EtoH	18	0,82	0,780
S2+EtoH	18	0,56	0,242
C1 +EtoH	16	0,22	0,189
C2 +EtoH	16	0,58	0,173
Swt +EtoH	-	0,10	0,201

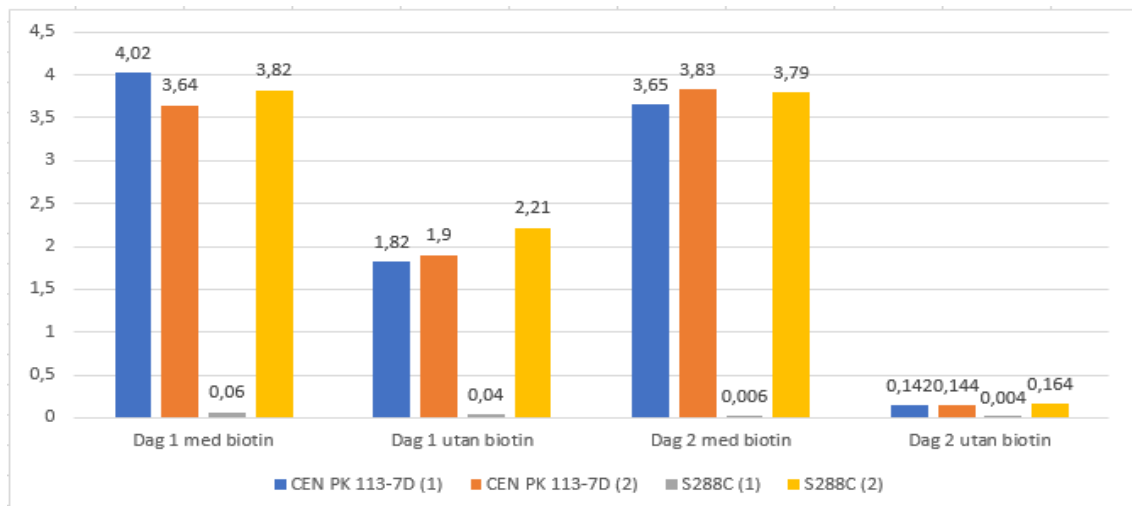
4.6 Kors-kontaminationstest

Odlingar med biotinfria medium utfördes för att undersöka om korskontamination skett då CEN.PK113-7D ska kunna växa utan tillsatt biotin, något S288C ska ha svårare för. Vid frånvaro respektive närvaro av biotin i en vitaminlösning erhöles efter en övernattsodling att C2 överlevde bäst utan biotin med ett OD över 3. S1 gav det sämsta värdet på 0,8 respektive 1,5. S2 observeras ha högre OD vid avsaknaden av biotin än C1 vilket är ett oväntat resultat, se figur 4.12. Med biotin överlevde all jäst markant bättre med OD över 4 för samtliga prov.



FIGUR 4.12: Resultat av en övernattsodling med de senaste cyklerna av S288C samt CEN.PK113-7D. Hälften av proverna odlades i ett YP-medium med biotin och andra hälften i ett YP-medium utan.

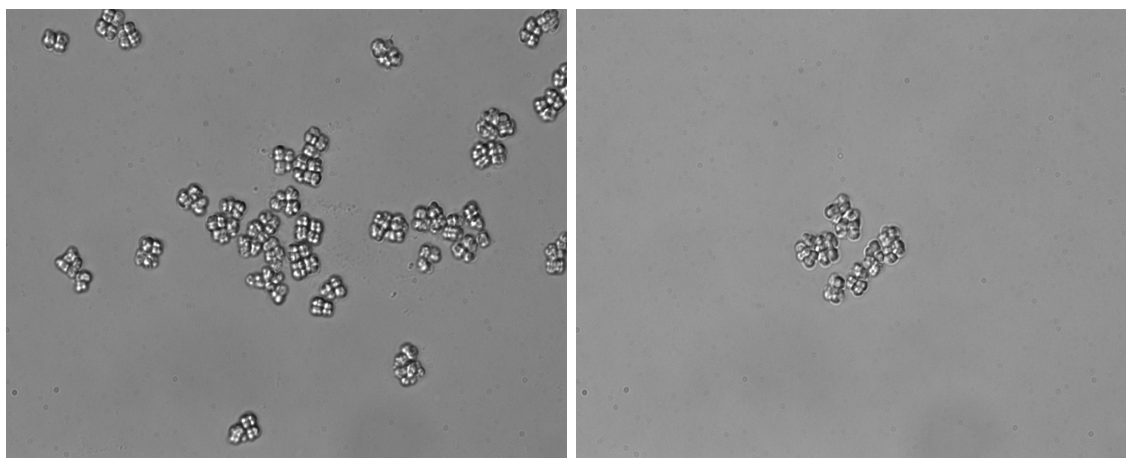
Eftersom cellerna har biotinreserver gjordes ännu ett test med biotinfritt medium men över två övernattskulturer istället för en. Från detta försök erhöles att alla stammar klarade sig mycket sämre utan biotin efter första dagen i jämförelse med första försöket i figur 4.12. Sämst observerades S1 vara då den ej överlevde första odlingen varken med eller utan biotin vilket antyder att något fel skett i utförandet. Efter andra odlingen fås nästan inget OD hos någon av stammarna vilka odlades utan biotin medan de som odlades med biotin fortsatte producera normala OD-värden, se figur 4.13



FIGUR 4.13: Resultat efter två dagars odling med de senaste cyklerna av S288C samt CEN.PK113-7D. Proverna odlades i ett YP-medium, hälften med biotin och andra hälften utan.

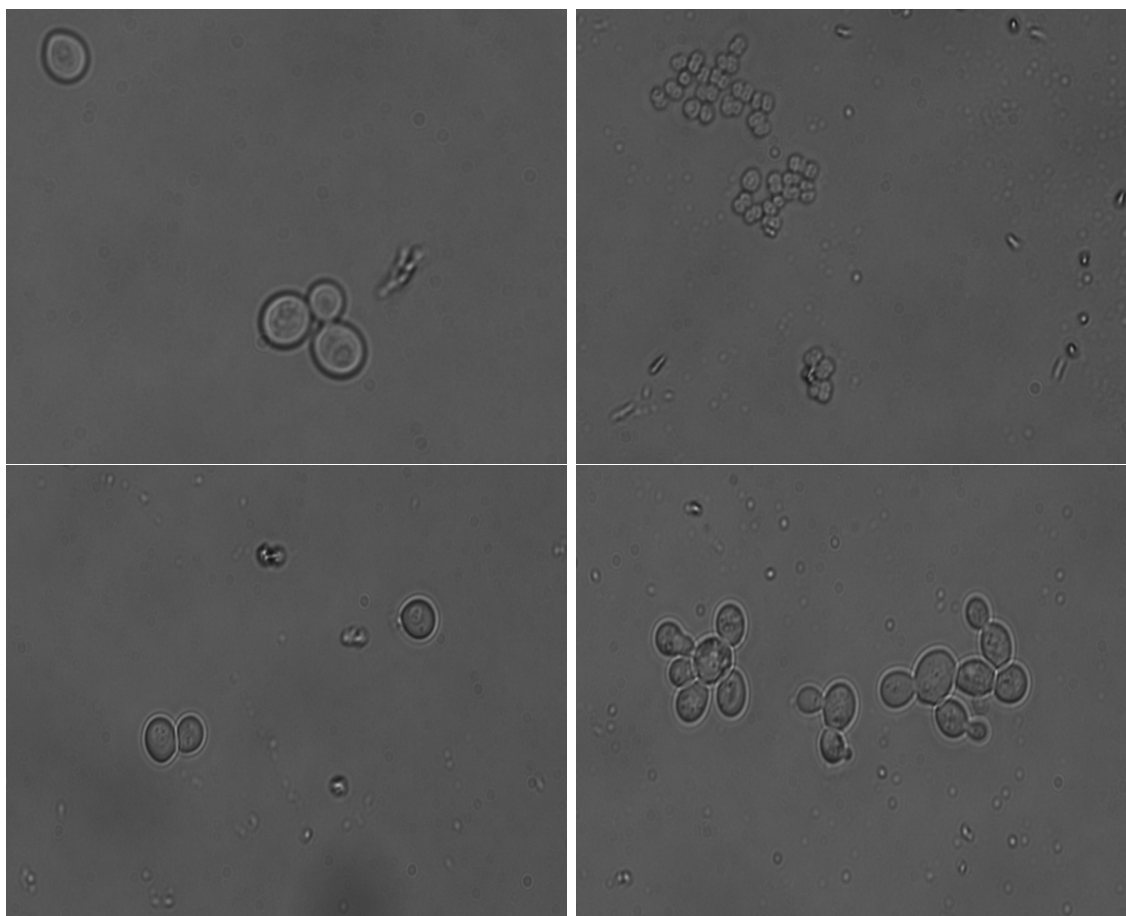
4.7 Mikroskopi

Bilder togs på stammarna S1 och T11 med 1000x förstoring för att titta på cellernas morfologi och för att leta efter potentiell kontaminering av bakterier. Det observerades att cellstorleken minskat kraftigt samt att cellerna klumpat ihop sig i mindre grupper efter att ha blivit utsatta för en hög temperatur, i detta fall 45°C, se figur 4.14.



FIGUR 4.14: T11 t.v. och S1 cykel 19 t.h. efter 45 graders chock. Se fig 4.15 för jämförelse av S1 odlad över natt i 30°C

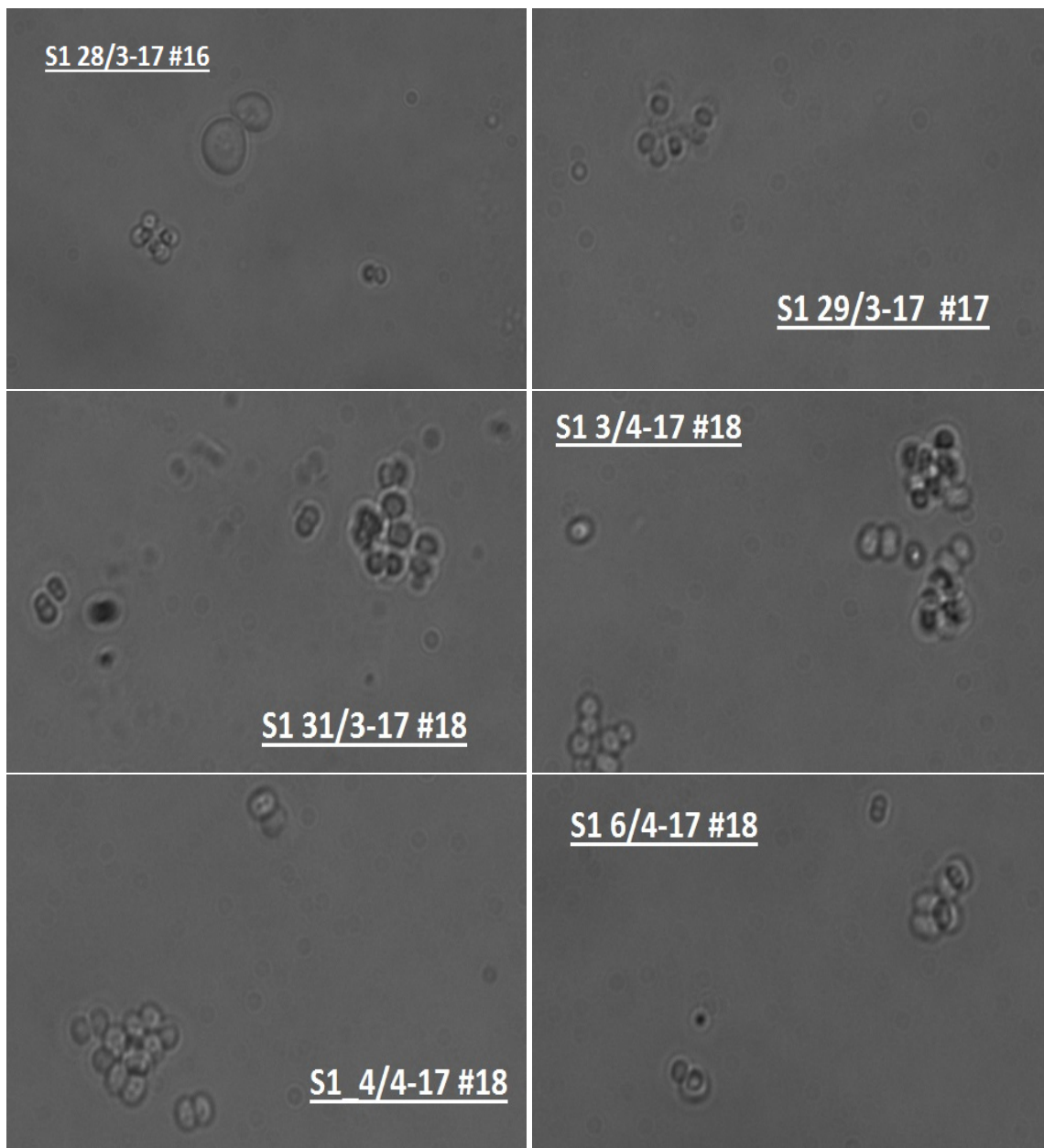
Storleksskillnaden mellan stammarna SWT, S2, S1 och C2 observerades i mikroskop. S1 observerades vara mycket mindre än de tre andra stammarna. De kulturer som visas i figur 4.15 var tagna från HPLC-test efter 21 timmar i satsvis odling. Den misstänkta kontaminationen kan ha påverkat resultatet från HPLC-försöket. C2 observerades ha liknande storlek som SWT men klumpade ihop sig mer, inte helt olik S1, den visade även på en avvikande form.



FIGUR 4.15: Jämförande av stammarna SWT (överst t.v.), S1 (överst t.h.), S2(botten t.v.) och C2(botten t.h.). Bilderna togs efter en övernattsodling vid 39,5°C. Alla tre proverna S1, S2 och C2 verkar ha blivit kontaminerade av bakterier, vilka kan ses som mindre och avlånga prickar på bilderna. Detta är extra synligt hos S1. C2 visar inte på samma morfologi men klumpar ihop sig på samma sätt som S1.

Förändringen hos S1 undersöktes genom att titta på flera olika cykler av stammen i hopp om att finna när kontamination skett. Bilderna i figur 4.16 visar S1 över de tre sista cyklerna. En klar skillnad i storlek hos stammen kan observeras från 28 mars, cykel 16, jämfört med övriga stammar då dessa krympt i storlek. Såsom i figur 4.14 verkar

värmestress påverka, alternativt att cellerna fått en mutation som påverkar, cellstorleken för värmeresistens.



FIGUR 4.16: Bilder på upptinade stammar av S1. De har alla odlats i övernattskultur vid 30°C innan bilderna togs. De utskrivna datumen visar då dessa stammar blev nedfrusna. #n visar vilken cykel de tillhör.

Diskussion

5.1 Till vilken utsträckning lyckades ALE-processen?

De två jäststammarna visade sig tidigt tåla chocker på 40°C väldigt bra vilket ledde till ett beslut om att ändra målet till att nå 45°C. Detta föranledde att chockerna tog ett snabbt kliv från 35°C till 39°C, där återupptogs chockrutinen av en 5 timmar lång chock följt av övernattningsodling i YPD-medium. Resultat av chockerna visade att jästen lätt anpassade sig till chocker av temperaturer på detta sättet långt över 40°C vilket tyder på att ALE-processen lyckats med att öka deras tolerans mot stress applicerad genom pulser. Dock kvarstod frågan om stammen blivit bättre på att överleva i högre temperaturer under längre tid, samtidigt som den ska kunna producera en önskvärd mängd etanol. För att få svar på detta gjordes tester med hjälp av en bioscreen samt en HPLC.

Det visade sig dock att det inte var lätt att bekräfta om metoden lyckats öka jäststammarnas tolerans mot värme under längre tidsintervall och om de behållit sin goda etanolproduktion. Detta eftersom testerna från både bioscreen och HPLC uppvisade förbryllande resultat. Från bioscreen erhöles att S1 och T11 uppvisade väldigt lika tillväxtkurvor även om S1 hade en något lägre tillväxthastighet, vilket antydde att S1-stammen utvecklat en bra förmåga att tillväxa vid 39°C. Vad som ytterligare kunde observeras från bioscreenresultaten är S1:s etanolresistens vid 39°C vilken är högre än den för T11. De övriga stammarna tillväxte också men inte alls i det höga tempo som S1 och T11 uppvisade. S2 visade på en sämre tillväxt än sin vildtyp vilket antyder mot att metoden inte alltid fungerat. Varför S2 blivit sämre än sin vildtyp vid höga temperaturer är osäkert. Detta då den både vid färre samt fler chocker gav liknande resultat i tillväxtkurvorna kan det antas att något hände väldigt tidigt i det laborativa arbetet som gjort stammen sämre varefter den inte förändrats mycket alls. Det kan tänkas att S2, istället för att anpassat sig till att tillväxa och dela sig vid höga temperaturer fått en mutation som enbart hjälper den överleva de höga temperaturerna i väntan på en mildare temperatur. Denna slutsats drogs eftersom att S2 klarat pulschockerna väldigt bra på 45°C. C1 och C2 visade tillväxtkurvor som

växer snabbare för cykel 3, samt 11 för C2, men vid cykel 16 börjar de återigen likna sin vildtyp. Detta misstänks kunna bero på för långa återhämtningstider mellan chockerna.

S1-stammens resultat från HPLC-testet var återigen väldigt avvikande. Stammen började med att tillväxa väldigt fort för att sedan nästan helt stanna upp efter endast 4 timmar. Medan de övriga stammarna fortsatte att tillväxa i god takt tills följande morgon. Dessutom var S1:s glukoskonsumtion och etanolhalt extremt låg, samtidigt som acetathalten var väldigt hög. Problemet är att acetat främst bildas som en biprodukt när jäst producerar etanol från glukos och glukoshalten sjönk knappt under tiden acetat producerades. Det är mer troligt att den höga mängden acetat beror på kontamination av en okänd mikroorganism som tillväxer på annan metabolit än glukos och som därmed inte observerades i HPLC:n.

Från dessa två tester visade det sig att T11 stammen var klart bäst gällande mängd producerad etanol gentemot förbrukade mängd glukos. De flesta av de modifierade stammarna, med S1 som strikt undantag, hade god etanolproduktion men en markant lägre tillväxt. Detta tillsammans med att de modifierade stammarna inte producerade lika mycket acetat som T11 leder till en intressant observation. Mätningarna indikerar att C1, C2, och S2 klarar av att producera nästan lika stor mängd etanol som T11 men med en lägre cellkoncentration. Från detta dras slutsatsen att antingen producerar jästen en annan ej undersökt metabolit eller så har de förbrukat mycket glukos för underhållsprocesser. Det är svårt att avgöra om detta är en fördel gentemot T11-stammen utan att göra fler tester. Detta tyder på att ALE-metoden med pulsstress kan ha fungerat och givit en annorlunda förändring än den som togs fram genom kontinuerlig stress. HPLC-mätningarna visade dock att vildtyper av CEN.PK113-7D samt S288C också producerade nästintill identisk mängd etanol som sina chockade variationer vilket tyder på att metoden som användes inte påverkar etanolproduktionen särskilt mycket för de stammarna som användes. Detta tillsammans med att OD-observationerna för samtliga stammar erhöll liknande värden mellan vildtyp och chockade stammar leder till slutsatsen att chockerna inte verkar ha resulterat i någon större förbättring på deras förmåga att tillväxa eller producera etanol vid 39°C i en satsvis odling under 21 timmar.

5.2 Problem kring det laborativa arbetet

Något som haft stor effekt på utförandet av det laborativa arbetet var tillgång till material. Labbet delades med många forskare och masterstudenter samt ytterligare en kandidatgrupp a 6 personer. Detta ledde till att labbytan, som är avsedd för ordinarie forskare, fick nu delas med ytterligare tio personer. Till en början var båda kandidatgrupperna tvungna att dela på endast två pipetter, detta ledde till ett mycket långsamt uppstartande av det laborativa arbetet. Utöver detta så var bokningen av LAF-bänkar, PCR-maskiner, shakers, thermal shakers, bioscreens, HPLC:n samt mikroskop en faktor som hindrade mycket av det planerade arbetet. Även det faktum att vi ej hade tillträde till lokalerna efter klockan 16:45 på vardagar samt inget tillträde på helger vilket satte en gräns på den tid jästen kunde chockas. Från början var det tänkt att använda en skakinkubator för att chocka jästproverna, vilken inte fanns tillgänglig för bokning under så lång tid. För att lösa detta användes en PCR-maskin vilken fyller samma funktion, hettar upp proverna till en förbestämd temperatur, dock skakas inte proverna i PCR-maskinen. Detta ledde till att en pellet formades på botten av röret under samtliga chocker. Vilka effekter pelletbildning kan ha haft på värmetåligheten hos cellerna är ej känt men det kan tänkas öka värmeresistensen då cellerna ligger närmare varandra och bildar en biofilmliknande struktur. Vill man kunna applicera forskningen på omrörda odlingar så är detta något man måste ta hänsyn till.

På grund av begränsad tillträde till labbet kunde chockerna ej göras kontinuerligt. Jäststammarna behövde därmed sparas i -80°C frys över varje helg. Det behövdes en övernattskultur från torsdagen till fredagen för att skapa en stock att använda på måndagen. Första chocken som kan göras varje vecka är då på tisdagen eftersom en fräsch övernattskultur behövs inför chocken. En följd av detta är också att kulturerna får tillbringa totalt 36 timmar i 30°C utan pulschock. Den långa vänttiden kan tänkas påverka den adaptiva evolutionen då inte lika stor press sätts på jästen.

5.3 Bioscreen

Både erhållet värde för generationstiden hos S1 samt T11 var kortare än teoretiskt beräknade värden och misstänks därmed vara inkorrekt då dessa låg under två timmar. Generationstiderna för S1 och T11 är så låga att utan fler tester kan inget sägas och något fel antas ha skett. 1 timme och 12 minuter är otroligt lågt för stammen T11 och stämmer inte överens med tidigare uppmätta värden för stammen vid 39,5°C. Samma slutsats dras även för S1 som har en liknande generationstid. Generationstiden för SWT som ligger strax över två timmar och ses som mer trolig även om detta verkar vara mycket lågt. Då jästen varit i 39,5°C vilket är en hög temperatur som påfrestar jästen så bör generationstiden bli längre vilket inte verkar vara fallet för dessa tre i bioscreentesterna. För resterande prover togs ett approximativt värde då alla visade på mer eller mindre samma tillväxthastighet, vilket gav generationstiden 2 timmar och 42 minuter vilket är närmare det som förväntades.

Det var många oklarheter som kan ha bidragit till felaktiga värden när bioscreenen genomfördes. Vaxkak-plattan som användes gjorde det mycket lätt att blanda ihop brunnar. Detta då plattan innehåller 100 stycken brunnar utan individuell märkning vilket ökar risken för att brunnarna blandas ihop vid pipetteringen. Så trots att arbetet skedde långsamt och mycket metodiskt, kändes stor osäkerhet då proven pipetterades i respektive brunnar. Det finns en möjlighet att prover kan ha missplacerats och därmed avlästs fel. Dock erhålls resultat som stämmer överens med tidigare resultat från OD-mätningar. Om ett fel har skett så verkar det inte haft en stor effekt på resultatet överlag och det förklarar ej de korta generationstiderna för S1 och T11. Efter experimentets genomförande noterades att det bildats ett lager av celler på botten av brunnarna utan etanol. Det är oklart varför detta skedde då skakning ingick i bioscreenen men det misstänks att cellkoncentrationerna i brunnarna blivit för höga vilket resulterat i att celler fallit till botten. Då de brunnar med etanol haft en väldigt låg tillväxt har dessa inte nått samma koncentration och därmed inte bildat ett bottenlager. Eftersom det inte fanns möjlighet att vortexa brunnarna utanför maskinen då manuella OD-mätningar togs så antas de OD-mätningar som utfördes efter bioscreen ge ett lägre värde än det verkliga, se tabell 4.3.

5.4 Kontamination

5.4.1 Korskontamination

Under experimentens gång har vi alltid försökt undvika kontaminering. För att dubbelkolla att ingen korskontaminering eller annan kontamination skett hos stammarna gjordes ett antal tester. Från biotintestet förväntades det att S288C inte skulle kunna tillväxa lika bra som CEN.PK113-7D i mediet vilket saknade biotin. När testet gjordes första gången skedde ett misstag vilket var att cellernas biotinreserver inte togs i åtanke. För att göra testet bättre skulle cellerna behöva överföras från den biotinfria lösningen till en ny biotinfri lösning upprepade gånger för att se en överlevnad över en längre period än en övernattskultur. På en kortare tidsperiod såsom en övernattskultur är det svårare att dra en klar slutsats över om kontaminering har skett eller inte men oavsett så förväntades CEN.PK113-7D prestera bättre än S288C vid avsaknad av biotin. Detta var inte alltid fallet då S2 gav högre OD än C1. Det kan tänkas att kontamination skett i ett av proverna alternativt båda. Då det var osäkert hur stor biotinreserv cellerna i vardera prov haft så finns det fortfarande en möjlighet att korskontamination inte skett. S1 som gav det minsta OD-värdet kan då antas inte vara kontaminerat av CEN.PK113-7D men ännu en gång skulle en längre odlingstid behövas för att dra en slutsats med större säkerhet. För att göra om detta test föreslås att göra fyra övernattskulturer med startkoncentration på 0,05 g/L celler med provtagning i slutet av varje satstagning, detta för att ta ut biotinreserverna och se om cellantalet konstant sjunker mot noll eller stabiliserar sig med tillväxt. Ett annat fel som skedde var vid tillberedningen av det biotinfriamediet där pH inte justerades innan *myo*-Inositol tillsattes enligt bilaga B.4 vilket kan ha påverkat vitaminlösningen i mediet.

För att få ett mer konkret resultat så utfördes testet en gång till, dock genomfördes inte den med större förändring på grund av tidsbrist. Denna gången fick jästen tillväxa två gånger i övernattskulturer med och utan biotin samt att mediet byttes mellan dag ett och två. En klar skillnad kunde noteras mellan proverna med biotin och dem utan. Dock verkar det som att ett misstag skett när det gäller inokuleringen av S1-stammen. Det visade sig att OD-värdet för S1 var omkring 0,1 för både det biotinfria mediet och mediet med biotin.

Det är extremt osannolik att även om S1 var kontaminerad av en mikroorganism att den ej skulle klara av att överleva i mediet. Därför dras slutsatsen att ett misstag skett vid inokulering. Vad gäller biotintestets resultat för övriga stammar så går det tyvärr inte att dra några konkreta slutsatser. CEN.PK113-7D-stammarna och S2 visade sig ha ungefär samma tillväxt efter två dagar med och utan biotin. Efter andra övernattsodling utan biotin verkar ingen av stammarna tillväxt särskilt bra vilket kan innebära att CEN.PK113-7D-stammarna blivit korskontaminerad av S288C, en säker slutsats kan dock inte dras. Efter testets gång har det insetts att även vildtyperna för de två stammarna borde inkluderats i testet som kontroll.

5.4.2 Okänd kontamination

Från första biotintestet erhöles ovanligt låga OD-värden hos S1 efter endast en övernattsodling vilket ledde till att en fråga om den var kontaminerad av något annat än jäst ställdes. För att undersöka om en okänd mikroorganism förekom i provet användes ett mikroskop med 1000x förstoring. Till en början misstänktes S1 ha blivit kontaminerad redan efter värmechock 13 eftersom S1 redan vid denna punkt visat på en bättre tillväxt. Om provet vid denna tid faktiskt varit kontaminerat eller ej var oklart, detta undersöktes med hjälp av mikroskopi, se figur 4.16.

Det intressanta med bilderna är att S1 verkar ha krympt i jämförelse med övriga stammar, detta kan även ses i figur 4.15. Detta antogs först vara en kontamination av bakterier, då bakterier ofta är mindre i storlek än jäst. Dock så visar figur 4.14 att även T11, en stam som antas vara okontaminerad då den nästan uteslutande har hållits nedfrusen, hade krympt. Att S1 och C2 verkade klumpa sig var också intressant. Detta antogs vara ytterligare ett sätt att hantera temperaturstressen.

Enligt tidigare observationer kan värmechocker leda till att jäst krymper till halva sin initiala volym. Eftersom detta projekt fokuserar på att utsätta jäststammarna för just värmechocker så verkar inte S1-stammens storlek lika orimlig längre. Under bioscreenförsöket observerades T11 och S1 ha stora likheter vad det gällde tillväxt vid högre temperaturer.

Under HPLC-experimentet misstänktes kontamination ha skett i proverna av S1 och S2. Detta då små avlånga prickar observerades bland jästen då proverna undersöktes med mikroskopi, se figur 4.15. Detta skulle kunna förklara den näst intill obefintliga koncentrationen av etanol samt den otroligt snabba OD-ökningen hos S1. Något som är oklart är dock hur resterande stammar ej verkar ha förlorat förmågan att producera etanol, då prickarna tycks ha förekommit i flera prover. Dock kan det även tänkas att prickarna som sågs genom mikroskopet kan ha uppkommit från orenheter på objektglaset varpå proven placerades.

5.5 Felkällor och framtida forskning

Många saker i arbetet skulle kunna förbättras för framtida forskning eller om arbetet skulle göras om idag. Mycket av metoden utvecklades under arbetets gång och fel rättades efterhand då de upptäcktes. Exempel på sådana fel som rättats till är att ett bestämt OD använts under chockerna för att kunna titta på hur väl de olika jäststammarna klarat värmechockerna och inte enbart om de överlevt vilket var fallet i början. Optimalt vore även att ha åtminstone ytterligare ett till prov av varje jäststam vilket skulle öka antalet jäststammar från fyra till sex stycken. Samt ta dessa från olika kolonier på den ursprungliga agarplattan, vilket inte gjordes under arbetets start av misstag. Genom att ta olika kolonier från vildtyp fås olika startgenom och därmed en bredare syn på hur metoden fungerar. Fler chocker skulle behöva göras för att optimera jäststammarna bättre, detta gjordes inte i arbetet på grund av tidsbrist. Något som skulle kunna göras för fortsatt optimering av jäststammarna vore att fortsätta värmechockerna med mindre steg och kortare chocktid. De som klarat av att anpassa sig kan odlas på agarplatta där nya kolonier tas ut. Det kan förväntas att jästen i lösningen har muterat på många olika sätt och alla celler bär inte på samma mutation. Genom att återigen dela upp celler i kolonier kan arbetsmetoden upprepas tills en effektiv jäststam erhållits eller tills metoden motbevisats alternativt funnits för ineffektiv. Det finns många alternativa vägar att gå och tester att utföra för att få en större förståelse för ALE och värmeresistens hos jäst.

5.6 Slutsats

Sammanfattningsvis så är det svårt att dra några slutsatser om hur väl ALE-metoden fungerar då våra erhållna resultat från de olika experimenten är motsägelsefulla. Det vi kan observera är att jäst har en otrolig förmåga att tåla värmechocker, hela vägen upp till 45°C i fem timmar, trots att den höga temperaturen lägger stor stress på dem. För att kunna dra några konkreta slutsatser om metoden borde försöken göras om flera gånger med flera kolonier från varje stam och över en längre tidsperiod för att få mer tillförlitlig data. Arbetet har även hjälpt oss i utvecklandet av vår laborativa kunskap och planering av experiment. Avslutningsvis anser vi att detta har varit ett oerhört lärorikt arbete trots att resultaten inte givit ett klart svar över metodens applicerbarhet.

Litteraturförteckning

- [1] Mark JJ. Beer in the Ancient World. Ancient History Encyclopedia; 2011. Available from: <http://www.ancient.eu/article/223/>.
- [2] Mapelli V, editor. Yeast Metabolic Engineering. 1st ed. Göteborg: Humana Press; 2014.
- [3] Alba-Lois L, Segal-Kischinevsky C. Yeast Fermentation and the Making of Beer and Wine. Nature Education. 2010;3(9):17. Available from: <https://www.nature.com/scitable/topicpage/yeast-fermentation-and-the-making-of-beer-14372813>.
- [4] Marques WL, Raghavendran V, Stambuk BU, Gombert AK. Sucrose and *Saccharomyces cerevisiae*: A relationship most sweet. FEMS Yeast Research. 2015;16(1).
- [5] Renewable Fuels Association. Industry Statistics; 2017. Available from: <http://www.ethanolrfa.org/resources/industry/statistics/#1454099103927-61e598f7-7643>.
- [6] ICM INC. Ethanol Production Process; 2012. Available from: <http://www.icminc.com/innovation/ethanol/ethanol-production-process.html>.
- [7] Tesfaw A, Assefa F. Current trends in bioethanol production by *Saccharomyces cerevisiae* : substrate, inhibitor reduction, growth variables, coculture, and immobilization. International Scholarly Research Notices. 2014;2014:11.
- [8] Lopes ML, Paulillo SCdL, Godoy A, Cherubin RA, Lorenzi MS, Giometti FHC, et al. Ethanol production in Brazil: a bridge between science and industry. Brazilian journal of microbiology. 2016 12;47(Suppl 1):64–76.

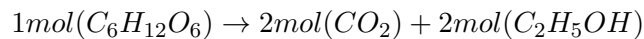
-
- [9] Abdel-Banat BMA, Hoshida H, Ano A, Nonklang S, Akada R. High-temperature fermentation: How can processes for ethanol production at high temperatures become superior to the traditional process using mesophilic yeast? *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2010;85(4):861–867.
- [10] Abreu-Cavalheiro A, Monteiro G. Solving ethanol production problems with genetically modified yeast strains. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2013;44(3):665–671.
- [11] Caspeta L, Chen Y, Ghiaci P, Feizi A, Buskov S, Hallström BM, et al. Altered sterol composition renders yeast thermotolerant. *Science*. 2014;246(6205):75–78.
- [12] Caspeta L, Nielsen J. Thermotolerant yeast strains adapted by laboratory evolution show trade-off at ancestral temperatures and preadaptation to other stresses. *mBio*. 2015;6(4).
- [13] Çakar ZP, Turanli-Yildiz B, Alkim C, Yilmaz Evolutionary engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for improved industrially important properties. *FEMS Yeast Research*. 2012;12(2):171–182.
- [14] Sonderegger M, Sauer U. Evolutionary Engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for Anaerobic Growth on Xylose. *Applied and environmental microbiology*. 2003;69(4):1990–1998.
- [15] Wenger JW, Piotrowski J, Nagarajan S, Chiotti K, Sherlock G, Rosenzweig F. Hunger artists: Yeast adapted to carbon limitation show trade-offs under carbon sufficiency. *PLoS Genetics*. 2011;7(8).
- [16] Cinar A, Parulekar SJ, Undey C, Birol G. *Batch Fermentation: Modeling: Monitoring, and Control*. 1st ed. New York: Marcel Dekker; 2003.
- [17] Nijkamp JF, van den Broek M, Datema E, de Kok S, Bosman L, Luttik MA, et al. De novo sequencing, assembly and analysis of the genome of the laboratory strain *Saccharomyces cerevisiae* CEN.PK113-7D, a model for modern industrial biotechnology *Saccharomyces cerevisiae* CEN.PK113-7D, a model for modern industrial biotechnology. *Microbial Cell Factories*. 2012;11(36). Available from: <http://www.microbialcellfactories.com/content/11/1/36>.

-
- [18] Mortimer RK, Johnston JR. Genealogy of principal strains of the yeast genetic stock center. *Genetics*. 1986;113(1):35–43.
- [19] Milo R, Phillips R. *Cell Biology by the Numbers*. 1st ed. Garland Publishing Inc; 2015. Available from: <http://book.bionumbers.org/>.
- [20] Adya AK, Canetta E, Walker GM. Atomic force microscopic study of the influence of physical stresses on *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*. *FEMS Yeast Research*. 2006;6(1):120–128.
- [21] Warringer J, Blomberg A. Automated screening in environmental arrays allows analysis of quantitative phenotypic profiles in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. 2003;20:53–67.
- [22] Clark DP, Pazdernik NJ. *Biotechnology*. 2nd ed. London: Academic Cell; 2016. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/book/9780123850157>.
- [23] Atkins P, de Paula j, Friedman R. *Physical Chemistry: Quanta, Matter and Change*. 2nd ed. Oxford: OUP Oxford; 2013.
- [24] Myers JA, Curtis BS, Curtis WR. Improving accuracy of cell and chromophore concentration measurements using optical density. *BMC Biophysics*. 2013;44(3):665–671. Available from: <http://www.biomedcentral.com/1757-5036/6/4>.

Bilaga 1 - Uträkningar

A.1 Beräkning av exoterm energiutveckling vid fermentation

Alla entalpier samt vattens specifika värmekapacitet är hämtade från Physical Chemistry: Quanta, Matter and Change.^[23] För att förstå en del av intresset för en ökad värmetolerans hos jäst är den exoterma energiutveckling viktig. Första beräkningen görs för att se hur mycket energi som frigörs när glukos fermenterar till koldioxid samt etanol. Sedan beräknas hur denna värmeenergi påverkar temperaturen i reaktorn. Denna uträkning görs med antagandet att vi har 1 mol glukos i 1 liter vatten, vilket ungefär motsvarar 1 kg.



$$\Delta H^0(C_6H_{12}O_6) = -1274 \frac{\text{kJ}}{\text{mol}}$$

$$\Delta H^0(CO_2) = -393,5 \frac{\text{kJ}}{\text{mol}}$$

$$\Delta H^0(C_2H_5OH) = -277,5 \frac{\text{kJ}}{\text{mol}}$$

$$\Delta H_{Tot} = \Delta H_{Prod.}^0 - \Delta H_{Reak.}^0 = (2 \times (-393,5) + 2 \times (-277,5)) - (-1274) = -71,4 \frac{\text{kJ}}{\text{mol}}$$

Från detta ser vi att den utvecklade värmeenergin från reaktionen blir $71,4 \frac{\text{kJ}}{\text{mol}}$ denna energi går då åt att värma 1 liter vatten enligt följande,

$$n \times \Delta H = m \times C_p \times dT$$

$$n(C_6H_{12}O_6) = 1\text{mol}$$

$$m(H_2O) = 1\text{liter} \approx 1\text{kg}$$

$$C_p(H_2O) = 4,184 \frac{\text{kJ}}{\text{kg} \times K}$$

$$\Delta H = -\Delta H^0 = 71,4 \frac{\text{kJ}}{\text{mol}}$$

$$dT = \frac{n \times -\Delta H_{Tot}^0}{m \times C_p} = \frac{1 \times 71,4}{1 \times 4,184} = 17,1^\circ C$$

A.2 Beräkning av medelvikten hos en jästcell

Från boken Cell Biology by the Numbers[19] togs det fram att en normalstor knoppningsjäst hade en volym på mellan 30-100 μm^3 samt en densitet mellan 1,08-1,1 g/cm^3 . Med detta kunde en medelvikt för en jästcell beräknas till.

$$m = V \times \rho = 65 \times 10^{-18} \text{m}^3 \times 1,09 \times 10^6 \frac{\text{g}}{\text{m}^3} = 7,085 \times 10^{-11} \text{g} \approx 7,1 \times 10^{-14} \text{kg}$$

A.3 Beräkning av hur OD kopplas till biomassakoncentration (g/L)

Detta görs för att förstå hur vi kopplar OD till masskoncentrationen när vi tar proverna på våra övernattningskulturer. Hur denna korrelation ser ut undersöktes utav en grupp 2013 [24]. De undersökte sambandet mellan OD och masskoncentration för en stor mängd olika organismer och det är deras värden för jäst vi använde i det laborativa arbetet.

$$[X] = m \times OD$$

Där $[X]$ = masskoncentrationen och OD är den optiska densiteten. Med detta uppmättes korrelationsfaktorn till $\approx 0,5$ vilket är det vi använt i arbetet.

A.4 Beräkning av Specifik Tillväxtfaktor

För att skapa en förståelse för hur snabbt jäst förökade sig beräknades den specifika tillväxtfaktorn, μ_{max} , först ut teoretiskt med hjälp av generationstiden, G , vilken uppskattats ligga mellan 1,5 och 2 timmar.

$$\mu_{max} = \frac{\ln(2)}{G}$$

$$\mu_{max} = 0,347 \text{ h}^{-1}$$

Denna specifika tillväxtfaktor jämfördes senare med ett laborativt framtaget μ_{max} från en bioscreen.

A.5 Bioscreen: OD-beräkning

OD-värden erhållna från bioscreen-data behöver korrigeras och görs så enligt ekvationerna nedan[21]. De uträknade värdena presenteras i en plot i figur 4.9 och 4.10.

$$OD = OD_{measured} - OD_{blank}$$

$$OD_{corr} = OD + (0,449 * OD^2) + (0,191 * OD^3)$$

Bilaga 2 - Protokoll

B.1 Värmechockar

Detta behövs:

- Färdiga övernattskulturer
- YP-medium

Börja med att boka en LAF-bänk och plocka fram övernattskulturerna. Spraya allt som tas in i bänken med etanol och var noga med steriltekniken. Mät OD på övernattskulturerna. OBS! Det krävs troligen 20x eller 40x spädning för att nå det linjära intervallet för spektrofotometern. När OD är mätt beräkna hur mycket kultur som behövs för att nå 0,1 OD i ett 3 mL rör.

$$C1 * V1 = C2 * V2$$

Pipettera de uträknade volymerna i tomma och sterila eppendorfrör, späd med autoklaverat vatten till en jämn volym, t.ex. 100 µL. Centrifugera proven i 5000 G vid 4°C i fem minuter. Häll supernatanten i bioslasken och resuspendera i 40 mL YP, se bilaga B.5. Pipettera över lösningen till ett PCR-rör och placera detta i PCR-maskinen. Ställ in tid och temperatur och vänta tills programmet kört färdigt.

B.2 Förberedning av YPD-medium

Detta behövs:

- 20 g jästextrakt
- 40 g glukos
- 40 g baktopepton
- Vatten

Börja med att väga upp jästextraktet och baktopeptonet och lös dessa i 1 L vatten, häll i detta i en av flaskorna. För att förbereda glukoslösningen är det bra att tänka på om man har glukosmonohydrat eller inte. Om så är fallet kommer man få anpassa vikten av pulvret för att ta hänsyn till vattnets effekt. Lös upp all glukos i en liter vatten och häll i lösningen i den andra flaskan. Autoklavera båda flaskorna för att få dem sterila och blanda sedan 50/50 för att få den eftersökta koncentrationen på 10 g/L jästextrakt, 20 g/L glukos, och 20 g/L baktopepton.

B.3 Värmeresistenstest i övernattsodling

Detta behövs:

- Färdiga övernattskulturer
- YPD-medium

Börja med att boka en LAF-bänk och plocka fram övernattskulturerna. Spraya allt som tas in i bänken med etanol och var noga med steriltekniken. Mät OD på övernattskulturerna. OBS! Det krävs troligen 20x eller 40x spädning för att nå linjära intervallet för spektrofotometern. När OD är mätt beräkna hur mycket kultur som behövs för att nå 0,1 OD i ett 3 mL rör.

$$C1 * V1 = C2 * V2$$

Pipettera de uträknade volymerna i tomma och sterila 15 mL kulturtuber, späd med autoklaverat YPD-medium till 3 mL. Ställ in kulturtuber i en skakinkubator. OBS! Se till att tuberna står lutande för att undvika pelletbildning. Sätt på skakinkubatorn, ta ut proverna efter önskad tid.

B.4 Förberedning av biotinfritt medium

Detta behövs:

- MQ-vatten
- Engångs 0,2 μm cellulosafilter
- Engångs 5 mL spruta
- 20 μL 0,1 M NaOH
- 25 μL 1 M NaOH
- 25 μL 1 M HCl
- 1 mg D-Pantotensyra hemicalciumsalt
- 1 mg Tiamin- HCl
- 1 mg Pyridoxin- HCl
- 1 mg Nikotinsyra
- 0,2 mg 4-aminobensyra
- 25 mg *myo*-Inositol
- 200 mL Minimalt medium
- 40 mL Glukos
- 400 mL Ftalat-buffert

Häll upp 20 mL 0,1 M NaOH i en 100 mL bägare, använd 1 M HCl och 1 M NaOH för att justera pH-värdet till 6,5. Tillsätt en magnetomrörare och påbörja omrörning. Tillsätt följande kemikalier i ordning och under kontinuerlig omrörning: 1 mg D-Pantotensyra hemicalciumsalt, 1 mg Tiamin- HCl, 1 mg Pyridoxin- HCl, 1 mg Nikotinsyra, och 0,2 mg 4-aminobensyra. Justera pH till 6,5 med hjälp av 1 M HCl och 1 M NaOH. Tillsätt 25 mg *myo*-Inositol och justera pH åter igen till 6,5 om det behövs.

Använd en engångs 5 mL spruta och ett engångs 0,2 μ m cellulosafilter för att filtrera 1 mL av lösningen till en 1 L bägare. Sätt på omrörning (200 rpm) och 30°C. Tillsätt 200 mL minimalt medium, 40 mL glukos, och 400 mL ftalat-buffert. Slå av omrörning när alla ingredienser löst upp sig.

B.5 Förberedning av YP-medium

Det behövs:

- 20 g jästextrakt
- 40 g bactopecton
- Vatten

Börja med att väga upp jäst extraktet och bactopectonet och lös dessa i en liter vatten, häll i detta i en 1 L flaska. Autoklavera flaskan för att få den steril.