



CHALMERS

CRISPR/Cas9 för introduktion av metaboliska vägar som möjliggör konsumtion av ättiksyra och xylos i *Saccharomyces cerevisiae*

Kandidatarbete BBTX01-19-01

Henrik Björck
Elin Blick
Linnéa Dehlén
Johanna Fredriksson
Pauline Hammer úr Skúoy
Karin Ytterberg

© HENRIK BJÖRCK, ELIN BLICK, LINNÉA DEHLÉN, JOHANNA FREDRIKSSON, PAULINE HAMMER ÚR SKÚOY och KARIN YTTERBERG, 2019.

Handledare: Yvonne Nygård, Elena Cámara och Maurizio Mormino

Examinator: Eva Albers

Kandidatarbete 2019: BBTX01-19-01

Institutionen för Biologi och Bioteknik
Avdelningen för Industriell Bioteknik
Chalmers tekniska högskola

Skriven i L^AT_EX
Göteborg, Sverige 2019

Abstract

CRISPR/Cas9 for introduction of metabolic pathways to enable the consumption of acetic acid and xylose in *Saccharomyces cerevisiae*

An alternative to fossil fuel is the usage of *Saccharomyces cerevisiae* in the process of producing bioethanol from lignocellulosic biomass. However, *S. cerevisiae* can only utilise around 70% of the sugars from lignocellulose to produce ethanol, rendering the process inefficient. In order to increase the use of the sugars present in lignocellulosic biomass, this study aimed to introduce metabolic pathways for both acetic acid and xylose consumption in *S. cerevisiae* and analyse the effects of the modifications. For the acetic acid consumption the *adhE*-gene was introduced whereas for the xylose consumption three genes were introduced encoding xylose reductase (XR), xylitol dehydrogenase (XDH), and xylulokinase (XK). The CRISPR/Cas9 genome editing system was transformed into the cells to introduce the two metabolic pathways separately in 12 strains of *S. cerevisiae*. The 12 strains included both laboratory strains as well as industrial and wild type strains. To analyse the results the three methods colony PCR, growth on solid selective media, and growth on liquid selective media were used. All studied strains had successful transformations for both pathways. On the other hand, the number of colonies varied between the different strains. For both pathways, the laboratory strains generally had more transformed colonies than the industrial and wild type strains. The lack of an integrated selection marker when using CRISPR/Cas9 as the genome editing tool made the selection of successfully engineered strains difficult. However, the results from growth in liquid media and colony PCR indicated that the integration of the metabolic pathway was successful for some of the strains. These results show that CRISPR/Cas9 is an useful method for integrating new metabolic pathways in *S. cerevisiae* and with further investigations the strains could provide important information in the development of bioethanol production.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*, Metabolic engineering, CRISPR/Cas9, Xylose pathway, Acetic acid pathway, Laboratory strains, Industrial strains, Wild type strains.

Sammanfattning

Ett alternativ till fossila bränslen är bioetanol producerat av *Saccharomyces cerevisiae* genom fermentering av sockerarter från lignocellulosa. Att *S. cerevisiae* endast kan fermentera runt 70 % av sockerarterna från lignocellulosan har dock gjort produktionen ineffektiv. I denna studie var målet att introducera metaboliska vägar för konsumtion av ättiksyra respektive xylos i *S. cerevisiae* för att öka utbytet av sockerarter från lignocellulosan, samt att analysera effekten av modifikationen på jästens tillväxt. För ättiksyrakonsumtion introducerades *adhE*-genen, medan gener som kodar för xylosreduktas (XR), xylitoldehydrogenas (XDH) och xylulokinas (XK) introducerades för xyloskonsumtion. Introduktionen av de metaboliska vägarna skedde genom att CRISPR/Cas9-systemet transformerades in i 12 stammar av *Saccharomyces cerevisiae*. Stammarna som transformerades var laboratoriestammar, industriella stammar samt vildtypsstammar. För att analysera resultaten användes tre metoder; koloni-PCR, tillväxt på fast selektionsmedium och tillväxt på flytande selektionsmedium. Samtliga studerade stammar hade lyckade transformationer för de båda metaboliska vägarna. Däremot varierade antalet kolonier för de olika stammarna. För laboratoriestammar var antalet transformationer generellt sätt högre för båda vägarna, medan de industriella stammarna och vildtypsstammarna hade färre antal kolonier. Avsaknaden av en i genomet integrerad selektionsmarkör vid användningen av CRISPR/Cas9-tekniken försvårade analysen av lyckade genmodifieringar. Trots det gav tillväxt på flytande medium och koloni-PCR resultat som indikerar på att vissa stammar genmodifierats med någon av de metaboliska vägarna. Dessa resultat visade att CRISPR/Cas9-tekniken fungerar som metod för att integrera nya metaboliska vägar i *S. cerevisiae* och att vidare undersökningar av stammarna kan ge betydelsefulla bidrag i utvecklingen av bioetanolproduktion.

Nyckelord: *Saccharomyces cerevisiae*, Genmodifiering, CRISPR/Cas9, Xylos, Ättiksyra, Laboratoriestammar, Industriella stammar, Vildtypsstammar.

Förord

Vi vill börja med att tacka alla på avdelningen för Industriell Bioteknik som vi delat laborationssalar och utrustning med. Ni hjälpte oss med olika maskiner såväl som teoretiska frågor och visade ett intresse för vårt projekt.

Vi vill rikta ett särskilt stort tack till alla våra handledare. Till Yvonne Nygård som gett oss värdefull hjälp med korrekturläsningar samt för att du tagit dig tid att ha möten med oss och givit oss respons under arbetets gång. Till Elena Cámara och Maurizio Mormino för er ovärderliga hjälp och ert positiva stöd under laborationerna. Tack för att ni möjliggjort för oss att få genomföra detta lärorika projekt.

Henrik, Elin, Linnéa, Johanna, Pauline och Karin, Göteborg, Maj 2019

Innehåll

1	Inledning	1
1.1	Bakgrund	1
1.2	Syfte	2
1.3	Avgränsningar	2
2	Teori	4
2.1	Jäststammar	4
2.1.1	Laboriestammar	4
2.1.2	Industriella stammar och vildtypsstammar	4
2.1.3	Problematiken med genmodifiering av industriella stammar och vildtypsstammar	5
2.2	Genmodifiering av jäststammar	6
2.2.1	CRISPR/Cas9-tekniken	6
2.2.2	Stamutveckling av <i>S. cerevisiae</i> med CRISPR/Cas9	6
2.2.3	Transformation med CRISPR/Cas9	7
2.2.4	Analys av genmodifieringar	7
2.3	Metaboliska vägar	8
2.3.1	Reaktionsvägen för ättiksyra	8
2.3.2	Reaktionsvägen för xylos	8
2.3.3	Redoxobalans vid insättning av metaboliska vägar	9
3	Metod	10
3.1	Verifiering av CRISPR/Cas9-tekniken	10
3.2	Tillverkning av medier	10
3.3	Stamutveckling	11
3.3.1	Laboriestammar i denna studie	11
3.3.2	Industriella stammar i denna studie	11
3.3.3	Vildtypsstammar i denna studie	11
3.3.4	Amplifiering och rening av donator-DNA	11
3.3.5	Transformation av <i>S. cerevisiae</i>	12
3.4	Selektion av transformater	12
3.4.1	Koloni-PCR för analys av genintegrering	12
3.4.2	Tillväxt av transformanter på fast medium	13
3.4.3	Tillväxtprofilering av transformanter i flytande medium	13
4	Resultat	14
4.1	Amplifiering av donator-DNA	14
4.2	Transformerade jästceller	15
4.3	Analys av tillväxt på fast medium	16
4.4	Analys av genintegrering med Koloni-PCR	16
4.4.1	Koloni-PCR på ättiksyrakolonier	16
4.4.2	Koloni-PCR på xyloskolonier	18
4.5	Stammarnas tillväxt i flytande medium	18
4.5.1	Tillväxt vid olika koncentrationer av ättiksyra	18

4.5.2	Tillväxt med xylos som enda kolkälla	19
4.5.3	Sammanställning av resultat från tillväxtprofileringen	20
5	Diskussion	22
5.1	Stammar och transformation	22
5.2	Selektion på fast medium	22
5.3	Koloni-PCR	23
5.4	Tillväxtprofilering	24
5.4.1	Tillväxtprofilering med ättiksyra	24
5.4.2	Tillväxtprofilering med xylos	25
5.4.3	Diploida och polyploida stammar i tillväxtprofilering	25
5.5	Koloni-PCR och tillväxtprofilering som analysmetod	25
5.6	CRISPR/Cas9 som genmodifieringsmetod	26
5.7	Hållbar utveckling kring biobränslen	27
5.8	Etik kring genetiskt modifierade organismer	27
5.9	Framtida studier	28
6	Slutsats	29
	Referenser	30
A	Protokoll för transformation	I
A.1	Förberedelse för transformation	I
A.2	Procedur för transformation	I
B	Lösningar och agarplattor	III
B.1	YPD	III
B.2	Komplett syntetiskt medium	III
B.2.1	Agarplattor med ättiksyra	III
B.2.2	Agarplattor med xylos	IV
B.3	Media samt agarplattor för <i>E. coli</i>	IV
C	Vektorkartor och sekvenser	V
C.1	Vektorkartor	V
C.2	Sekvenser för sgRNA och oligonukleotider	VI

1 Inledning

Mikroorganismen *Saccharomyces cerevisiae* används i stor utsträckning inom bio-raffinaderier då de kan producera etanol från biomassa genom fermentering av sockerarter. Det första steget i utnyttjandet av biomassa som råmaterial för etanolproduktion är att den så kallade lignocellulosa hydrolyseras, bryts ner enzymatiskt, till olika sockerarter. Av dessa sockerarter är det endast ca 70 % som jästen naturligt kan fermentera, vilket har gjort processen ineffektiv [1].

För att optimera fermenteringen av lignocellulosa hos *S. cerevisiae* kan genmodifieringar av olika slag utföras. Dessa ändringar i jästens genom kan innebära alltifrån att möjliggöra att cellerna kan använda nya sockerarter som kolkällor, till att de kan hantera miljöer som vanligtvis inhiberar jästens tillväxt eller producera nya kemikalier som samhället är i behov av. För att möjliggöra nedbrytningen av xylos och ättiksyra hos *S. cerevisiae* används i denna laborativa studie CRISPR/Cas9-tekniken för att introducera metaboliska vägar i olika stammar. Stammarna har olika bakgrund där laborariestammar användes då de är relativt enkla att genmodifiera. Vidare användes industriella stammar samt vildtypsstammar eftersom de tolererar miljöer som förekommer inom etanolindustrin [2, 3].

1.1 Bakgrund

För att begränsa användandet av fossila bränslen utvecklas nu alternativa förnybara bränslekällor, till exempel biobränslen från biomassa. Biobränslen, till skillnad från fossila bränslen, antas inte öka nettonivån av koldioxid i atmosfären då koldioxidutsläppen motsvarar den koldioxid växten tagit upp från atmosfären under sin livstid [4]. Den första generationens biobränslen utnyttjar främst fermentering av socker- och stärkelerika jordbruksgrödor, som majs och sockerrör, till etanol [5]. Då jordbruksgrödorna istället hade kunnat användas för livsmedelsproduktion har dessa bränslen gett upphov till en konflikt mellan mat- och bränsletillverkning. Därför har andra generationens biobränslen utvecklats, som istället nyttjar biomassa från lignocellulosa [6]. Lignocellulosa finns i exempelvis restprodukter från skogsindustrin och dess användning konkurrerar inte med matproduktionen [6, 7].

Processen i vilken biomassa från lignocellulosa omvandlas till bioetanol består av ett flertal steg där lignocellulosa bryts ned, dess sockerarter fermenteras innan etanol renas och jästen återvinns. Förbehandling bryter först ner lignocellulosa till sina beståndsdelar lignin, hemicellulosa och cellulosa [8, 9]. De två sistnämnda hydrolyseras sedan till ca 70 % hexoser som cellodextrin och glukos, vilka kan fermenteras av *S. cerevisiae* för att producera etanol [1, 8]. *S. cerevisiae* kan vid fermentering även producera andra kemikalier, som isoprenoider och 2,3-butandiol, vilket gör nedbrytandet av lignocellulosa värdefullt även i andra avseenden än produktionen av bränslen [1]. Ett problem med lignocellulosa är de resterande 30 % som hydrolyseras till pentoser, exempelvis xylos, vilka jästen inte kan fermentera [1]. Vidare bildas ättiksyra som biprodukt vilket inhiberar nedbrytningen av sockerarterna under fermenteringen [9, 10]. Att endast 70 % av sockerarterna från biomassa kan

utnyttjas gör att det har varit kostsamt att producera etanol i den skala som skulle krävas för att ersätta fossila bränslen med andra generationens biobränslen [6, 11].

I vissa jästtyper och bakterier finns det metaboliska vägar för att omvandla pentoser till etanol samt vägar som gör att inhiberingseffekten av ättiksyra minskar [5, 10]. Dessa organismer har en lägre etanolproduktion än *S. cerevisiae* vilket är varför genmodifiering av den senare föredras framför användandet av alternativa organismer [10]. Vid tidigare studier har det observerats att uttrycket av exempelvis enzymen xylosreduktas (XR) och xylitoldehydrogenas (XDH) från *Pichia stipitis* eller xylosisomeras (XI) från bakterien *Bacteroides vulgatus* gett en ökad xyloskonsumtion såväl som etanolproduktion i *S. cerevisiae* [12, 13]. På samma sätt har det visats att introduktionen av *adhE*-genen som uttrycker acetaldehyddehydrogenas (AADH) från organismer som *Escherichia coli* i laboriestammar förbättrat deras utbyte av etanol [1].

För att förbättra produktionen av andra generationens biobränslen är det av intresse att utreda jäststammar med olika bakgrund som kan tänkas användas inom industriell produktion. Industriella stammar och vildtypsstammar är mer effektiva i industriella miljöer eftersom de är mer anpassade till de förhållanden som råder inom industrin [14, 15]. Introduktion av metaboliska vägar i laboriestammar är dock enklare i jämförelse med industriella stammar och vildtypsstammar [2, 16]. Det är därför av intresse att studera introduktionen av metaboliska vägar i både laboriestammar, industriella stammar och vildtypsstammar för att hitta en potentiellt optimerad jäststam att använda inom industrin. I denna studie har CRISPR/Cas9-tekniken använts för att integrera metaboliska vägar för ättiksyra- och xylosvägen i olika jäststammar av *S. cerevisiae*.

1.2 Syfte

Syftet med projektet var att sätta in gener för nedbrytning av ättiksyra och xylos i stammar av *S. cerevisiae* med hjälp av CRISPR/Cas9-tekniken. Generna skulle integreras i laboriestammar, industriella stammar samt vildtypsstammar. Vidare var syftet att jämföra vilken effekt generna hade på nedbrytning av xylos respektive ättiksyra i de olika stammarna.

1.3 Avgränsningar

Endast en variant av metaboliska vägar för xylos respektive ättiksyra introducerades i stammar av *S. cerevisiae*. Två gener, som kodar för XDH och XR, från *P. stipitis* och en extra kopia av genen för XK användes för att introducera xylosvägen i *S. cerevisiae*. För ättiksyravägen integrerades *adhE*-genen som kodar för AADH direkt från *E. coli K-12*, utan att vara kodonoptimerad för *S. cerevisiae*.

Från *S. cerevisiae* användes 12 olika stammar, både laboriestammar, industriella stammar och vildtypsstammar, vilka modifierades i studien. Observera att de metaboliska vägarna introducerades separat i stammarna, vilket resulterade i 23 stycken

modifierade stammar eftersom xylosvägen redan fanns i en av stammarnas genom.

Ytterligare avgränsning var att endast cellernas tillväxt på ättiksyra eller xylos under aeroba förhållanden studerades och inte deras etanolproduktion. De odlingsmedier som används vid verifieringen innehöll enbart bestämda koncentrationer av xylos respektive ättiksyra. Medier innehållande hydrolyserad lignocellulosa användes inte.

2 Teori

Alla laboratoriestammar, industriella stammar och vildtypsstammar har olika egenskaper och deras egenskaper kan dessutom modifieras. Dock är det svårare att genmodifiera vissa jäststammar i jämförelse med andra. Genom att genmodifiera jäststammar med CRISPR/Cas9-tekniken kan gener för nya reaktionsvägar introduceras i deras DNA.

2.1 Jäststammar

För att effektivisera fermenteringsprocessen kan olika strategier användas, där dels genmodifieringar kan ge förbättrat utbyte, dels valet av stam kan påverka utbytet. Då *S. cerevisiae* i många fall kan använda homolog rekombination kan jästen modifieras genom att transformera in gener med homologi till jästens genom [17]. Användningen av homolog rekombination förekommer dock inte i alla stammar då vissa saknar de maskinerier som krävs för effektiv homolog rekombination. Problematiken med modifieringen av industriella stammar och vildtypsstammar ligger i att de ofta är polyploida vilket försvårar modifieringen av dessa stammar jämfört med laboratoriestammar som ofta är haploida [18, 19]. Då stammarna har en högre tolerans mot industriella miljöer såsom varierande pH och temperatur, samt att de tolererar såväl som producerar mer etanol, gör att många studier fokuserar på att hitta metoder för att modifiera även denna sortens stammar [3].

2.1.1 Laboratoriestammar

Laboratoriestammar används traditionellt i större grad än industriella stammar och vildtypsstammar vid genmodifieringar då de har vissa modifikationer i sin uppsättning som gör dem mer mottagliga för genmodifieringar [20]. En av dessa modifikationer är att laboratoriestammar är haploida och endast har en uppsättning kromosomer vilket gör modifieringen enklare. Traditionella gentekniska metoder som Cre-loxP rekombineringssystemet eller homolog rekombination är även effektiva i laboratoriestammar, eftersom en lyckad transformation med dessa metoder kommer resultera i att hela genomet hos stammen ändras, då stammarna endast har en uppsättning [16].

Att använda laboratoriestammar är dock problematiskt i industriella miljöer då de anpassats för att vara lätthanterliga inom laboratoriemiljöer och skiljer sig mycket från andra stammar [21]. Ett resultat av dessa modifikationer är att laboratoriestammar har lägre tolerans mot fermenteringsinhibitorer och förändringar i miljön såsom etanol- eller pH-nivåer [16]. Detta får som konsekvens att ytterligare optimering behöver ske för att de genmanipulerade laboratoriestammarna ska kunna användas inom industrin [22].

2.1.2 Industriella stammar och vildtypsstammar

Till skillnad från laboratoriestammar har industriella stammar och vildtypsstammar utvecklats för att tåla en hög etanolkoncentration. Exempelvis har de industriella

stammar och vildtypsstammar som använts vid alkoholtillverkningsprocesser visats motstå produktinhibering bättre när höga etanolkoncentrationer uppstår vid fermentering jämfört med laboriestammar [3, 10]. För de industriella stammarna har även etanolproduktionen och toleransen mot andra industriella förhållanden, som varierande pH och temperaturer, visats vara högre än för laboriestammar [1, 10].

De fördelaktiga egenskaper som industriella stammar och vildtypsstammar uppvisar gör det intressant att studera dessa vidare. Potentiellt kan introduktionen av metaboliska vägar via genmodifiering tillsammans med användandet av mer robusta jäststammar resultera i en hållbar biobränsleproduktion. Anledningen är att sockerarterna i lignocellulosan utnyttjas i större utsträckning samtidigt som produkterna, exempelvis ättiksyra, från nedbrytningen av biomassa och höga etanolhalter får mindre inverkan på fermenteringsprocessen [2]. Vid lyckade modifieringar av stammar med hög etanolproduktion, kan utbytet av etanol öka ytterligare jämfört med laboriestammar som fått motsvarande modifiering.

2.1.3 Problematiken med genmodifiering av industriella stammar och vildtypsstammar

Problematiken med de industriella stammarna och vildtypsstammarna är att de oftast inte är haploida [14]. De flesta stammarna är antingen diploida, med två uppsättningar kromosomer, eller polyploider med fler kromosomuppsättningar [2]. Att ha flera uppsättningar av kromosomer gör att toleransen mot olika förhållanden ökar, men det försvårar även manipuleringen av jästens genom [2, 20]. För genmodifieringar av haploida stammar behöver endast en kromosom modifieras för att ändra hela cellens fenotyp, medan diploida och polyploida celler kräver att samtliga kromosomer ändras då de har flera uppsättningar av samma gen [16].

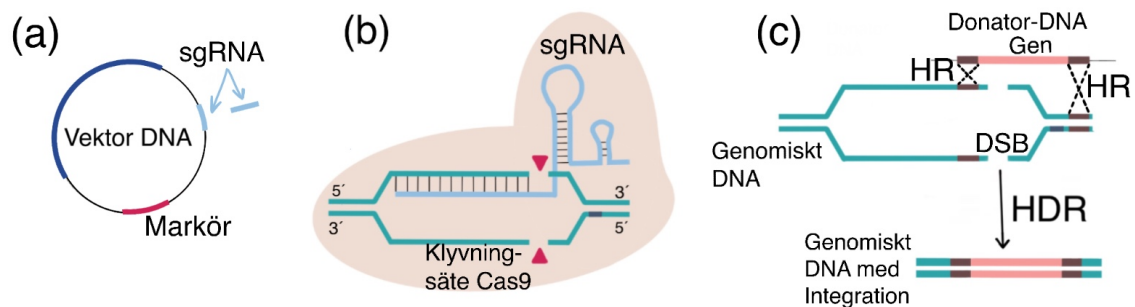
Ett ytterligare problem med genmodifieringen av industriella stammar och vildtypsstammar är att användandet av auxotrofiska markörer är svårt och därmed används ofta antibiotikaresistens som markör [14]. En auxotrof cell saknar gen som kodar för ett enzym som är viktigt i syntesen av en specifik aminosyra [23]. I celler som saknar genen kan aminosyran inte syntetiseras, utan tillsatts av aminosyran i tillväxtmediet behövs för att celler ska överleva. Vid utnyttjande av auxotrofiska markörer vid genmutationer blir den essentiella genen utbytt mot genen av intresse, och muterade celler kommer därför inte kunna växa på plattor utan aminosyror tillsatta. Genom att odla en koloni på två separata selektionsplattor, en med tillsatt aminosyra och en utan, kan selektion av de gener som endast överlever på plattan med aminosyra ske. I laboriestammar används auxotrofiska markörer för att särskilja genmodifierade celler från de som inte blivit genmodifierade, men i industriella stammar samt vildtypsstammar är detta svårare då de är polyploida. För polyploida stammar är det svårt att få alla kromosomer genmodifierade och de kopior som fortfarande har den essentiella genen kan kompensera för de kopior som saknar genen och cellerna kan därmed fortsätta växa på medier utan tillsatt aminosyra [14, 24]. För selektion av polyploida stammar används därför vanligtvis antibiotikaresistens som markör, vilket begränsar användandet av de modifierade stammarna industriellt [14].

2.2 Genmodifiering av jäststammar

Förändringar i genomet kan skapa nya biologiska funktioner hos celler. Det finns många sätt att utföra förändringar i genomet och ett sätt är att använda CRISPR/Cas9-tekniken [25].

2.2.1 CRISPR/Cas9-tekniken

Tekniken bakom CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats) kommer ursprungligen från en skyddsmekanism mot virus som återfinns i bakterier och har utvecklats till en metod för genmodifiering [16, 18]. CRISPR/Cas9-tekniken kan användas för att genmodifiera *S. cerevisiae* genom att designa ett sgRNA (single guide RNA) som är komplementärt mot den gen som ska modifieras [18]. Nukleotidkomplexet guidar endonukleaset Cas9 (CRISPR-associated protein 9) till den komplementära DNA-sekvensen vilket resulterar i att Cas9 specifikt klyver DNA-sekvensen [16]. Klyvningen ger upphov till ett dubbelsträngat brott (DSB) i DNA:t och nya gener kan föras in när DNA-polymeras lagar brottet (se Figur 1).



Figur 1: CRISPR/Cas9-tekniken där (a) en vektor, innehållandes en gen för Cas9 samt markör, transformeras in i jästen tillsammans med sgRNA som antingen sitter i vektorn eller introduceras separat som DNA-sekvens. (b) Cas9 klyver genomiskt DNA efter att sgRNA guidar nukleaset till den komplementära DNA-sekvensen. (c) Ett DSB från klyvningen lagas via homolog direkt reparation (HDR) där det donator-DNA som kodar för genen integreras i brottet då den har homologa regioner (HR) med genomiskt DNA kring brottet.

En av de främsta fördelarna med att använda CRISPR/Cas9-tekniken istället för traditionella metoder som exempelvis Cre-loxP-rekombination, är att markörer med antibiotikaresistens inte behöver integreras direkt in i genomet [14]. Eftersom det är problematiskt att använda organismer med antibiotikaresistens inom industriella användningsområden, är det fördelaktigt att resistensen inte integreras i genomet, då det kan vara svårt att få bort den integrerade markören senare [14, 24].

2.2.2 Stamutveckling av *S. cerevisiae* med CRISPR/Cas9

Genmodifiering med CRISPR/Cas9-tekniken bygger på att jästen kommer eftersträva att laga det DSB som Cas9 ger upphov till, där modifiering kommer ske i själva brottet [18]. Lagningen av brottet sker genom sammanfogning av ändarna via icke-homolog sammanfogning (NHEJ) eller genom att andra DNA-sekvenser i klyvningssätet integreras via homolog direkt reparation (HDR) (se Figur 1c) [18].

För *S. cerevisiae* är HDR det främsta sättet att laga ett DSB, vilket kräver en godtycklig homolog sekvens som integreras in i brottet [26]. Detta är ett viktigt steg i CRISPR/Cas9-tekniken eftersom det kan utnyttjas för att integrera en homolog DNA-sekvens av intresse, donator-DNA, och på så vis utveckla nya stammar av *S. cerevisiae* [18].

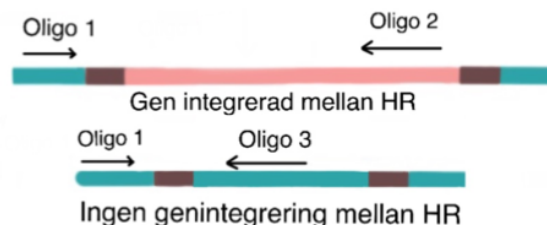
2.2.3 Transformation med CRISPR/Cas9

Transformation är en teknik där genetiskt material förs in i till exempel en jästcell vilket kan resultera i genetisk modifiering. För att optimera transformation av jästceller är det mest effektivt om jästen är i den exponentiella tillväxtfasen (log-fas) [27]. Dessutom används polyetylenglykol (PEG), litiumacetat (LiAc) och värmechock för att öka transformationseffektiviteten. PEG är viktigt då det ökar mängden DNA som binder till cellväggen och ökar därmed sannolikheten att DNA förs in i cellen [27]. Det har även visats att LiAc och värmechock ger en ökad effektivitet av transformationen genom att passagen av DNA genom cellväggen underlättas.

För att använda CRISPR/Cas9-tekniken transformeras en vektor innehållandes genen som kodar för Cas9-endonukleaset in i jästcellen. Även sgRNA förs in i jästen och sitter antingen i CRISPR/Cas9-vektorn eller introduceras enskilt (se Figur 1c). En selektionsmarkör för antibiotikaresistens transformeras in tillsammans med CRISPR/Cas9-vektorn i jästen, men till skillnad från andra genmodifieringsmetoder integreras inte markören i genomet utan kan efter transformationen föras ut ur jästcellen igen [25].

2.2.4 Analys av genmodifieringar

Huruvida genen har blivit integrerad på rätt ställe i genomet kan undersökas genom till exempel koloni-PCR (colony polymerase chain reaction) [28]. Cellerna lyseras med hjälp av upphettning vilket frigör genetiskt material. Tillsatta oligonukleotider binder därefter specifikt till vissa regioner av genen som amplifieras (se Figur 2). Amplifieringsprodukten visualiseras sedan i en gelelektrofores [28]. Om fragmenten från gelelektroforesen har de förväntade längder som det genomiska materialet ska ha vid användandet av de specifika oligonukleotiderna, ger detta en indikation på att en lyckad genmodifikation har skett.



Figur 2: Hur PCR-produkter analyseras med hjälp av oligonukleotider. Bindningsställen för oligonukleotider där oligonukleotid 1 (oligo 1) binder till HR medan oligonukleotid 2 (oligo 2) binder i den integrerade genen vid lyckad insättning. Om genen inte integreras binder istället oligonukleotid 3 (oligo 3) i den ursprungliga genen. Två olika långa fragment erhålls i gel beroende på om oligo 2 eller 3 binder vilket tillåter analys av integreringen.

En annan analyseringsmetod är att använda ett selektionsmedium i fast form innehållandes en kolkälla som endast celler med en lyckad genmodifiering kan utnyttja [29]. Till exempel skulle det kunna vara någon form av pentos då de flesta jäststammar vanligtvis inte kan använda en kolkälla innehållandes fem kol.

Ytterligare en metod är att använda tillväxtprofilering. Till skillnad mot selektionsmedium i fast form används i denna metod flytande medier för att hitta celler där de metaboliska vägarna introducerats. En jämförelse görs mellan en transformerad koloni och en kontrollkoloni där en ökad tillväxt ger en indikation på vilka kolonier som tagit upp genen av intresse.

2.3 Metaboliska vägar

Nya metaboliska vägar kan introduceras i *S. cerevisiae* för att möjliggöra tillväxt på annat än dess naturliga kolkällor. För att kunna metabolisera ättiksyra och xylos, vilket *S. cerevisiae* inte gör naturligt, behöver vägar för respektive kolkälla föras in i genomet. Att möjliggöra nedbrytning av ättiksyra gör framförallt att inhiberingen minskar vilket leder till att jästcellerna även bättre kan utnyttja de kolkällor som den redan kan bryta ner.

2.3.1 Reaktionsvägen för ättiksyra

För att *S. cerevisiae* skall kunna bryta ner ättiksyra kan *adhE*-genen som härstammar från *E. coli K-12* introduceras i jästens genom [10]. Denna gen kodar för ett protein, acetylerande acetaldehyddehydrogenas (AADH), som omvandlar ättiksyra till acetaldehyd. Acetaldehyd reagerar vidare och bildar etanol med hjälp av alkoholdehydrogenas (ADH) som finns naturligt i *S. cerevisiae*. Båda stegen kräver reducerad nikotinamidadeninukleotid (NADH) för att metaboliska vägen ska ske. Genom att integrera *adhE*-genen i *ALD6*-lokus kan dessutom en väg, som hos jästen kan producera ättiksyra från acetaldehyd, blockeras, vilket är gynnsamt om målet är att producera etanol [10]. Det förväntade resultatet vid insättning av *adhE*-genen i jäst är att ättiksyranivån minskar genom att etanol bildas från ättiksyra [1]. Minskningen av ättiksyra har framför allt en positiv inverkan på utbytet av etanol från samtliga sockerarter då ättiksyra har en hämmande effekt för jästen.

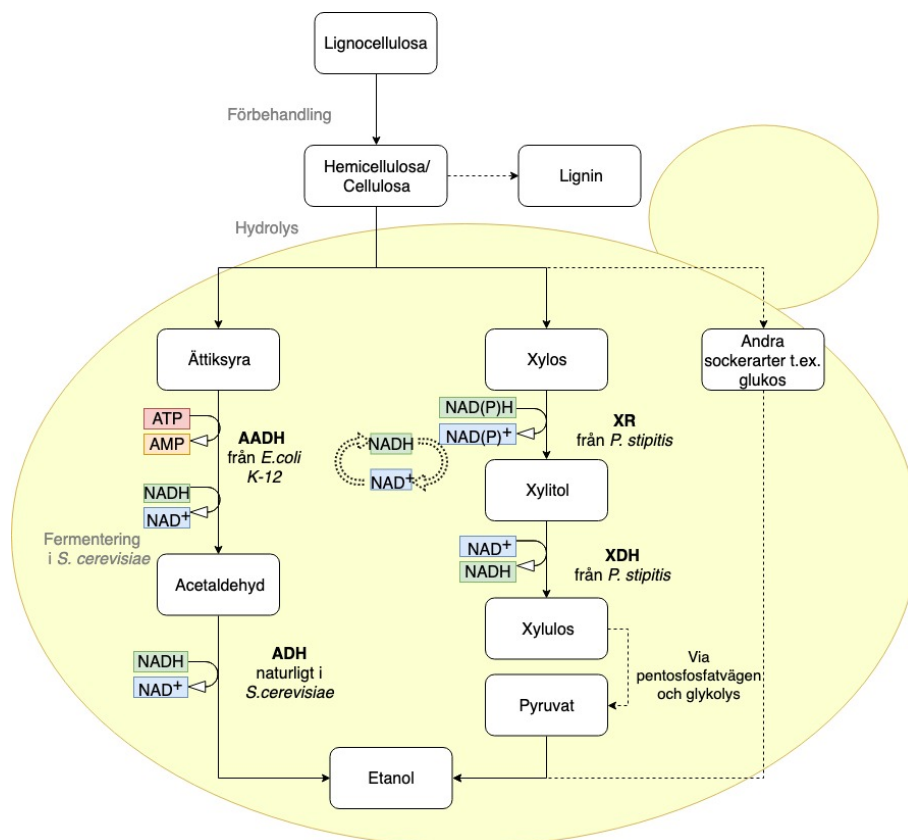
2.3.2 Reaktionsvägen för xylos

För att kunna producera etanol från substratet xylos integreras två gener i jästens genom. De gener som integreras kodar för proteinerna XR och XDH från *P. stipitis* samt en extra kopia av genen som kodar för endogen xylulokinas (XK) [30]. XR konverterar xylos till xylitol med hjälp av reducerad nikotinamidadeninukleotidfosfat (NADPH) eller NADH som kofaktor [10]. Vidare konverterar XDH xylitol till xylulos. Xylulos fosforeras sedan till xylulos-5-fosfat genom XK som kan delta i den icke-oxidativa pentosfosfatvägen för nedbrytning till pyruvat [10]. XK är viktig för xylosmetabolismen i jäst och en extra kopia av genen för XK integreras då det har visats att mängden xylos som kan brytas ned ökar [10, 30]. Ett för stort uttryck

av XK kan dock ge en försämrad tillväxt av jästen vid användning av xylos som kolkälla [30].

2.3.3 Redoxbalans vid insättning av metaboliska vägar

Introduktionen av den metaboliska vägen för ättiksyra resulterar i att en större mängd av NADH konsumeras och därmed erhålls ett överskott av nikotinamidadenindinukleotid (NAD^+) [10]. Överskottet av NAD^+ kan leda till att mängden etanol som bildas blir mindre och mängden ättiksyra blir större än optimalt då den senare inte kan konsumeras av jästcellen [10]. För xylosvägen sker en redoxbalans åt motsatta hållet då XR kan använda både NADPH och NAD^+ , medan XDH endast använder NAD^+ som leder till ett överskott av NADH [10]. Detta kan för *S. cerevisiae* med insättning av xylosvägen leda till en hög ackumulation av xylitol och ett lågt etanolutbyte [10]. Denna redoxbalans som uppkommer i både ättiksyra- och xylosvägen skulle idealt kunna kompenseras med att integrera båda de metaboliska vägarna i samma jästcell (se Figur 3). I fall där endast en metabolisk väg introduceras åt gången kommer andra redoxjämvikter i jästens metabolism troligen kunna kompensera obalansen [31].



Figur 3: De kopplade reaktionsvägarna för ättiksyra och xylos. I xylosvägen fås ett underskott av NADH och i ättiksyravägen ett överskott av NAD^+ . Idealt borde både reaktionsvägen för xylos och ättiksyra integreras i samma jästcell då detta hade jämnat ut den redoxbalansen som fås vid insättning av endast en väg.

3 Metod

I syfte att genmodifiera och selektera *S. cerevisiae* användes i denna studie en rad olika metoder. För att bekräfta att CRISPR/Cas9-tekniken var applicerbar i denna studie utfördes en verifiering av tekniken. Vidare utvecklades stammarna med CRISPR/Cas9-tekniken och analyserades med olika selektionsmetoder för att finna de lyckade genmodifieringarna.

3.1 Verifiering av CRISPR/Cas9-tekniken

I verifieringen av CRISPR/Cas9-tekniken användes *ADE2*-genen som markör då ett avbrott i denna gen resulterar i en tydlig fenotyp [32]. Genom att klippa mitt i genen och sätta in en slumpmässig, dubbelsträngad oligonukleotid med ett stoppkodon uttrycks inte *ADE2* och det sker en ackumulering av P-ribosylaminoimidazol (AIR) som är röd till färgen. Verifieringen gjordes endast på laboratoriestammarna.

För utförande av verifieringen följdes ett protokoll för transformering (se Bilaga A). Vid transformationen förbereddes en DNA-blandning (se Tabell 1). Vektorn som användes för transformationen var YN2 innehållande CRISPR/Cas9-systemet samt sgRNA med målsekvensen *ADE2* (se Bilaga C för fullständig vektorkarta). Efter tre dagars inkubering studerades plattorna för att hitta röda kolonier, vilka indikerar på att CRISPR/Cas9-tekniken fungerat.

Tabell 1: DNA-blandningen för verifiering av CRISPR/Cas9-tekniken

Komponent	Mängd
Vektor	600 ng
Donator-DNA	10 µg
Laxsperma	5 µl
Sterilt vatten	Till slutvolym på 75 µl

3.2 Tillverkning av medier

För att kunna odla jästen under optimala förhållanden förbereddes flytande och fasta medier med definierade koncentrationer. För mediet som användes i transformationen förbereddes en jäst-pepton-dextros-lösning (YPD) (se Bilaga B). En lösning med samma koncentrationer, men med agar tillsatt, användes även till fast medium. Vid selektion av lyckade transformanter för xylos- samt ättiksyravägen användes minimalmedium i form av komplett syntetiskt medium (SC). Selektionsplattor för ättiksyra tillverkades genom att förbereda en minimalmedium-lösning där glukos ersattes med 1 g ättiksyra/l, 2 g ättiksyra/l respektive 5 g ättiksyra/l (se Bilaga B). Dessutom justerades ättiksyran och SC-lösningen till pH 5. För xylosselektionen förbereddes fast medium med 20 g xylos/l som kolkälla (se Bilaga B). Till vissa delar av arbetet krävdes även fast samt flytande LB-medium (lysogeny broth) för att odla *E. coli* (se Bilaga B). För selektion av de mikroorganismer som tagit upp vektorn med en gen för antibiotikaresistens behövdes selektionsplattor. Dessa plat-

tor förbereddes genom att efter autoklavering tillsätta 200 µg/ml geneticin (G418) till YPD-agar respektive 100 µg/ml ampicillin till LB-medium med agar.

3.3 Stamutveckling

Metaboliska vägar för tillväxt på ättiksyra och xylos introducerades med CRISPR/Cas9-tekniken i laborierestammar, industriella stammar och vildtypsstammar av *S. cerevisiae*. Respektive metabolisk väg introducerades separat i varje stam med undantag för den industriella stammen *KE6-12* som redan hade den metaboliska vägen för xylos [8].

3.3.1 Laborierestammar i denna studie

I denna studie användes *S288c*, *CEN.PK* och *BY4741* som laborierestammar. Stammarna är vanliga inom biotekniken då deras genom är sekvenserat och mycket är känt om deras egenskaper. De ovannämnda laborierestammarna har även egenskaper som gör dem enklare att utföra genetiska manipulationer på [20].

3.3.2 Industriella stammar i denna studie

Introduktionen av de metaboliska vägarna för ättiksyra och xylos skedde i stammarna *Ethanol Red (EtOH Red)* och *PE-2* som är vanligt förekommande inom den amerikanska respektive brasilianska bioetanolproduktionen [3, 33]. *PE-2* har bland annat visat sig ha en etanolproduktion som är ungefär 50 % högre än den för laborierestammen *S288c* och även visat sig ha högre tolerans mot lågt pH samt inhibitorn ättiksyra än laborierestammen *CEN.PK* [33, 34]. Vidare har ättiksyravägen introducerats i den industriella stammen *KE6-12*.

3.3.3 Vildtypsstammar i denna studie

I denna studie modifierades de sex olika vildtypsstammarna *LBCM37*, *LBCM67*, *LBCM97*, *LBCM109*, *LBCM110* och *LBCM126*. Enligt en tidigare studie har dessa stammar, som isolerats från den brasilianska cachaçaproduktionen, visats ha naturliga modifieringar vilket gör deras etanoltolerans högre [3]. Samma studie har även visat att *LBCM37* och *LBCM97* är mer toleranta mot varierande pH mellan 2.4-9 än vad *BY4741*, *PE-2* och *EtOH Red* är.

3.3.4 Amplifiering och rening av donator-DNA

Enligt protokollet för Phusion-polymeras från Thermo Scientific amplifierades *adhE*-genen från *E. coli K-12* med hjälp av oligonukleotiderna EC116 och EC117 (se Bilaga C för sekvenser). PCR-produkten, det vill säga *adhE*-genen, renades fram med kittet GeneJET PCR Purification Kit från Thermo Scientific enligt medföljande protokoll och verifierades med gelelektrofores.

De tre generna som integrerades för xylosvägen kom från vektorn XXX vilken togs fram vid en tidigare studie [35]. Vektorn XXX renades med GeneJET Plasmid Miniprep Kit från Thermo Scientific enligt tillhörande protokoll. De tre generna

som kodade för proteinerna XR, XDH och XK amplifierades som en kasset från XXX-vektorn enligt protokollet för Phusion-polymeras från Thermo Scientific. De oligonukleotider som användes för amplifieringen av xyloskassetten var EC122 och EC123 (se Bilaga C för sekvenser). Produkten renades fram med kittet GeneJET PCR Purification Kit från Thermo Scientific. PCR-produkten, det vill säga xyloskassetten, kontrollerades med gelelektrofores.

3.3.5 Transformation av *S. cerevisiae*

För att introducera de metaboliska vägarna för ättiksyra samt xylos i *S. cerevisiae* följdes ett protokoll för transformation (se Bilaga A). Vid transformation med ättiksyravägen krävdes ingen sammanfogning av donator-DNA eller sgRNA, då vektorn YN2 som användes för ättiksyravägen innehöll både CRISPR/Cas9-systemet och sgRNA med *ALD6* som målsekvens (se Bilaga C för fullständig vektorkarta). Donator-DNA:t som användes för ättiksyravägen var *adhE*-genen. Vektorn EC2 som användes för xylosvägen innehöll CRISPR/Cas9-systemet men inget sgRNA (se Bilaga C för vektorkarta). Det sgRNA som användes för xylosvägen hade *HO*-lokus som målsekvens och innan transformationen utfördes sammanfogning av sgRNA:t. Att integrationen sker i *HO*-lokus beror på att det inte påverkar jästens tillväxtshastighet [36]. Vidare användes xyloskassetten som donator-DNA för xylosvägen. För transformationen användes DNA-blandningar med olika koncentrationer för de olika vägarna (se Tabell 2).

Tabell 2: DNA-blandningarna för transformationerna av ättiksyra- och xylosvägen

Komponenter	Ättiksyra	Xylos
Vektor	600 ng	3 μ l
sgRNA		4 μ g
Donator-DNA	1,5 μ g	1,5 μ g
Laxsperma	5 μ l	5 μ l
Sterilt vatten	Till slutvolym på 75 μ l	Till slutvolym på 75 μ l

3.4 Selektion av transformater

För att selektera fram de kolonier som tagit upp vektorn med CRISPR/Cas9-systemet odlades kolonierna på fast medium innehållande G418. Då vektorn även bland annat innehöll en gen med resistens mot G418 överlevde endast de organismer som tagit upp vektorn. För att vidare selektera de kolonier som hade integrerat generna av intresse i sina genom användes en, eller en kombination, av de tre olika metoderna koloni-PCR, tillväxt på selektionsplattor och tillväxtprofilering i flytande medium.

3.4.1 Koloni-PCR för analys av genintegrering

För att analysera huruvida jäststammarna hade integrerat generna av intresse på rätt plats i sina genom användes koloni-PCR. Amplifieringen utfördes med Phire-polymeras från Thermo Scientific enligt tillhörande protokoll. Oligonukleotiderna

EC118, EC119 samt EC120 och oligonukleotiderna EC62, EC63 samt EC124 användes för analys av ättiksyra- respektive xylosvägen (se Bilaga C för sekvenserna). Längden på PCR-produkterna analyserades därefter med gelelektrofores.

3.4.2 Tillväxt av transformanter på fast medium

Tillväxt av de transformerade kolonierna på fast medium gjordes på selektionsplattor med SC-medium användes för att utvärdera huruvida jäststammarna hade tagit upp respektive donator-DNA i sina genom. Ättiksyraplattor med 1 g ättiksyra/l, 2 g ättiksyra/l samt 5 g ättiksyra/l användes som selektion på fast medium för ättiksyravägen medan fast medium med 20 g xylos/l användes för xylosvägen. Kolonierna överfördes till selektionsplattor genom att stämpla transformerade kolonier med sterila sammetsdukar. Kolonierna fick växa på selektionsplattorna under 4 dagar i 30°C.

3.4.3 Tillväxtprofilering av transformanter i flytande medium

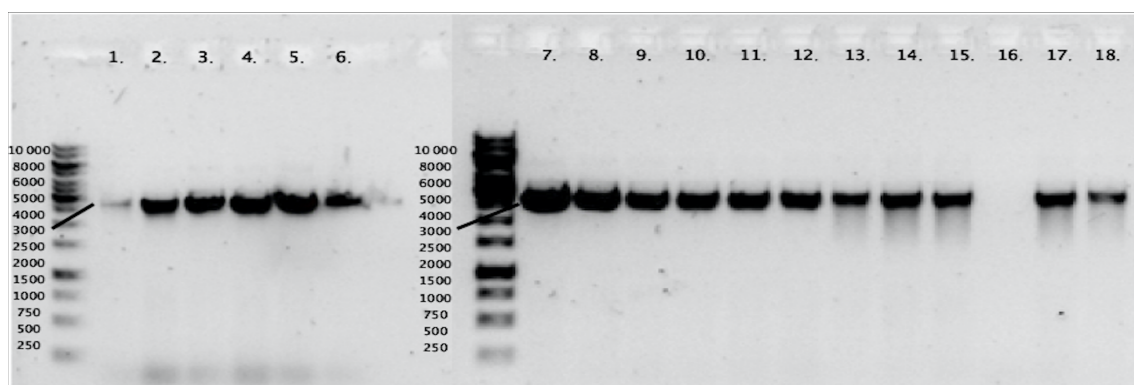
Med en så kallad Growth Profiler 960 utfördes tillväxtprofilering i flytande medier för att undersöka huruvida jäststammarna kunde växa på xylos eller ättiksyra. Tillväxtprofileringen i Growth Profiler 960 fungerar genom att tillväxtmedierna fotograferas var 30:e minut och antalet pixlar med celler i fotografiet analyseras [37]. Antalet färgade pixlar kan liknas med celltätheten i odlingen och utifrån pixlarna kan därav celltillväxten studeras. För att förbereda jäststammarna för tillväxtprofileringen inokulerades först transformanterna i 250 µl YPD-lösning på en mikrotiterplatta som inkuberades över natten i 30°C och 260 rpm. Från de inkuberade kulturerna bereddes, i Growth Profiler-plattor, YP-ättiksyra- respektive YPX-kulturer med ett OD₆₀₀ på cirka 0.2 för varje kultur. Ättiksyrakoncentrationerna som användes i YP-ättiksyra-kulturerna var 1 g/l, 2 g/l och 5 g/l och xyloskoncentrationen i YPX-kulturerna var 20 g/l. Ättiksyralösningens pH justerades även till pH 5 för 1 g ättiksyra/l och 2 g ättiksyra/l. För varje testad stam profilerades även en kontroll, det vid säga en omodifierad koloni, för att kunna jämföra skillnaden och examinera de genmodifierade stammarna. Tillväxtprofileringen av cellkulturerna i Growth Profiler 960 utfördes under aeroba förhållanden i 30°C och 250 rpm tills cellerna nått stationär fas.

4 Resultat

Amplifieringen av donator-DNA kontrollerades och för *adhE*-genen samt xyloskassetten hade amplifieringen lyckats. Transformationen utfördes sedan och lyckade transformationer erhöles för alla jäststammar som undersöktes. Genom selektion på fast medium, koloni-PCR och tillväxtprofilering i flytande medium söktes det sedan efter kolonier med insättning av donator-DNA. Med koloni-PCR hittades indikeringar för lyckade insättningar av alla laborierestammar för ättiksyravägen samt en indikation hos vildtypsstammen *LBCM97* för xylosvägen. Tillväxtprofileringen gav indikation på att *PE-2* samt *LBCM67* har integrering av ättiksyravägen. För xylosvägen hade alla stammar utom *PE-2*, *LBCM67*, *LBCM109* samt *LBCM126* fått förmågan att växa på xylos.

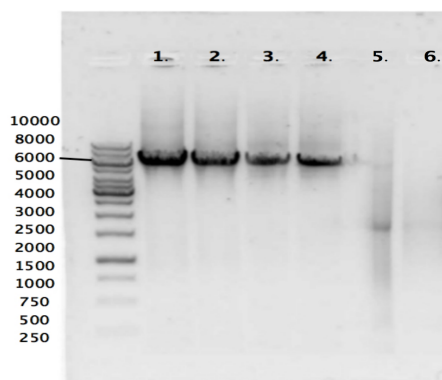
4.1 Amplifiering av donator-DNA

Amplifieringen av *adhE*-genen var lyckad i 17 av 18 fall (se Figur 4). För en lyckad amplifiering erhålls ett fragment på 2759 bp.



Figur 4: Gelelektrofores av PCR-produkterna från försöket att amplifiera *adhE*-genen. Amplifieringen var lyckad för PCR-produkterna i brunn 1-15 och 17-18 medan PCR-produkten i brunn 16 inte var lyckad.

För amplifieringen av xyloskassetten erhöles i fyra av sex fall en lyckad amplifiering (se Figur 5). Xyloskassetten hade en storlek på 6069 bp vid gelelektrofores.



Figur 5: Gelelektrofores av PCR-produkterna från försöket att amplifiera xyloskassetten. Brunnarna 1-4 har amplifiering medan i brunnarna 5 och 6 var amplifieringen inte lyckad.

4.2 Transformerade jästceller

Efter inkubering av de transformerade jästcellerna uppskattades antalet kolonier som vuxit på YPD-plattor med G418. Kolonier som inte fått in vektorn med antibiotikaresistens överlevde inte i närvaro av G418. Samtliga stammar hade lyckade transformationer för både ättiksyra- och xylosvägen (se Tabell 3). Alla stammar hade dock färre kolonier för xylosvägen än för ättiksyravägen, men det fanns i samtliga fall minst tio stycken kolonier att testa. Generellt hade laboriestedammarna flest kolonier och även de industriella hade relativt många. Vildtypsstammarna *LBCM37* och *LBCM110* fick omkring samma antal kolonier som laboriestedammarna och de industriella stammarna, medan resterande vildtypsstammar hade jämförelsevis få kolonier.

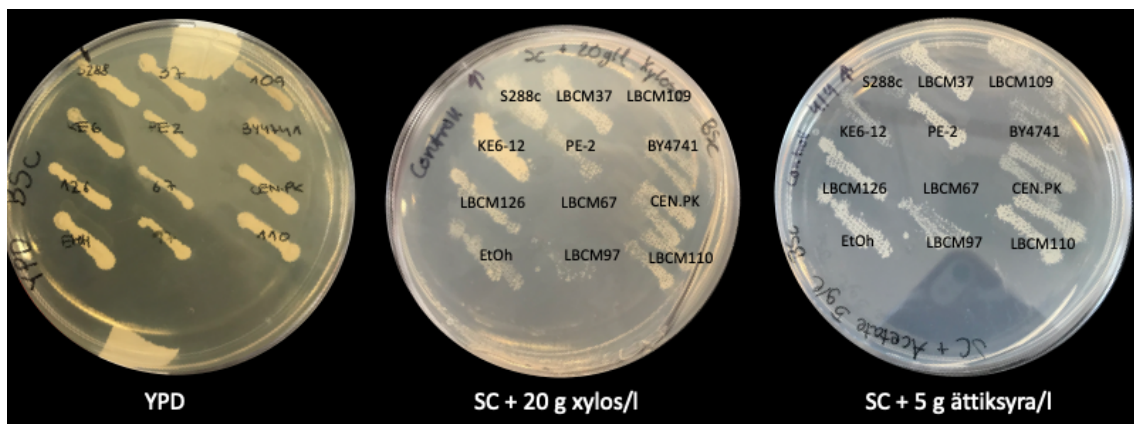
Tabell 3: Antal kolonier efter transformation av ättiksyra- och xylosvägen med 1/10 respektive 9/10 av transformationsblandningen

Stam	Ättiksyra		Xylos	
	1/10	9/10	1/10	9/10
<i>S288c</i>	324	>500	34	188
<i>CEN.PK</i>	468	>500	33	416
<i>BY4741</i>	67	>500	25	138
<i>EtOH Red</i>	158	>500	29	89
<i>PE-2</i>	53	380	5	>500
<i>KE6-12</i>	80	>500	-*	-*
<i>LBCM37</i>	>500	>500	29	190
<i>LBCM67</i>	25	99	0	97
<i>LBCM97</i>	10	96	2	24
<i>LBCM109</i>	20	150	0	13
<i>LBCM110</i>	250	>500	14	109
<i>LBCM126</i>	3	15	1	29

*Hade redan xylosvägen integrerad

4.3 Analys av tillväxt på fast medium

Analys av tillväxten på fast selektionsmedium på SC-plattor med ättiksyra eller xylos som enda kolkällor användes för att analysera vilka kolonier som integrerat genen av intresse. Analysen på plattorna visade ingen skillnad mellan olika transformerade kolonier då alla kolonier växte på de tre ättiksyrakoncentrationerna, samt på xylos. Vidare visade både den positiva kontrollstammen *KE6-12* och de negativa kontrollstammar som inte blivit transformerade tillväxt på xylos, med undantag *LBCM67* som inte växte alls (se Figur 6). *LBCM97* hade enligt visuell bedömning en lägre celltillväxt än övriga kontroller. Även för selektionen med ättiksyra hade alla negativa kontroller tillväxt utom *LBCM67* (se Figur 6). Selektionen på fast medium lyckades alltså inte.



Figur 6: Kontrollkolonier utan transformationer på YPD samt SC + 20 g xylos/l och SC + 5 g ättiksyra/l. För 20 g xylos/l utgjorde *KE6-12* en positiv kontroll för xylosvägen med bekräftad xyloskonsumtion. *KE6-12* hade visuellt större tillväxt än övriga kontroller, medan *LBCM97* hade en mindre tillväxt än övriga stammar. För både ättiksyra och xylos saknade *LBCM67* tillväxt.

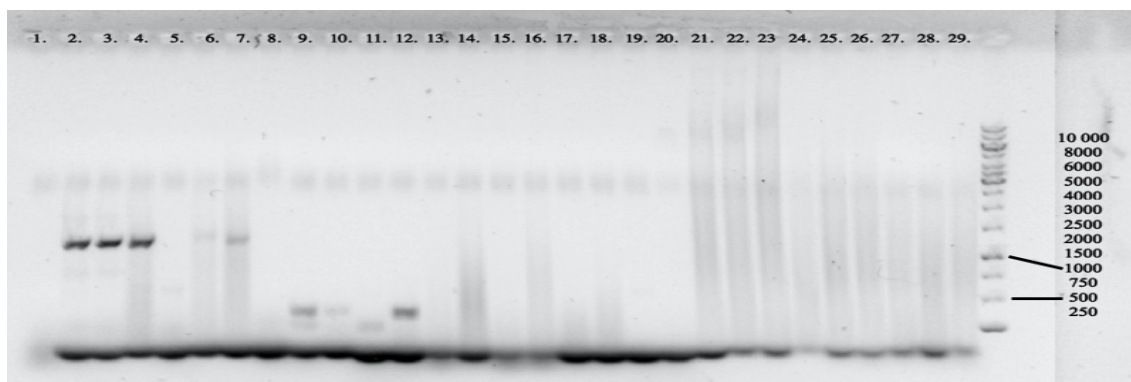
4.4 Analys av genintegrering med Koloni-PCR

För att avgöra om xylos- samt ättiksyravägen förts in på rätt plats i genomet hos de olika jäststammarna användes koloni-PCR följt av gelelektrofores. *BY4741* hade positiva resultat för insättning av ättiksyravägen medan det för *S288c* samt *CEN.PK* fanns indikationer för positiva resultat. För xylosvägen visades att *LBCM97* hade en antydning på positiv insättning.

4.4.1 Koloni-PCR på ättiksyrakolonier

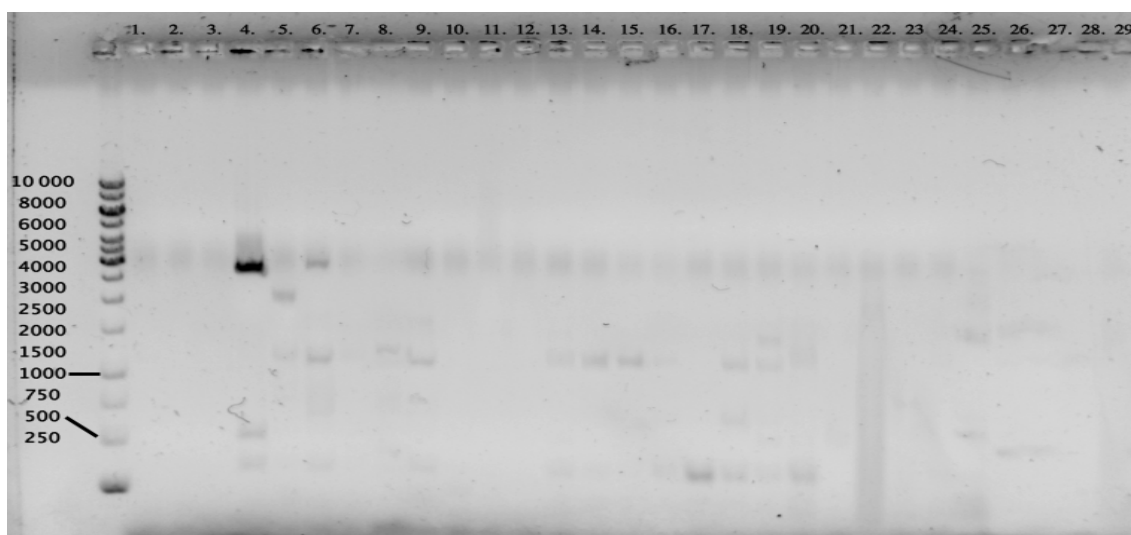
En insättning av *adhE*-genen för ättiksyravägen gav ett fragment på 1157 bp. För en jästcell utan genmodifiering erhöles ett fragment på 555 bp. Resultaten tydde på fyra positiva integreringar i *BY4741* (se Figur 7).

4. Resultat



Figur 7: En gelelektrofores av produkten från koloni-PCR utfördes för att hitta lyckade genmodifieringar av ättiksyravägen. Brunnarna 2-4 och 7 indikerar lyckade genmodifieringar av jäststammen *BY4741*. I resterande brunnar hade jäststammarna inte fått integrationen eller så hade banden smetat ut sig och kunde inte tolkas.

För *S288c* samt *CEN.PK* erhöles fragment kring 1000 bp vilket indikerade att positiva genmodifieringar skett även för dessa stammar (se Figur 8). Det framgick även att många fler fragment än de förväntade erhöles.



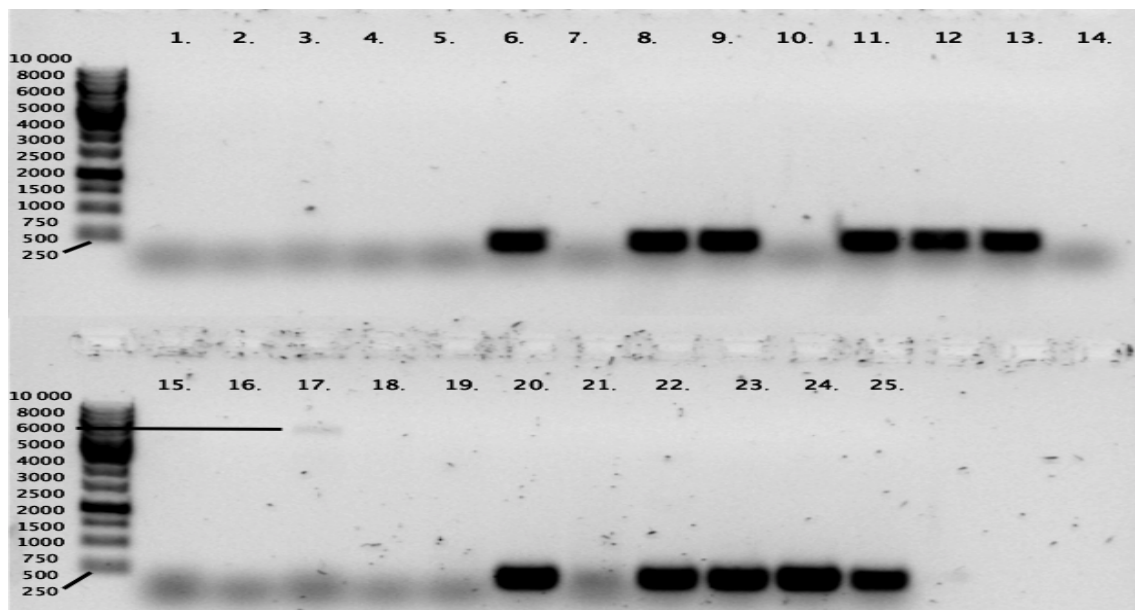
Figur 8: En gelelektrofores av produkten från koloni-PCR utfördes för att hitta lyckade genmodifieringar av ättiksyravägen. Brunnarna 5-6, 8-9, 13-15 samt 18-19 visade på indikationer av lyckade genmodifieringar. Brunnarna 5-6 samt 8-9 var från jäststammen *S288c* och 13-15 samt 18-19 var för stammen *CEN.PK*. I resterande brunnar hade jäststammarna inte fått insättningen eller så kunde resultatet inte tolkas för att banden smetat ut sig samt att många andra fragment uppkommit av koloni-PCR.

De flesta resultaten för insättningen av *adhE*-banden som erhöles från koloni-PCR hade ofta smetat ut sig och därav kunde inte resultaten från gelelektroforesen ge information om integrationen lyckats eller inte (se Figur 8). Omfattande felsökningar att finna orsaken för utsmetning av banden utfördes utan att hitta problemet.

4.4.2 Koloni-PCR på xyloskolonier

Utifrån resultaten från tillväxtprofileringen valdes de kolonier från plattorna som antogs vara positiva och undersöktes med koloni-PCR och gelelektrofores (se Tabell 4). För en korrekt insättning av den metaboliska vägen för xylos vid användning av EC62, EC63 samt EC124 ges fragment på 6 kilobaspar (kb) och 1197 bp av gelelektroforesen. Vidare ges en omodifierad fragmentstorleken 203 bp. Vid användning av endast EC62 och EC63 ges 6 kb för en lyckad insättning och 203 bp för ett negativt prov.

En lyckad transformation av stammen *LBCM97* indikerades av koloni-PCR och gelelektroforesen vid användning av alla tre oligonukleotider (se Figur 9). Vid användning av endast EC62 och EC63 på samma kolonier erhöles inget positivt resultat.



Figur 9: En gelelektrofores av produkten från koloni-PCR utfördes för att hitta lyckade genmodificeringar för xylosvägen. Brunn 17 hade en indikation på lyckad genmodificering av jäststammen *LBCM97* och hade ett fragment av storleken 6 kb. Brunnarna 6, 8-9, 11-13, 20 samt 22-25 hade ett fragment på runt 203 bp vilket indikerade att insättningen inte lyckades. I övriga brunnar erhöles inga fragment.

4.5 Stammarnas tillväxt i flytande medium

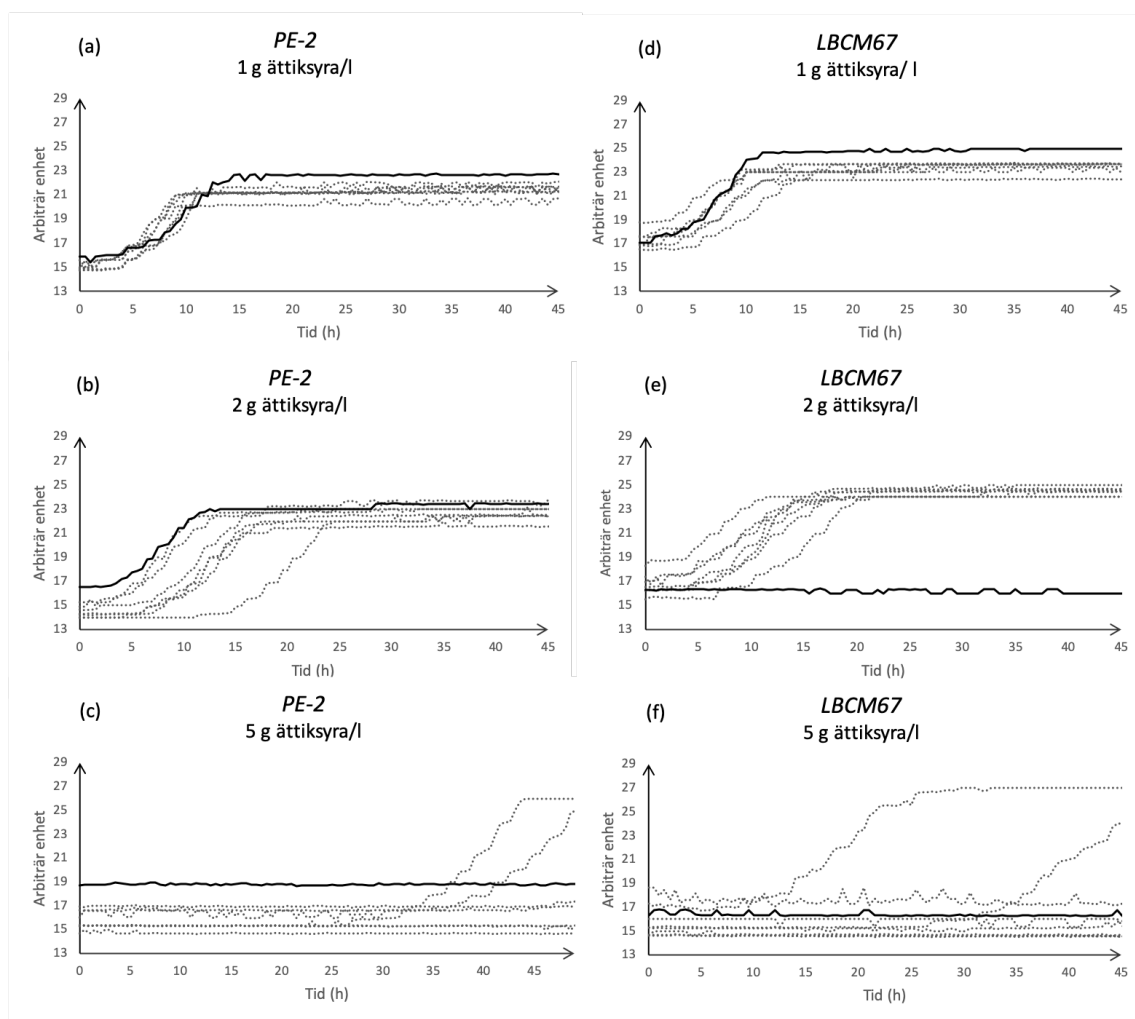
Data som erhöles från tillväxtprofileringen sammanställdes med pixeldensiteten, här med en arbiträr enhet, som funktion av tiden. Enbart ett urval av tillväxtsprofilerna för de olika stammarna presenteras här. Dessa stammar ansågs kunna beskriva tillväxten hos de olika stammarna på bästa sätt. Samtliga stammars tillväxt finns sammanställda i tabellform.

4.5.1 Tillväxt vid olika koncentrationer av ättiksyra

Tillväxten hos den industriella stammen *PE-2* i ett flytande medium med 1 respektive 2 g ättiksyra/l visade på att alla kolonier inklusive kontrollen växte i mediet

(se Figur 10a och b). I medium med 5 g ättiksyra/l var det två kolonier som växte medan de andra kolonierna inklusive kontrollen inte hade någon tillväxt (se Figur 10c).

LBCM67 hade, likt *PE-2*, tillväxt för samtliga kolonier inklusive kontrollen i medium med 1 g ättiksyra/l (se Figur 10d). Däremot, i medium med 2 g ättiksyra/l, växte alla kolonier utom kontrollen (se Figur 10e). Tillväxten av kolonierna i medium med 5 g ättiksyra/l visar att *LBCM67* hade två kolonier som kunde växa i mediet (se Figur 10f).

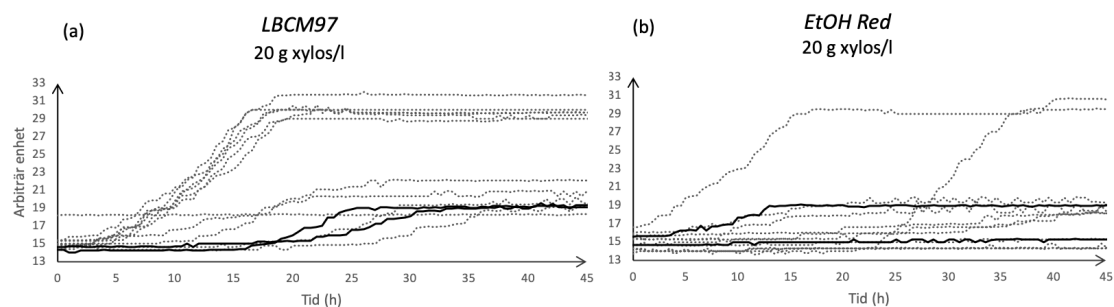


Figur 10: Tillväxt över tid hos transformerade jästceller med ättiksyra som enda kolkälla. De icke-transformerade kontrollkolonierna av samma stam visas i heldraget svart. Tillväxt hos den industriella stammen *PE-2* i (a) 1 g ättiksyra/l (b) 2 g ättiksyra/l och (c) 5 g ättiksyra/l. Tillväxt hos den laborativa stammen *LBCM67* i (d) 1 g ättiksyra/l, (e) 2 g ättiksyra/l och (f) 5 g ättiksyra/l.

4.5.2 Tillväxt med xylos som enda kolkälla

I flytande medium med xylos som enda kolkälla var tillväxten hos de transformerade jästcellerna olika beroende på stam. I vissa fall växte ingen av kolonierna och i andra fall växte en majoritet av kolonier bättre än de icke-transformerade kontroll-

kolonierna. Vildtypsstammen *LBCM97* hörde till de transformerade stammar som uppvisade tillväxt på xylos (se Figur 11a). Två transformerade kolonier av *EtOH Red* uppvisade skillnader i tillväxt gentemot kontrollen, men denna skillnad uppkom efter olika tidsintervall (se Figur 11b). De icke-transformerade kontrollkolonierna uppvisade för både *LBCM97* och *EtOH Red* en viss tillväxt med en arbiträr enhet på uppemot 19, men flera av kolonierna låg betydligt högre på runt 30.



Figur 11: Tillväxt över tid hos transformerade jästceller med 20 g xylos/l som enda kolkälla. De icke-transformerade kontrollkolonierna av samma stam visas i heldraget svart och analyserades två gånger. (a) Tillväxten hos *LBCM97* där flera kolonier uppvisade tillväxt relativt kontrollerna. (b) Tillväxten hos *EtOH Red* där två kolonier uppvisade större tillväxt än kontrollen, dock vid olika tidpunkter.

4.5.3 Sammanställning av resultat från tillväxtprofileringen

Resultaten från tillväxtprofileringen för samtliga stammar sammanställdes i form av antalet kolonier med tillväxt mot totala antalet kolonier som testades (se Tabell 4). Ingen av stammarna växte bättre än respektive kontroll på 1 g ättiksyra/l och för 2 g ättiksyra/l var resultatet liknande då endast *LBCM67* växte bättre än kontrollen. För 5 g ättiksyra/l varierade antalet stammar med tillväxt och detsamma gällde med xylos som kolkälla. Notera att stammen *KE6-12* redan hade en reaktionsväg för xylos.

4. Resultat

Tabell 4: Kolonier med större tillväxt än respektive kontroll/samtliga testade kolonier

Stam	Ättiksyra 1 g/l	Växande kontroll	Ättiksyra 2 g/l	Växande kontroll	Ättiksyra 5 g/l	Växande kontroll	Xylos	Växande kontroll
<i>S288c</i>	0/7	+	0/7	+	0/7	-	1/22	+
<i>CEN.PK</i>	0/7	+	0/7	+	0/7	-	1/11	+
<i>BY4741</i>	0/7	+	0/7	+	0/5	-	3/11	+
<i>EtOH Red</i>	0/7	+	0/7	+	0/7	-	2/11	+
<i>PE-2</i>	0/7	+	0/7	+	2/7	-	0/11	+
<i>KE6-12</i>	0/7	+	0/7	+	0/7	-	-*	+
<i>LBCM37</i>	0/7	+	0/7	+	0/11	-	6/22	+
<i>LBCM67</i>	0/7	+	7/7	-	2/9	-	0/11	+
<i>LBCM97</i>	0/7	+	0/7	+	0/11	+	6/11	+
<i>LBCM109</i>	0/7	+	0/7	+	0/7	+	0/11	+
<i>LBCM110</i>	0/7	+	0/7	+	0/7	+	1/11	+
<i>LBCM126</i>	0/7	+	0/7	+	0/10	-	0/11	+

* hade redan reaktionsväg för xylos

5 Diskussion

Introduktion av metaboliska vägar för xylos och ättiksyra i totalt 12 stammar genomfördes med CRISPR/Cas9-tekniken då tekniken kan ge snabbare stamutveckling [16]. Tekniken bygger på att gener av intresse integreras i det brott som endonukleaset Cas9 orsakar (se Figur 1) och på att vektorn som bär på en antibiotikaresistens inte integreras i jästens genom vid transformationen. Då generna integreras i genomet kan metoden användas för stamutveckling utan att senare behöva avlägsna markören, samtidigt som vektorns införande tillåter selektion av de transformerade jästcellerna. Avsaknaden av markör i genomet kommer samtidigt att försvåra selektionen av kolonier med genintegrering av de metaboliska vägarna [20]. Detta innebär att CRISPR/Cas9 kan användas för att i olika grad modifiera varierande stammar, men analysen av lyckade genmodifieringar försvåras.

Efter att de lyckade transformanterna identifierats genom selektion på antibiotika (G418) analyserades andelen lyckade genintegreringar på stammar med olika bakgrund. För att analysera genintegreringen av de metaboliska vägarna användes tre olika metoder; selektionsmedium på fast såväl som flytande medium med tillväxtprofilering samt koloni-PCR.

5.1 Stammar och transformation

Transformationerna av de två metaboliska vägarna lyckades för samtliga stammar, men skillnader i antal kolonier återfanns mellan dem. Den mest markanta skillnaden är att vildtypsstammarna *LBCM67*, *LBCM97*, *LBCM109* och *LBCM126* generellt sett hade färre kolonier än de övriga transformerade stammarna. För de två transformationerna observerades det att stammar som hade flest kolonier för ättiksyrafallet även hade flest kolonier i xylofallet. Denna observation indikerar att vissa stammar var enklare att transformera än andra.

Vid jämförelser mellan ättiksyravägen och xylosvägen, uppvisade ättiksyravägen generellt en högre andel lyckade transformationer (se Tabell 3). En möjlig förklaring till denna skillnad kan vara att ättiksyravägen endast inkluderade introduktionen av en gen medan xylosvägen inkluderade tre gener. Introduktion av fler gener kräver fler resurser vilket troligen kan påverka jästens viabilitet. Vidare kan storleken på vektorn påverka transformationen då det är svårare för större segment att ta sig igenom cellens membran och vägg. Däremot har vektorerna i dessa fall en liknande storlek på 9423 bp respektive 9366 bp för de två vägarna, och därför har storleken troligtvis inte gett upphov till skillnaden i antal lyckade transformationer.

5.2 Selektion på fast medium

Analysen av transformerade kolonier på selektionsplattor visade, för både ättiksyra- och xylosvägen, ingen skillnad i tillväxt. En möjlig förklaring till att samtliga kolonier med de två transformationerna, inklusive majoriteten av de negativa kontrollstammarna, växte är inkuberingstiden på fyra dagar. Detta kan ha resulterat i att stam-

marna hunnit anpassa sig till frånvaron av glukos som kolkälla och därför till viss del kunnat växa på både ättiksyra och xylos. Anpassningen till kolkällorna styrks av att de flesta kontrollstammar vid selektion i flytande medium växte på xylos och 1-2 g ättiksyra/l även om deras tillväxt var lägre än för de lyckade transformationerna.

Kontrollen för *LBCM67* uppvisade inte någon tillväxt på fast selektionsmedium, varken xylos eller ättiksyra. Det kan möjligtvis bero på att vissa vildtypsstammar inte har förmågan att växa på dessa alternativa kolkällor. Däremot noterades det att *LBCM67* kontrollen växte under tillväxtprofileringen vid 1 g ättiksyra/l samt 20 g xylos/l. Skillnaderna i kontrollens tillväxt i flytande jämfört med fast medium kan bero på att stämplingen av kolonierna skett oregelbundet för fast medium. Det skulle kunna leda till att olika mängd biomassa kan ha överförts till selektionsplattorna.

För tillväxt på fast medium kan koncentrationerna av ättiksyra varit för låga för att utgöra en inhibitor. Även tillväxtprofileringen stödjer resonemanget att ättiksyra-koncentrationen var för låg då alla kolonier hade liknande tillväxt som kontrollen för 1 g ättiksyra/l och 2 g ättiksyra/l (se Tabell 3). Att kolonierna på selektionsplattorna även växte på 5 g ättiksyra/l indikerar på att denna koncentrationen också var för låg för att inhibera celltillväxten.

5.3 Koloni-PCR

Koloni-PCR gav för vissa stammar tydliga resultat gällande ättiksyravägen, medan andra resultat var mer svårtolkade. För *BY4147* erhöles tydliga positiva resultat för integreringen av *adhE*-genen. De två andra laboriestammarna *S288c* och *CEN.PK* gav vid koloni-PCR svagare indikationer på positiv integrering för ättiksyravägen. I övrigt var det svårt att få resultat på koloni-PCR för ättiksyravägen och istället erhöles utsmetning av band. Det kan ha berott på att oligonukleotiderna som användes inte var optimala för att amplifiera just den önskade sekvensen. Vildtypsstammars genom är inte sekvenserat och risken finns därför att oligonukleotiderna inte varit anpassade för dessa och de önskade fragmentstorlekarna kan därför inte amplifieras. Dessutom kan det vara svårare att amplifiera från ett genom än till exempel en vektor då templatet är mycket större hos genomet. På grund av ovanstående problem kan det därför vara svårt att få resultat även om genen hade varit integrerad i genomet. Förutom att oligonukleotiderna inte var optimala kan utsmetningen bero på färgningen av gelen. SYBR-Safe eller GelGreen användes för att färga gelen där GelGreen gav band som var mer utsmetade. Däremot användes inte GelGreen i samtliga fall då utsmetning erhöles vilket indikerar att det inte var den enda orsaken till problemet.

När det kommer till koloni-PCR för xylosvägen hittades en indikation på en lyckad genmodifiering medan resterande resultat antingen var negativa eller inte gick att tolka. Indikationen på den lyckade genmodifieringen erhöles hos *LBCM97*. Däremot erhöles endast fragmentet på 6kb och inte på 1197 bp, vilket gör resultatet något osäkert. Fragmentet på 6 kb är väldigt stort och därmed inte optimalt för analy-

sering med koloni-PCR. Huvudmålet för att verifiera positiv insättning var att få fragmentet på 1197 bp. Att fragmentet inte erhöles kan bero på att oligonukleotiden EC124 inte var optimal för att binda in till jäststammarnas genom. Till skillnad från ättiksyravägen uppkom ingen utsmetning, men i vissa brunnar erhöles inga fragment alls. Fallen där inga fragment erhöles kan bero på att oligonukleotiderna inte bundit in till DNA:t och därav har det inte skett någon amplifiering av de önskade fragmenten. De brunnar som inte har några fragment skulle därmed kunna vara positiva kolonier för xylosvägen, men för att avgöra detta behövs vidare analys.

5.4 Tillväxtprofilering

För att vidare analysera vilka kolonier som integrerat generna användes tillväxtprofilering. Metoden särskiljer sig från de övriga selektionsmetoder som används eftersom tillväxtprofileringen, förutom att identifiera lyckade integreringar, även ger en indikation på hur mycket kolonierna från respektive stam vuxit genom att pixlarna mäts. Då ingen standardkurva för lösningarna gjordes inkluderar resultatet även bakgrundsbrus. Eftersom tillväxtprofileringen inkluderar raka linjer har bakgrundsbruset dock inte ökat under försökets gång och troligen inte påverkat resultatet negativt. Användandet av profileringen visade på att xylosvägen integrerats i ett flertal stammar, medan kolonier som blivit transformerade med ättiksyravägen inte entydigt visade på skillnader i tillväxt.

5.4.1 Tillväxtprofilering med ättiksyra

Med undantag för *LBCM67* visade resultaten från tillväxtprofileringen att inga kolonier vuxit bättre än sina kontroller i medier med 1 g ättiksyra/l respektive 2 g ättiksyra/l. Alla kolonier inklusive kontrollerna hade vuxit, vilket kan indikera att en för låg koncentration av ättiksyra använts (se Figur 10).

Av de kolonier som odlades i medium med 5 g ättiksyra/l var det ytterst få som klarade av att växa. Även om den metaboliska vägen för ättiksyra lyckades bli introducerad i cellerna är det fortfarande möjligt att den inte ger en tillräckligt stor förbättring av jästens metabolism för att kunna växa i denna koncentration. Dessutom är inte *adhE*-genen kodonoptimerad då den kommer från *E. coli K-12* vilket också skulle kunna påverka uttrycket av genen. Ättiksyrakoncentrationen kan alltså ha varit för hög för att kunna verifiera lyckade transformanter.

En annan faktor skulle kunna vara att pH inte kontrollerades för proverna med 5 g ättiksyra/l. Detta kan ha lett till att pH har varit under 5 vilket inte är optimalt för cellernas tillväxt. Det vill säga, cellerna hade inte de rätta förutsättningarna för att växa även om ättiksyravägen introducerats korrekt och borde gjort det möjligt för dem att växa i mediet. Tre kontroller växte på 5 g ättiksyra/l och alla var vildtypsstammar. Att vildtypsstammarna växte beror troligen på att de tål det låga pH:t då det till exempel är känt sedan tidigare att *LBCM97* kan växa vid låga pH [3]. När det kommer till *LBCM37* har den också visats kunna tolerera varierande pH, dock växte inte kontrollkolonin för *LBCM37* på 5 g ättiksyra/l. En förklaring kan

vara att denna stam inte kan växa på ättiksyra medan *LBCM97* kan det.

För kolonierna av *PE-2* och *LBCM67* som vid 5 g ättiksyra/l vuxit trots eventuellt ogynnsamt pH är det stor sannolikhet att de integrerat *adhE*-genen (se Figur 10). Dock är det värt att ta i beaktande att även de resterande kolonierna i det här fallet kan ha fått ättiksyravägen introducerad, men har svårare att kompensera för ett lågt pH. Vidare har tidigare studier visat att *PE-2* har en högre pH-tolerans än exempelvis laboriestammar vilket delvis kan förklara varför dessa stammar kunde växa på 5 g xylos/l trots att pH inte kontrollerats [34].

5.4.2 Tillväxtprofilering med xylos

Totalt erhöles 20 indikationer på lyckade insättningar av xyloskassetten (se Tabell 4). De jäststammar som inte erhöles någon lyckad insättning var den industriella stammen *PE-2* samt tre av vildtypsstammarna *LBCM67*, *LBCM109* och *LBCM126*. De två vildtypsstammar med flest indikationer på lyckad insättning var *LBCM37* samt *LBCM97*.

I vissa fall föreföll även kontrollkolonin ha en viss tillväxt på medium med xylos som kolkälla. Detta skedde exempelvis för *LBCM97* (se Figur 11a). Denna tillväxt skulle kunna innebära att även de ickemodifierade jästcellerna av *LBCM97* har möjlighet att bryta ner xylos i begränsad mängd. I relation mot de positiva kolonier som uppvisar stor tillväxt är tillväxten hos kolonierna emellertid förhållandevis liten. Denna skillnad i tillväxt gör att det är troligt att den nya reaktionsvägen för xylos trots allt integrerats hos de kolonier som vuxit bättre än kontrollerna (se Tabell 4).

5.4.3 Diploida och polyploida stammar i tillväxtprofilering

Hos diploida och polyploida stammar är det möjligt att genmodifieringen inte skett i alla kromosomuppsättningar. Tillväxten hos de två starkast växande kolonierna av *EtOH Red* startar efter 0 respektive 24 timmar (se Figur 11b). Dessa skillnader i längd på fördröjningsfasen (lag-fas) kan bero på att olika antal genmodifieringar har skett i de olika kolonierna. Om xylosvägen endast har introducerats i ena uppsättningen av kromosomer kan det påverka hur snabbt jästen kan metabolisera xylos och komma in i log-fas. En dubbel uppsättning gener kan antas ge ett större uttryck av xylosvägen och därmed en snabbare förmåga att växa på xylos. Om xyloskassetten istället är introducerad i båda kromosomuppsättningarna kan enzymerna för xylosnedbrytning ha producerats fortare, vilket kan vara orsaken bakom den kortare fördröjningsfasen. Liknande resonemang kan förklara tillväxten hos vissa kolonier för *LBCM67* samt *PE-2* för ättiksyravägen (se Figur 10f).

5.5 Koloni-PCR och tillväxtprofilering som analysmetod

Generellt är koloni-PCR en bra metod för att verifiera insättning av gener, då de fragment som erhålls vid verifiering med gelelektrofores visar huruvida DNA:t är integrerat på rätt ställe. Det gäller dock att oligonukleotiderna är sekvensoptimerade

men trots det finns det ändå svårigheter till att en amplifiering sker.

Tillväxtprofilering som metod är en bra utgångspunkt för analysering av transformanter. Metoden ger data som smidigt går att jämföra mellan olika stammar samtidigt som den visar om cellerna kan växa i det medium som valts ut. Det finns däremot en del begränsningar med metoden. Förutom att tillväxtprofilering är tidskrävande, både när det gäller förberedelser och själva mätningar, är den svår att optimera då medierna spelar stor roll för resultaten. Vidare ger den inte helt tillförlitliga resultat, då metoden inte säger något om var genen av intresse har integrerats.

Enligt tillväxtprofileringen har vissa celler fått genen integrerad (se Tabell 4), medan koloni-PCR visade på att ingen kassett integrerats. Anledningen till att tillväxtprofileringen och koloni-PCR indikerade olika resultat kan bero på att insättningen av genen skett på fel plats i genomet. Sitter genen på fel plats visas inte det av koloni-PCR då oligonukleotiderna endast binder till området där insättningen är tänkt att ske. Däremot kan en ospecifik insättning av genen ge utslag i tillväxtprofileringen. Dessutom kan det i polyploida jäststammar vara så att inte alla kopior av kromosomen fått insättningen utan bara några. På koloni-PCR erhålles då ett svagt fragment som tyder på korrekt integrering av donator-DNA samt ett svagt fragment som tyder på en icke lyckad gensättning. På tillväxtprofilering skulle som nämnts detta ge resultat. Tillväxtprofilering visade sig vara en bra metod för att få en överblick på vilket medium kolonierna kan växa men för analys av korrekt insättning krävs komplettering med exempelvis koloni-PCR.

5.6 CRISPR/Cas9 som genmodifieringsmetod

Det finns flera fördelar med CRISPR/Cas9 som genmodifieringsmetod. Den största fördelen är att det inte krävs någon selektionsmarkör, som exempelvis antibiotikaresistens, för att föra in nytt genetiskt material i cellers genom. Att selektionsmarkörerna inte integreras i genomet är fördelaktigt vid genmodifiering av polyploida jästceller då det är svårt att få in, respektive ut, markören ur samtliga kromosomuppsättningar [14]. Dessutom vill inte industrin ha antibiotikaresistens i cellers genom och därmed är det positivt att kunna göra genmodifieringar utan markörer [24].

Avsaknaden av selektionsmarkörer i genomet försvårar dock selektionen av lyckade gensättningar jämfört med traditionella genmodifieringsmetoder, då cellerna som framgångsrikt integrerat genen inte kan identifieras genast [20]. Detta har avspeglats i denna studie genom att det har varit svårt att selektera för de positiva integreringarna. Därmed blev det ett stort fokus på att hitta en fungerande selekteringsmetod för analys av integrering istället för att, som syftet med denna studie, analysera effekten av de lyckade genmodifieringarna.

En annan fördel med CRISPR/Cas9 är att polyploida stammar av *S. cerevisiae* kan genmodifieras. Men även om CRISPR/Cas9-tekniken har lättare att genmodifiera polyploida jästceller så är dessa fortfarande inte lika lätta att modifiera som laboriestammar. Vid genmodifiering av ättiksyravägen lyckades integreringen hos alla

laboratoriestammar enligt koloni-PCR (se Figur 7 samt Figur 8), men endast en industriell stam samt en vildtypsstam hade lyckad integrering enligt tillväxtprofilerna (se Tabell 4).

5.7 Hållbar utveckling kring bibränslen

Biobränslen bygger på användning av biomassa som är en förnybar, men inte obegränsad, resurs [38]. Det är därför viktigt att den biomassa som används vid produktionen av biobränslen, såväl som den jordbruksmark som biomassan kommer ifrån, utnyttjas effektivt.

Lignocellulosan som används kommer ofta från skogsområden, men om behovet på skog som källa för biomassa ökar finns risken att avverkningen av denna skog ger negativt utslag på koldioxidutsläppen [4]. Främst handlar denna problematik om risken att behöva breda plats till skogsbruket där återväxten av träd riskerar att vara långsammare än nedhuggningen av både träd och annan vegetabilitet [4]. Vidare kan ökad användning av restprodukter från skogsindustrin leda till att skogarna urlakas på näring där näringsämnen som kväve och fosfor, vilka vanligtvis återvinns av bakterier, försvinner från skogarna [39]. Det är därför av vikt att den skog som används inom andra generationens biobränslen används i största möjliga grad och att skogshållning sker effektivt [38]. Vidare skulle nedbrytningen av samtliga delar lignocellulosa potentiellt kunna effektivisera produktionen av andra generationens biobränsle.

Utvecklingen av tredje såväl som fjärde generationens biobränslen har börjat ske. Tredje generationens bygger på användning av mikroalger i vattendrag som kan utnyttja näringsämnen från industriavfall för att växa och generera biomassa [6]. Denna biomassa är rik på kolhydrater men även oljor, vilka kan generera biodiesel [6]. Förutom att mikroalger bidrar till att återvinna restavfall från industrierna binder de även in koldioxid, vilket gör att koldioxidmängden i atmosfären minskar [6]. Algerna kommer heller inte konkurrera om marken på samma sätt som den biomassa som används i första och andra generationens biobränslen [6]. Fjärde generationens biobränslen bygger istället på att mikroorganismer blir modifierade för att kunna använda råmaterial som inte är begränsade av organiska råvaror eller jordbruksmark [40]. Exempelvis modifieras bakterier för att kunna växa på gaser i atmosfären, exempelvis syngas, eller att använda cyanobakterier för att producera bränslen från solljus [40]. Den tredje och fjärde generationens biobränslen kommer därmed inte konkurrera med andra industrier i lika stor utsträckning, samt att de inte behöver stora jordbruksytor.

5.8 Etik kring genetiskt modifierade organismer

Genetiskt modifierade organismer (GMO) är ett omdebatterat ämne och diskussionen kring användandet av CRISPR/Cas9-tekniken är pågående. Sommaren 2018 fick EU nya direktiv där organismer som erhålls genom direkt mutagenes, därav via CRISPR/Cas9-tekniken, nu anses som GMO [41]. Organismer klassas som GMO

om modifieringar i organismers genom erhållits på onaturlig väg, exempelvis genom införandet av nya gener eller genom direkt mutagenes av befintligt genom [42]. Traditionell rekombination eller parning klassas därmed inte som GMO då modifieringarna introduceras på naturlig väg.

Regleringen för GMO är uppdelad beroende på typ av verksamhet, innesluten användning, avsiktlig utsättning och utsläppande på marknaden [43]. Användning och forskning av GMO i laboratorie- samt industrimiljö är verksamheter med innesluten användning och regleras därmed efter tillhörande regulationer [44]. Enligt regulationen krävs det en anmälan eller ett tillstånd från Arbetsmiljöverket för att bedriva en verksamhet med innesluten användning av GMO i Sverige. De regulationer som finns kring innesluten användning av GMO begär bland annat att en riskanalys av arbetet utförs där även skyddsåtgärder ska beskrivas [45]. Dessutom ska också avfall som berört eller består av GMO dekontamineras samt hanteras på ett säkert sätt där hälsa och miljö inte riskeras.

5.9 Framtida studier

För framtida studier hade det både varit intressant att vidare utveckla selekteringsmetoder samt ytterligare analysera stammar som genmodifierats med de metaboliska vägar för ättiksyra och xylos. De analysmetoder som användes i denna studie lyckades inte effektivt identifiera de kolonier som hade eller inte hade integrerat de nya generna i sina genom. Både koloni-PCR och selektionplattorna gav i flera fall bristfälliga resultat där ingen slutsats kunde dras. Det hade därför varit av vikt att utveckla och optimera selektionsmetoderna för att bättre kunna undersöka de transformerade stammarna. Vidare hade det varit intressant att analysera etanolproduktionen för de kolonier med nya metaboliska vägar när jästen växer i respektive medium under anaeroba förhållanden.

Det bildas även andra pentoser i nedbrytning av lignocellulosa och det hade därför varit av betydelse för etanolproduktionen om *S. cerevisiae* kunde metabolisera även dessa. Ett naturligt framtida steg är således att även införa metaboliska vägar för andra pentoser, exempelvis arabinos, i *S. cerevisiae*. Vidare kan flera metaboliska vägar för alternativa kolkällor föras in i samma jästcell. Introduktion av flera vägar kommer förutom att jästen utnyttjar större andel av sockerarterna även ha andra fördelar som effektiviserar etanolproduktionen. Bland annat kan redoxbalansen som bildas när de olika vägar för xylos- och ättiksyrakonsumtionen introduceras i olika celler förebyggas genom att introducera dessa vägar i samma cell.

För djupare analys av de genmodifierade stammarna kan tillväxten samt etanolproduktionen studeras när de får växa i medium med hydrolyserad lignocellulosa. Därutöver är det av betydelse att studera effekten av de nya metaboliska vägar för konsumtionen av andra kolkällor än glukos. Analys av tillväxten hade dessutom gett information om huruvida det finns andra komponenter i den hydrolyserade lignocellulosan som kan påverka tillväxten eller fermenteringen.

6 Slutsats

I denna studie lyckades de utvalda stammarna av *S. cerevisiae* transformeras med CRISPR/Cas9-tekniken för att introducera metaboliska vägar för nedbrytning av ättiksyra och xylos från hydrolyserad lignocellulosa. Resultaten tyder på att transformationen av laboriestammarna generellt gav upphov till fler transformerade kolonier än de industriella stammarna samt vildtypsstammarna. Vidare visades det att vildtypsstammarna hade en varierande effektivitet, där *LBCM37* och *LBCM110* hade fler lyckade transformationer, samtidigt som de övriga vildtypsstammarna uppvisade lägst andel lyckade transformationer. Användandet av tillväxtprofilering och koloni-PCR indikerade att genmodifieringen av vissa stammar lyckats. Tillväxtprofilering samt koloni-PCR indikerade därmed att CRISPR/Cas9-tekniken fungerade som metod för att introducera de önskade metaboliska vägarna i laboriestammar såväl som industriella stammar och vildtypsstammar. Ett problem med CRISPR/Cas9-tekniken var dock att avsaknaden av en markör gav upphov till att selektionen av lyckade genintegreringar försvåras. En kombination av tillväxtprofilering och optimerad koloni-PCR skulle därmed kunna minimera problemet med selektionen och på så vis skulle mer entydiga resultat kunna erhållas. Denna studie visar att CRISPR/Cas9 är en användbar metod för att integrera nya metaboliska vägar i *S. cerevisiae* och ytterligare studier kring stammarna skulle kunna ge viktig information i utvecklingen av bioetanol.

Referenser

- [1] Turner T.L., Kim H., Kong I.I., Liu J.J., Jin Y.S. och Zhang G.C. Engineering and evolution of *Saccharomyces cerevisiae* to produce biofuels and chemicals. 162:175–215, 2016.
- [2] Turner T.L., Kim H., Kong I.I., Jin Y.S. och Kim S.R. Phenotypic evaluation and characterization of 21 industrial *Saccharomyces cerevisiae* yeast strains. *FEMS Yeast Research*, 18(1), 2018.
- [3] da Conceição L.E.F.R., Saraiva M.A.F., Diniz R.H.S., Oliveira J., Barbosa G.D., Alvarez F. m.fl. Biotechnological potential of yeast isolates from cachaça: the Brazilian spirit. *Journal of Industrial Microbiology Biotechnology*, 42(2):237–246, 2015.
- [4] Zanchi G., Pena N. och Bird N. Is woody bioenergy carbon neutral? A comparative assessment of emissions from consumption of woody bioenergy and fossil fuel. 4(6):761–772, 2012.
- [5] Wang X., Yang J., Yang S. och Jiang Y. Unraveling the genetic basis of fast L-arabinose consumption on top of recombinant xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae*. 116(2):283–293, 2019.
- [6] Robak K. och Balcerek M. Review of second generation bioethanol production from residual biomass. *Food Technol Biotechnol*, 56(2):174–187, 2018.
- [7] Nigam P.S. och Singh A. Production of liquid biofuels from renewable resources. *Progress in Energy and Combustion Science*, 37(1):52–68, 2011.
- [8] Novy V., Wang R., Westman J.O., Franzén C.J. och Nidetzky B. *Saccharomyces cerevisiae* strain comparison in glucose–xylose fermentations on defined substrates and in high-gravity SSCF: convergence in strain performance despite differences in genetic and evolutionary engineering history. *Biotechnology for Biofuels*, 10(1):205, 2017.
- [9] Jönsson L.J. och Martín C. Pretreatment of lignocellulose: Formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects. *Bioresource Technology*, 199:103–112, 2016.
- [10] Wei N., Quarterman J., Kim S.R. Cate J.H. och Jin Y.S. Enhanced biofuel production through coupled acetic acid and xylose consumption by engineered yeast. *Nature Communications*, 4:2580, 2013.
- [11] Naik S.N., Goud V.V., Rout P.K. och Dalai A.K. Production of first and second generation biofuels: A comprehensive review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14(2):578 – 597, 2010.
- [12] Wahlbom C.F., Jönsson L.J., Hahn-Hägerdal B., Otero-Cordero R. och van Zyl W.H. Generation of the improved recombinant xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* TMB 3400 by random mutagenesis and physiological comparison with *Pichia stipitis* CBS 6054. *FEMS Yeast Research*, 3(3):319–326, 2003.
- [13] Peng B., Huang S., Liu T. och Geng A. Bacterial xylose isomerases from the mammal gut Bacteroidetes cluster function in *Saccharomyces cerevisiae* for effective xylose fermentation. *Microb Cell Fact*, 14:70, 2015.
- [14] Zhang G.C., Kong I.I., Kim H., Liu J.J., Cate J.H.D. m.fl. Construction of a quadruple auxotrophic mutant of an industrial polyploid *Saccharomyces cere-*

- visiae* strain by using RNA-guided Cas9 nuclease. *Applied and environmental microbiology*, 80(24):7694–7701, 2014.
- [15] Louis E.J. Historical evolution of laboratory strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2016(7), 2016.
- [16] Stovicek V., Borodina I. och Forster J. CRISPR–Cas system enables fast and simple genome editing of industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Metabolic Engineering Communications*, 2:13–22, 2015.
- [17] Donohoue P.D., Barrangou R. och May A.P. Advances in industrial biotechnology using CRISPR-Cas systems. *Trends in Biotechnology*, 36(2):134–146, 2018.
- [18] Estrela R. och Cate J.H.D. Energy biotechnology in the CRISPR-Cas9 era. *Current Opinion in Biotechnology*, 38:79–84, 2016.
- [19] Karcher S.J. och Ness B. Polyploidy . *Salem Press Encyclopedia of Health*, 2019.
- [20] Stovicek V., Holkenbrink C. och Borodina I. CRISPR/Cas system for yeast genome engineering: advances and applications. *FEMS Yeast Res*, 17(5), 2017.
- [21] Steensels J., Snoek T., Meersman E., Nicolino M.P., Voordeckers K. och Verstrepen K.J. Improving industrial yeast strains: exploiting natural and artificial diversity. *FEMS Microbiology Reviews*, 38(5):947–995, 2014.
- [22] Kim S.R., Skerker J., Kong I.I., Kim H., Maurer M.J., Zhang G.C. m.fl. Metabolic engineering of a haploid strain derived from a triploid industrial yeast for producing cellulosic ethanol. *Metabolic Engineering*, 40:176–185, 2017.
- [23] Singer Instrument Company Limited. Yeast genetics. <https://www.singerinstruments.com/resource/what-is-yeast-genetics/>. [Online; citerad 2019-04-24].
- [24] Hashimoto S., Ogura M., Aritomi K., Hoshida H., Nishizawa Y. och Akada R. Isolation of auxotrophic mutants of diploid industrial yeast strains after UV mutagenesis. *Applied and environmental microbiology*, 71(1):312–319, 2005.
- [25] Lee M.E., DeLoache W.C., Cervantes B. och Dueber J.E. A highly characterized yeast toolkit for modular, multipart assembly. *ACS Synth Biol*, 4(9):975–86, 2015.
- [26] Gao S., Honey S., Futcher B. och Grollman A.P. The non-homologous end-joining pathway of *S. cerevisiae* works effectively in G1-phase cells, and religates cognate ends correctly and non-randomly. *DNA Repair*, 42:1–10, 2016.
- [27] Kawai S., Hashimoto W. och Murata K. Transformation of *Saccharomyces cerevisiae* and other fungi: methods and possible underlying mechanism. *Bioengineered bugs*, 1(6):395–403, 2010.
- [28] New England BioLabs. Colony PCR. <https://www.neb.com/applications/cloning-and-synthetic-biology/dna-analysis/colony-pcr>. [Online; citerad 2019-05-14].
- [29] Ronald M. Atlas. *Handbook of Media for Environmental Microbiology* . Taylor Francis Group, 2 utgåvan, 2005.
- [30] Jin Y.S., Ni H., Laplaza J.M. och Jeffries T.W. Optimal growth and ethanol production from xylose by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* require moderate D-xylulokinase activity. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(1):495–503, 2003.

-
- [31] Ghosh A., Zhao H. och Price N.D. Genome-scale consequences of cofactor balancing in engineered pentose utilization pathways in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS One*, 6(11), 2011.
- [32] Zonneveld B.J. och van der Zanden A.L. The red ade mutants of *Kluyveromyces lactis* and their classification by complementation with cloned ADE1 or ADE2 genes from *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 11:823–827, 1995.
- [33] Argueso J.L., Carazzolle M.F., Mieczkowski P.A., Duarte F.M., Netto O.V., Missawa S.K. m.fl. Genome structure of a *Saccharomyces cerevisiae* strain widely used in bioethanol production. *Genome Research*, 19(12):2258–2270, 2009.
- [34] Della-Bianca B.E., de Hulster E., Pronk J.T., van Maris A.J. och Gombert A.K. Physiology of the fuel ethanol strain *Saccharomyces cerevisiae* PE-2 at low pH indicates a context-dependent performance relevant for industrial applications. *FEMS Yeast Research*, 14(8):1196–1205, 2014.
- [35] Westman J.O., Bonander N., Taherzadeh M.J. och Franzén C.J. Improved sugar co-utilisation by encapsulation of a recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strain in alginate-chitosan capsules. *Biotechnology for Biofuels*, 7(1):102, 2014.
- [36] Hector R.E., Dien B.S., Cotta M.A. och Qureshi N. Engineering industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains for xylose fermentation and comparison for switchgrass conversion. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 38(9):1193–202, 2011.
- [37] EnzyScreen B.V. Growth profiler 960. https://www.enzyScreen.com/growth_profiler.htm. [Online; citerad 2019-05-15].
- [38] Axenbom Å., Bjursell S., Ebenå G., Eriksson E., Guldbrand L., Högberg M. m.fl. Bioenergi – en viktig pusselbit i klimatfrågan. Energiutblick. Energimyndigheten, 2007.
- [39] Ågren G. och Hyvönen-Olsson R. Fungerar kretsloppen om vi använder mera biobränslen? SLU Publikationstjänst, Uppsala, 2006.
- [40] Aro E.M. From first generation biofuels to advanced solar biofuels. *Ambio*, 45 Suppl 1(Suppl 1):24–31, 2016.
- [41] European Commission. A scientific perspective on the regulatory status of products derived from gene editing and the implications for the GMO directive. https://ec.europa.eu/info/sites/info/files/2018_11_gcsa_statement_gene_editing_1.pdf, 2018. [Online; citerad 2019-05-14].
- [42] Karnov Group. Förordning (2000:271) om innesluten användning av genetiskt modifierade organismer. <https://open.karnovgroup.se/miljoratt-och-halsoskydd/SFS2000-0271>, 2000. [Online; citerad 2019-05-14].
- [43] European Commission. GMO legislation. https://ec.europa.eu/food/plant/gmo/legislation_en. [Online; citerad 2019-05-14].
- [44] Arbetsmiljöverket. Genteknik – innesluten användning av gmm. <https://www.av.se/halsa-och-sakerhet/innesluten-anvandning-av-gmm/>, 2016. [Online; citerad 2019-05-14].
- [45] Arbetsmiljöverket. Innesluten användning av genetiskt modifierade mikroorganismer. 2011.

A Protokoll för transformation

Protokoll för införandet av genetiskt material i cellerna. Proceduren utfördes för både xylos- och ättiksyravägen.

A.1 Förberedelse för transformation

- Odlja jäststammen på (YPD) agarplattor (~2 dagar). För stammar som växer dåligt på glukos kan andra kolkällor användas.
- Skrapa cellerna från plattan och inokulera cellerna i ~10 ml YPD.
- Inkubera cellerna över natten vid 30°C och skakning på 280 vpm.

A.2 Procedur för transformation

- Förbered en YPD-kultur (5 ml/transformation) med ett OD₆₀₀ på 0.4.
- Utför sammanfogning av enkelsträngad DNA enligt följande:
 - Blanda 20 µl (100 µM) av enkelsträngad oligonukleotid (framåt) + 20 µl (100 µM) av enkelsträngad oligonukleotid (revers) + 10 µl 5x T4 ligasbuffer (t ex New England Biolabs, Fermentas) och blanda väl;
 - Håll blandningen vid 98°C i 5 min för att denaturera oligonukleotiderna;
 - Sänk temperaturen gradvis (1°C/30 sekunder) under 86 cykler (vilket är en ungefärlig sänkning på 0.0333°C/s), för att tillåta sammanfogning av oligonukleotiderna;
 - Håll blandningen vid 12°C vid behov
- Odlja cellerna till ett OD₆₀₀ på 1.0-1.5 (2 till 6 h) med skakning på 280 vpm vid 30°C.
- Centrifugera 3 min med 3,000 vpm (stora centrifugen).
- Tvätta cellerna två gånger med 25 ml sterilt vatten.
- Resuspendera pelleten i sterilt 0.1 M LiAc (100 µl/transformation) och flytta över till en eppendorftub.
- Centrifugera vid 1,300 g i 1 min (från och med nu bordscentrifugen).
- Resuspendera pelleten i 0.1 M LiAc (använd 100 µl/transformation).
- Centrifugera vid 1,300 g i 1 min.
- Avlägsna supernatanten och tillsätt till den torra pelleten i följande ordning:
 - 240 µl 50% PEG4000
 - 35 µl 1 M LiAc
 - 75 µl DNA-mix
- Vortexa tills pelleten har resuspenderat helt.
- Inkubera i 30 min på ett värmeblock vid 30°C.
- Utför en värmeshock i 20 min vid 42°C (vattenbad).
- Centrifugera tuberna vid 1,300 g i 1 min och avlägsna supernatanten.
- Resuspendera cellerna försiktigt i 0.5 ml YPD och inkubera skakandes vid 30°C i 2 h (Thermomixer), för att underlätta uttrycket av resistensmarkören.
- Resuspendera cellerna försiktigt i 1 ml sterilt vatten och stryk ut 100 µl på en G418-selektionsplatta (1/10).
- Centrifugera ner resterande celler i 1 min vid 1,300 vpm.

A. Protokoll för transformation

- Avlägsna supernatanten och resuspendera pelleten i 100 μ l sterilt vatten och stryk ut på en andra G418-selektionsplatta (9/10).
- Inkubera 2-5 dagar vid 30°C (30°C-rummet i SysBio-labbet) tills transformanter vuxit.

B Lösningar och agarplattor

Samtliga lösningar och agarplattor som användes i denna studie förbereddes med samma koncentrationer på de olika komponenterna genom hela studien. Lösningarna steriliserades genom autoklavering alternativt filtrering beroende på lösningens egenskaper och i flera fall justerades även pH för att främja optimal tillväxt.

B.1 YPD

YPD-medium förbereddes genom att jästextrakt, pepton samt vatten autoklaverades i en behållare och glukoslösningen i en annan (se Tabell B.1).

Tabell B.1: Koncentrationer i YPD

Reagens	Slutkoncentration	Steriliserad
Jästextrakt	10 g/l	Autoklaverade
Pepton	20 g/l	
Glukos	20 g/l	Autoklaverad

B.2 Kompletet syntetiskt medium

Agarplattor med komplett syntetiskt medium förbereddes genom att de olika reagensen steriliserades separat. För de lösningar som filtrerades användes genomgående filter med porstorlek av 42 mikrometer. Kolkällan i form av ättiksyra eller xylos adderades till mediet före platttillverkning.

B.2.1 Agarplattor med ättiksyra

För att selektera fram de transformanter som kunde bryta ner ättiksyra användes agarplattor med olika koncentrationer av ättiksyra (se Tabell B.2). YNB (yeast nitrogen base) utan aminosyror, ammoniumsulfat samt CSM (complete supplement mixture) filtrerades tillsammans och ättiksyra filtrerades separat. För båda lösningarna justerades pH till 5 innan filtrering. Agarlösningen autoklaverades för sig.

Tabell B.2: Koncentrationer i ättiksyraplattor

Reagens	Slutkoncentration	Steriliserad
YNB	1,7 g/l	Filtrerade
Ammoniumsulfat	5 g/l	
CSM	Se behållare	Autoklaverad
Agar	20 g/l	
Ättiksyra	1 g/l, 2 g/l eller 5 g/l	Filtrerad

B.2.2 Agarplattor med xylos

För att analysera xylostranformanternas användes agarplattor med xylos som kolkälla istället för glukos (se Tabell B.3).

Tabell B.3: Koncentrationer i xylosplattor

Reagens	Slutkoncentration	Steriliserad
Jästkvävebas (YNB)	1,7 g/l	Autoklaverad
Ammoniumsulfat	5 g/l	
CSM	Se behållare	
Agar	20 g/l	
Xylos	20 g/l	Autoklaverad

B.3 Media samt agarplattor för *E. coli*

För att odla *E. coli* krävdes så kallat LB-medium (lysogeny broth). Detta medium förbereddes (se Tabell B.4) varefter pH justerades till 7.

Tabell B.4: Koncentrationer i LB-medium

Reagens	Slutkoncentration
NaCl	10 g/l
Trypton	10 g/l
Jästextrakt	5 g/l
Vatten	Önskad volym

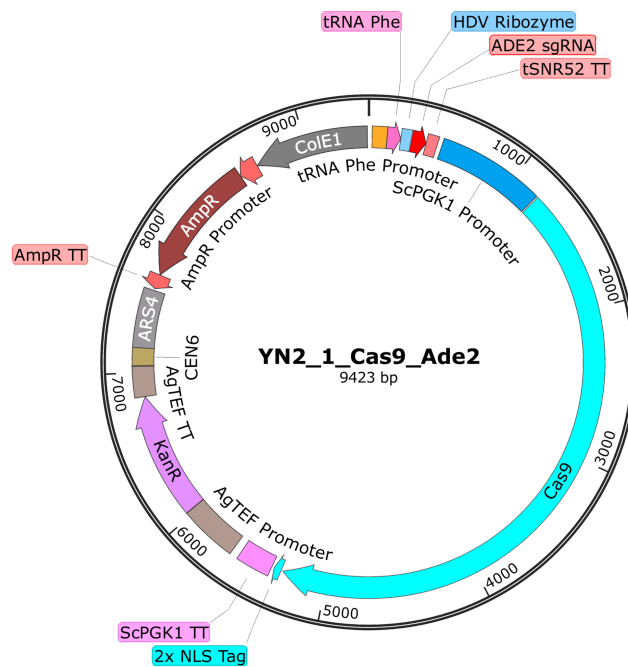
Till agarplattor med LB-medium adderades även 20 g/l agar. Samtliga lösningarna autoklaverades innan platttillverkning.

C Vektorkartor och sekvenser

Vektorkartor över de vektorer som användes i studien. Därutöver listas sekvenser på sgRNA och oligonukleotider.

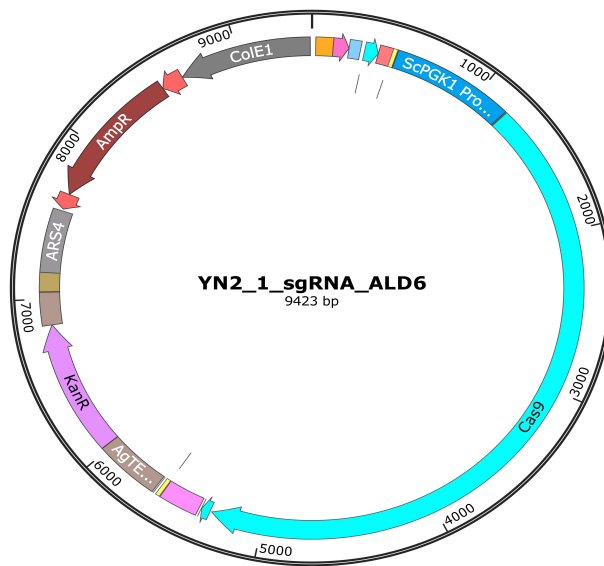
C.1 Vektorkartor

YN2-vektorn som användes vid verifieringen av CRISPR/Cas9-tekniken innehöll CRISPR/Cas9-systemet samt sgRNA med *ADE2*-genen som målsekvens (se Figur C.1 för vektorkarta).



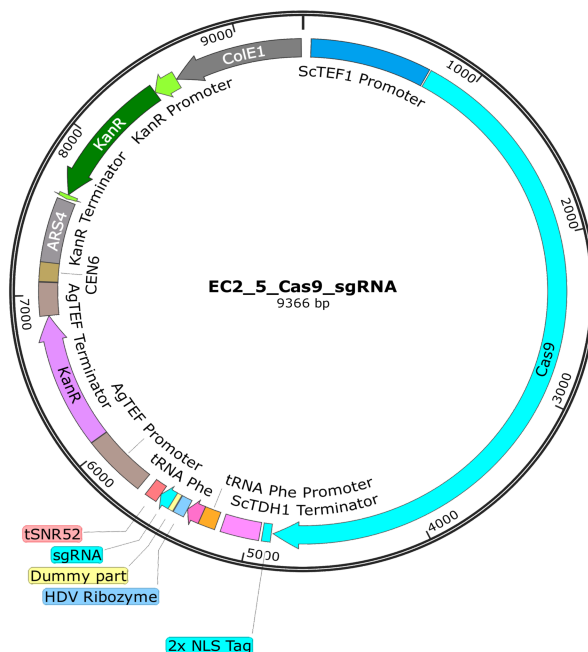
Figur C.1: Karta över vektorn YN2 innehållande CRISPR/Cas9-systemet och sgRNA med *ADE2*-genen som målsekvens.

YN2-vektorn som användes vid transformationen av den metaboliska vägen för ättiksyra innehöll CRISPR/Cas9-systemet och sgRNA med *ALD6*-genen som målsekvens (se Figur C.2 för vektorkarta).



Figur C.2: Karta över vektorn YN2 innehållande CRISPR/Cas9-systemet och sgRNA med *ALD6*-genen som målsekvns.

EC2-vektorn som användes vid transformationen av den metaboliska vägen för xylos innehöll CRISPR/Cas9-systemet (se Figur C.3 för vektorkarta).



Figur C.3: Karta över vektorn EC2 innehållande CRSIPR/Cas9-systemet.

C.2 Sekvenser för sgRNA och oligonukleotider

Nedan visas sekvensen på sgRNA:t som användes för insättning av xyloskassetten. Därefter listas sekvenserna för de oligonukleotider som användes i studien.

sgRNA för xyloskassetten:

sgRNA med *HO*-lokus som målsekvens för insättning av xyloskassetten
TACGTTGTGAAAAAGGGCGA

EC62_HO_check_F:

CCTGAATTTATGTACGGCGAGCA

EC63_HO_check_R:

CCTGGTCGTCACAGTAGCTGA

EC116_adhE_F:

TATTTTGTGTATATGACGGAAAGAAATGCAGGTTGGTACAATTAAGCG
GATTTTTTCGCTTTTTTCTC

EC117_adhE_R:

AACATCTTTAACATACACAAACACATACTATCAGAATACAATGGCTGTT
ACTAATGTCGCTG

EC118_pALD6_check_F:

GAGGGGGATTCAAGACAAGC

EC119_ALD6_R:

CTTTCCAATTCGTCAGCCAAC

EC120_adhE_check_rev

TATAGGCTGGCTGACCAACG

EC122_XYL_HO_arm_F:

GTTTCGTGAAGCATTCTTAGCCGGCTTGATCGACTCAGATGCTAAGGGA
TATAGAAGCAAATAGTTGTCAGT

EC123_XYL_HO_arm_R:

GATGAATAAACAGTTTGAATTGCTATTTTATAAGATTCAGCTTCAATTC
TTGCTCCGTTCCCTG

EC124_XYL1_check_R

CAGGGAAGTTGGAGACACCG