



CHALMERS TEKNISKA HÖGSKOLA

Mikrobiell biokonvertering av para-xylen från lignin för produktion av tereftalsyra i framtida bioraffinaderier

KANDIDATARBETE
KBTX01-14-16

Handledare

Carl Johan FRANZÉN och Charilaos XIROS

Examinator

Eva ALBERS

Författare

Julia GUTMAN
Jimmie HOFMAN
Carl MALINA
Adam NIKLASSON
Angelo SALAZAR
Robin ÖZ

E-post:

gujulia@student.chalmers.se
hofman@student.chalmers.se
malcarl@student.chalmers.se
adamnik@student.chalmers.se
sangelo@student.chalmers.se
robinoz@student.chalmers.se

Gruppen för Industriell Bioteknik
Institutionen för Kemi- och Bioteknik
CHALMERS TEKNISKA HÖGSKOLA
Göteborg, 19 maj 2014

Förord

Detta kandidatarbete har genomförts under våren 2014 vid gruppen för Industriell bioteknik, institutionen för Kemi- och Bioteknik, Chalmers Tekniska Högskola. Vi vill rikta ett speciellt tack till våra handledare Carl Johan Franzén och Charilaos Xiros för deras goda handledning och engagemang. Vi vill även tacka Ruifei Wang för hans tålamod och otaliga timmar i laborationssalen med oss samt Maurizio Bettiga och Valeria Mapelli för deras vägledning.

Abstract

As a step in the development towards a biobased society, lignin is a potential substitute for petroleum in production of aromatic compounds such as terephthalic acid (TPA). The aim of this project is to find a potential pathway for microbial bioconversion of paraxylene (pX), as an intermediate formed during lignin degradation, for production of TPA and also to study a suitable host for this reaction pathway. The reactions were identified using databases and several enzymes of interest were found. By combining enzymes from *Pseudomonas putida* and *Comamonas testosteroni* a complete theoretical reaction pathway from pX to TPA was constructed. Three integration cassettes were designed in order to introduce the pathway to the host *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*). Study on tolerance by continuous OD-measurements using Bioscreen C MBR and HPLC-analysis, were conducted to evaluate the suitability of *S. cerevisiae* as a host for production of TPA. Consumption of TPA was indicated during cell growth and the results from this study show that TPA, under studied conditions, does not have an impact on the metabolism of *S. cerevisiae* CEN.PK 113-7D.

Sammanfattning

Som ett led i utvecklingen mot ett biobaserat samhälle är lignin ett potentiellt substitut till petroleum för produktion av aromatiska föreningar, exempelvis tereftalsyra (TPA). Syftet med projektet är att hitta möjliga reaktionsvägar för mikrobiell biokonvertering av para-xylen (pX), vilken fanns vara en intermediär vid degradering av lignin, för produktion av TPA samt även undersöka en lämplig värdorganism för denna reaktionsväg. Reaktionerna studerades med hjälp av databassökningar, vilket resulterade i identifiering av enzymer som kan katalysera hela reaktionsvägen från pX till TPA. Genom att kombinera enzymer från *Pseudomonas putida* och *Comamonas testosteroni* konstruerades en fullständig reaktionsväg. Tre integrationskassetter designades för att introducera reaktionsvägen i värdorganismen *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*). En toleransstudie genomfördes för att utvärdera lämpligheten hos *S. cerevisiae* som värdorganism för produktion av TPA, genom kontinuerlig OD-mätning med Bioscreen C MBR och HPLC-analys. En viss konsumtion av TPA påvisades under celltillväxt och resultatet från toleransstudien visar på att TPA, under studerade betingelser, inte har någon inverkan på tillväxten och metabolismen hos *S. cerevisiae* CEN.PK 113-7D.

Innehåll

1	Inledning	5
1.1	Syfte och mål	5
1.2	Bakgrund	5
2	Teori	7
2.1	Lignin och tereftalsyra	7
2.2	Enzymatiska reaktioner för potentiell biokonvertering av para-xylen och tereftalsyra hos <i>Pseudomonas putida</i> och <i>Comamonas testosteroni</i>	7
2.3	Homolog rekombination av integrationskassetten	8
2.3.1	Selektionsmarkörer för verifiering av integration	8
2.4	Kodonoptimering	9
2.5	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> som värdorganism	9
2.5.1	Metabolismen hos <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	9
2.6	Metod för toleransstudier	10
2.6.1	Kontinuerlig mätning av OD	10
2.6.2	HPLC	10
3	Metod	12
3.1	Design av integrationskassetten	12
3.2	Toleransstudie av <i>Saccharomyces cerevisiae</i> CEN.PK 113-7D	12
3.2.1	Analys av tillväxt	13
3.2.2	Analys av förändring av metabolitkoncentrationer under cellodling	13
4	Resultat	14
4.1	Design av integrationskassetten	14
4.2	Toleransstudie av <i>Saccharomyces cerevisiae</i> CEN.PK 113-7D	16
4.2.1	Solubilitet av pX och TPA i YPD-medium	16
4.2.2	Mätning av tillväxt med Bioscreen C MBR	16
4.2.3	Mätning av tillväxt vid odling i skakflaskor	17
4.2.4	HPLC-analys av koncentrationsförändring av TPA och DMSO under celltillväxt	17
4.2.5	HPLC-analys av förändringar i cellmetabolismen	18
5	Diskussion	20
6	Slutsatser	22
7	Referenser	23
Appendix A Lab manual - Solubility of pX and TPA		I
Appendix B Lab manual - Growth analysis		II
Appendix C Lab manual - Cultivation		V
Appendix D Integrationskassetter		IX
Appendix E Resultat av toleransstudie		XVIII

1 Inledning

1.1 Syfte och mål

Syftet med kandidatarbetet är att genomföra en studie för att kartlägga möjliga reaktionsvägar för mikrobiell biokonvertering av lignin till tereftalsyra (TPA) för att i framtiden kunna producera TPA industriellt i bioraffinaderier. Fokus för denna studie kommer att ligga på produkten TPA, där en milstolpe är att hitta en lämplig intermediär i biokonverteringen av lignin till TPA. Ett mål är att designa integrationskassetter för att möjliggöra genetisk modifiering av en mikroorganism för att introducera reaktionsvägen från den bestämda intermediären till TPA. Ett ytterligare mål är att genomföra en toleransstudie för att undersöka mikroorganismens lämplighet för industriell biokonvertering.

1.2 Bakgrund

För en mer hållbar utveckling är det nödvändigt att gå från ett oljebaserat till ett biobaserat samhälle [13]. Biobaserade produkter som etanol och plast framställs idag främst ur enkla sockerarter från bland annat sockerrör, majs eller spannmål [22]. Detta medför en problematik där användning av sockerarter för biobaserade produkter från spannmål konkurrerar med mat- och djurfoderproduktion, vilket inte är hållbart då matbristen redan är utbredd och befolkningens mängden ökar [25]. En ytterligare problematik är utnyttjande av landtillgångar för produktion av spannmål för bioetanolproduktion, vilket i sin tur resulterar i negativa miljömässiga konsekvenser, till exempel skövling av regnskog.

Ett potentiellt substitut till enkla sockerarter och petroleum är lignocellulosa som bland annat används inom skogs-, jordbruks- och livsmedelsindustrin [25]. Lignocellulosa består av cellulosa, hemicellulosa samt lignin och det pågår omfattande forskning kring användning av lignocellulosa för bioetanolproduktion. För att er hålla en miljömässigt och ekonomiskt hållbar process krävs att alla delar av lignocellulosa tas tillvara på, däribland även lignin som anses vara en restprodukt vid bearbetning av lignocellulosa [25]. Lignin är en komplex och heterogen polymer rik på aromatiska enheter, vilka kan utvinnas för storskalig produktion av kemiska föreningar [13]. Mikroorganismer har visat på enzymatisk aktivitet där lignin degraderas till aromatiska föreningar [29]. Detta möjliggör vidare konvertering till kommersiellt intressanta kemiska föreningar [11, 28].

Ett exempel på en kemisk förening av stort kommersiellt intresse är tereftalsyra (eng. terephthalic acid, TPA). TPA används idag för framställning av bland annat polyeten-tereftalat (PET) samt för tillverkning av exempelvis polyester [1]. En fördel med att producera TPA från lignin är att det finns starka globala företag, bland annat inom dryckes- och klädesindustrin, med ett stort intresse av biobaserad TPA [5]. Det uppskattas att ungefär 170 miljarder ton växtbaserat material produceras globalt varje år och med en ligninhalt på 30 % skulle detta innebära 50 miljarder ton lignin.

TPA framställs idag genom en serie kemiska processer från para-xylen (pX) där pX i dagsläget främst framställs från petroleum vilket ger stora möjligheter för förbättring och utveckling ur ett miljöperspektiv [5]. Bakterier har visat på olika reaktionsvägar, där kombinationen av dessa resulterar i biokonvertering av pX till TPA [11, 28]. Den kombinerade enzymatiskt katalyserade reaktionsvägen är av intresse att introducera i modellorganismen *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) i syfte att möjliggöra biokonvertering av pX från lignin för produktion av TPA.

2 Teori

2.1 Lignin och tereftalsyra

Lignin utgör tillsammans med cellulosa och hemicellulosa de tre beståndsdelarna som ingår i lignocellulosa. Lignin är en komplex heterogen molekyl som består av monomera koniferylalkohol, sinapylalkohol och p-kumarylalkohol. Lignin är rikt på aromatiska föreningar vilket gör det till ett lämpligt utgångsmaterial för produktion av aromatiska kemikalier [29]. Ett exempel på en sådan kemikalie är tereftalsyra (TPA).

TPA är en organisk disyra som vid standardtillstånd förekommer i fast form. TPA har en löslighet på 0.065 g/kg i vatten, varför den karaktäriseras som en starkt olöslig förening [6]. Syrakonstanterna för TPA är $pK_{a,1}=3.51$ och $pK_{a,2} = 4.82$ vid standardtillstånd, vilket innebär att det är en svag organisk syra [20]. Idag sker kemisk tillverkning av TPA främst genom oxidering av p-xylen (pX), där konverteringen sker genom oxidering i närvaro av syre med ättiksyra som lösningsmedel [8]. Tidigare studier visar på att katalytiska egenskaper hos olika mikroorganismer kan ligga till grund för produktion av TPA från pX [11, 28].

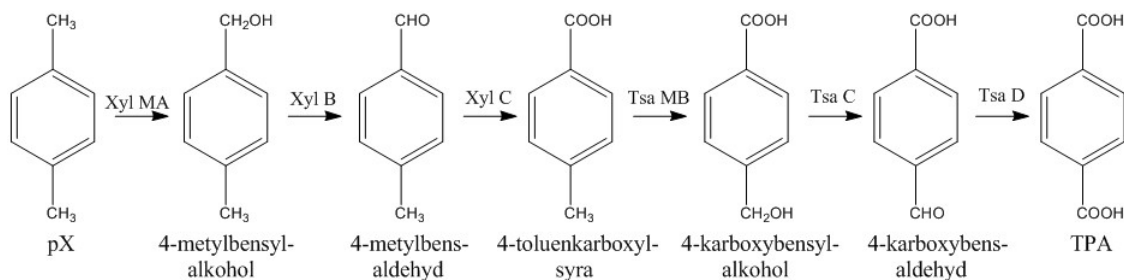
2.2 Enzymatiska reaktioner för potentiell biokonvertering av paraxylen och tereftalsyra hos *Pseudomonas putida* och *Comamonas testosteroni*

Pseudomonas putida (*P. putida*) och *Comamonas testosteroni* (*C. testosteroni*) är gram-negativa bakterier som tillhör släktet proteobakteria [15]. Släktena *Pseudomonas* och *Comamonas* är kemoorganotrofa vilket innebär att de använder organiska föreningar som energi- och kolkälla. Organismerna har visat på katalytiska egenskaper för biokonvertering av aromatiska föreningar, däribland toluen och xylen [9, 11, 28].

Enzymer, som konverterar aromatiska föreningar, har hittats i en så kallad TOL-plasmid med benämningen pWW0 hos *P. putida* [9]. Enzymerna som uttrycks från pWW0 katalyserar bland annat nedbrytning av toluen och xylen vilket resulterar i bildande av pyruvat och intermediärer i citronsyrcykeln [4]. Reaktionsvägen där xylen omvandlas till pyruvat katalyseras av enzymer som finns kodade i två olika operon, Xyl ABC och Xyl DEFG. Det förstnämnda operonet kodar för enzymer som katalyserar reaktionsvägen då aromatiska kolväten omvandlas till motsvarande karboxylsyror [9]. Xyl DEFG kodar för enzymer som katalyserar fortsatta reaktioner för produktion av intermediärer i citronsyrcykeln [10].

I *C. testosteroni* har ett antal enzymer hittats i en plasmid med benämningen pTSA [26]. Dessa katalyserar reaktioner där omvandling av aromatiska föreningar sker. Plasmiden kodar bland annat för enzymer som katalyserar reaktionen från toluenkarboxylat med TPA som intermediär för att slutligen bilda pyruvat [7, 12]. Enzymer som katalyserar reaktionsvägen, där 4-toluenkarboxylat konverteras till TPA, återfinns i operonet Tsa MBCD i pTSA. Dessa enzymer kodas av generna Tsa B, Tsa C, Tsa D och Tsa M.

Enzymerna som kodas av operonen Xyl ABC och Tsa MBCD katalyserar två reaktioner som tillsammans kan möjliggöra reaktionsvägen för att konvertera pX till TPA, där båda metylgrupperna i pX oxideras till karboxylgrupper. Enzymer kodade i Xyl ABC möjliggör konvertering av en metylgrupp i pX till en karboxylgrupp. Enzymerna kodade i Tsa MBCD möjliggör följaktligen samma reaktion för den andra metylgruppen. Genom att introducera generna för hela reaktionsvägen i en organism är det möjligt att erhålla mikrobiell biokonvertering av pX till TPA (figur 1). Hela reaktionsvägen kan introduceras stabilt i *S. cerevisiae* med integrationskassetter som möjliggör överföring av genetiskt material genom homolog rekombination.



Figur 1: Möjlig reaktionsväg från pX till TPA. Reaktionerna katalyseras av angivna enzymer hittade i TOL-plasmiden samt i pTSA-plasmiden. Xyl MA består av två subenheter kodade av Xyl A och Xyl M. Likaså består Tsa MB av två subenheter kodade av Tsa M och Tsa B.

2.3 Homolog rekombination av integrationskassetten

Homolog rekombination används för att introducera nytt genetiskt material i en mikroorganism. Vanligtvis används integrationskassetter vilka innehåller homologa sekvenser, promotor- och terminatorsekvenser samt generna av intresse. Den syntetiserade integrationskassetten med flankerande homologa sekvenser transformeras in i en värdcell. Specifika kontrollmekanismer i eukaryota celler vars roll är att laga skadat DNA, bland annat dubbelsträngsbrott, kommer därefter att behandla det nya genetiska materialet som en skada i genomet. Detta resulterar i att integrationskassetten ligeras fast i värdcellens DNA och således har nytt genetiskt material introducerats i värdorganismens genom.

2.3.1 Selektionsmarkörer för verifiering av integration

För att kunna verifiera att en gen av intresse har integrerats i genomet hos värdcellen är det nödvändigt att ha en selektionsmarkör. Vanliga selektionsmarkörer som används för verifiering av integration är dominant markörer, exempelvis resistensgener för antibiotika. Genom att introducera en resistensgen för antibiotika i samband med att en gen av intresse sätts in i värdorganismens genom är det möjligt att odla rekombinanta celler på medium som innehåller antibiotika.

Det är möjligt att återanvända selektionsmarkörer genom att utnyttja loxP- och Cre-rekombinassystemet, där selektionsmarkörerna flankeras med loxP-säten. Ett loxP-säte är en naturligt förekommande DNA-sekvens bestående av 34 baspar varav de 8 centrala bestämmer riktningen [23]. Cre-rekombinas är ett enzym som binder till loxP-säten. Beror på riktningen av loxP-sätena klyvs antingen den omringade sekvensen bort genom homolog överkorsning eller så sker en invertering av målsekvensen vilket inhiberar

uttrycket av genen. Markörgenen klipps ut från rekombinanta celler vid närvaro av Cre-rekombinas. Därefter kan samma selektionsmarkör användas för nästa transformation och hela processen kan upprepas.

2.4 Kodonoptimering

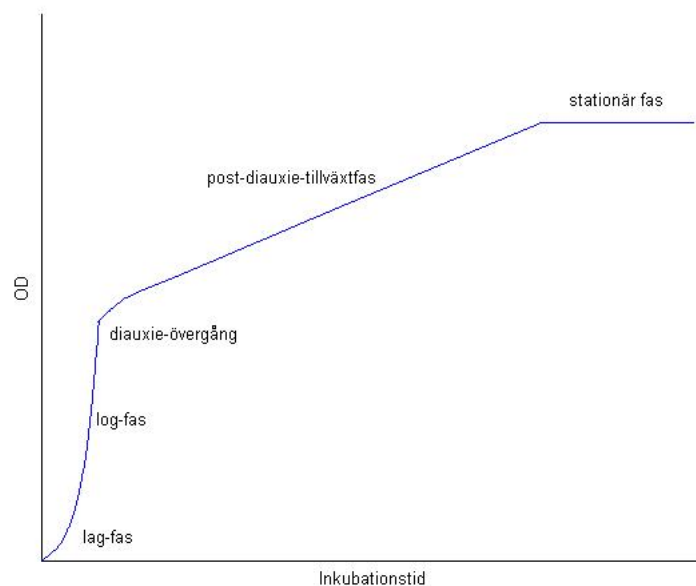
Vid överföring av gener mellan olika mikroorganismer är kodonoptimering ett sätt att möjliggöra eller öka uttrycket av den nya genen i värdorganismen. Förekomsten av specifika kodon för aminosyror varierar mellan olika organismer [17]. Mindre förekommande kodon kan minska uttrycket och ge andra problem som att translationen avbryts [21]. Ett sätt att kodonoptimera är att använda det kodon som förekommer mest för en viss aminosyra hos värdcellen. Det kan uppstå problem med DNA-sekvenser där ett kodon per aminosyra används, då risken för repeterade sekvenser ökar. Detta kan resultera i att genen blir instabil [24]. Vidare finns det en risk att icke önskade restriktionsenzymäten introduceras. Kodonoptimering görs ofta med hjälp av en algoritm som tar hänsyn till dessa komplikationer, för att säkerställa uttryck av genen.

2.5 *Saccharomyces cerevisiae* som värdorganism

S. cerevisiae är en encellig jästsvamp som används inom forskning och industri tack vare dess robusta egenskaper och enkla odlingsförhållanden [18]. Den har en tålig cellvägg och växer, vid goda betingelser, med en kort generationstid. *S. cerevisiae* har en väldokumenterad prestationsförmåga i bland annat industriella fermentationsprocesser vid storskalig etanolproduktion i bioraffinaderier [22]. Det faktum att *S. cerevisiae* tolererar ett brett pH-spektrum, samt kan växa vid aeroba och anaeroba förhållanden gör den till en god industriorganism [31].

2.5.1 Metabolismen hos *Saccharomyces cerevisiae*

Tillväxten av *S. cerevisiae* kan under optimala förhållanden delas in i tre generella huvudfaser vilka är lag-, log-, och stationär fas (figur 2) [27]. Under lag-fasen sker en adaptation till miljön, där bland annat enzymsyntes sker. Därefter börjar log-fasen där tillväxt sker exponentiellt och cellantalet fördubblas med konstant hastighet. Under celltillväxt vid aeroba förhållanden metaboliserar jäst glukos till pyruvat genom glykolys. Den fermentativa process som påbörjas efter glykolysen, vid tillräckligt höga glukoskoncentrationer, är omvandlingen av pyruvat till etanol, laktat och koldioxid [30]. Under denna process produceras även biprodukten glycerol som bland annat upprätthåller redoxbalansen i cellen [19]. Vidare bildas det även acetat [3]. Vid begränsad halt glukos kommer cellerna in i en diauxie-övergång som karaktäriseras av en minskad tillväxthastighet. De producerade metaboliterna etanol, glycerol och acetat kommer att konsumeras av cellen som energi- och kolkälla för att möjliggöra fortsatt tillväxt under en post-diauxie-tillväxtfas [3, 30].



Figur 2: En generell tillväxtkurva för aerob odling av *S. cerevisiae*. Figuren visar hur optiska densiteten förhåller sig till lag-fasen, log-fasen (respirofermentativ tillväxt på glukos), diauxie-övergång, post-diauxie-tillväxtfas (respiration på etanol) och för den stationära fasen.

2.6 Metod för toleransstudier

Tolerans innebär organismers adaptionsförmåga till nya förhållanden. Toleransen kan studeras genom att exempelvis följa celltillväxten, vilket kan göras genom kontinuerlig mätning av optisk densitet (OD). Vidare kan förändringar i organismens metabolism studeras med exempelvis High Performance Liquid Chromatography (HPLC).

2.6.1 Kontinuerlig mätning av OD

En Bioscreen C MBR (Oy Growth Curves Ab Ltd, Helsingfors, Finland) är ett instrument som används för att automatiskt övervaka celltillväxt genom att vid upprepade tillfällen utföra mätningar av OD [2]. Med denna utrustning kan upp till 200 prover följas samtidigt, vilket ger möjlighet att följa tillväxten av olika mikroorganismer, såväl som tillväxt vid olika betingelser. Utrustningen är därmed lämplig för användning i studier där bland annat tolerans av inhibitorer hos mikroorganismer undersöks.

2.6.2 HPLC

HPLC används för separation och detektion av kemiska och biologiska komponenter som inte är flyktiga [16]. Separationstekniken går ut på att en volym av ett flytande prov injiceras i en kolonn som är packad med partiklar, 3-5 μm i diameter. De individuella komponenterna i provet separeras genom den packade kolonnen med hjälp av en eluent, drivna av ett högt tryck. Separationen av komponenterna i provet erhålls till följd av kemiska och fysiska interaktioner mellan komponenter i lösningen och packingsmaterial i kolonnen. Enskilda komponenter i provet detekteras genom jämförelse med standardkurvor för respektive molekyl. Två av flera detektionsmetoder som används i HPLC är spektroskopisk detektion med absorption av ultraviolett ljus (UV) samt detektion med

brytningsindex (RI). Det detekterade resultatet för UV och RI presenteras i form av ett vätskekromatogram med en tidsaxel som visar tiden efter injektionen samt kromatografiska toppar som representerar separerade komponenter. Från topparna kan en höjd och en area utläsas som indikerar hur mycket av varje molekyl som finns i lösningen.

3 Metod

Databaser användes för att hitta enzymer som katalyserar delreaktioner från para-xylen (pX) till tereftalsyra (TPA). För att möjliggöra introducering av den katalytiska reaktionsvägen i *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) designades integrationskassetter innehållandes gener av intresse. Vidare studerades huruvida den haploida jäststammen *S. cerevisiae* CEN.PK 113-7D är tolerant mot pX och TPA.

3.1 Design av integrationskassett

Litteratursökningar genomfördes för att hitta en möjlig reaktionsväg från pX till TPA. För att konstruera denna reaktionsväg eftersöktes organismer med förmågan att biokonvertera pX. Genom sökning i databaserna KEGG Pathway, NCBI och MetaCyc studerades vilka enzymkatalyserade delreaktioner som skulle kunna resultera i en reaktionsväg från pX till TPA. Gensekvenserna för motsvarande enzymer erhöles från databasen UniProt. Homologa gener hos *S. cerevisiae* undersöktes med BLAST-funktionen i databasen NCBI.

Funna gener kodoptimerades mot en kodonanvändningstabell för *S. cerevisiae* med en genetisk algoritm från DNA 2.0, Inc. Hänsyn togs till repeterbara sekvenser större än eller lika med tio baspar. Vidare identifierades restriktionsenzym-säten samt ett antal bestämda sekvenser som inkluderade acceptor- och donatorsekvenser för kryptisk splitsing, RNA-destabiliserande sekvenser (ATTTA), Shine-Dalgarnosekvenser samt bakteriella ribosombindningssäten. Dessa ersattes med icke-kodande sekvenser. Restriktionsenzym-sätena som ersattes var SacI, SacII, SpeI, SmaI, XhoI, EcoRI, BamHI, ClaI, EcoRV, XhoI, HindIII, PstI, PstI och XbaI.

De kodoptimerade generna flankerades med restriktionsenzym-sätena SacI, XhoI, BamHI, EcoRI, EcoRV, PstI, HindIII, och XbaI. TEF1, TEF2 och GPD1 valdes som jästspecifika promotorer. Som terminator valdes CYC1. I integrationskassetterna inkluderades även en selektionsmarkörgen för kanamycin- och geneticinresistens (KAN^R) vilken flankerades med loxP-säten. Varje integrationskassett designades så att den innehöll två eller tre gener av intresse. Sex olika säten om 40 baspar, i den inaktiva HO-genen (YDL227C) från kromosom IV hos *S. cerevisiae*, valdes som flankerande homologa sekvenser i integrationskassetterna.

3.2 Toleransstudie av *Saccharomyces cerevisiae* CEN.PK 113-7D

En toleransstudie genomfördes för att studera huruvida *S. cerevisiae* är en lämplig organism för integration av gener för biokonvertering av pX till TPA. Solubiliteten av respektive ämne undersöktes för att fastställa möjliga koncentrationer i YPD-medium, med DMSO som lösningsmedel, för efterföljande toleransstudie (Appendix A). Toleransen studerades genom kontinuerliga OD-mätningar med en Bioscreen C MBR vid olika betingelser. Påverkan av TPA på metabolismen hos *S. cerevisiae* studerades med HPLC genom att mäta koncentrationen av etanol, glukos, acetat och glycerol, samt TPA och DMSO.

3.2.1 Analys av tillväxt

Bioscreen C MBR användes för kontinuerlig mätning av OD. Resultatet behandlades med en linjäriseringsformel (Appendix E). För analysen förbereddes YPD-medium med TPA löst i DMSO samt pX löst i DMSO. Ytterligare ett YPD-medium innehållande endast DMSO förbereddes (Appendix B).

3.2.2 Analys av förändring av metabolitkoncentrationer under cellodling

Odling av *S. cerevisiae* CEN.PK 113-7D utfördes i skakflaskor vid 30°C och 200 rpm i olika medier under 48.5 h respektive 17.5 h. För försöken förbereddes YPD-medium, YPD-medium med DMSO samt YPD-medium med DMSO och TPA. Koncentrationen av TPA i mediet var 0.6 g/l och koncentrationen DMSO var 66 g/l (Appendix C). Ett andra test utfördes även, vilket inkluderade ett cellfritt TPA-medium. Prover för HPLC togs varje timme under odlingen. Efter analys av tillväxtkurvor från OD-mätningar valdes prover från de mest intressanta tidpunkterna för vidare analys med HPLC. Resultatet av replikaten från HPLC analyserades där medelvärden och standardfel beräknades. HPLC av sorten UltiMate 3000 (Thermo Fischer Scientific Inc, Waltham, USA) med kolonn Rezex ROA-organic acid H+ (8%) 300 x 7.80 mm (Phenomenex Inc, Torrance, USA) användes med detektionsmetoderna brytningsindex (RI) och absorption av ultraviolett ljus (UV). Etanol, glukos, acetat och glycerol samt DMSO analyserades med UV-absorption och TPA analyserades med RI. Proverna jämfördes med standardlösningar (Appendix C).

4 Resultat

4.1 Design av integrationskassett

Litteratur- och databassökningar genomfördes för att identifiera en möjlig reaktionsväg från para-xylen (pX) till tereftalsyra (TPA). Enzymer som katalyserar samtliga delreaktioner karaktäriserades. Tre integrationskassetter innehållandes totalt åtta enzymkodande sekvenser designades, där varje enzym katalyserar en delreaktion i biokonvertering från pX till TPA.

Två plasmider, pWW0 och pTSA, från *Pseudomonas putida* respektive *Comamonas testasteroni* innehållandes totalt åtta gener av intresse hittades. Generna kodar för enzymer som tillsammans kan katalysera hela reaktionsvägen från pX till TPA (figur 1). Plasmiden pWW0 innehåller ett operon bestående av bland annat generna Xyl A, Xyl B, Xyl C och Xyl M. Dessa gener kodar för enzymer som tillsammans katalyserar de första tre reaktionsstegen vid konvertering av pX till TPA, det vill säga konvertering av pX till 4-toluenkarboxysyra. Plasmiden pTSA innehåller ett operon bestående av bland annat generna Tsa B, Tsa C, Tsa D och Tsa M. Dessa gener kodar för enzymer som katalyserar de tre sista reaktionsstegen i konverteringen av pX till TPA, det vill säga från 4-toluenkarboxysyra till TPA. Följande enzymer katalyserar den fullständiga reaktionsvägen från pX till TPA:

Xylenmonooxygenas (Xyl MA):

Enzymet består av två subenheter, NADH-acceptorreduktas som kodas av Xyl A, samt hydroxylas som kodas av Xyl M. Under den enzymatiska hydroxyleringsreaktionen från pX till 4-metylbensylalkohol bildas NADH. Enzymet binder även två trevärdiga järnjoner. Xylenmonooxygenas kan endast katalysera reaktionen irreversibelt.

Bensylalkoholdehydrogenas (Xyl B):

Enzymet kodas av Xyl B och katalyserar dehydrogeneringsreaktionen från 4-metylbensylalkohol till 4-metylbensaldehyd i närvaro av NAD^+ . Enzymet binder två zinkjoner. Bensylalkoholdehydrogenas kan katalysera reaktionen reversibelt.

Bensaldehyddehydrogenas (Xyl C):

Enzymet kodas av Xyl C och katalyserar dehydrogeneringsreaktionen från 4-metylbensaldehyd till 4-toluenkarboxysyra i närvaro av NAD^+ där vatten oxideras vilket resulterar i bildande av NADH. Bensaldehyddehydrogenas kan endast katalysera reaktionen irreversibelt.

4-toluenkarboxylatmonooxygenas (Tsa MB):

Enzymet består av två subenheter, en reduktasenhet som kodas av Tsa B, samt en oxygenasenhet som kodas av Tsa M. Under den enzymatiska hydroxyleringsreaktionen från 4-toluenkarboxysyra till 4-karboxybensylalkohol bildas NADH. Enzymet binder även två trevärdiga järnjoner. 4-toluenkarboxylatmonooxygenas kan endast katalysera reaktionen irreversibelt.

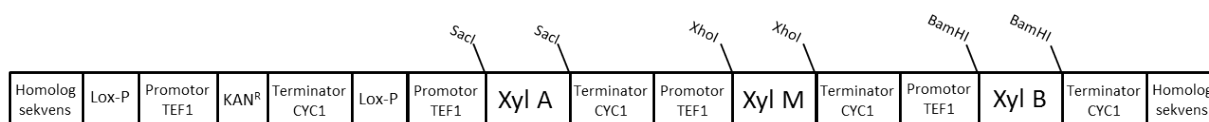
4-karboxybensylalkoholdehydrogenas (Tsa C):

Enzymet kodas av Tsa C och katalyserar dehydrogeneringsreaktionen från 4-karboxybensylalkohol till 4-karboxybensaldehyd i närvaro av NAD^+ . 4-karboxybensylalkoholdehydrogenas kan endast katalysera reaktionen irreversibelt.

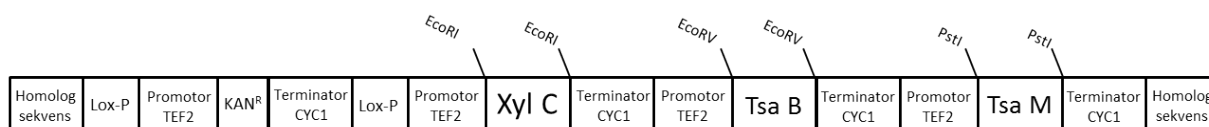
4-karboxybensaldehyddehydrogenas (Tsa D):

Enzymet kodas av Tsa D, och katalyserar dehydrogeneringsreaktionen från 4-karboxybensaldehyd till TPA i närvaro av NAD^+ . 4-karboxybensaldehyddehydrogenas kan endast katalysera reaktionen irreversibelt.

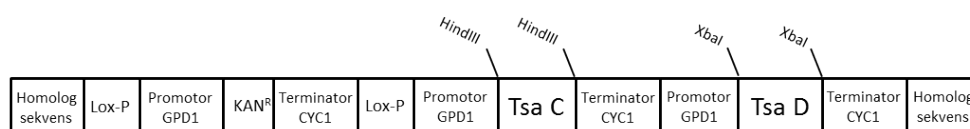
Tre integrationskassetter designades (Appendix D). Integrationskassetten I (figur 3) flankeras med homologa sekvenser mellan kvävebas 3-42 samt 65-104 i HO-genen (YDL227C). Integrationskassetten II (figur 4) flankeras med homologa sekvenser som motsvarar sekvensen mellan kvävebas 623-662 samt 684-721 i HO-genen. Integrationskassetten III (figur 5) flankeras med homologa sekvenser som motsvarar sekvensen mellan kvävebas 940-985 samt 1008-1046 i HO-genen.



Figur 3: Integrationskassetten I innehållandes de kodonoptimerade generna Xyl A, Xyl M och Xyl B där KAN^R används som selektionsmarkör. Som promotor och terminator används TEF1 respektive CYC1. Xyl A flankeras med restriktionsenzymäten för SacI, Xyl M flankeras med sätten för XhoI och Xyl B flankeras med sätten för BamHI.



Figur 4: Integrationskassetten II innehållandes de kodonoptimerade generna Xyl C, Tsa B och Tsa M där KAN^R används som selektionsmarkör. Som promotor och terminator används TEF2 respektive CYC1. Xyl C flankeras med restriktionsenzymäten för EcoRI, Tsa B flankeras med sätten för EcoRV och Tsa M flankeras med sätten för PstI.



Figur 5: Integrationskassetten III innehållandes de kodonoptimerade generna Tsa C och Tsa D där KAN^R används som selektionsmarkör. Som promotor och terminator används GPD1 respektive CYC1. TsaC flankeras med restriktionsenzymäten för HindIII och Tsa D flankeras med sätten för XbaI.

4.2 Toleransstudie av *Saccharomyces cerevisiae* CEN.PK 113-7D

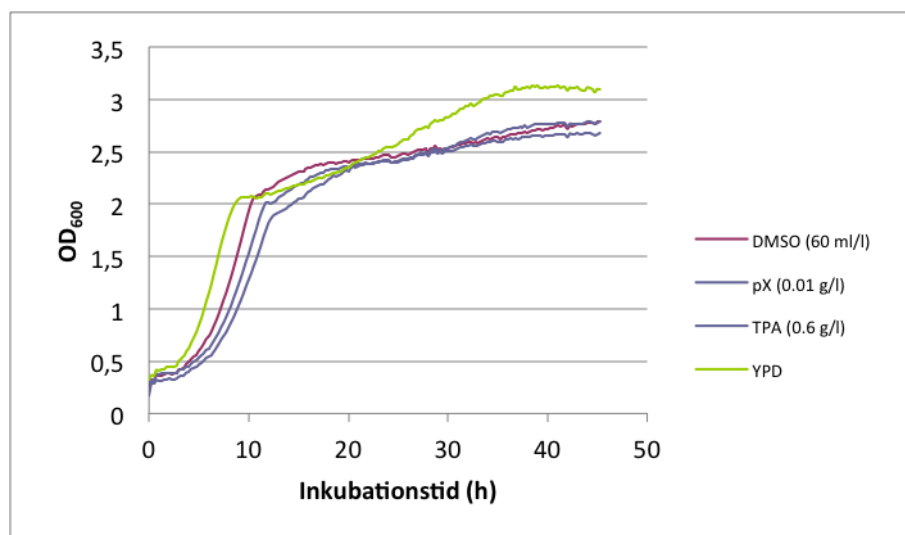
Toleransen för DMSO, pX samt TPA studerades hos *S. cerevisiae*. Tillväxten av *S. cerevisiae* följdes vid olika betingelser genom kontinuerlig OD-mätning i en bioscreen. Fortsättningsvis studerades tillväxten genom OD-mätning vid olika betingelser där odlingen utfördes i skakflaskor.

4.2.1 Solubilitet av pX och TPA i YPD-medium

För att lösa upp pX och TPA i YPD-medium utfördes solubilitetsförsök för att erhålla en så hög koncentration som möjligt av respektive förening där DMSO användes som lösningsmedel (Appendix E). Lägsta möjliga DMSO-koncentration bestämdes till 60 ml/l, vilken möjliggjorde solubilitet av maximalt 0.125 g/l pX i YPD-medium. 0.6 g/l TPA motsvarar den maximala solubiliteten av TPA i YPD-medium med lägsta möjliga DMSO-koncentrationen som bestämdes till 60 ml/l. Solubiliteten av TPA i YPD-medium ökade vid högre pH.

4.2.2 Mätning av tillväxt med Bioscreen C MBR

Toleransen för pX, TPA samt DMSO studerades hos *S. cerevisiae*, där tillväxten av mikroorganismen följdes i en Bioscreen C MBR. Fyra olika tillväxtbetingelser undersöktes, däribland YPD-medium, YPD-medium med DMSO, YPD-medium med DMSO och pX samt YPD-medium med DMSO och TPA (figur 6). Tillväxthastigheten jämfördes vid olika koncentrationer av DMSO, pX samt TPA (Appendix E). Fyra replikat av varje tillväxtbetingelse undersöktes.



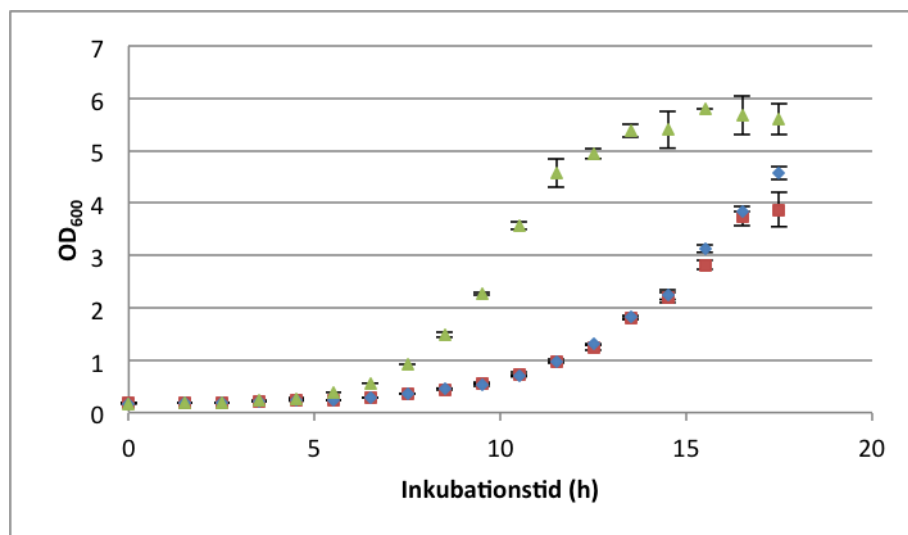
Figur 6: Tillväxt av *S. cerevisiae* vid odling i Bioscreen C MBR i YPD-medium (YPD), YPD-medium med DMSO (DMSO), YPD-medium med DMSO och pX (pX), samt YPD-medium med DMSO och TPA (TPA). Tillväxten visas då koncentrationen av DMSO är 60 ml/l, pX 0.01 g/ och TPA 0.6 g/l i respektive tillväxtmedium. Medelvärden av fyra replikat av samma tillväxtbetingelse beräknades och motsvarande kurvor presenteras. OD vid våglängden 600 nm har plottats mot antalet passerade timmar.

Ur figur 6 kan det urskiljas att den specifika tillväxthastigheten är högre för cellodlingen i YPD-medium än för de tre övriga betingelserna där DMSO, DMSO och pX eller DMSO

och TPA är närvarande. Det slutliga OD-värdet för odlingen i YPD-medium är högre än för övriga betingelser.

4.2.3 Mätning av tillväxt vid odling i skakflaskor

Toleransen för TPA och DMSO studerades hos *S. cerevisiae*, där tillväxten följdes under två kultiveringstillfällen med inkubationstid 48.5 respektive 17.5 timmar. Tre olika tillväxtbetingelser undersöktes, däribland YPD-medium, YPD-medium med DMSO (60 ml/l) samt YPD-medium med DMSO (60 ml/l) och TPA (0.6 g/l) (figur 7).

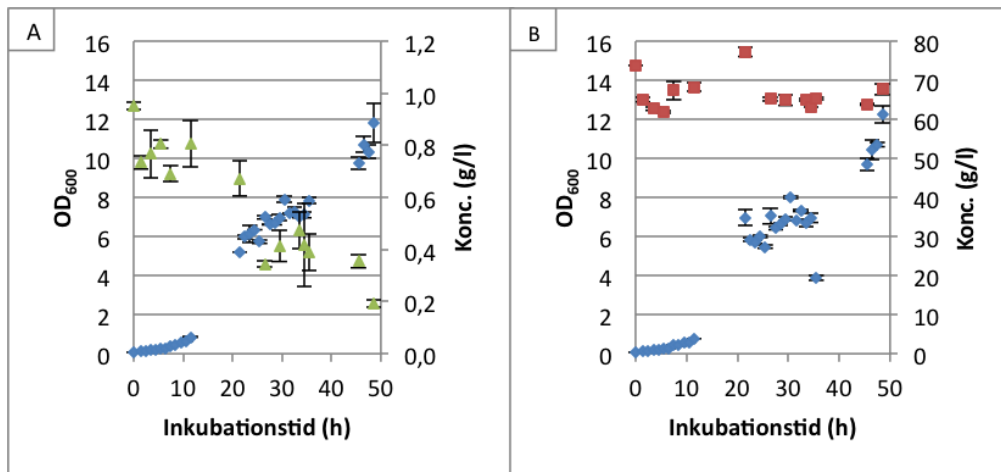


Figur 7: Tillväxt av *S. cerevisiae* vid odling i skakflaskor med YPD-medium (Δ), YPD-medium med DMSO (60 ml/l) (\diamond) och YPD-medium med DMSO (60 ml/l) och TPA (0.6 g/l) (\square). Tillväxten visas som medelvärdet av två replikat för respektive tillväxtbetingelse, där OD vid våglängden 600 nm plottats mot antalet passerade timmar. Standardfelet för respektive punkt visas.

Generationstid uppskattades grafiskt från kurvorna i figur 7 som är framtagna från medelvärdet av två replikat för respektive tillväxtbetingelse. Generationstid för medelvärdet av replikaten beräknades för YPD-medium till 1.59 h, för YPD-medium med DMSO till 2.63 h samt för YPD-medium med DMSO och TPA till 2.63 h.

4.2.4 HPLC-analys av koncentrationsförändring av TPA och DMSO under celltillväxt

Mängden TPA och DMSO analyserades med HPLC under odling av *S. cerevisiae* i skakflaskor innehållandes YPD-medium med DMSO (60 ml/l) samt YPD-medium med DMSO (60 ml/l) och TPA (0.6 g/l) där koncentrationer för respektive ämne jämfördes mot celltillväxten (figur 8).

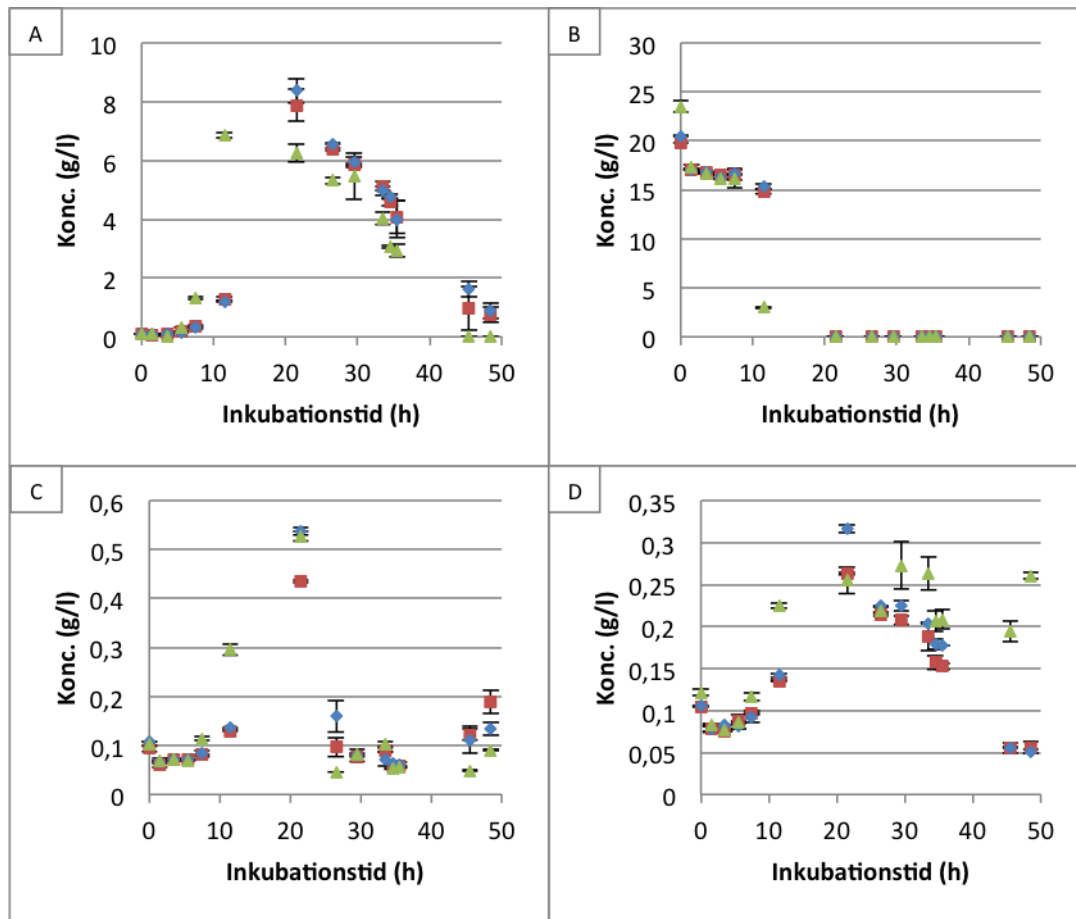


Figur 8: A) Tillväxt av *S. cerevisiae* (\diamond) samt koncentrationen TPA (\triangle) i YPD-medium med DMSO (60 ml/l) och TPA (0.6 g/l). B) Tillväxt av *S. cerevisiae* (\diamond) samt koncentrationen DMSO (\square) i YPD-medium med DMSO (60 ml/l). Celltillväxten motsvarar medelvärdet av två replikat där OD vid våglängden 600 nm har plottats mot antalet passerade timmar. Koncentrationen av TPA och DMSO representeras av ett medelvärde av två replikat. Standardfelet för respektive punkt visas.

Ur figur 8 kan det urskiljas att koncentrationen av TPA minskar vid celltillväxt. Det visas inte på någon koncentrationsförändring av DMSO under av celltillväxt. Två replikat av cellfria kontrollprov gjordes och ett medelvärde av replikaten beräknades. Skillnaden i medelvärde mellan koncentrationen i de första kontrollproverna och koncentrationen i de sista kontrollproverna beräknades för TPA till 15.4 mg/l med standardfelet 0.0077. För DMSO beräknades skillnaden mellan första och sista kontrollproverna till 1.47 g/l med standardfelet 0.7352.

4.2.5 HPLC-analys av förändringar i cellmetabolismen

Koncentrationen av acetat, etanol, glukos och glycerol studerades med HPLC, då tillväxt av *S. cerevisiae* följdes i YPD-medium, YPD-medium med DMSO samt i YPD-medium med DMSO och TPA (figur 9). Två replikat genomfördes för respektive tillväxtmedium, ifrån vilka ett medelvärde beräknades och presenteras grafiskt.



Figur 9: A) Koncentrationsförändring av etanol. B) Koncentrationsförändring av glukos. C) Koncentrationsförändring av acetat. D) Koncentrationsförändring av glycerol. Standardfelet för respektive punkt visas. Medelvärden av uppmätt HPLC-data för två replikat där tillväxt följdes i YPD-medium (\triangle), YPD-medium med DMSO (60 ml/l) (\diamond) samt YPD-medium med DMSO (60 ml/l) och TPA (0.6 g/l) (\square).

Figur 9 visar inte på några koncentrationerskillnader av etanol, glukos, acetat och glycerol för celltillväxt i YPD-medium med DMSO jämfört med YPD-medium med DMSO och TPA.

5 Diskussion

I denna studie undersöktes möjligheten att biokonvertera para-xylen (pX), som en potentiell produkt från mikrobiell biokonvertering av lignin, till tereftalsyra (TPA) hos *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) CEN.PK 113-7D. PX har en strukturell likhet med TPA, vilket gör den fördelaktig att använda som utgångsmetabolit i produktionen av TPA. Den kan därför ses som en viktig intermediär i reaktionen från lignin till TPA. Mikroorganismer som i kombination kan biokonvertera pX till TPA hittades, vilket bidrog ytterligare till valet av pX som utgångsmetabolit. Den enzymatiska reaktionsvägen från pX till TPA önskas introduceras i *S. cerevisiae* ty dess industriellt fördelaktiga egenskaper.

Litteraturstudier och databassökningar resulterade i identifiering av enzymer som katalyserar reaktionen från pX till TPA. I sökningar fastslogs att *S. cerevisiae* saknar homologa gensekvenser för enzymer som katalyserar denna reaktionsväg. Detta kan tyda på att motsvarande reaktioner saknas i organismen. Integrationskassetter designades för att möjliggöra uttryck av gener för biokonverteringen av pX till TPA i *S. cerevisiae*. För att uttrycka generna i jäst valdes starka värdspecifika promotorer samt en terminator. Risken för brist på specifika co-faktorer ökar i takt med att antalet gener som kontrolleras av samma promotor ökar. Därför valdes olika promotorer för integrationskassetterna. TEF1 och TEF2 valdes som promotorer baserat på att gener under kontroll av dessa uttrycks oberoende av vilka betingelser cellen befinner sig i. Promotorn GPD1 valdes då den i *S. cerevisiae* kontrollerar uttrycket av ett enzym involverat i glykolysen. I integrationskassetterna inkluderades även en resistensgen för kanamycin och geneticin (KAN^R) vilken flankerades med loxP-säten. Detta gjordes för att möjliggöra användning av samma markörgen vid integration av samtliga integrationskassetter, då genen kan klippas ut genom användning av Cre-rekombinas. Sekvensen för HO-genen, vilken i detta projekt användes som målsekvens för homolog rekombination, valdes då genen är inaktiv i den stam av *S. cerevisiae* som önskas användas som värdorganism.

För att öka sannolikheten för genuttryck och erhålla produktion av TPA kodonoptimerades gensekvenserna. RNA-destabiliserande sekvenser och säten för kryptisk splitsning ersattes med andra kvävebaser för att undvika splitsning samt för att minska risken för instabilt mRNA i värdorganismen. Bakteriella ribosombindningssäten samt Shine-Dalgarno-sekvenser ersattes för att möjliggöra amplifiering av DNA i *Escherichia coli*. Dock finns det utrymme för vidare optimering med mer lämpliga algoritmer samt restriktioner, vilket kan ge ett högre genuttryck och i sin tur högre produktion av TPA.

Eventuella problem som kan uppstå som följd av integration av generna är att proteinerna som potentiellt kommer att uttryckas riskerar att felveckas. Detta kan bero på skillnader i posttranslationella processer mellan eukaryoter och bakterier, vilket kan resultera i att uttryckta proteiner hamnar på positioner i cellen där de inte är verksamma på grund av olika fysiologiska egenskaper hos dessa organismer. Intermediärerna riskerar därmed att inte komma i kontakt med enzymer som katalyserar reaktionsvägen från pX till TPA. Det finns även en risk att de uttryckta proteinerna visar på interaktioner med andra proteiner i cellen, vilket kan orsaka förändring i enzymaktivitet hos organismen. Ytterligare en problematik som kan påverka produktionen av TPA är att samtliga föreningar i reaktionsvägen, där pX konverteras till TPA, kan vara involverade i redan existerande metabola vägar i cellen.

Lämpligheten av *S. cerevisiae* som värdorganism för integration av kassetterna samt produktion av TPA undersöktes i en toleransstudie där tillväxten av *S. cerevisiae* CEN.PK 113-7D följdes i närvaro av pX och TPA. Inledningsvis gjordes solubilitetsförsök för att erhålla högsta möjliga koncentration av pX och TPA i YPD-medium. pX visades vara olösligt i vatten, varför DMSO användes som lösningsmedel. Resultaten som erhöles från tillväxtanalys med Bioscreen C MBR visar dock på osäkerhet vad gäller koncentration pX i tillväxtmedierna, ty den lägre koncentrationen visar på större tillväxtinhibering (figur 11, Appendix E). Den begränsade möjligheten att lösa upp pX i tillväxtmediet, samt den minimala skillnaden i tillväxt av *S. cerevisiae* vid olika koncentrationer av pX bidrog till avgränsningen att inte genomföra vidare undersökningar av pX vad gäller toleransen. Fokus lades därför på att undersöka TPA. Lösligheten av TPA i vatten visades öka vid pH över 5, vilket är pH-optimum för *S. cerevisiae*. DMSO användes därför som lösningsmedel i efterföljande toleransanalys för att kunna lösa upp TPA i YPD-medium vid pH 5.

OD-mätningar utförda i Bioscreen C MBR visar på att den specifika tillväxthastigheten för *S. cerevisiae* minskar i närvaro av DMSO (figur 6). Tillväxthastigheten för organismen i närvaro av TPA skiljdes inte från tillväxten i enbart YPD-medium och DMSO (figur 7). Detta tyder på att TPA inte har en signifikant effekt på celltillväxten under studerade koncentrationer. Det sist uppmätta OD-värdet för odling i YPD-medium var högre än de odlingar i YPD-medium som även innehöll DMSO, DMSO och TPA samt DMSO och pX. Detta indikerar att biomassakoncentrationen är högre för odling i YPD-medium jämfört med odling i närvaro av DMSO och TPA. Dock fanns det ingen skillnad mellan de sist uppmätta OD-värdena för YPD-medium med DMSO och TPA jämfört med YPD-medium med DMSO, vilket tyder på att TPA inte har en effekt på celltillväxten under studerade koncentrationer. DMSO orsakar därför med största sannolikhet den negativa effekten på celltillväxten. För att analysera celltillväxten med de olika analysmetoderna förbereddes förkulturer. För de olika experimenten gjordes detta på olika sätt, där det i fallet för OD-mätning i Bioscreen C MBR förbereddes en förkultur 48 timmar innan experimentet genomfördes och därmed kan cellernas välmående under detta experiment ifrågasättas.

Påverkan av TPA på metabolismen hos *S. cerevisiae* studerades genom att undersöka koncentrationsförändringar av etanol, glukos, acetat och glycerol under celltillväxt. Resultaten visar på en fördröjning av produktion och konsumtion av metaboliterna i närvaro av DMSO i YPD-mediet (figur 9). Uppmätta metabolitkoncentrationer för YPD-medium med DMSO samt YPD-medium med DMSO och TPA följer samma trend. Detta tyder på att TPA, vid undersökta koncentrationer, inte har en inverkan på tillväxten eller metabolismen hos *S. cerevisiae*. Därmed kan organismen anses vara tolerant mot denna produkt vid studerade betingelser. Resultaten visar även på att koncentrationen av TPA minskar under celltillväxt (figur 8). Detta skulle kunna tyda på en eventuell biokonvertering eller assimilering av TPA. Orsaken till att koncentrationen av TPA minskar är något som bör ses över i framtida studier för att erhålla en högre produktion av TPA.

Nästa steg i detta projekt är att introducera integrationskassetterna i genomet hos *S. cerevisiae* samt undersöka den enzymatiska aktiviteten. Vidare är det av intresse att studera biokonvertering av lignin till pX för att möjliggöra en fullständig reaktionsväg från lignin till TPA för framtida bioraffinaderier.

6 Slutsatser

Från resultatet av litteratur- och databassökningen kan slutsatsen dras att det finns naturliga delreaktioner för biokonvertering av para-xylen (pX) till tereftalsyra (TPA). Dessa kan i teorin kombineras för att erhålla en fullständig reaktionsväg från pX till TPA. Ett lämpligt tillvägagångssätt är att skapa integrationskassetter för att möjliggöra introducering av enzymer, som katalyserar reaktionsvägen, i *Saccharomyces cerevisiae*. Från resultaten av toleransstudien kan slutsatsen dras att TPA ej påverkar celltillväxten vid de koncentrationer som undersöktes. Vidare visade *S. cerevisiae* CEN.PK 113-7D på konsumtion av TPA utan att någon märkbar effekt på cellmetabolismen detekterades. DMSO visade på en tillväxtinhiberande effekt vilket gör detta till ett icke lämpligt lösningsmedel för denna studie.

7 Referenser

- [1] Al-Khattaf S, Tukur NM, Al-Amer A. Modeling Xylene Reactions over ZSM-5 Zeolite in a Riser Simulator: 1,3-versus 1,2-Methyl Shift. *Industrial & Engineering Chemistry Research*. 2005; 44(21): 7957-68.
- [2] Bioscreen C Automated Growth Curves. [Hämtad: 2014 apr 17]. Tillgänglig: http://www.bioscreen.fi/pdf/gc_factsheet_a4.pdf
- [3] Boulton B, Singleton VL, Bisson, LF, Kunkee RE. Yeast and Biochemistry of Ethanol Fermentation. I: Principles and Practices of Winemaking. Chapman & Hall, USA. 1996; 126-7.
- [4] Burlage RS, Hooper SW, Saylor GS. The TOL (pWW0) Catabolic Plasmid. *Applied and Environmental Microbiology*. 1989; 55(6): 1323-8.
- [5] Collias DI, Harris AM, Nagpal V, Cottrell IW, Schultheis MW. Biobased Terephthalic Acid Technologies: A Literature Review. *Industrial Biotechnology*. 2014; 10(2): 91-105.
- [6] CRC Handbook of Chemistry and Physics. 84:e uppl. Boca Raton, FL: CRC Press. 2003; 2013-14.
- [7] Dagley S, Geary PJ, Wood JM. The Metabolism of Protocatechuate by *Pseudomonas testosteroni*. *Biochemical Journal*. 1968; 109(4): 559-68.
- [8] Dylewski, S. W. Organic Chemical Manufacturing, Volym 7: Selected Processes, U.S. Environmental Protection Agency, Research Triangle Park, NC. 1981.
- [9] Franklin FC, Bagdasarian M, Bagdasarian MM, Timmis KN. Molecular and Functional Analysis of the TOL Plasmid pWWO from *Pseudomonas putida* and Cloning of Genes for the Entire Regulated Aromatic Ring Meta Cleavage Pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1981; 78(12): 7458-62.
- [10] Harayama S, Lehrbach PR, Timmis KN. Transposon Mutagenesis Analysis of Meta-Cleavage Pathway Operon Genes of the TOL Plasmid of *Pseudomonas putida* mt-2. *Journal of Bacteriology*. 1984; 160(1): 251-5.
- [11] Junker F, Kiewitz R, Cook AM. Characterization of the p-toluenesulfonate Operon Tsa MBCD and Tsa R in *Comamonas testosteroni* T-2. *Journal of Bacteriology*. 1997; 179(3): 919-27.
- [12] Junker F, Sailer E, Oppenberg HRS, Kroneck PMH, Leisinger T, Cook AM. Degradative Pathways for p-toluenecarboxylate and p-toluenesulfonate and their Multicomponent Oxygenases in *Comamonas testosteroni* Strains PSB-4 and T-2. *Microbiology*. 1996; 142(9): 2419-27.
- [13] Kamm B, Gruber PR, Kamm M. Biorefineries – Industrial Processes and Products. Ullmann’s Encyclopedia of Industrial Chemistry: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. 2000.
- [14] Kamm M, Gruber PR, Kamm B. Biorefineries - Industrial Processes and Products Germany: Weinheim. 2006.

-
- [15] Madigan MT. Brock Biology of Microorganisms. San Francisco: Benjamin Cummings. 2012.
- [16] Malviya R, Bansal V, Pal O P, Sharma P K. High Performance Liquid Chromatography. Journal of Global Pharma Technology. 2010; 2(5): 22-26.
- [17] Miné-Hattab J, Rothstein R. Gene Targeting and Homologous Recombination in *Saccharomyces cerevisiae* I: Renault S, Duchateau P, redaktör. Site-directed Insertion of Transgenes: Springer Netherlands. 2013.
- [18] Mishra S, Baranwal R. Yeast Genetics and Biotechnological Applications. I: Satyanarayana T, Kunze G, redaktör. Yeast Biotechnology: Diversity and Applications: Springer Netherlands. 2009.
- [19] Nevoigt E, Stahl U. Osmoregulation and Glycerol Metabolism in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. FEMS Microbiology Reviews 21. 1997; 231-241.
- [20] Properties of Organic Compounds [Internet]. Chapman & Hall/CRC Press. 2014.
- [21] Rothstein R. Targeting, Disruption, Replacement, and Allele Rescue: Integrative DNA Transformation in Yeast. I: Christine Guthrie GRF, redaktör. Methods in Enzymology. Volym 194: Academic Press. 1991; 281-301.
- [22] Rudolf A, Karhumaa K, Hahn-Hägerdal B. Ethanol Production from Traditional and Emerging Raw Materials. I: Satyanarayana T, Kunze G, redaktör. Yeast Biotechnology: Diversity and Applications: Springer Netherlands. 2009.
- [23] Sauer B. Functional Expression of the Cre-lox Site-specific Recombination System in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Molecular and Cellular Biology. 1987; 7(6): 2087-96.
- [24] Sinden RR. DNA Structure and Function. San Diego: Academic Press. 1994.
- [25] Sustainable Biofuels Prospects Challenges. The Royal Society. 2008.
- [26] Tralau T, Cook AM, Ruff J. Map of the IncP1beta Plasmid pTSA Encoding the Widespread Genes (*tsa*) for p-toluenesulfonate Degradation in *Comamonas testosteroni* T-2. Applied and Environmental Microbiology. 2001; 67(4): 1508-16.
- [27] Werner-Washburne M, Braun E, Johnston GC, Singer RA. Stationary Phase in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 1993; 57: 383-401.
- [28] Worsey MJ, Williams PA. Metabolism of Toluene and Xylenes by *Pseudomonas (putida (arvilla))* mt-2: Evidence for a New Function of the TOL plasmid. Journal of Bacteriology. 1975; 124(1): 7-13.
- [29] Zakzeski J, Bruijninx PCA, Jongerius AL, Weckhuysen BM. The Catalytic Valorization of Lignin for the Production of Renewable Chemicals. Chemical Reviews. 2010; 110(6): 3552-99.
- [30] Zhang N, Wu J, Oliver SG. Gis1 is Required for Transcriptional Reprogramming of Carbon Metabolism and the Stress Response During Transition into Stationary Phase in Yeast. Microbiology. 2009; 155: 1690-1698.

-
- [31] Skoog K, Hahn-Hägerdal B. Xylose Fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*. 1988; 10(2): 66-80.
- [32] Warringer, J. and Blomberg, A.; Automated Screening in Environmental Arrays Allows Analysis of Quantitative Phenotypic Profiles in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. 2003; (20): 53-67.

Appendix A Lab manual - Solubility of pX and TPA

A.1 PX solubility in YPD-medium

In order to perform an analysis of cellular growth with Bioscreen C MBR, p-xylene must be dissolved in water. The solubility will be tested by adding pX to DMSO. The solution will then be dissolved in YPD medium.

A.1.1 Preparation of YPD-medium

1. Stir and suspend 8 g peptone, 8 g glucose and 4 g YE powder in MQ-water up to 400 ml.
2. Adjust pH to 5.
3. Filter the medium into an autoclaved flask.
4. Autoclave the medium.

A.1.2 PX solubility test procedure

1. Add 10 mg pX to 20 μ l DMSO to a falcon tube.
2. If not dissolved add more DMSO until pX is dissolved.
3. Dilute to 1 ml with YPD.
4. If not dissolved try again with less pX.

A.2 TPA solubility in YPD-medium

The solubility of TPA in water is 0.065 g/kg at 25 °C [6]. In order to dissolve TPA in YPD medium, DMSO is used as a solvent. Solubility of TPA in DMSO is 26 g/100 g at 20 – 30 °C¹.

A.2.1 Procedure

1. Add 10 mg TPA to 20 μ l DMSO to a falcon tube.
2. If not dissolved add more DMSO until TPA is dissolved.
3. Dilute to 1 ml with YPD.
4. If not dissolved try again with less TPA.

¹http://www.gaylordchemical.com/uploads/images/pdfs/literature/102B_english.pdf

Appendix B Lab manual - Growth analysis

B.1 Preparation of YPD-medium

- Preculture and reference YPD sample
 1. Stir and suspend 8 g peptone, 8 g glucose and 4 g YE powder in MQ-water up to 400 ml.
 2. Adjust pH to 5.
 3. Autoclave the medium.
- TPA and DMSO master mixes
 1. Stir and suspend 1.6 g peptone, 1.6 g glucose and 0.8 g YE powder in MQ-water up to 75.2 ml.
 2. Adjust pH to 5.

The amounts of peptone, glucose and YE powder for TPA and DMSO are calculated for a total amount of 80 ml medium. The reason why the medium is only diluted to 75.2 ml with MQ-water is because DMSO will be added.

B.2 PX master mix

Dilute a master mix that would have a concentration of 1 g/l pX if it would be diluted to 5 ml with YPD medium.

1. Add 300 μ l DMSO to a sterile falcon tube.
2. Add 58 μ l pX to the DMSO
3. Dilute according to table 1.

Table 1: Table of pX master mixes with different concentrations of pX, including 300 μ l DMSO diluted with YPD to a total volume of 5 ml.

Concentration pX (g/l)	Amount pX mastermix (μ l)
0.125	44.75
0.100	35.80
0.075	26.85
0.050	17.90
0.025	8.95
0.010	3.58

B.3 TPA master mix

1. Add 300 μ l DMSO to a sterile falcon tube.
2. Add TPA according to table 2.
3. Dilute with YPD medium to 5 ml.

Table 2: TPA master mixes with different concentrations of TPA, including 300 μ l DMSO suspended with YPD to a total volume of 5 ml.

Concentration TPA (g/l)	Amount TPA mastermix (mg)
0.60	3.00
0.40	2.00
0.20	1.00
0.10	0.50
0.05	0.25
0.01	0.05

B.4 DMSO master mix

1. Add amount of DMSO according to table 3 to a sterile falcon tube.
2. Dilute with YPD-medium to 5 ml.

Table 3: Different amounts of DMSO, suspended with YPD to 5 ml.

Concentration DMSO (ml/l)	Amount DMSO (μ l)
80	400
60	300
40	200
20	100
10	50

B.5 Preparation of glycerol stocks of *Saccharomyces cerevisiae* CEN.PK 113-7D

1. Inoculate 140 μ l of *S. cerevisiae* glycerol stock to 70 ml YPD medium in a 500 ml shake flask using a sterile pipette.
2. Incubate in a shaker for 14 hours, until the stationary phase is reached, at 160 rpm and 30°C.
3. Add 180 μ l of sterile glycerol to a 2 ml screw-cap vial.
4. Add 820 μ l of liquid *S. cerevisiae* culture to the vial. Mix thoroughly and store at -80°C.

B.6 Measurement of growth curves

1. Measure OD₆₀₀ at the start of the incubation. Use YPD-medium as control sample.
2. Measure OD₆₀₀ every 30 minutes until the stationary phase is reached. Dilute the samples to an OD in the absorbance range 0.01-0.3.

B.7 Preculture of *Saccharomyces cerevisiae* CEN.PK 113-7D

1. Add 1 ml frozen culture glycerol stock to a sterile 500 ml shake flask with 100 ml YPD medium.
2. Cultivate until stationary phase, while controlling with OD-measurements, at 30 °C and 160 rpm.

B.8 Performing the cultivation in Bioscreen C MBR

The cultivation will be performed with different concentrations of TPA, DMSO and pX separately for *S. cerevisiae* according to table 4. Conduct the cultivation in the Bioscreen C MBR at 30 °C.

Table 4: Cultivation scheme in Bioscreen C MBR with three replicates for each concentration.

Condition	Concentration (g/l)
TPA	0.6
	0.40
	0.20
	0.10
	0.05
	0.01
DMSO	88
	66
	44
	22
	11
pX	0.025
	0.010

Add following to each well:

1. Master mix making a total volume of 150 μ l in each well (including cell culture).
2. X μ l of cell culture, which will give a start OD of 0.01.

Each unique environment will be tested in three wells at the same time. Check the growth curves (OD) for each well.

Appendix C Lab manual - Cultivation

C.1 Cultivation 1

C.1.1 Preparations

C.1.1.1 Master mixes: Prepare 400 ml media for reference YPD samples, 400 ml for TPA master mix and 400 ml for DMSO master mix, taking into account the volume of DMSO when adding MQ-water.

Sterile YPD-medium, 1200 ml:

1. Stir and suspend 24 g peptone, 20 g glucose and 12 g YE powder in MQ-water up to 1128 ml.
2. Adjust pH to 5.
3. Autoclave the medium.

TPA master mix (0.6 g/l, 400 ml):

1. Add 24 ml DMSO to a sterile flask.
2. Add 0.24 g TPA to the DMSO.
3. Dilute to 400 ml with sterile YPD-medium.

Reference DMSO master mixes (66 g/l, 400 ml):

1. Add 24 ml DMSO to a sterile flask.
2. Dilute to 400 ml with sterile YPD-medium.

Reference YPD-medium (400 ml):

1. Dilute 376 ml of sterile YPD-medium with 24 ml MQ-water.

C.1.1.2 Standards for organic acids: Prepare organic acid standards according to table 5.

Table 5: HPLC-standards for organic acids

	1	2	3	4	5
Dilution	0.7500	0.5000	0.2500	0.1250	0.0625
Glucose (g/l)	15.00	10.00	5.00	2.50	1.25
Glycerol (g/l)	0.7500	0.5000	0.2500	0.1250	0.0625
Acetate (g/l)	1.500	1.000	0.500	0.250	0.125
Ethanol (g/l)	11.2500	7.5000	3.7500	1.8750	0.9375

C.1.1.3 TPA and DMSO standards: Prepare TPA and DMSO standards for HPLC.

Std 1 (0.6 g/l TPA, 66 g/l DMSO):

1. Dissolve 3.6 mg TPA in 0.36 ml DMSO.
2. Dilute to 6 ml with YPD medium.

Prepare eluent (5 mM H_2SO_4) by diluting 25 ml 1 M H_2SO_4 with MQ-water to 5 l.
Dilution of TPA and DMSO standards:

1. Std 1 = TPA 0.6 g/l, DMSO 66 g/l.
2. 0.75 ml Std 1 + 0.25 ml eluent = TPA 0.45 g/l, DMSO 49.5 g/l.
3. 0.50 ml Std 1 + 0.50 ml eluent = TPA 0.30 g/l, DMSO 33 g/l.
4. 0.25 ml Std 1 + 0.75 ml eluent = TPA 0.15 g/l, DMSO 16.5 g/l.
5. 0.125 ml Std 1 + 0.875 ml eluent = TPA 0.075 g/l, DMSO 8.25 g/l.
6. 0.063 ml Std 1 + 0.937 ml eluent = TPA 0.0378 g/l, DMSO 4.125 g/l.

C.1.1.4 *S. cerevisiae* preculture

1. Add 0.5 ml frozen culture glycerol stock to a sterile 500 ml shake flask with 70 ml YPD medium. Do duplicates.
2. Cultivate until stationary phase, controlling with OD-measurements) at 30°C and 160 rpm.
3. Mix the two cultures.
4. Measure OD.

C.1.2 Performing the analysis

TPA samples

1. Add 190 ml of TPA-medium to two separate shake flasks.
2. Add preculture so that the calculated OD becomes about 0.01.

DMSO samples

1. Add 190 ml of DMSO-medium to two separate shake flasks.
2. Add preculture so that the calculated OD becomes about 0.01.

YPD samples

1. Add 190 ml of YPD-medium to two separate shake flasks.
2. Add preculture so that the calculated OD becomes about 0.01.

Run all shake flasks on a shaker at 30°C and 200 rpm. Take samples every hour.

C.1.2.1 Measurement of OD: Take samples every hour.

1. Measure OD₆₀₀ at the start of the incubation. Use YPD-medium as control sample.
2. Dilute the samples to an OD in the range 0.01-0.3 abs.

C.1.2.2 HPLC analysis: To see how the metabolism of *S. cerevisiae* CEN.PK 113-7D changes in presence of TPA and DMSO, samples from the shake flask cultivation will be analyzed using HPLC.

Take samples every hour.

Filter 1 ml of the samples with 0.2 μ l nylon filters into 1.5 ml Eppendorf tubes and put the tubes in a -18°C freezer.

Use diluted acid stock solutions as standards according to *Protocol for HPLC Solutions and Standards*.

Run TPA and DMSO standards first and decide the elution time.

Set up HPLC sequence and run samples.

1. Start with a blank sample.
2. Run standards starting with the lowest.
3. Run a second blank.
4. Run samples.
5. Run a third blank with the same program as for samples.
6. End with a fourth blank using the Standby program.

C.2 Cultivation 2

C.2.1 Preparations

C.2.1.1 Master mixes: Prepare 400 ml medium for reference YPD samples, 800 ml for TPA master mix and 400 ml for DMSO master mix, taking in to account the volume DMSO when adding MQ-water.

Prepare the media and HPLC standard solutions according to Appendix C.1.

C.2.2 Performing the analysis

TPA samples

1. Add 190 ml of TPA-medium to two separate shake flasks.
2. Add preculture so that the calculated OD becomes about 0.01.

DMSO samples

1. Add 190 ml of DMSO-medium to two separate shake flasks.
2. Add preculture so that the calculated OD becomes about 0.01.

YPD samples

1. Add 190 ml of YPD-medium to two separate shake flasks.
2. Add preculture so that the calculated OD becomes about 0.01.

Cell free samples

1. Add 190 ml of TPA-medium to two separate shake flasks.

Run all shake flasks on a shaker at 30 °C and 200 rpm. Take samples every hour.

Appendix D Integrationskassetter

Nedan presenteras sekvenser för integrationskassetterna där **homologa sekvenser i HO-genen (YDL227C)**, **loxP-säten**, **promotorer**, **KAN^R-genen**, **terminator**, **restriktionsenzym-säten** samt **gener av intresse** är markerade. Integrationskasset I innehåller generna för Xyl A, Xyl M och Xyl B. Integrationskasset II innehåller generna för Xyl C, Tsa B och Tsa M. Integrationskasset III innehåller generna för Tsa C och Tsa D.

D.1 Integrationskasset I

GCTTTCTGAAAACACGACTATTCTGATGGCTAACGGTGAACTACTTCGTATAG
 CATAATTATACGAAGTTATTCAGTACTGACAATAAAAAGATTCTTGTTTTTCAA
 GAACTTGTCAATTTGTATAGTTTTTTTTATATTGTAGTTGTTCTATTTTAATCAAA
 TGTTAGCGTGATTTATATTTTTTTTCGCCTCGACATCATCTGCCAGATGCGAA
 GTTAAGTGCGCAGAAAGTAATATCATGCGTCAATCGTATGTGAATGCTGGTGC
 CTATACTGCTGTCGATTCGATACTAACGCCGCCATCCAGTGTGCGAAAACGAGC
 TCTCGAGAACCTTAATATGGGTAAGGAAAAGACTCACGTTTCGAGGCCGCGA
 TTAAATTCCAACATGGATGCTGATTTATATGGGTATAAATGGGCTCGCGATAA
 TGTCGGGCAATCAGGTGCGACAATCTATCGATTGTATGGGAAGCCCGATGCGC
 CAGAGTTGTTTCTGAAACATGGCAAAGGTAGCGTTGCCAATGATGTTACAGAT
 GAGATGGTCAGACTAAACTGGCTGACGGAATTTATGCCTCTTCCGACCATCAA
 GCATTTTATCCGTA CTCTGATGATGCATGGTTACTCACCACTGCGATCCCCG
 GCAAACAGCATTCCAGGTATTAGAAGAATATCCTGATTCAGGTGAAAATATT
 GTTGATGCGCTGGCAGTGTTCCCTGCGCCGGTTGCATTCCGATTCCTGTTGTAA
 TTGCTCTTTTAAACAGCGATCGGATTTTCGTCCTCGCTCAGGCCGCAATCACGAA
 TGAATAACGGTTTGGTTGATGCGGATTTTTGATGACGAGCGTAATGGCTGG
 CCTGTTGAACAAGTCTGGAAAGAAATGCATAAGCTTTTGCCATCTCACCGGA
 TTCAGTCGTCACCTCATGGTGATTTCTCACTTGATAACCTTATTTTTGACGAGGG
 GAAATTAATAGGTTGTATTGATGTTGGACGAGTCGGAATCGCAGACCGGATACC
 AGGATCTTGCCATCCTATGGAACCTGCCTCGGTGAGTTTTCTCCTTCATTACAG
 AAACGGCTTTTTCAAAAATATGGTATTGATAATCCTGATATGAATAAATTGCA
 GTTTCATTTGATGCTCGATGAGTTTTTCTAATCATGTAATTAGTTATGTCACGC
 TTACATTCACGCCCTCCCCCACATCCGCTCTAACCGAAAAGGAAGGAGTTAG
 ACAACCTGAAGTCTAGGTCCCTATTTATTTTTTTTATAGTTATGTTAGTATTAAG
 AACGTTATTTATATTTCAAATTTTTCTTTTTTTTCTGTACAGACGCGTGACGC
 ATGTAACATTATACTGAAAACCTTGCTTGAGAAGGTTTTGGGACGCTCGAAGG
 CTTTAATTTGCGGCCCTACTTCGTATAGCATACTATACGAAGTTATTCAGTA
 CTGACAATAAAAAGATTCTTGTTTTTCAAGA ACTTGTCAATTTGTATAGTTTTTTT
 ATATTGTAGTTGTTCTATTTTAATCAAAATGTTAGCGTGATTTATATTTTTTTTTC
 GCCTCGACATCATCTGCCAGATGCGAAGTTAAGTGCAGCAGAAAGTAATATCA
 TGCGTCAATCGTATGTGAATGCTGGTCGCTATACTGCTGTCGATTCGATACTA
 ACGCCGCCATCCAGTGTGCGAAAACGAGCTCTCGAGAACCCTTAATGAGCTCAT
 GAACGAATTTTTTAAGAAGATTTTCGGGTTTATTCGTTCCACCACCCGAATCTA
 CAGTCTCGGTTAGGGGGCAAGGGTTCCAATTCAAGGTTCCTAGAGGTCAAAACC
 ATTCTTGAGTCGGCTCTGCATCAAGGTATCGCATTTCCCACGACTGTAAAGT
 GGGTTCTTGTGGTACTTGCAAATACAAGCTAATTTTCAGGTAGGGTTAATGAAC
 TAACCTCAAGCGCCATGGGTTTGGAGCGGTGATTTGTACCAGTCTGGATACAGA
 TTGGGATGCCAATGTATACCCAAGGAAGACTTAGAAATAGA ACTAGATACCGT
 ACTGGGTCAGGCGCTTGTGCCTATCGAAAACCAGTGCTTTAATTTCTAAGCAA
 AAAGATTGGCTCATGACATTTGTTGAAATGGAAGTGGTCCCTGATAAACAAATT
 GCTTTCTATCCAGGGCAATATGCTGATGTGGAGTGTGCGGAATGCTCGGCTGT
 AAGGAGTTACAGTTTTTTCAGCGCCACCTCAGCCAGATGGTTCTTTGTCTTTCC
 ATGTACGTCGTGTTCCAGGTGGCGTATTTTTCTGGTTGGTTATTCGGTGGGGAT
 AGAACTGGTGCCACACTGACCTTAAGAGCCCCATATGGTCAATTTGGTTTGCA
 TGAATCTAATGCCACAATGGTCTGCGTGCCGGGGGCACAGGATTAGCACCAA
 TAAAATGTGTGTTGCAATCTATGACGCGAGGCGCAGAGAGAAAGAGATGTTTTG
 TTATTTTTTCGGTGCAAGACAGCAACGTGATCTATATTGTTTAGACGAAATTGA

GGCATTACAGTTAGATTGGGGAGGCAGATTTGAACTTATACCAGTTTTGTCTG
AGGAATCTTCGACAAGTTCTTGGAAAGGTAAGAGGCATGGTCACCGAGTAT
TTCAAAGAATATTTGACAGGCCAGCCATATGAAGGGTATCTGTGTGGTCCTCC
TCCCATGGTTGATGCCGCAGAAACGGAATTGGTACGTTTAGGTGTCGCTAGAG
AATTGGTTTTTGTCTGATAGATTCTACAATAGGCCTCCTTGCTAAGAGCTCTCAT
GTAATTAGTTATGTCACGCTTACATTCACGCCCTCCCCCACATCCGCTCTAAC
CGAAAAGGAAGGAGTTAGACAACCTGAAGTCTAGGTCCCTATTTATTTTTTTA
TAGTTATGTTAGTATTAAGAACGTTATTTATATTTCAAATTTTTCTTTTTTTTC
TGTACAGACGCGTGTACGCATGTAACATTATACTGAAAACCTTGCTTGAGAAG
GTTTTGGGACGCTCGAAGGCTTTAATTTGCGGCCTCAGTACTGACAATAAAAA
GATTCCTGTTTTCAAGAACTTGTCATTTGTATAGTTTTTTTTATATTGTAGTTGT
TCTATTTTTAATCAAATGTTAGCGTGATTTATATTTTTTTTTTCGCCTCGACATCAT
CTGCCAGATGCGAAGTTAAGTGCGCAGAAAGTAATATCATGCGTCAATCGTA
TGTGAATGCTGGTTCGCTATACTGCTGTGCGATTGATACTAACGCCGCCATCCA
GTGTCGAAAACGAGCTCTCGAGAACCCTTAATCTCGAGATGGATACTTTAAGG
TACTATTTGATCCCTGTTGTAACCTGCTTGTGGGCTTATTGGCTTTTATTACGGG
GGCTATTGGGTTTGGTTGGGTGCAGCTACTTTTCCAGCCTTAATGGTGCTGGA
TGTAATCTTGCCAAAAGACTTCTCAGCTAGAAAGGTTTCACCTTTTTTTGCTGA
TTTGACTCAGTATTTGCAGCTTCCCTTGATGATCGGACTATACGGTTTTGTTGGT
TTTTGGAGTTGAAAATGGTAGGATTGAACTTTCTGAACTTTTGCAAGTAGCCG
GGTGCATTCTTTCCCTCGCATGGTTATCAGGAGTTCCCACGTTACCGGTGTCC
CACGAATTAATGCACAGAAGACACTGGCTTCCACGCAAAAATGGCCCAATTACT
TGCTATGTTTTACGGAGATCCCAATAGGGACATCGCACATGTTAATACCCATC
ATCTATATTTGGATACTCCTTTGGATTCTGATACACCATATAGGGGTCAAACG
ATATACTCTTTTGTGATTTTCAGCAACGGTTCGGCAGTGTGAAAGATGCCATCAA
AATAGAGGCAGAAACTTTGAGGAGAAAAGGACAATCACCTTGGAATCTCTCGA
ACAAACTTACCAATACGTGCTTTTATTATTGGCGCTACCTGGGCTGGTTTTCTT
ATCTCGGAGGACCAGCGCTTGGATTGGTACGATTGCTTCTATGATTATAGCC
AAAGGTATCGTGGAAGGCTTCAACTATTTTCAACACTATGGACTTGTGAGAGA
CCTAGACCAACCTATCTTACTCCATCACGCTTGGAAATCACATGGGAACTATTG
TCAGACCATTGGGATGCGAAATAACAAATCATATTAACCATCATATAGATGGT
TATACACGTTTTTATGAATTGCGGCCTGAAAAAGAAGCACCAAAATGCCTTC
GCTGTTTGTCTGCTTCCCTGTTAGGATTGATCCCTCCATTGTGGTTTCGCTCTAAT
CGCCAAGCCCAAGTTGAGGGATTGGGATCAACGCTACGCTACACCCGGAGAG
AGAGAGTTAGCTATGGCTGCTAACAAGAAAGCTGGGTGGCCCTTATGGTGCGA
ATCAGAACTAGGTAGAGTTGCGAGTATTTAACTCGAGTCATGTAATTAGTTAT
GTCACGCTTACATTCACGCCCTCCCCCACATCCGCTCTAACCGAAAAGGAAG
GAGTTAGACAACCTGAAGTCTAGGTCCCTATTTATTTTTTTTTATAGTTATGTTAG
TATTAAGAACGTTATTTATATTTCAAATTTTTCTTTTTTTTTCTGTACAGACGCG
TGTACGCATGTAACATTATACTGAAAACCTTGCTTGAGAAGGTTTTGGGACGC
TCGAAGGCTTTAATTTGCGGCCTCAGTACTGACAATAAAAAAGATTCTTGTTTT
CAAGAACTTGTCATTTGTATAGTTTTTTTTATATTGTAGTTGTTCTATTTTAATC
AAATGTTAGCGTGATTTATATTTTTTTTTTCGCCTCGACATCATCTGCCAGATGC
GAAGTTAAGTGCGCAGAAAGTAATATCATGCGTCAATCGTATGTGAATGCTGG
TCGCTATACTGCTGTGCGATTGATACTAACGCCGCCATCCAGTGTGCAAAAACG
AGCTCTCGAGAACCCTTAATGGATCCATGGAAATTAAGCTGCAATAGTTCCG
CAAAAAACCGGCCCATTCCTTTTAGAGCACGTAGCCTTAAACGAACCTGCGGA
AGACCAAGTTCTAGTGAGATTAGTGGCTACAGGTCTGTGTACACCGACTTGG
TTTGTAGGGATCAACACTATCCAGTCCCTTTGCCTATGGTTTTTTGGACACGAA
GGTGCTGGTGTCTGTTGAAAGAGTGGGCTCTGCTGTAAAGAAAGTTCAGCCAG
GCGATCATGTCGTGTTGACATTCTATACTGTGGGAGTTGTGACGCCTGTTTA
TCGGGTGATCCTACATCTTGTGCCAACTCCTTCGGTCCCAACTTTATGGGAAG
ATCAGTCACCGGAGAGTGTACGATCCATGACCATCAGGGGGCTGAGGTGGGG
GCTTCTTTTTTCGGTCAATCCTCGTTTTCGACATAACGCGCTATCATATGAAAGA
AATACTGTTAAGGTAACATAAAGATGTCCCACTAGAATTATTGGGTCCACTAGG
CTGTGGTATCCAAACTGGTGCTGGTTCTGTATTGAACGCCCTCAACCCACCGG
CAGGTAGTCAATAGCTATCTTTGGCGCCGGTGCAGTTGGATTATCGGCAGTT
ATGGCGGCGGTCTGTTGCTGGCTGCACCACAATCATTGCAGTAGACGTCAAGGA

AAATAGGTTAGAGCTTGCCTCCGAATTAGGAGCTACTCACATCATTAAATCCAG
CAGCTAATGATCCCATCGAAGCAATAAAGGAAATTTTCGCCGACGGTGTACCT
TATGTTTTAGAAACCTCTGGTCTTCCAGCAGTGCTAACTCAAGCTATTTTGTCG
AGCGCCATTGGCGGAGAAATTGGCATAGTGGGTGCTCCTCCTATGGGTGCCAC
AGTCCCAGTAGACATTA ACTTCTTGCTTTTTAATAGGAAATTAAGGGGTATCG
TTGAAGGTCAAAGTATAAGCGACATTTTTATACCAAGGCTCGTGGAACTTTAT
AGACAAGGAAAGTTTCCCTTTGATAAGTTAATCAAATTCTATCCTTTTGATGA
GATTAATAGAGCAGCGGAAGATTCTGAAAAGGGTGTA ACTCTGAAGCCTGTTT
TACGCATTGGGTAA **GGATCCTCATGTAATTAGTTATGTCACGCTTACATTAC**
GCCCTCCCCCACATCCGCTCTAACCGAAAAGGAAGGAGTTAGACAACCTGAA
GTCTAGGTCCCTATTTATTTTTTTTATAGTTATGTTAGTATTAAGAACGTTATTT
ATATTTCAAATTTTTCTTTTTTTTTCTGTACAGACGCGTGTACGCATGTAACATT
ATACTGAAAACCTTGCTTGAGAAGGTTTTGGGACGCTCGAAGGCTTTAATTTG
CGGCCCGGCTAACTCTTACGTTATGTGCGCAGATGGCTCCGCTGC

D.2 Integrationskassett II

GCTGTAAAAGTATGGCTTGGATGCTTGGTCTGTGGTTAGGCTACTTCGTATAGCATAATTATACGAAGTTATCTGTAATACGACTCACTATAGGGAATATTAAGCTTGAATTCGCGGCCGCTTCTAGAGGCTACCTATATTCCACCATAACATCAATCATGCGGTTGCTGGTGTATTTACCAATAATGTTTAATGTATATATATATATATATATATATGGGGCCGTATACTTACATATAGTAGATGTCAAGCGTAGGGCGCTTCCCCTGCCGGCTGTGAGGGCGCCATAACCAAGGTATCTATAGACCGCCAATCAGCAA**ACTACCTCCGTACATTCATGTTGCACCCACACATTTATAACCCAGACCGCGACAAATTACCCATAAGGTTGTTTGTGACGGCGTCGTACAAGAGAACGTGGGAACTTTTAGGCTCACCAAAAAAGAAAGAAAAAATACGAGTTGCTGACAGAAGCCTCAAGAAAAAAATTCCTTCTTCGACTATGCTGGAGGCAGAGATGATCGAGCCGGTAGTTAACTATATATAGCTAAATTGGTTCATCACCTTCTTTTCTGGTGTGCGCTCCTTCTAGTGCTATTTCTGGCTTTTCCTATTTTTTTTTTTTCCATTTTTCTTTCTCTTTCTAATATATAAATTCTCTTGCATTTTCTATTTTTTCTCTCTATCTATTCTACTTGTATTCCCTTCAAGGTTTTTTTTTTAAGGAGTACTTGTTTTTTAGAATATACGGTCAACGAACTATAATTA**ACTAATGGGTAAGGAAAAGACTCACGTTTCGAGGCCGCGATTAAATTCCAACATGGATGCTGATTTATATGGGTATAAATGGCTCGCGATAATGTCGGGCAATCAGGTGCGACAATCTATCGATTGTATGGGAAGCCCGATGCGCCAGAGTTGTTTCTGAAACATGGCAAAGGTAGCGTTGCCAATGATGTTACAGATGAGATGGTCAGACTAAACTGGCTGACGGAATTTATGCCTCTTCCGACCATCAAGCATTTTATCCGTA**CTCCTGATGATGCATGGTTACTCACCCAC**TGCGATCCCCGGCAAAACAGCATTCCAGGTATTAGAAGAATATCCTGATT**CAGGTGAAAATATTGTTGATGCGCTGGCAGTGTTCCCTGCGCCGGTTGCATTCGATT**CCTGTTTGTAATTGTCCTTTTAACAGCGATCGCGTATTT**CGTCTCGCTCAGGCGCAATCACGAATGAATAACGGTTTGGTTGATGCGAGTGATTTGATGACGAGCGTAATGGCTGGCCTGTTGAACAAGTCTGGAAAGAAATGCATAAGCTTTTGCCAT**TCTCACCGGATT**CAGTCGTCACTCATGGTGATTTCTCACTTGATAACCTTATTTTGACGAGGGGAAATTAATAGGTTGTATTGATGTTGGACGAGTCGGAATCGCAGACCGATAACCAGGATCTTGCCATCCTATGAACTGCCTCGGTGAGTTTTCTCTCTTATTACAGAAACGGCTTTTTTCAAAAATATGGTATTGATAATCCTGATATGATAAAATTGCAGTTTCATTTGATGCTCGATGAGTTTTTCTAATCATGTAATTAGTTATGTACAGCTTACATTCACGCCCTCCCCCACATCCGCTCTA**ACCGAAAAGGAAGGAGTTAGACAACCTGAAGTCTAGGTCCCTATTTATTTTTTTTATAGTTATGTAGTATTAAGAACGTTATTTATATTTCAAATTTTTTCTTTTTTTTTCTGTACAGACGCGTGACGCATGTAACATTATACTGAAAACCTTGCTTGAGAAGGTTTTGGGACGCTCGAAGGCTTTAATTTGCGGCC**CTACTTCGTATAGCATAATTATACGAAGTTAT**CTGTAATACGACTCACTATAGGGAATATTAAGCTTGAATTCGCGGCCGCTTCTAGAGGCTACCTATATTCCACCATAACATCAATCATGCGGTTGCTGGTGATTTACCAATAATGTTTAATGTATATATATATATATATATATATATGGGGCCGTATACTTACATATAGTAGATGTCAAGCGTAGGGCGCTTCCCCTGCCGGCTGTGAGGGCGCCATAACCAAGGTATCTATAGACCGCCAATCAGCAA**ACTACCTCCGTACATTCATGTTGCACCCACACATTTATAACCCAGACCGCGACAAATTACCCATAAGGTTGTTTGTGACGGCGTCGTACAAGAGAACGTGGGAACTTTTTAGGCTCACCAA**AAAAGAAAGAAAAAATACGAGTTGCTGACAGAAGCCTCAAGAAAAAAATTCCTTCTTCGACTATGCTGGAGGCAGAGATGATCGAGCCGGTAGTTAACTATATATAGCTAAATTGGTTCATCACCTTCTTTTCTGGTGTGCGCTCCTTCTAGTGCTATTTCTGGCTTTTCCTATTTTTTTTTTTTCCATTTTTCTTTCTCTCTTTTCTAATATAA**AATTCTCTTGCATTTTCTATTTTTCTCTCTATCTATTCTACTTGTTTATTCCCTTCAAGGTTTTTTTTTTAAGGAGTACTTGTTTTTTAGAATATACGGTCAACGAACTATAATTA**ACTAACTGAATTC**ATGAGGGAAACTAAGGAACAGCCTATTTGGTATGGTAAAGTGTTCTCTAGTAACTGGGTAGAAGCTAGAGGAGGAGTCGCTAATGTAGTGGACCCATCCAATGGAGATATTTTGGGCATAACCGGAGTGCGCAATGGGAAGACGTAGATGCGGCCGTTAACGCTGCTAAACGTGCTCAAAAAGAATGGGCAGCTATCCCGTTTTTCCGAAAGGGCGGCAATAGTCCGCAAGGCAGCTGAAAAATTGAAAGAAAGGGAATATGAGTTTGCCGACTGGAATGTCCGAGAATGCGGCTCTATAAGACCTAAGGGTCTTTGGGAAGCAGGTATTGCATACGAGCAAATGCACAGGCTGCTGGTTTAGCCTCTCTGCCTAACGGCACTTTATTCCCATCTGCTGTC**CCAGGAAGGATGAATTTGTGTCAGAGAGTCCCTGTCCGGTGTGTTGGAGTTAT************

CGCTCCATGGAATTTCCCATTTGTTCCCTTGCCATGAGATCAGTGGCTCCCGCATT
GGCTTTAGGTAACGCGGTAATTCCTAAAGCCAGATCTTCAGACGGCGGTTACTG
GAGGCGCCTTGATCGCGGAGATTTTTTCCGATGCCGGAATGCCAGACGGAGTC
CTACATGTTTTACCTGGTGGGGCCGACGTAGGTGAATCTATGGTAGCTAATTC
AGGGATAAACATGATTAGTTTTACAGGCTCAACACAAGTTGGGAGATTAATCG
GAGAAAAATGTGGTAGAATGCTAAAGAAAAGTTGCCTTAGAATTAGGTGGTAA
CAACGTCCATATTGTGCTGCCTGATGCAGATTTGGAGGGTGCCGTTTCATGCG
CCGCATGGGGTACTTTTTTGCATCAAGGTCAGGTTTGTATGGCTGCTGGCAGA
CATCTAGTGCATAGAGATGTTGCACAACAGTATGCAGAGAAATTGGCATTGCG
GGCAAAGAACTTAGTCGTGGGAGATCCCAATTCTGACCAAGTACACCTCGGAC
CATTAAATTAACGAAAAGCAGGTAGTAAGAGTGCACGCATTAGTTGAATCAGCT
CAGAGAGCTGGTGCCTCAAGTGTGGCTGGTGGAAACATATCAAGACAGATATTA
TCAAGCCACAGTGATTATGGACGTCAAGCCAGAAAATGGAAGTGTTTAAAAGCG
AAATTTTTTGGGCTGTGCTCCGATCACTGTGTTTGATTCCATAGAAGAAGCA
ATTGAACTTGCTAACTGTTCTGAGTACGGTTTGGCTGCTTCTATTCATACAAG
GGCTCTCGCCACCGGCTTGGACATTGCCAAGAGACTGAACACCGGCATGGTTC
ACATTAATGATCAACCTATAAACTGCGAACCACATGTACCTTTTTGGAGGTATG
GGCGCATCGGGCAGCGGTGGGAGGTTCCGGAGGGCCCGCTTCTATAGAGGAGT
TTACTCAAAGTCAGTGGATAAGCATGGTTGAAAAACCGGCAAATATCCCTTT
TAA**GAATTC**TCATGTAATTAGTTATGTCACGCTTACATTCACGCCCTCCCCCA
CATCCGCTCTAACCGAAAAGGAAGGAGTTAGACAACCTGAAGTCTAGGTCCCT
ATTTATTTTTTTTATAGTTATGTTAGTATTAAGAACGTTATTTATATTTCAAATT
TTTTTTTTTTTTCTGTACAGACGCGTGTACGCATGTAACATTATACTGAAAACC
TTGCTTGAGAAGGTTTTTGGGACGCTCGAAGGCTTTAATTTGCGGCCCTGTAAT
ACGACTCACTATAGGGAATATTAAGCTTGAATTCGCGGCCGCTTCTAGAGGCT
ACCTATATTTCCACCATAACATCAATCATGCGGTTGCTGGTGTATTTACCAATAA
TGTTTAATGTATATATATATATATATATATATGGGGCCGTATACTTACATATAGTA
GATGTCAAGCGTAGGCGCTTCCCCTGCCGGCTGTGAGGGCGCCATAACCAAGG
TATCTATAGACCGCCAATCAGCAAACCTACCTCCGTACATTCATGTTGCACCCA
CACATTTATACACCCAGACCGCGACAAATTACCCATAAGGTTGTTTGTGACGG
CGTCGTACAAGAGAACGTGGGAACTTTTTAGGCTCACCAAAAAAGAAAAGAAA
AATACGAGTTGCTGACAGAAGCCTCAAGAAAAAAAAAAATTCTTCTTCGACTAT
GCTGGAGGCAGAGATGATCGAGCCGGTAGTAACTATATATAGCTAAATTGGT
TCCATCACCTTCTTTTTCTGGTGTGCTCCTTCTAGTGCTATTTCTGGCTTTTTCC
TATTTTTTTTTTTCCATTTTTCTTTCTCTCTTTCTAATATATAAATTCTCTTGCA
TTTTCTATTTTTCTCTCTATCTATTCTACTTGTATTATCCCTTCAAGGTTTTTTTT
TTAAGGAGTACTTGTTTTTGAATATACGGTCAACGAACATAAATTAACATAA
CT**GATATC**ATGAATTTGAACAAGCAGGTGGCTATAGTTACTGGAGGCGCTTCA
GGATTTGGTGCAGCAATCGCGCGGAGGTTGAGTCAAGCAGGAGCTGCTGTCC
TTGTGCGAGACTTAAACGCGGAAGGTGCCCAAAGAATGGCTACAGAGTTGAAC
GCTGCCGGTGGTTCGTGCACTAGGTATGGCCTGCGATGTTTCGAAAGAAGCTGA
CTATCGTGCAGTCGTTGACGCTGCCATCGCTCAATTGGGTGGGTTACATATCG
TTGTTAATAACGCGGGAAACCACCCATAGAAAACAAACCTGCATTAGCAGTGACC
GAAGATGAGTTCGACAGAGTCTATAGAGTTAATTTGAAGTCAGTCTACTGGTC
CGCACAATGTGCACTGCCACATTTTTGCACAACAAGGACATGGTGTGATGGTTA
ATGTTGCATCAACTACAGGTGTGAGACCCGGCCCCGGCTTGACGTGGTACTCC
GGTAGCAAAGCAGCAATGATAAACTTAACTAAAGGGCTGGCTCTGGAATTTGC
CCGTTCCGGGAGTCAGAATTAATGCCGTTAATCCAATGATTGGTGAGACACCTA
TGATGGCAGACTTCATGGGGATGGAAGATACACCAGCAAACAGAGAGAGATT
TCTCTCAAGAATCCCATTAGGCAGGTTTACCAGACCAGATGATGTCGCTTCAG
CCGTGGCATTTTTTAGCTTCTGATGATGCGTCTTTTTCTGACTGGTGTCTGCTTAG
ATGTGGACGGCGGCAGAAATATATAA**GATATC**TCATGTAATTAGTTATGTCAC
GCTTACATTCACGCCCTCCCCCACATCCGCTCTAACCGAAAAGGAAGGAGTT
AGACAACCTGAAGTCTAGGTCCCTATTTATTTTTTTTATAGTTATGTTAGTATTA
AGAACGTTATTTATATTTCAAATTTTTCTTTTTTTTTCTGTACAGACGCGTGTAC
GCATGTAACATTATACTGAAAACCTTGCTTGAGAAGGTTTTTGGGACGCTCGAA
GGCTTTAATTTGCGGCCCTGTAATACGACTCACTATAGGGAATATTAAGCTTG
AATTCGCGGCCGCTTCTAGAGGCTACCTATATTTCCACCATAACATCAATCATG

CGGTTGCTGGTGTATTTACCAATAATGTTTAATGTATATATATATATATATATA
TGGGGCCGTATACTTACATATAGTAGATGTCAAGCGTAGGCGCTTCCCCTGCC
GGCTGTGAGGGCGCCATAACCAAGGTATCTATAGACCGCCAATCAGCAAATA
CCTCCGTACATTCATGTTGACCCACACATTTATACACCCAGACCGCGACAAA
TTACCCATAAGGTTGTTTGTGACGGCGTCGTACAAGAGAACGTGGGAACTTTT
TAGGCTCACCAAAAAAGAAAGAAAAAATACGAGTTGCTGACAGAAGCCTCAA
GAAAAAATAATTCTTCTTCGACTATGCTGGAGGCAGAGATGATCGAGCCGGT
AGTTAACTATATATAGCTAAATTGGTTCCATCACCTTCTTTTCTGGTGTGCTC
CTTCTAGTGCTATTTCTGGCTTTTCTATTTTTTTTTTCCATTTTTCTTTCTCT
CTTTCTAATATATAAATTCTCTTGCATTTTCTATTTTTTCTCTCTATCTATTCTAC
TTGTTTATTCCCTTCAAGGTTTTTTTTTAAGGAGTACTTGTTTTTAGAATATAC
GGTCAACGAACATAAATTAACATAACTCTGCGAGATGTCAGCAGATGTGCCAGT
AACTGTTGTCAGCTGTAAGGGCAGTTGCCCGTGACGTAAGGCGCTTGAATTGC
GTCACGCGAACGGTCAGCCTTTACCTGGTGTCATCCGCTGGAGCGCATATAGAT
CTAGCACTGCCAAACGGACTTGTGACAGTACAGTTTGGTAAACGCCACCGG
GCAGGCGACCATGGACTGCTACCAAGTCGCCGTTGGTTGGGATGCTAATTCAC
GTGGTGGATCAGTCTGGATTTCATGAAAAGTTGAAGGTGGGTCAGGCTTTGAG
AGTCACACACAGAGCCACCTGTTCTGAAAATGGCTCCAGAGCACCGTAGAGTTC
TATTGTTGGCCGGCGGCATTGGTGTACGCCTATATACGCTATGGCACAGGCT
TGTGCACAGCAAGGTGTCGATGTTGAACTATGGGCATCCGCTAGATCAGCAC
ACGGCTTGCATACTTAGAAGAATTAAGGCATTACTTGGTCAGAGACTACATC
TACATGCTGACGACGAACAGGGAGGTCCGATGAACCTTACTGAGAGATTGGCT
ACGCAACGCTGGGATGCAGTCTACGCTTGCGGACCCGCTCCAATGCTTGACGC
TTTGACTGCGGCTACCGCTCATTGGGCCCCCTGGTTCGGTTAGGATGGAAAGGT
TCAAAGGTGCTGAACAACCAGCCAGTGAAAGGCAGCCATTCGAATTGGTCTTG
CAAAGAGCCGGTCTATCTACCACGGTAGATGCACATGAGTCTGTGTTGGACGC
CATGGAAAGAGTAGGTGTTGACTTCCCATGGTCCCTGTAGAGAAGGAATTTGTG
GGACATGTGAAGCACCCGTGCTTGAAGGCGAAGTTCAACACTTGGATTATGTT
TTATCACCGGAAGAGAGGGCAGAACAACGTAGAATGATGGTGTGTGTCTCTCG
CTGCGGCGGCGGTAGATTAGTTTTGGATATATAACTGCGAGTCATGTAATTAGT
TATGTCACGCTTACATTCACGCCCTCCCCCACATCCGCTCTAACCGAAAAGG
AAGGAGTTAGACAACCTGAAGTCTAGGTCCCTATTTATTTTTTTTATAGTTATGT
TAGTATTAAGAACGTTATTTATATTTCAAATTTTTCTTTTTTTTCTGTACAGAC
GCGTGTACGCATGTAACATTATACTGAAAACCTTGCTTGAGAAGGTTTTGGGA
CGCTCGAAGGCTTTAATTTGCGGCCAGAAATCTCAGTAGATAGCTTGGATCCT
AAGCTAATGG

D.3 Integrationskassett III

GGCGAGCATATAGAAGTTCGTGAAGCATTCTTAGCCGGCTCTACTTCGTATAG
CATACATTATACGAAGTTATAGTTTATCATTATCAATACTCGCCATTTCAAAGA
ATACGTAAATAATTAATAGTAGTGATTTTCCTAACTTTATTTAGTCAAAAAATT
AGCCTTTTAATTCTGCTGTAACCCGTACATGCCCAAATAGGGGGCGGGTTAC
ACAGAATATATAACATCGTAGGTGTCTGGGTGAACAGTTTATTCTGTCATCC
ACTAAATATAATGGAGCCCGCTTTTTAAGCTGGCATCCAGAAAAAAAAGAAT
CCCAGCACCAAAATATTGTTTTCTTCACCAACCATCAGTTCATAGGTCCATTCT
CTTAGCGCAACTACAGAGAACAGGGGCACAAACAGGCACAAAAACGGGCACAA
CCTCAATGGAGTGATGCAACCTGCCTGGAGTAAATGATGACACAAGGCAATTG
ACCCACGCATGTATCTATCTCATTTTTCTTACACCTTCTATTACCTTCTGCTCTC
TCTGATTTGGAAAAAGCTGAAAAAAAAGGTTGAAACCAGTTCCTGAAATTAT
TCCCCTACTTGACTAATAAGTATATAAAGACGGTAGGTATTGATTGTAATTCT
GTAATCTATTTCTTAAACTTCTTAAATTCTACTTTTATAGTTAGTCTTTTTTT
TAGTTTTAAACACCAGAACTTAGTTTCGACGGATATGGGTAAGGAAAAGACT
CACGTTTCGAGGCCGCGATTAAATTCCAACATGGATGCTGATTTATATGGGTA
TAAATGGGCTCGCGATAATGTCGGGCAATCAGGTGCGACAATCTATCGATTGT
ATGGGAAGCCCGATGCGCCAGAGTTGTTTCTGAAACATGGCAAAGGTAGCGTT
GCCAATGATGTTACAGATGAGATGGTCAGACTAAACTGGCTGACGGAATTTAT
GCCTCTCCGACCATCAAGCATTTTATCCGTAATCCTGATGATGCATGGTTACT
CACCCTGCGATCCCCGGCAAAACAGCATTCAGGTATTAGAAGAATATCCTG
ATTCAGGTGAAAAATATTGTTGATGCGCTGGCAGTGTTCCTGCGCCGGTTGCAT
TCGATTCCTGTTTGTAATTGTCCTTTTAAACAGCGATCGCGTATTTTCGTCTCGCT
CAGGCGCAATCACGAATGAATAACGGTTTGGTTGATGCGAGTGATTTTGATGA
CGAGCGTAATGGCTGGCCTGTTGAACAAGTCTGGAAAGAAATGCATAAGCTTT
TGCCATTCTCACCGGATTCAGTCGTCACTCATGGTGATTTCTCACTTGATAACC
TTATTTTTGACGAGGGGAAATTAATAGGTTGTATTGATGTTGGACGAGTCGGA
ATCGCAGACCGATACCAGGATCTTGCCATCCTATGGAACCTGCCTCGGTGAGTT
TTCTCCTTCAATACAGAAACGGCTTTTTTCAAATAATGGTATTGATAATCCTGA
TATGAATAAATTGCAGTTTCATTTGATGCTCGATGAGTTTTTCTAATCATGTAA
TTAGTTATGTCACGCTTACATTCACGCCCTCCCCCACATCCGCTCTAACCGAA
AAGGAAGGAGTTAGACAACCTGAAGTCTAGGTCCCTATTTATTTTTTTTATAGT
TATGTTAGTATTAAGAACGTTATTTATATTTCAAATTTTTCTTTTTTTTCTGTA
CAGACGCGTGACGCATGTAACATTATACTGAAAACCTTGCTTGAGAAGGTTT
TGGGACGCTCGAAGGCTTTAATTTGCGGCCCTACTTCGTATAGCATACATTAT
ACGAAGTTATAGTTTATCATTATCAATACTCGCCATTTCAAAGAATACGTAAA
TAATTAATAGTAGTGATTTTCCTAACTTTATTTAGTCAAAAAATTAGCCTTTTA
ATTCTGCTGTAACCCGTACATGCCCAAATAGGGGGCGGGTTACACAGAATAT
ATAACATCGTAGGTGTCTGGGTGAACAGTTTATTCTGTCATCCACTAAATAT
AATGGAGCCCGCTTTTTAAGCTGGCATCCAGAAAAAAAAGAATCCCAGCACCC
AAAATATTGTTTTCTTCACCAACCATCAGTTCATAGGTCCATTCTCTTAGCGCA
ACTACAGAGAACAGGGGCACAAACAGGCACAAAAACGGGCACAACTCAATGG
AGTGATGCAACCTGCCTGGAGTAAATGATGACACAAGGCAATTGACCCACGCA
TGTATCTATCTCATTTTTCTTACACCTTCTATTACCTTCTGCTCTCTCTGATTTGG
AAAAAGCTGAAAAAAAAGGTTGAAACCAGTTCCTGAAATTATCCCCTACTT
GACTAATAAGTATATAAAGACGGTAGGTATTGATTGTAATTCTGTAAATCTAT
TTCTTAAACTTCTTAAATTCTACTTTTATAGTTAGTCTTTTTTTTTTAGTTTTAA
ACACCAGAACTTAGTTTCGACGGATAGCTTATGAGCACTGTTTTATATAGAT
GCCCTGAGCTGCTTATTGGTGGAGAGTGGCGACCAGGAAGACATGAACAACG
GTTGGTTGTTTCGAAACCCCGCCACAGGCGAGCCTTTGGACGAATTGAGGCTGG
CCTCAGCCGATGATCTACAGTTGGCATTGCAAACAACCTCAACAGGCATTCGAG
CACTGGAGACAAGTTCCTGCGCACGAACGTTGTGCAAGACTCGAAAGAGGAG
TTGCAAGATTAAGAGAAAATACAGAAAGAATTGCGCATCTCTTAACATTAGAA
CAAGGTAAAACCTTTAGCAGAAGCAAGGATGGAATGCGCTATGGCCGCCGATTT
GATTAAGTGGTATGCAGAAGAGGCAAGGAGAGTCTATGGTAGGGTCATCCCG
GCCAGACTCCCAAATAGTCGTATGGAAGTCTTCAAGTTTCCAGTTGGCCAGT
AGCAGCTTTTAGCCCATGGAATTTCCCTTTAGTATTGTCCGCAAGAAAACCTAG
GTGGTGCCATTGCCGCTGGCTGTTCAATCGTACTTAAAGCAGCCGAAGAACT

CCGGCTTCTGTTGCAGCCATGGTTGATTGTCTGAACCAGGAGTTACCGCCAGG
TGTGGTGCAGCTTTTGTATGGAGTGCCAGCCGAAGTGTCTCAAGCTCTAATTG
CTTCTCCTGTAGTGAGAAAAGTTACTTTTACGGGCTCAGTGCCAGTGGGTAGG
CATCTTGCTGAGTTATCCGCCCGACACTTGAAAAGGATTACCTTGGAGCTAGG
TGGTCACGCACCCGTAATCGTTTGCGGTGATGCTGATATAGCAAGAACGGTTA
ACTTAATGGTTCAACATAAGTTTTCGGAATGCCGGTCAGGCTTGTCTCGCCCCG
ACTCGGTTCTTCGTTGATAGGAGAATATACGGTGATTTCGTGACGCATTTGG
AGCTACTCAGGCTTTGAGAGTCGGCGCCGGTATGGCCGCAGAAACCCAGATG
GGTCCTGTGCGATCCGCAAGGCGACAAGCCGCCGTACAAGATTTGATAGCCCG
ATCAGTCGCTGCTGGTGCCAGACCCGGTGGCTTCTGCTGTACCGGAAGCTGGGT
ATTTTCGTAGCTCCTACACTATTGGCCGATGTCCCCTTGTATGCACCGGTGATG
TCTGAAGAACCTTTTGGGCCCGTTGCATGCGCTGTGCCATTTGACTCGTTAGA
CCAAGCTATTGCTCAAGCCAATCATAATCCATACGGTTTGGCTGGCTACCTTTT
TACTGATTCAGCTAAAGCCATTCTTGCGGTTTCCGAGAGGCTTGAAGTGGGCA
GTTTAGCAGTGAATGGTATGGGTGTTTCTGTACCAGAAGCCCCATTTGGTGGA
GTTAAGGACTCCGGCTATGGAAGCGAGAGCGGCACAGAAGGAATGGAAGCCT
TTTTAGATACCAAGTTTATGCATTACGTTGCTTAAAGCTTTCATGTAATTAGT
TATGTCACGCTTACATTCACGCCCTCCCCCACATCCGCTCTAACCGAAAAGG
AAGGAGTTAGACAACCTGAAGTCTAGGTCCCTATTTATTTTTTTTATAGTTATG
TTAGTATTAAGAACGTTATTTATATTTCAAATTTTTCTTTTTTTTTCTGTACAGA
CGCGTGTACGCATGTAACATTATACTGAAAACCTTGCTTGAGAAGGTTTTGGG
ACGCTCGAAGGCTTTAATTTGCGGCCCTACTTCGTATAGCATA CATTATACGA
AGTTATAGTTTATCATTATCAATACTCGCCATTTCAAAGAATACGTAAATAATT
AATAGTAGTGATTTTCTAACTTTATTTAGTCAAAAAATTAGCCTTTTAATTCT
GCTGTAACCCGTACATGCCCAAAATAGGGGGCGGGTTACACAGAATATATAAC
ATCGTAGGTGTCTGGGTGAACAGTTTATTCCTGGCATCCACTAAATATAATGG
AGCCCGCTTTTTAAGCTGGCATCCAGAAAAAAGAATCCCAGCACCAAAAT
ATTGTTTTCTTACCAACCATCAGTTCATAGGTCCATTCTCTTAGCGCAACTAC
AGAGAACAGGGGCACAAACAGGCAAAAAACGGGCACAACCTCAATGGAGTGA
TGCAACCTGCCTGGAGTAAATGATGACACAAGGCAATTGACCCACGCATGTAT
CTATCTCATTTTCTTACACCTTCTATTACCTTCTGCTCTCTCTGATTTGAAAA
AGCTGAAAAAAGGTTGAAACCAGTTCCTGAAATTATTCCCCTACTTGACT
AATAAGTATATAAAGACGGTAGGTATTGATTGTAATTCTGTAATCTATTTCT
TAAACTTCTTAAATTCTACTTTTATAGTTAGTCTTTTTTTTTTAGTTTTAAACAC
CAGAACTTAGTTTCGACGGATCTAGAAATGTTTCATTAGAAACTGTTGGTATGT
GGCTGCATGGGATACTGAAATTCGGGCGGAAGGACTTTTTTCATAGA ACTCTTT
TGAATGAGCCAGTTTTTATTATACAGAGACACACAAGGGAGGGTTCGTTGCGTTA
GAAAATAGATGTTGCCATAGGTCTGCTCCACTCCATATTGGGAGGCAAGAAGG
TGACTGTGTGAGATGTTTGTACCACGGATTGAAATTC AATCCATCGGGTGCCT
GTGTTGAAATTCCTGGGCAAGAACAATAACCCCTAAAACATGTATTA AAAGT
TATCCGGTTGTCGAGAGAAACCGTTTAGTTTGGATATGGATGGGTGATCCGGC
CCGCGCAATCCAGACGACATTGTTGATTATTTCTGGCACGATTCACCTGAAT
GGAGAATGAAGCCAGGCTATATTCATTATCAAGCTAATTACAAATTAATTGTT
GATAACCTGCTAGATTTCACTCATTGTCATGGGTACATCCTACAACCTTGGG
TACTGATTCGCGCCCTCATTAAAGCCTGTAATTGAGAGGGACACAACAGGTA
CTGGTAAGTTAACAATTACCAGGTGGTATCTAAACGATGACATGTCTAATTTG
CACAAAGGTGTCGCCAAATTCGAGGGTAAGGCTGACAGATGGCAGATATATCA
ATGGAGTCCACCAGCACTGCTGCGTATGGATACGGGTAGCGCACCCGACTGGAA
CTGGCGCTCCCGAAGGACGCAGAGTCCCAGAGGCTGTT CAGTTCGGGCATACG
TCGATACAAACTCCAGAGACGGAAACGACCTCTCACTATTGGTTCTGCCAGGC
TAGAACTTCGATCTTGATGACGAAGCACTAACAGAAAAAATATATCAAGGTG
TAGTTGTTGCTTTTGAAGAAGACAGGACGATGATAGAAGCCCATGAAAAAATT
CTTTCACAGGTACCAGATAGACCCATGGTTCCAATTGCAGCAGATGCAGGACT
TAACCAAGGCAGATGGTTATTAGACAGATTATTAAGGCTGAAAACGGCGGTA
CTGCCCCCTAACTAGATCATGTAATTAGTTATGTCACGCTTACATTCACGCC
TCCCCCACATCCGCTCTAACCGAAAAGGAAGGAGTTAGACAACCTGAAGTCT
AGGTCCCTATTTATTTTTTTTTATAGTTATGTTAGTATTAAGAACGTTATTTATAT
TTCAAATTTTTCTTTTTTTTTCTGTACAGACGCGTGTACGCATGTAACATTATAC

TGAAAACCTTGCTTGAGAAGGTTTTGGGACGCTCGAAGGCTTTAATTTGCGGC
CCTACTTCGTATAGCATAATTATACGAAGTTATTGTGAAAAGGGCGAAGGC
CCTGAATCTTATAAAATAGC

Appendix E Resultat av toleransstudie

E.1 Solubilitet

Solubiliteten av pX samt TPA i YPD-medium, där DMSO användes som lösningsmedel, undersöktes. Olika koncentrationer av pX och TPA testades (tabell 6, 7).

Tabell 6: Solubilitet av pX i YPD-medium med DMSO som lösningsmedel. Olika koncentrationer av pX samt DMSO testades och resultatet ges i form av poäng där -1 = olösligt, 0 = halvlösligt och +1 = lösligt. Vid olösligt bildas tydlig emulsion och/eller fällning. Vid halvlösligt bildas svag emulsion och/eller fällning. Vid lösligt bildas en klar lösning utan fällning eller emulsion.

Test	pX (μ l)	DMSO (μ l)	YPD (μ l)	Poäng
1	11.600	60	960	-1
2	5.800	60	940	-1
3	5.800	100	894	-1
4	2.900	100	897	-1
5	2.900	500	500	+1
6	0.725	82	918	+1
7	0.752	60	937	+1

Tabell 7: Solubilitet av TPA i YPD-medium med DMSO som lösningsmedel. Olika koncentrationer av TPA samt DMSO testades och resultatet ges i form av poäng där -1 = olösligt, 0 = halvlösligt och +1 = lösligt. Vid olösligt bildas tydlig emulsion och/eller fällning. Vid halvlösligt bildas svag emulsion och/eller fällning. Vid lösligt bildas en klar lösning utan fällning eller emulsion.

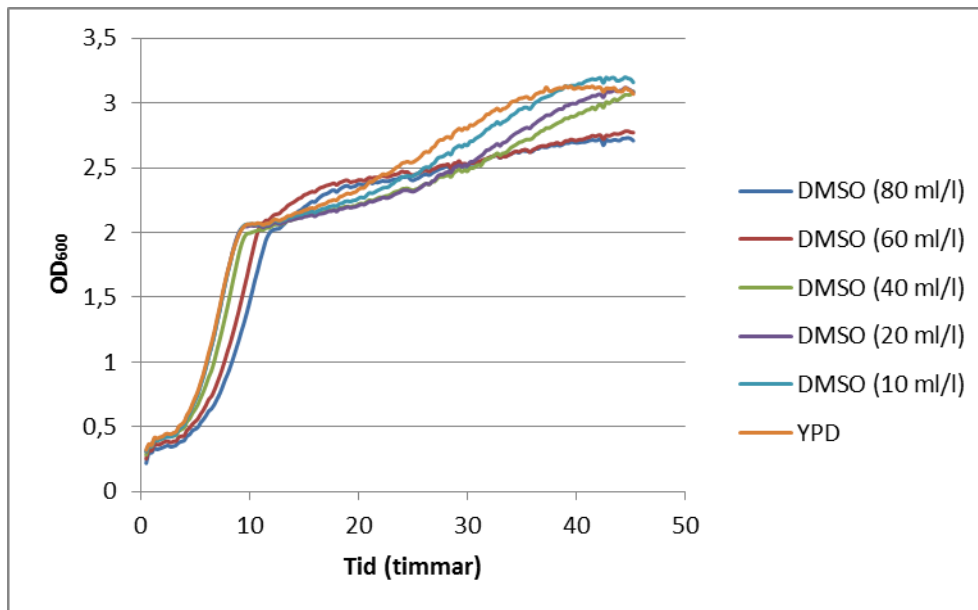
Test	TPA (μ l)	DMSO (μ l)	YPD (μ l)	Poäng
1	10.0	20	980	-1
2	10.0	40	960	0
3	10.0	60	940	-1
4	2.4	60	940	-1
5	1.5	60	940	-1
6	1.2	60	940	-1
7	1.2	80	920	0
8	1.2	100	900	0
9	1.0	60	940	-1
10	0.9	100	900	0
11	0.6	60	940	+1
12	0.6	100	900	-1
13	0.6	150	850	-1

E.2 Mätning av tillväxt

Tillväxt av *Saccharomyces cerevisiae* CEN.PK 113-7D studerades vid olika betingelser med en Bioscreen C MBR. Påverkan av tillväxt analyserades vid olika koncentrationer av DMSO, pX samt TPA. Graferna som presenteras nedan har behandlats med en linjäriseringsformel där hänsyn tas till OD-mätning i Bioscreen C MBR [32]. Ekvationen definieras enligt:

$$OD_{cor} = OD_{obs}^2 \cdot 0,449 + OD_{obs} \cdot 0,191$$

Tillväxten av *S. cerevisiae* undersöktes i YPD-medium med tillsatt DMSO i olika koncentrationer för fyra replikat (figur 10). Generationstider beräknades (tabell 8).



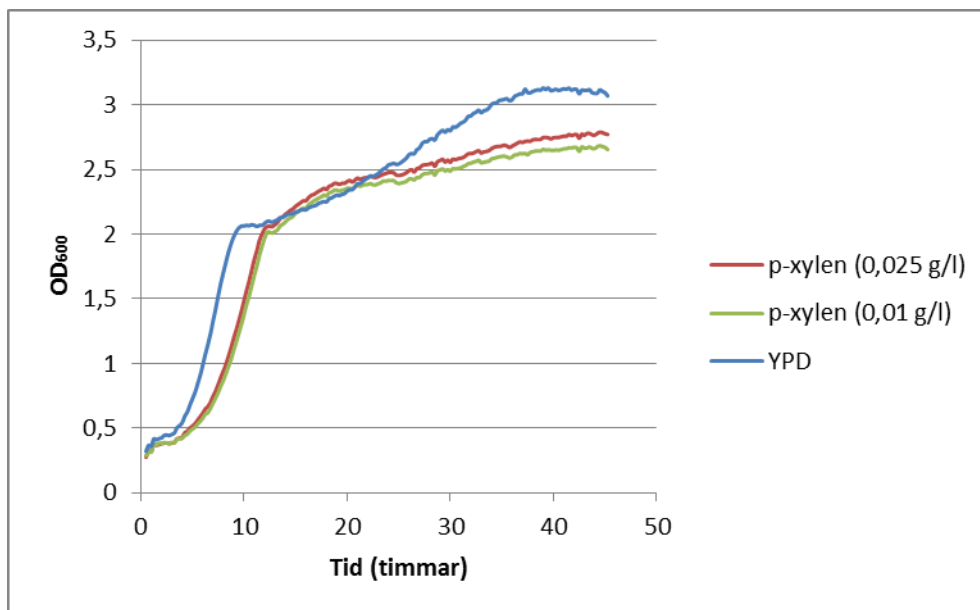
Figur 10: Tillväxt av *S. cerevisiae* CEN.PK 113-7D i YPD-medium med olika koncentrationer av DMSO samt enbart YPD-medium. Medelvärdet av fyra replikat av samma tillväxtbetingelse har beräknats och motsvarande kurvor presenteras. OD vid våglängden 600 nm har plottats mot antalet passerade timmar.

Medelvärdet av standardavvikelserna för tillväxten i YPD-medium beräknades till 0.048 och generationstiden beräknades till 2.47 h.

Tabell 8: Generationstiden uppskattades grafiskt ur kurvan framtagen från medelvärdet av replikaten för tillväxt i närvaro av DMSO. Standardavvikelse för varje tillväxtbetingelse presenteras.

Koncentration DMSO (ml/l)	Generationstid (h)	Standardavvikelse
80	2.95	0.019
60	2.95	0.046
40	2.60	0.023
20	2.44	0.063
10	2.41	0.017

Tillväxten av *S. cerevisiae* CEN.PK 113-7D undersöktes i YPD-medium med tillsatt pX i olika koncentrationer för fyra replikat (figur 11). Generationstider beräknades (tabell 9).



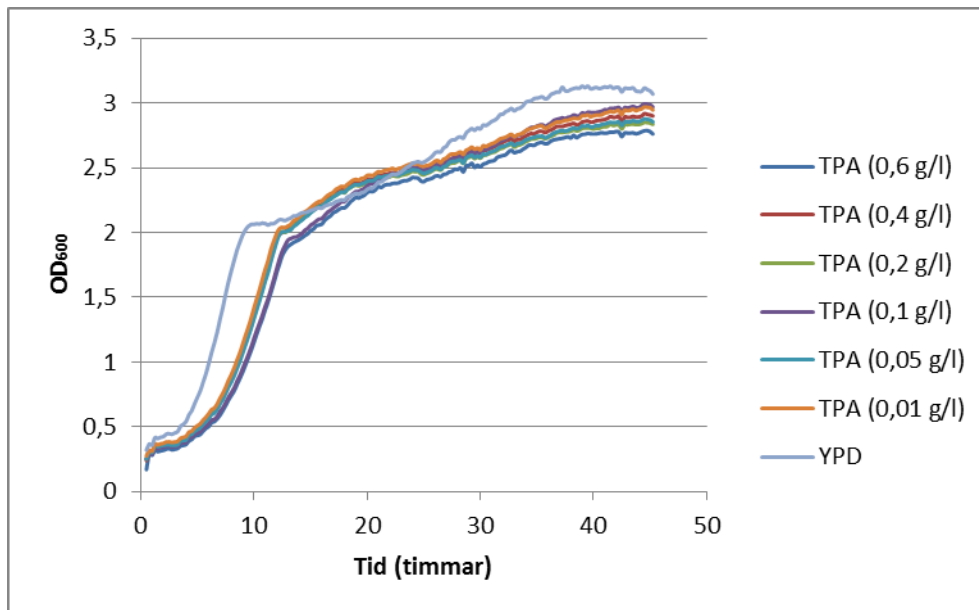
Figur 11: Tillväxt av *S. cerevisiae* CEN.PK 113-7D i YPD-medium med olika koncentrationer av pX samt enbart YPD-medium. Medelvärdet av fyra replikat av samma tillväxtbetingelse har beräknats och motsvarande kurvor presenteras. OD vid våglängden 600 nm har plottats mot antalet passerade timmar.

Medelvärdet av standardavvikelsena för tillväxt i YPD-medium beräknades till 0.048 och generationstid beräknades till 2.47 h.

Tabell 9: Generationstiden uppskattades grafiskt ur kurvan framtagen från medelvärdet av replikaten för tillväxt i närvaro av pX. Standardavvikelse för varje tillväxtbetingelse presenteras.

Koncentration pX (ml/l)	Generationstid (h)	Standardavvikelse
0.025	3.38	0.083
0.010	3.48	0.042

Tillväxten av *S. cerevisiae* CEN.PK 113-7D undersöktes i YPD-medium med tillsatt TPA i olika koncentrationer för fyra replikat (figur 12). Generationstider beräknades (tabell 10).



Figur 12: Tillväxt av *S. cerevisiae* CEN.PK 113-7D i YPD-medium med olika koncentrationer av TPA samt enbart YPD-medium. Medelvärdet av fyra replikat av samma tillväxtbetingelse har beräknats och motsvarande kurvor presenteras. OD vid våglängden 600 nm har plottats mot antalet passerade timmar.

Medelvärdet av standardavvikelse för tillväxt i YPD-medium beräknades till 0.048 och generationstiden beräknades till 2.47 h.

Tabell 10: Generationstid har uppskattades grafiskt ur kurvan framtagen från medelvärdet av replikaten för tillväxt i närvaro av TPA. Standardavvikelse för varje tillväxtbetingelse har även beräknats.

Koncentration TPA (ml/l)	Generationstid (h)	Standardavvikelse
0.60	3.22	0.030
0.40	3.22	0.070
0.20	3.13	0.100
0.10	3.29	0.044
0.05	3.23	0.095
0.01	3.22	0.074