

**IMMOBILISERING AV SACCHAROMYCES  
CEREVISIAE OG VIRKNING AV KITOSAN PÅ  
DEN MEKANISKE STYRKEN TIL CELLEVEGGEN  
TIL SACCHAROMYCES CEREVISIAE**

---

**Av**

**Åshild Samseth**

## Forord

Denne masteroppgaven er utført som en del av sivilingeniørstudiet Industriell Kjemi og Bioteknologi ved Institutt for Bioteknologi ved Norges Teknisk-Naturvitenskapelige Universitet (NTNU).

Under arbeidet med masteroppgaven har flere instrumenter blitt brukt med gjærceller sannsynligvis for første gang ved universitetet. Dette har vært en utfordrende prosess, men for alle som har vært involvert er jeg sikker på at erfaringene fra dette arbeidet vil være nyttig for videre arbeider ved universitetet.

Jeg vil derfor rette en stor takk til min veileder Marit Slettmoen for god veiledning under masterarbeidet og for å ha hjulpet meg til å se at jeg faktisk hadde oppnådd en god del resultater til tross for mitt daværende inntrykk av det motsatte. En stor takk går også til Kjell Morten Vårum for disponering av kitosanene benyttet i masteroppgaven. Videre vil jeg takke H el ene Martin-Yken ved Institut National des Sciences Appliqu ees Toulouse og Etienne Dague ved Laboratoire d'Analyse et d'Architecture des Syst emes for samtaler med gode innspill og ekspertise innen bruk av atom er kraftmikroskopi (AFM) på gjærceller. En stor takk rettes også til Gjertrud Maurstad for god opplæring i bruk av AFM og for   ha vært tilstede når jeg har hatt nye spørsmål knyttet til bruk av AFM. Jeg vil også takke Astrid Bjørkøy og Bjørn Torger Stokke for deres vilje og tålmodighet til   prøve ut kvantitativ fasekontrast mikroskopi med gjærceller eksponert for kitosan. Ikke minst vil jeg takke mine medarbeidere Soosan Hadjialirezaei og Karen Dunker for samarbeidet under metodeutviklingen for immobilisering av gjærceller til glassoverflater. Til slutt vil jeg rette en stor takk til alle andre ved Institutt for Bioteknologi som har bidratt med r d og opplæring som har gitt fremgang i arbeidet. Tusen takk til alle sammen og jeg håper mitt bidrag har åpnet mulighet for mer spennende forskning ved universitetet.

Ellers vil jeg benytte anledningen til   takke venner og familie for r d og støtte under arbeidet med masteren. Uten deres hjelp hadde jeg sannsynligvis fortsatt vært syk og langt fra innlevering av oppgaven. Tusen takk!

Trondheim 12.11.16

Åshild Samseth

## Sammendrag

Målet for denne masteroppgaven var å utvikle en metode for immobilisering av *S. cerevisiae* til en glassoverflate samt å undersøke hvordan celleveggenes elastisitet til *S. cerevisiae* blir påvirket av kitosan med 66% eller 94,4% deacetylering.

Undersøkelsene har bestått av måling av zetapotensial, bestemmelse av Youngs modulus ved nanoindentering med AFM og bruk av kvantitativ fasekontrastmikroskopi for å observere morfologiske endringer samt at fasekontrastmikroskopi ble benyttet for inspeksjon av immobiliseringsforsøkene. Måling av optisk tetthet ble benyttet for bekreftelse av stabil fase til gjærcellene under forsøkene. I tillegg ble bovint serumalbumin (BSA) ble forsøkt benyttet for å hindre immobilisering av *S. cerevisiae* til glassoverflater.

Masteroppgaven er bygget opp med en introduksjonsdel der det blir gitt en oversikt over relevant informasjon fra litteraturen om *Saccharomyces cerevisiae* og den kationiske polymeren kitosan som danner grunnlaget for oppgaven. Videre presenteres aktuell forskning for problemstillingen om påvirkninger av celleveggenes elastisitet og metoder for immobilisering med utfyllende informasjon om poly-L-lysin som blir benyttet i oppgaven. Teori for bestemmelse av optisk tetthet, lysmikroskopi, bestemmelse av zetapotensial og AFM blir deretter presentert. Etter dette følger presentasjon tilknyttet det praktiske arbeidet utført. Materialer og eksperimentelle metoder blir presentert fulgt av resultater, diskusjon av resultatene og konklusjon. Til slutt blir forslag for videre studier bygget på funnene fra arbeidet med masteroppgaven presentert.

Bestemmelse av zetapotensialet til *S. cerevisiae* ble brukt som et verktøy for metodeutviklingen for immobilisering av gjærceller på glassoverflater samt for å undersøke interaksjonen mellom kitosan og gjærens cellevegg. Det ble funnet at egenskapene til løsningen som gjærcellene var suspendert i var viktig for gjærcellens muligheter for å danne forbindelser ved elektrostatisk interaksjon med en funksjonalisert glassoverflate. Det negative zetapotensialet til *S. cerevisiae* ble mer skjermet i gjærekstrakt peptone dektrose (YPD) media. Det ble også funnet at ved bestemmelse av zetapotensial er det viktig å behandle prøvene likt, da det ble funnet indikasjoner på at zetapotensialet økte over tid og varierte avhengig av

konsentrasjonen av gjærceller i prøvene. Isoelektrisk punkt (IEP) til *S. cerevisiae* ble funnet til å ligge mellom pH 3 og 4. Ved tilsats av kitosan til suspensjoner av gjærceller i buffer eller Milli-Q(MQ)-vann ble det observert en signifikant økning i zetapotensialet fra en negativ til en positiv verdi. Dette indikerer at kitosan legger seg rundt gjærcellen. 94,4% deacetylert kitosan viste en høyere økning i zetapotensialet enn 66% deacetylert kitosan ved pH 6,5. Det ble derimot observert en signifikant nedgang i zetapotensialet til gjærcellene eksponert for kitosan i YPD-media der årsaken ble antatt å være utfelling av komplekser av kitosan og partikler i YPD-media.

Immobilisering av *S. cerevisiae* ble oppnådd ved funksjonalisering av glassoverflaten med  $\alpha$ -poly-L-lysin (PLL) etterfulgt av tørking, før en konsentrert suspensjon av *S. cerevisiae* i enten HEPES- eller MOPS-buffer ble påført glassoverflaten. Etter 10 minutter ble overflaten skylt forsiktig slik at det ble dannet et lag med celler på glassoverflaten. Denne immobiliseringsmetoden førte til et tett dekke av gjærceller på glassoverflaten som viste lite mobilitet og dermed kunne benyttes for nanoindentering med AFM. Videre undersøkelser indikerte at funksjonalisering av glassoverflate med PLL som hadde lav (15 000 Da) og høy (300 000 Da) molekylvekt samt økt at ionestyrke på løsningen ved funksjonaliseringen ga høyere mobilitet til gjærcellene. Funksjonalisering av glassoverflater med BSA hindret immobilisering, men viste en større grad av gjenværende celler enn ved bruk av en ufunksjonalisert glassoverflate.

Ved hjelp av nanoindentering med AFM ble celleveggenes elastisitet bestemt. Hertz-Sneddon-modellen ble benyttet for beregning av Youngs modulus fra kraft mot avstandskurvene oppnådd ved nanoindentering av gjærcellens overflate. En rekke feilkilder ble funnet ved bestemmelse av Youngs modulus til gjærcellenes cellevegg. Resultatene kunne allikevel gi indikasjon på en økning i celleveggenes elastisitet ved eksponering for 66% deacetylert kitosan der gjennomsnittsverdien av Youngs modulus var  $72 \pm 58$  kPa og  $46 \pm 42$  kPa for henholdsvis ueksponerte og eksponerte gjærceller. Det ikke kan derimot ikke trekkes noen konklusjoner om virkningen av 94,4% deacetylert kitosan på celleveggenes elastisitet siden det ikke ble oppnådd tilstrekkelig mengde eksperimentelle data. Kvantitativ fasekontrast ytterligere indikasjon på en økning i elastisiteten da gjærcellers eksponering for begge kitosaner førte til en observerbar reduksjon av høyden til gjærcellene.

## Abstract

The aim for this thesis was to develop a method for immobilizing *S. cerevisiae* to a glass surface as well as examine how the elasticity of cell wall of *S. cerevisiae* is affected by chitosan with 66% or 95% deacetylation. The examinations that have been done are measuring of zeta potential, calculating Young's modulus from nanoindentation with atomic force microscopy (AFM) and use of quantitative phase contrast microscopy for observation of morphological changes as well as ordinary phase contrast microscopy was used for inspection of the immobilizing experiments. Measuring of optical density was used to confirm stable growth phase for the yeast during the experiments. Bovine serum albumin (BSA) was explored as an agent to prevent immobilizing of *S. cerevisiae* to glass surfaces.

This master thesis consists first of an introduction with relevant information from literature about *Saccharomyces cerevisiae* and the cationic biopolymer chitosan which forms the foundation for this thesis followed by relevant research about the different impacts of the cell wall elasticity as well as methods of immobilizing microorganisms with complementary information about poly-L-lysine, which is used for immobilisation in this thesis. The theory about optical density, light microscopy, zeta potential and atomic force microscopy (AFM) precedes the presentation of the practical work done in this thesis. Materials and methods are presented followed by the results, discussion and conclusion, finishing with proposals for further research based by the discoveries made by writing this master thesis.

The measurement of *S. cerevisiae*'s zeta potential was used as a tool for developing a method of immobilizing yeast to glass surfaces as well as to examine the interaction between chitosan and the cell wall of yeast. It was found that the characteristics of the solution in which the yeast was suspended, was important for the ability of yeast to form electrostatic interactions with a functionalized glass surface. The negative zeta potential of yeast was subjected to a higher degree of particle screening in yeast extract peptone dextrose (YPD) media. It was also found that it is important to prepare the samples in the same way, since indications were found that the zeta potential increased in a time dependent manner and was dependent on the concentration of yeast in the samples. The isoelectric point for *S. cerevisiae* was

found to be between pH 3 and 4. Addition of chitosan to suspensions of yeast in buffer or Milli-Q(MQ) water gave a significant increase of zeta potential from a negative to a positive value. This indicates that chitosan covers the surface of yeast cells. 94,4% deacetylated chitosan had a higher increase in the zeta potential compared to 66% deacetylated chitosan at pH 6,5. On the contrary yeast exposed to chitosan in YPD media had a significant decrease in zeta potential, which was assumed to come from precipitation of complexes of chitosan and particles from YPD media.

Immobilizing of *S. cerevisiae* was achieved by functionalizing the glass surface with  $\alpha$ -poly-L-lysine (PLL) followed by drying before a concentrated suspension of *S. cerevisiae* in either HEPES or MOPS buffer was applied to the surface. After 10 minutes the surface was gently rinsed such that a monolayer of cells was formed on the glass surface. This method of immobilization created a dense layer of yeast cells at the glass surface that showed little mobility and could therefore be used for nanoindentations by AFM. Further examinations indicated that functionalizing glass surfaces with PLL which had low (15 000 Da) or high (300 000 Da) molecular weight and increased ionic strength during the functionalizing of glass surfaces may give rise to a higher mobility of immobilized yeast. Functionalizing glass surfaces with BSA prevented immobilization, but had a higher degree of remaining yeast cells than use of unfunctionalized glass surfaces.

Nanoindentations with AFM gave the cell wall elasticity. The Hertz-Sneddon-model was used for the calculations of Young's modulus from the force distance curves achieved from nanoindentations of the yeasts cell surface. There were many sources of errors for the calculation of Young's modulus. The results could still indicate an increase in the cell wall elasticity when exposing yeast to 66% deacetylated chitosan as the average of Young's modulus was found to be  $72\pm 58$  kPa and  $46\pm 42$  kPa for unexposed and exposed yeast cells respectively. For 94,4% deacetylated chitosan there cannot be made any conclusions on its effect on the elasticity of the cell wall since there was not sufficient experimental data collected. The use of quantitative phase contrast microscopy gave further indication for an increase in the elasticity since the exposure of yeast cells to both chitosans gave an observed reduction in height for the yeast cells.

# Innholdsfortegnelse

<b>FORORD</b>	<b>2</b>
<b>SAMMENDRAG</b>	<b>3</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>5</b>
<b>INNHOLDSFORTEGNELSE</b>	<b>7</b>
<b>1 INNLEDNING</b>	<b>11</b>
<b>2 LISTE OVER FORKORTELSER</b>	<b>13</b>
<b>3 INTRODUKSJON</b>	<b>14</b>
3.1 <b>Saccharomyces cerevisiae</b>	<b>14</b>
3.1.1 Formering	14
3.1.2 Vekst og vekstbetingelser	14
3.1.3 Cellevegg	15
3.2 <b>Kitosan</b>	<b>17</b>
3.2.1 Fremstilling	18
3.2.2 Løslighet av kitosan	19
3.2.3 Antimikrobiell aktivitet	20
3.2.4 Kitosans mekanisme	21
<b>4 AKTUELL FORSKNING</b>	<b>25</b>
4.1 <b>Celleveggpåvirkninger</b>	<b>25</b>
4.1.1 Celleveggens elastisitet under normale forhold	25

4.1.2	Endringer i celleveggens elastisitet ved ulike typer påvirkninger	26
4.1.3	Kitosans påvirkninger av celleveggen til gjær	26
4.2	<b>Immobilisering av celler på glassoverflater</b>	<b>28</b>
4.2.1	Poly-L-lysin	29
<b>5</b>	<b>TEORI FOR ANVENDT APPARATUR</b>	<b>31</b>
5.1	<b>Optisk tetthet</b>	<b>31</b>
5.2	<b>Lysmikroskopi</b>	<b>32</b>
5.2.1	Fasekontrast	33
5.2.2	Kvantitativ fasekontrast	34
5.3	<b>Zetapotensial</b>	<b>34</b>
5.3.1	Elektroforetisk mobilitet	35
5.3.2	Laser Doppler Velosimetri	36
5.4	<b>Atomær kraftmikroskopi</b>	<b>37</b>
5.4.1	Prinsipp for AFM spektroskopi	37
5.4.2	Kalibrering	38
5.4.3	Youngs modulus og Hertz-Sneddon modellen	39
<b>6</b>	<b>MATERIALER OG EKSPERIMENTELL METODE</b>	<b>41</b>
6.1	<b>Løsninger og kjemikalier</b>	<b>41</b>
6.2	<b>Instrumenter</b>	<b>41</b>
6.3	<b>Utstyr</b>	<b>42</b>
6.4	<b>Eksperimentell metode</b>	<b>42</b>
6.4.1	Kultivering av gjærceller	42
6.4.2	Bestemmelse av optisk tetthet	42



6.4.3	Bestemmelse av zetapotensial for gjærceller i ulike løsninger	43
6.4.4	Immobilisering av gjærceller på glassoverflate	44
6.4.5	Avbildning av glassoverflater med immobiliserte gjærceller	45
6.4.6	Kvantitativ fasekontrast	46
6.4.7	AFM-basert nanoindentasjon	46
<b>7</b>	<b>RESULTATER</b>	<b>49</b>
7.1	<b>Vekstkurve for <i>S. cerevisiae</i></b>	<b>49</b>
7.2	<b>Zetapotensial</b>	<b>49</b>
7.2.1	Bestemmelse av zetapotensial for gjærceller løst i YPD-medium, buffer eller MQ-vann. 50	
7.2.2	Bestemmelse av zetapotensial for gjærceller etter tilsats av kitosan	53
7.2.3	Bestemmelse av zetapotensial for gjærceller etter tilsats av NaCl	55
7.3	<b>Immobilisering av gjærceller på glassoverflate</b>	<b>56</b>
7.4	<b>Kvantitativ fasekontrast</b>	<b>62</b>
7.5	<b>Resultater fra AFM</b>	<b>65</b>
<b>8</b>	<b>DISKUSJON</b>	<b>72</b>
8.1	<b>Zetapotensial til gjærceller suspendert i ulike løsninger med eller uten kitosan</b>	<b>75</b>
8.2	<b>Immobilisering av gjærceller på glassoverflate</b>	<b>81</b>
8.3	<b>Morfologiske endringer til gjærceller ved tilsats av kitosan</b>	<b>87</b>
8.4	<b>Indentering og elastisitet</b>	<b>88</b>
8.4.1	Eliminering av støy i kraft mot avstandskurver	88
8.4.2	Utregning av Youngs modulus	89
8.4.3	Forskjell i Youngs modulus mellom en glassoverflate med eller uten et dekke av immobiliserte gjærceller	92

8.4.4	Youngs modulus for gjærceller	94
8.4.4.1	Innvirkninger av immobiliseringsmetode	96
8.4.4.2	Variasjon i elastisitet	97
8.4.5	Hvordan tilsats av kitosan påvirket elastisiteten til gjærcellene	97
<b>9</b>	<b>KONKLUSJON</b>	<b>100</b>
<b>10</b>	<b>VIDERE STUDIER</b>	<b>103</b>
<b>11</b>	<b>REFERANSER</b>	<b>106</b>

## 1 Innledning

Immobilisering av mikroorganismer på forskjellige typer overflater er et nyttig verktøy som kan benyttes i flere sammenhenger. Innen mjødproduksjon er immobilisering av gjær på overflaten til fermenteringstanken studert(1) siden det er vist at immobilisering gir en fordel i forhold til frie celler med tanke på produksjonsutbytte og -stabilitet(2). Potensialet for å bruke immobiliserte mikroorganismer for å rense industriell kloakk for giftige stoffer er også beskrevet i litteraturen(3). Målsettingen med denne oppgaven var å immobilisere et tett lag av *Saccharomyces cerevisiae* på en glassoverflate og benytte disse overflatene for studier av kitosans antimikrobielle effekt på gjærcellene, ved hjelp av AFM.

Kitosan er en biopolymer som viser stort potensiale i en rekke anvendelser. Den dokumenterte antimikrobielle effekten av kitosan er spesielt viktig. Siden kitosan er nedbrytbar og ikke er funnet til å være giftig har kitosan potensiale for erstatte mer giftige stoffer som blir benyttet i jordbruk, matvareindustri og medisin(4). I en verden som har en økende grad av resistente patogener gir kitosan et viktig bidrag i kampen mot bakteriene(5). Spesielt siden resistens for kitosan er funnet til å ikke gi resistens for andre vanlige antifungale midler noe som tyder på en vesentlig forskjell på mekanismen(6) noe som er en god karakteristikk til nye antimikrobielle midler. Bruk av kitosan i bandasjer har også potensiale for å gi positive bivirkninger ved frigjøring av arbeidskapasitet da sårene til pasientene leger raskere(4).

Fokuset i denne oppgaven vil være å undersøke deler av kitosans antimikrobielle effekt ved å se på hvordan kitosan påvirker de mekaniske egenskapene til *S. cerevisiae*. Dette innebærer endringer i stivheten til celleveggen etter eksponering for kitosan. Det er ikke blitt funnet at kitosans bidrag til elastisitetendringer er undersøkt i tidligere studier. Dette vil derfor sannsynligvis gi ny innsikt i hvordan kitosan påvirker *S. cerevisiae*. To kitosaner med ulik deacetyleringsgrad (DG) vil bli benyttet i forsøkene.

I oppgaven blir det benyttet Zetasizer for måling av zetapotensial, atomær kraftmikroskopi (AFM), kvantitativ fasekontrast mikroskopi og vanlig fasekontrastmikroskopi for å innhente informasjon om immobilisering og virkningen av kitosan på *S. cerevisiae*. Effekter av ulike parametere i systemet, som media, pH

og buffer, er blitt undersøkt for å utvikle en god metode for immobilisering og for å utføre nanoindenteringer med AFM. Med unntak av fasekontrastmikroskopi er det ikke kjent om noen på universitetet tidligere har benyttet seg av disse metodene for å studere *S. cerevisiae* eller andre mikroorganismer.

## 2 Liste over forkortelser

- AG: Acetyleringsgrad
- DG: Deacetyleringsgrad
- EPL:  $\epsilon$ -poly-L-lysin
- FFR: Fast Field Reversial (raskt feltreversering)
- $F_A$ : fraksjon GlcNAc i kitosan
- GlcN: D-glukosamin
- GlcNAc: N-acetyl-D-glukosamin
- HEPES: 4-(2-Hydroksyetyl)piperazine-1-etanesulfonsyre
- IEP: Isoelektrisk punkt
- LDV: Laser Doppler Velosimetri
- MI: Malvern Instruments
- MIK: minimum inhiberingskonsentrasjon
- MOPS: 3-(N-Morfolino)propansulfonsyre
- MQ: Milli-Q
- ORF: Open reading frame (åpen leseramme)
- PALS: Fase Analyse Lyssprednings teknikk
- PDMS: Polydimetylsiloksan
- PLL:  $\alpha$ -poly-L-lysin
- SFR: Slow Field Reversial (sakte feltreversering)
- YPD: Yeast extract peptone dextrose (gjærekstrakt pepton dekstrose)

## 3 Introduksjon

### 3.1 *Saccharomyces cerevisiae*

*Saccharomyces cerevisiae* er en gjærsopp som blir brukt til brygging og baking i tillegg til at det er en mye benyttet modellorganisme i litteraturen. *S. cerevisiae* er en fakultativ aerob gjærsopp som kan eksistere både i haploid og diploid form. Formen på *S. cerevisiae* er rund eller oval og den har en diameter på ca 6  $\mu\text{m}$ . *S. cerevisiae* er i lang tid blitt brukt som modellorganisme og var den første eukaryote cellen som fikk hele genomet sekvensert(7). Per 22.oktober 2016 er det funnet 6 604 ORF-er (Open Reading Frame, åpen leseramme) hvorav 78% er bekreftet(8).

#### 3.1.1 Formering

Reproduksjon av *S.cerevisiae* kan enten foregå aseksuelt eller ved kjønnnet formering. Aseksuelt skjer dette ved knoppsskyting der en dattercelle vokser ut fra en del av morcellen før den knipes av. På morcellen kan det observeres et knoppsskytingsarr der kontakten opprinnelig var, mens på dattercellen er det et tilsvarende fødselsarr. Kjønnnet formering foregår ved fusjon av to celler med hver sin parringstype. Ved næringsfattige forhold vil den fusjonerte cellen, zygoten, gjennomføre meiose og danne en ascus med 4 acussporer, to av hver parringstype(7).

#### 3.1.2 Vekst og vekstbetingelser

*S. cerevisiae* kan vokse i mange ulike næringsmedia og har en fordoblingstid på 90 minutter. Optimal temperatur for veksten er 30°C og som fakultativ aerob mikroorganisme kan *S. cerevisiae* vokse både ved fermentering og/eller oksidativ fosforylering avhengig av oksygenivået. Ved overskudd av glukose i næringsmediet vil *S. cerevisiae* til tross for aerobe forhold allikevel gjennomføre fermentering. Dette betegnes som Crabtree-effekten(7). Ved måling av optisk tetthet for å finne konsentrasjonen til en cellekultur med gjær vil en måling av optisk tetthet på 1 tilsvare  $3 \cdot 10^7$  celler/mL, men dette varierer fra stamme til stamme(9).

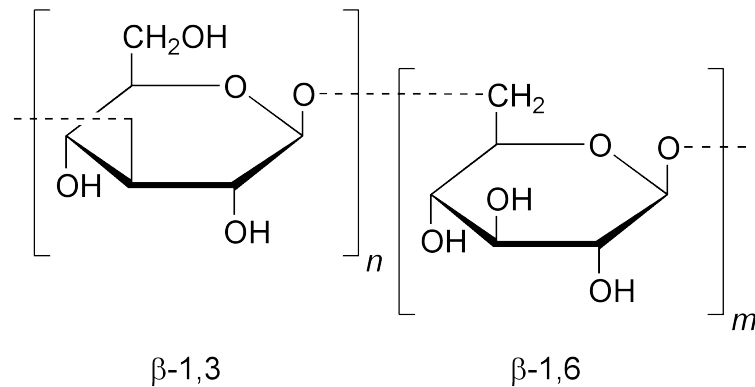
Ved kultivering av *S. cerevisiae* i batch vil *S. cerevisiae* gå igjennom ulike vekstfaser. Det starter med at *S. cerevisiae* tilpasser seg mediet i lagfasen, der lite vekst kan registreres, før veksten øker sterkt i den eksponensielle fasen. *S. cerevisiae* går

deretter igjennom et diauxisk skifte ved slutten av den eksponentielle fasen. Det diauxiske skifte inntreffer på det tidspunktet når den lettest tilgjengelige karbonkilden er brukt opp og gjærcellen er nødt til å tilpasse respirasjon ved utnyttelse av en annen karbonkilde. I den post-diauxiske fasen fortsetter veksten, men betraktelig svakere enn i den eksponentielle fasen. Når et essensielt næringsstoff er oppbrukt i mediet vil *S. cerevisiae* gå inn i stasjonær fase der veksten stopper opp og det ikke blir registrert noen videre endring i konsentrasjon av gjærceller i batchen. En gjærceelle i stasjonær fase vil gå ut av den stasjonære fasen når det tilsettes næring igjen(10).

### 3.1.3 Cellevegg

Gjærceller er eukaryote celler som skiller seg fra animalske celler ved at de har cellevegg. Funksjonene til celleveggen er å gi gjærcellen form, stabilisere det indre osmotiske trykket, beskytte cellen mot mekanisk stress samt degraderende enzymer og være forankringspunkt for proteiner med ulike funksjoner(11). Celleveggen er knyttet til resten av cellen ved tilknytning til transmembranproteiner i plasmamembranen og kan deles inn i en strukturell del av polysakkarider som bidrar som et stativ for et beskyttende lag av med mannoproteiner. Komponentene i celleveggen til *S. cerevisiae* består i hovedsak av 60-70% glukun, 1-2% kitin og 35-40% mannoproteiner(12). Glukan er en polymer som er satt sammen av D-glukosemonomerer ved hjelp av glykosidbindinger. Celleveggen til gjær består i hovedsak av  $\beta$ -1,3-glukan med  $\beta$ -1,6 forgreninger(13) også kalt laminarin (Figur 3.1.1). Laminarin inngår sammen med kitin i den strukturelle delen av celleveggen. Kitin er en polymer bestående av N-acetyl-D-glukosaminmonomerer bundet sammen med  $\beta$ -1,4-bindinger.  $\beta$ -1,3-glukan er bundet sammen med kitin ved hjelp av  $\beta$ -1,4-bindinger. Kitinet gir stivhet og fysisk styrke til cellen, mens  $\beta$ -1,3-glukanets primære heliks konfigurasjon gir celleveggen elastisitet(14). Kitinet befinner seg i hovedsak i den ytre delen av det strukturelle laget, men finnes i størst omfang i strukturene tilknyttet vegetativ formering; kitinringen i halsen til morcellen, primær septumet og i knopp skytingsarr(15-18). På yttersiden av  $\beta$ -1,3-glukannettverket finnes sterkt forgrenede  $\beta$ -1,6-glukankjeder(19, 20) der behandlede glykosylfosfatidylinositolanker kan være festepunkt for mannoproteiner(14, 21, 22). Mannoproteinene kan også være festet til  $\beta$ -1,3-glukan ved alkali-labile bindinger(14). Det ytre laget av celleveggen er sterkt glykosylert siden

mannoproteiner er proteiner glykosylert med en rekke mannosemonomerer. Dette laget beskytter det indre gluklaget mot vegg-degraderende enzymer og er også viktig for celle-celle gjenkjennelse ved biofilmdannelse og seksuell agglutinasjon(11).



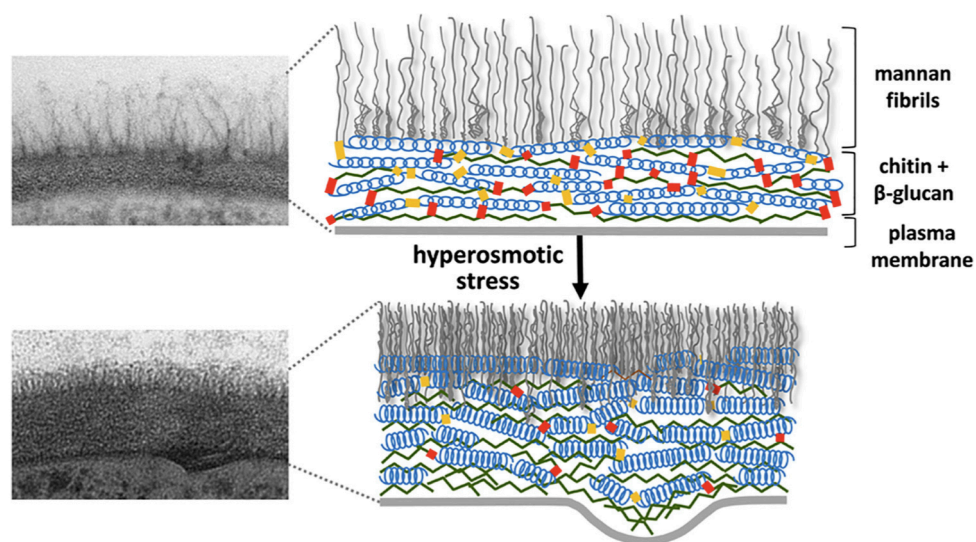
Figur 3.1.1: Kjemisk struktur av  $\beta$ -1,3- og  $\beta$ -1,6 gluklan.

Gjærcellens cellevegg er en dynamisk struktur som endrer seg både i ulike deler av cellesyklus, vekstfase og ved ulike vekstbetingelser(23) samt eksponering for stressfaktorer fra omgivelsene. Under vegetativ formering oppstår det en økning av kitin i strukturer som oppstår i forbindelse med knoppskytingen(15, 16). Etter formeringen forblir en del av kitinet på stedet der knoppskytingen fant sted og er med på å danne et knoppskytingsarr både på mor og dattercellen(17, 18). Når gjær går inn i stasjonær fase blir celleveggen blant annet tykkere og det dannes flere disulfidbroer mellom mannoproteinene som gjør celleveggen mer ugjennomtrengelig for makromolekyler og øker resistensen for degraderende enzymer(12). Dehydrering av *S. cerevisiae* gir en nedgang i transkripsjon av  $\beta$ -1,3-glukan syntetase *FSK1* og nedregulering av mannoproteinrelaterte gener(24), noe som blir foreslått av Dupont(25) betyr at celleveggens stivhet minsker ved dehydrering.

En gradvis endring av celleveggens komponenter beskriver allikevel ikke celleveggens raske respons på endringer i omgivelsene. Hyperosmotisk sjokk gir en kraftig senkning av gjærcellers volum med inntil 60%(12, 26). Ved en slik sammentrekning blir celleveggen tykkere og mer kompakt (Figur 3.1.2)(27). Den raske responsen ser ut til å komme av  $\beta$ -1,3-glukans struktur karakterisert som en hul spiral som gir fjærlignende egenskaper(12). Denne sammentrekningen av  $\beta$ -1,3-glukan er sannsynlig begrenset av bindinger mellom komponentene i



celleveggen (Figur 3.1.2)(27). Celleveggenes opprinnelige oppbygning av komponenter og bindingene mellom disse er derfor viktig for gjærcellens robusthet.



Figur 3.1.2: Endring av celleveggenes tykkelse ved hyperosmotisk sjokk for *C. albicans*. Til venstre vises TEM-bilder av celleveggen før (øverst) og like etter eksponering av 2M NaCl (nederst). Korresponderende illustrasjoner til høyre for TEM-bildene viser en mulig framstilling av celleveggenes oppbygning under de forskjellige forholdene. Plasmamembranen – horisontal tykk går linje, kitin – grønne linjer,  $\beta$ -1,3-glukan – blå spiraler, mannoproteiner – vertikale grå linjer, binding mellom  $\beta$ -1,3-glukan og kitin – rød firkant, binding mellom  $\beta$ -1,3-glukanspiraler – gul firkant (hentet fra (27)).

### 3.2 Kitosan

På grunn av kitosans nedbrytbare natur kombinert med kationske egenskaper nær fysiologisk pH er kitosan en yndet polymer for forskere. Hvert år publiseres tusentalls av artikler om kitosan og dens derivater. Bruksområdene til kitosan spenner seg fra medisinsk bruk til flokkuleringsagent i vannrensesystemer(4). Som flokkuleringsagent kan kitosan både adsorbere sprøytemidler(28) og metallioner(29) og få mikroorganismer til å flokkulere(30, 31). Derivater av kitosan har i tillegg gitt ytterligere muligheter for applikasjon innen for eksempel medisin for dannelse av nytt vev, bedre medisindistribusjon i kroppen, samt forbedring av den allerede

eksisterende antimikrobielle effekten til kitosan(4). Kitosans antimikrobielle effekt har i tillegg åpnet muligheter for bruk av kitosan som konserveringsmiddel(32).

Kitosan er en heteropolymer bestående av N-acetyl-D-glukosamin (GlcNAc) og D-glukosamin (GlcN) bundet sammen med  $\beta$ -1,4-bindinger. Kategoriseringen av kitosan blir gjort etter molekylvekt og hvor stor fraksjon GlcNAc ( $F_A$ ) som kitosanet består av. I stedet for  $F_A$ , eller acetyleringsgrad (AG), benyttes også deacetyleringsgrad (DG) til kitosanet som definerer hvilken grad det opprinnelige kitinet har blitt deacetylert(33). Inndelingen i molekylvekt er hovedsakelig en oppdeling i høy molekylvekt kitosan (HMVK) og lav molekylvekt kitosan (LMVK)(34). I tillegg defineres de aller minste kitosanene som kitosan oligosakkarider (KOS)(6) også omtalt som oligokitosaner(35). Spennet som hver molekylvektkategori strekker seg over er derimot ikke definert slik at det bruken av kategoriene varierer fra artikkel til artikkel.

### 3.2.1 Fremstilling

Den naturlige forekomsten av kitosan er svært lav. Utgangspunktet for dannelsen av kitosan er derfor kitin. Kitin finnes som et strukturelt element i skallet til leddyr (*artropoda*), men finnes også i skallet til blekkspruter, i alger og celleveggen til noen fungi (sopp). Kommersielt fremstilles kitosan fra kitin isolert fra blant annet rekeskall eller andre krepsdyr(36). Det er påvist 3 ulike krystallinske former for kitin,  $\alpha$ - (antiparallele kjeder),  $\beta$ - (parallelle kjeder) og  $\gamma$ -kitin (to antiparallele kjeder og en parallel)(37). Disse blir isolert fra ulike kilder som eksempel henholdsvis krepsdyr, skallet til blekksprut og hjortebiller (*Lucinade*)(38). Interaksjonen mellom kjedene, såkalt kjede-kjedeinteraksjoner består av hydrogenbindinger(37). Det er derfor en forskjell på reaktiviteten til  $\alpha$ - og  $\beta$ -kitinet under produksjon av kitosan, der  $\beta$ -kitin er mer reaktiv ved deacetylering(39, 40). Siden det finnes rikelig med skallrester fra skaldyrindustrien og at  $\alpha$ -kitin som regel gir høyere utbytte ved deacetyleringen er derimot skallrester den primære kilden for produksjon av kitosan(39).

Fremstillingen av kitosan foregår ved partiell de-N-acetylering utført ved basisk hydrolysering. I teorien kan syrehydrolysering benyttes, men siden den glykolytiske bindingen i kitinpolymeren er mer ustabil i syre, degraderes polymeren i langt høyere grad enn ved basisk hydrolysering. Acetoamidogruppen har høy resistens mot basisk

hydrolysering, men den er lavere enn resistensen til den glykolytiske bindingen slik at produksjon av kitosan er mulig uten for stor grad av degradering av polymeren ved hjelp av denne metoden. For å danne kitosaner med ulik AG benyttes ulike råmaterialer samt nøye regulering av de-N-acetyleringstiden og med kontinuerlig ekstraksjon med fortynnet syre(36).

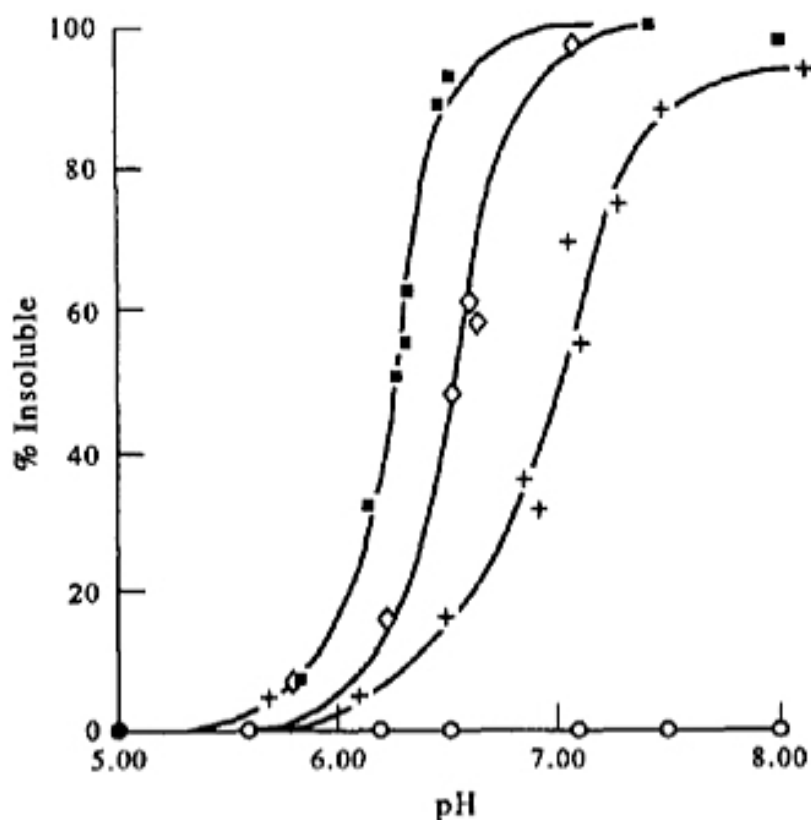
For å danne kitosaner med lavere molekylvekt enn det som kan bli isolert fra naturlige kilder blir det benyttet ulike typer for kitinaser eller kitosanaser. Disse enzymene er ofte dyre og det er blitt funnet at papain, pronase og pepsin kan brukes som en erstatning for å lage lav molekylær masse kitosan, kito-oligomer og monomerer(41, 42).

### 3.2.2 Løslighet av kitosan

I motsetning til kitin har kitosan større løslighet i vann. Mulighetene for at en polymer feller er blitt antatt til å komme av kjede-kjedeinteraksjoner mellom homogene strekk i polymerene. Kitin som består av én type monomer kan danne kjede-kjedeinteraksjoner mellom flere kitinpolymerer som observert i  $\alpha$ -,  $\beta$ - og  $\gamma$ -kitin(38). Dette er det mindre av i kitosan på grunn av heterogeniteten som følge av de ulike monomerene kitosan er bygget opp av. Ved lav (<40%) og høy (>80%) AG vil det være større mulighet for kjede-kjedeinteraksjoner mellom homogene områder slik at løseligheten kan være lavere for disse polymerene. Polyelektrolyttegenskapene til kitosan er derimot den primære bakgrunnen for løseligheten til kitosan med høy molekylvekt. Protonering av aminogruppen på C2-karbonatomet i GlcN-molekylene gir en positiv ladning som øker løseligheten(33). Løseligheten av kitosan er derfor avhengig av pH (Figur 3.2.1) og ionestyrken til løsningen. Kitosan er vist til å danne komplekser med enkelte overgangsmetaller og postovergangsmetaller. Tilstedeværelse av ioner som danner komplekser med kitosan bidrar derfor med å senke løseligheten til kitosan(36).

$pK_a$  verdier for kitosan er funnet til å ligge innenfor intervallet 6,2-7,2(43-46). Alle kitosaner er derfor løselig ved pH 6 eller lavere, men løseligheten avtar ved høyere pH der kitosan begynner å felle ut(36). Ved høyere pH gir en større AG høyere løselighet. Nøytral løselighet, der kitosanet er løselig over alle undersøkte verdier av pH, ble i studier av Vårum og Strand funnet for kitosan med middels og høy

molekylvekt og en GA på henholdsvis 49%(46) og 60%(47). Den nøytrale løseligheten er blitt tilskrevet acetylgruppens tilfeldige plassering i kjeden slik at kjede-kjedeinteraksjoner blir mer fraværende(33).



Figur 3.2.1: Løseligheten til kitosaner med forskjellig AG ved ulik pH. ■ AG=1%, ◇ AG=17%, + AG=37%, ○ AG=60% (reprodusert fra (47))

Det er uoverensstemmelser i litteraturen hvorvidt  $pK_a$  varierer med ulik AG. For å finne  $pK_a$ -verdiene har det blitt benyttet potentiometrisk titrering(44, 48, 49),  $H^1$ NMR-spektroskopi(48, 49) og elektroforetisk lysspredning(46). Enkelte studier har da vist at  $pK_a$  er den samme uavhengig av kitosanens AG(46, 48), mens andre rapporterer om forskjellige  $pK_a$  for kitosaner med ulik AG(44, 49).

### 3.2.3 Antimikrobiell aktivitet

Kitosan er vist til å ha antimikrobielle effekter for en rekke mikroorganismer(4). Genetiske analyser har vist et at KOS har flere cellulære mål sammenlignet med

vanlige antimikrobielle midler. Derfor antydes det(6)og bekreftes(35) at kitosan kan brukes mot resistente patogener.

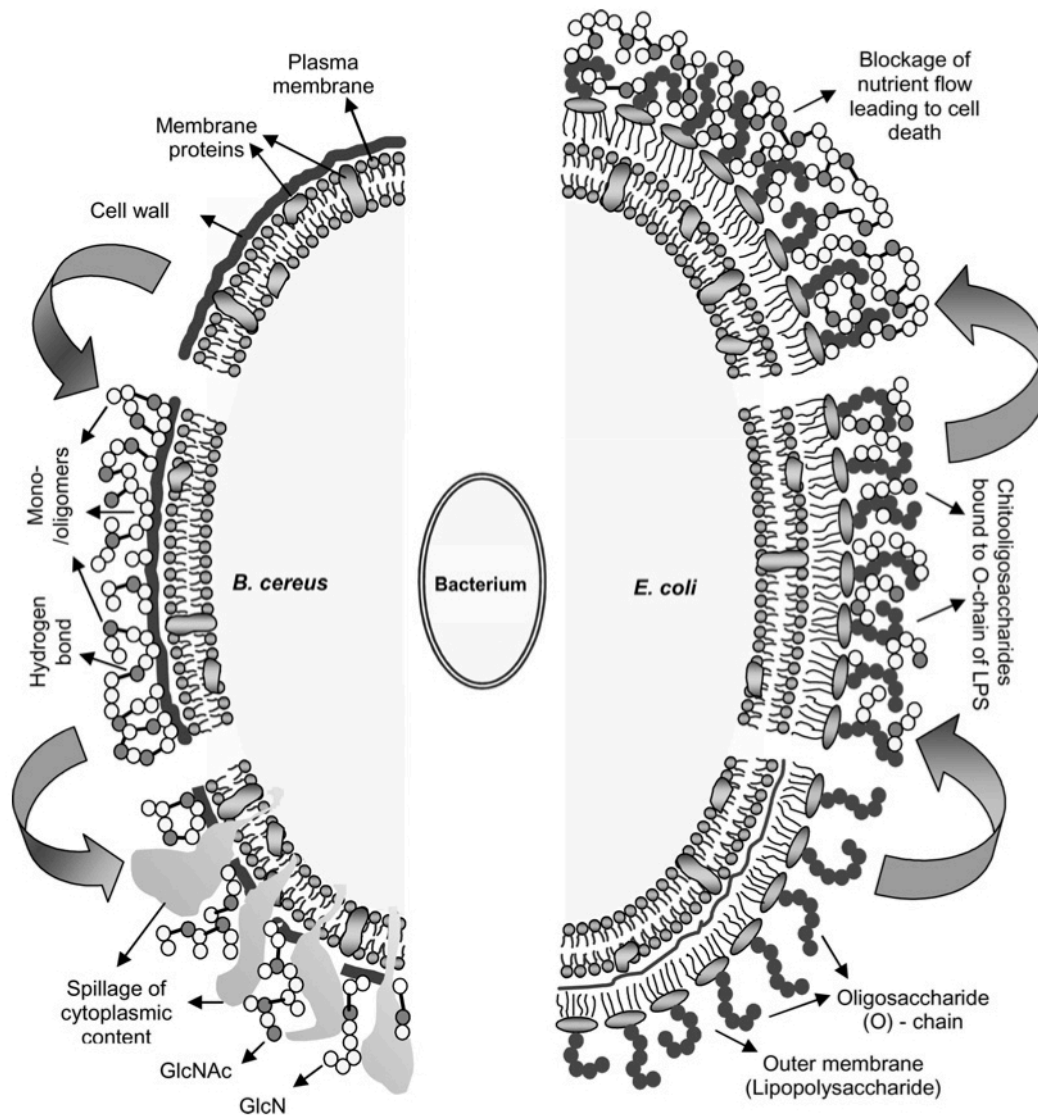
Den antimikrobielle aktiviteten til kitosan kan se ut til å være avhengig av de polyelektriske egenskapene til kitosan. Lavere AG og lavere pH gir en større antimikrobiell effekt(50). Det er ikke konsensus i litteraturen hvordan molekylvekt til kitosan påvirker den antimikrobielle effektiviteten. Mellegård antar at dette blant annet er på grunn av ulik bruk av kitosan med varierende kjemiske egenskaper som AG og molekylvekt noe som heller ikke alltid er beskrevet i studiene(34). Trendene går i hver sin retning der det rapporteres om at LMVK er mer effektivt enn HMVK(42) og omvendt(34, 51). Kulikov trekker fram at variasjonene kan komme av variasjoner i spredningen av molekylvekt i en prøve, distribuering av acetylgruppene, biprodukter og variasjon i kjemisk struktur ved terminalgruppene på polysakkaridene(35). I et forsøk på å belyse sammenhengen mellom molekylvekt og antimikrobiell effekt undersøkte Younes *et.al.*(50) 15 karakteriserte kitosan på 8 bakterier (4 gram-negative og 4 gram-positive) og 3 sopp. Det ble vist at lavere molekylvekt ga bedre antibakteriell effekt mot gram-negative bakterier, mens for gram-positive var tendensen motsatt. For sopp varierte resultatene ut fra hvilken organisme som ble studert.

Konsentrasjonen av kitosan som er benyttet i litteraturen for å nå minimum inhibasjonskonsentrasjon (MIK) varierer sterkt. Noen rapporterer om nedsatt vekst ved svært lave konsentrasjoner (50µg/mL(52)) andre rapporterer om langt høyere konsentrasjoner (666µg/mL(53)) for å oppnå antimikrobiell effekt. Disse forskjellene forklares ved bruk av ulike typer media og ulik konsentrasjon av gjærceller(53, 54). Kumar *et.al.*(42) har vist at konsentrasjonen som er nødvendig for inhibering av *e.coli* ikke har en lineær sammenheng.

### 3.2.4 Kitosans mekanisme

Selve mekanismen for den antimikrobielle virkningen av kitosan har ikke blitt fullstendig belyst. Flere forslag for kitosans mekanisme ovenfor bakterier er blitt lagt fram. Vishu Kumar *et.al.*(41) har foreslått at kitosan kan binde seg til den negativt ladde overflaten til bakterier og hindre opptak av næring eller at interaksjon med cellemembran kan gi økt permeabilitet og en utfluks av intracellulære komponenter

(Figur 3.2.2). Det er også blitt lagt fram forslag om at kitosan med lav molekylvekt kan penetrere bakteriers cellemembran og hindre transkripsjon og mRNA syntese ved å binde seg til DNA(55). Det er også antydninger til at kitosan ved chelatering kan gjøre essensielle næringsstoffer i omgivelsene utilgjengelig(56).



Figur 3.2.2: En hypotetisk modell av mekanismen til KOS for *B. cereus* og *E. coli*. For gram-positive *B. cereus* (venstre del av illustrasjon) kan kitosans tilknytning til cellemembranen føre til økt permeabilitet og lekkasje av cytoplasmisk innhold. For gram-negative *E. coli* (høyre del av illustrasjon) kan kitosans tilknytning til lipopolysakkarider blokkere næring fra å komme inn i cellen (hentet fra (41)).

Den antifungale mekanismen til kitosan er heller ikke fullstendig belyst. Kulikov *et.al.*(35) mener mekanismen for oligokitosaner (KOS) er forskjellig for bakterier og

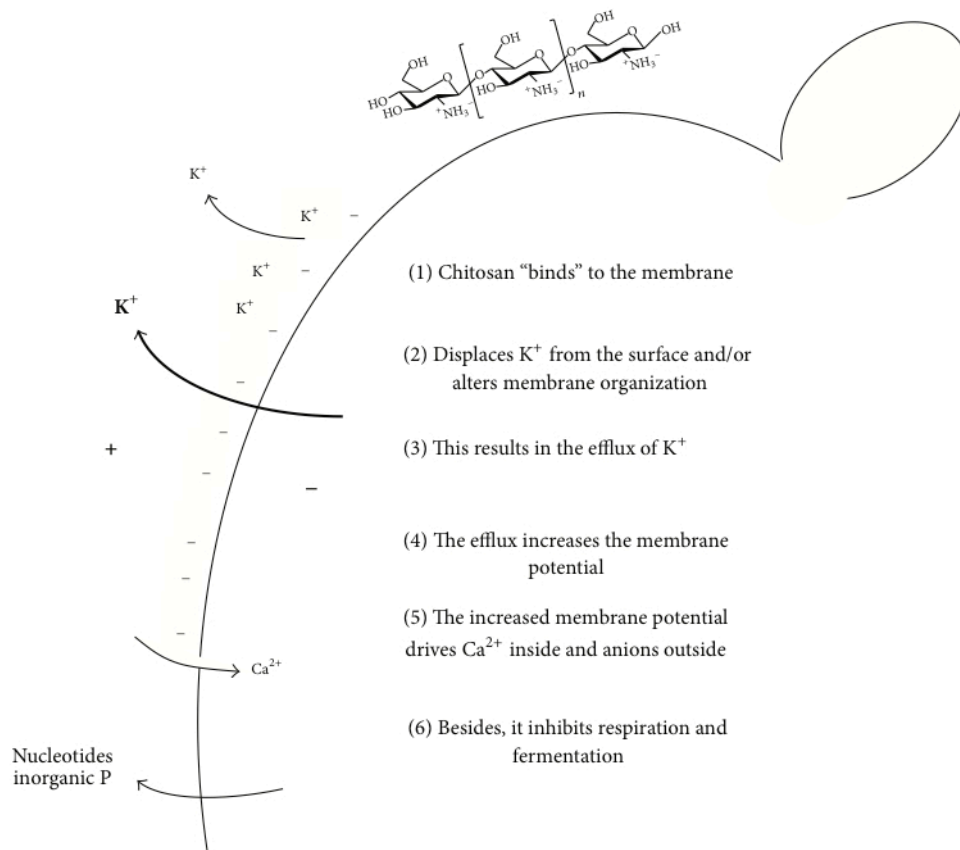
*Candida albicans* (en patogen gjærsopp). De trekker fram at forskjell i overflateladning samt adhesiner og septiner kan være grunnlaget for en annen mekanisme, men at ytterligere studier er nødvendig å gjennomføre for å belyse mekanismen for gjær. Denne påstanden gjenspeiles i de varierende rapporterte antimikrobielle aktivitetene til kitosan på ulike arter fra soppriket(50).

For å få klarhet i mekanismen til kitosan for gjærceller har genetiske analyser av gjær under påvirkning av kitosan blitt gjennomført. To av de genetiske studiene som er funnet har vist at mange av genene til *S. cerevisiae* som blir påvirket av kitosan er tilknyttet både cellen og celleomslutningen. Studiene viser klare fellestrekk i registrerte endringer av en del biologiske prosesser. Celleveggsorganisering, ATP-produksjon og oksidativ fosforylering ble oppregulert, mens ribosombiogenese og polyfosfat metabolsk prosess var blant de nedregulerte. Det blir bemerket en mulighet for at kitosan kan ha flere mål, men de to studiene trekker fram plasmamembranen som et mulig hovedmål i *S. cerevisiae*(6, 52).

En av de genetiske studiene har registrert transkripsjonsendringene over tid etter tilsats av kitosan. De første gengruppene som ble oppregulert ble funnet til å være knyttet til plasmamembranen. Disse genene kodet enten for proteiner i endoplastisk retikulum som er involvert i biogenese av membranproteiner eller for integrale membranproteiner som har minst en transmembranstruktur(52).

Fysiologiske studier viser ytterligere indikasjoner på plasmamembranen som et viktig mål for kitosan. Flowcytometriregistrering av DNA-bindene propidiumjodid på innsiden av celler og registrering av UV-absorberende forbindelser i supernatanten fra cellekulturen etter tilsats av kitosan har vist at plasmamembranen til gjær blir skadet(35, 52) og fører til utstrømning av molekyler(52, 53). Mutasjon i gener for endocytose, som blant annet er viktig for resirkulering av plasmamembranekomponenter, har gjort *S. cerevisiae* hypersensitivt for kitosan(57). Et konkret eksempel på hvordan kitosan påvirker plasmamembranen ble illustrert i en studie av Palma *et.al.*(58) Der ble det vist, ved bruk av en kunstig membran, at kitosan kan binde til negativt ladde fosfolipider som endrer fluiditeten til membranen og gir økt membranpermeabilitet.

Et forslag på den antifungale mekanismen til kitosan, ble lagt fram i en studie av Pena *et.al.*(53)(Figur 3.2.3). Som følge av observasjonene som ble gjort i studien ble det foreslått at kitosans assosiering til plasmamembranens overflate fører til en økning av membranpotensialet på grunn av dissosiering av  $K^+$ -ioner med følgene utstrømning av kationet fra cellen. Polariseringen av plasmamembranen fører deretter til at  $Ca^{2+}$  strømmer inn i cellen samtidig som negativt ladde molekyler, som nukleotider og fosfat, strømmer ut. I tillegg inhiberes fermentering og respirasjon.



Figur 3.2.3: Illustrasjon av foreslått antifungal mekanisme for kitosan. (1) Kitosan binder til membranen, og (2) fortrenger  $K^+$  fra overflaten og/eller endrer membranorganisasjonen. (3) Dette fører til en utstrømning av  $K^+$ . (4) Utstrømningen øker membranpotensialet. (5) Denne økningen driver  $Ca^{2+}$  inn og anioner ut av cellen. (6) I tillegg inhiberes respirasjon og fermentering (hentet fra (53))



## 4 Aktuell forskning

### 4.1 Celleveggpåvirkninger

#### 4.1.1 Celleveggenes elastisitet under normale forhold

Det publiseres stadig flere artikler som tar for seg elastisiteten til celleveggen til *S. cerevisiae*. Målinger utført ved AFM har til nå gitt en Youngs modulus på 0,15-1,62MPa for celleveggenes elastisitet(59-65). Elastisiteten i knoppskytingsarr er vist til å gi en høyere Youngs modulus fra 2,0-6,1 MPa(63, 65). Knoppskytingsarrs større stivhet blir begrunnet ved høyere andel kitin i knoppskytingsarr(63). Den store forskjellen i verdiene for knoppskytingsarrs elastisitet blir bemerket av Lanero *et.al.*(65) kan komme av ulike metoder benyttet som ulikt media og gjærlinje. Bui *et.al.*(64) bemerker videre at Touhami *et.al.*(63) har brukt et feil uttrykk i utregningene av Youngs modulus.

Det er i litteraturen benyttet to metoder for å måle elastisiteten til celleveggen til *S. cerevisiae*. Den andre metoden som blir benyttet er micromanipulering. I mikromanipulering blir gjærcellene plassert mellom to plater som presses mot hverandre ofte til gjærcellene sprekker(66). Ved denne bruk av denne metoden er celleveggenes elastisitet funnet til å være 100-200 MPa(67, 68). Resultatene fra de ulike metodene er derfor vanskelig å sammenligne. For leser kan det være av interesse at Mercade, Thomas og Zhang(69) har utformet en bedre modell for utregning av Youngs modulus for begge disse metodene. Dobbeltlagmodellen som de har utformet baserer seg på en bedre approksimering av en gjærcelle, der celleveggen representeres som to lag. Dette skal gi et bedre representasjon av elastisiteten. Det presiseres også at AFM og mikromanipulering er to komplementære metoder som gir informasjon om elastisiteten til henholdsvis det ytre laget med mannoproteiner og den totale celleveggenes stivhet. Dette var også noe Lanero *et.al.*(65) bemerket måtte være tilfellet ved observasjon av de ulike resultatene oppnådd med de ulike metodene. Dobbeltlagmodellen har derimot ikke blitt benyttet for utregningene i denne oppgaven.

#### 4.1.2 Endringer i celleveggenes elastisitet ved ulike typer påvirkninger

Det er funnet få studier om ser på ulike substansers påvirkninger av elastisiteten til celleveggen. Schiavone *et.al.*(59) har sett på hvordan etanol påvirker elastisiteten til celleveggen. Det ble i studien vist at etanol gjør gjærcellens cellevegg mer elastisk. Dette uten at det ble observert en signifikant endring av komposisjonen av celleveggskomponentene. Foruten denne studien har det blitt undersøkt hvordan elastisiteten ble endret ved å behandle celleveggen med 4 lag polyelektrolytt. Resultatet viste en økning i stivhet(65). *C.albicans* har blitt undersøkt for hyperosmotiske påvirkninger. Det ble ikke målt elastisitet til celler under hyperosmotisk sjokk, men ble det funnet at en mutant uten gener for enzymer som fasiliterer binding mellom de ulike komponentene av celleveggen ble mer elastisk i forhold til villtypen(27).

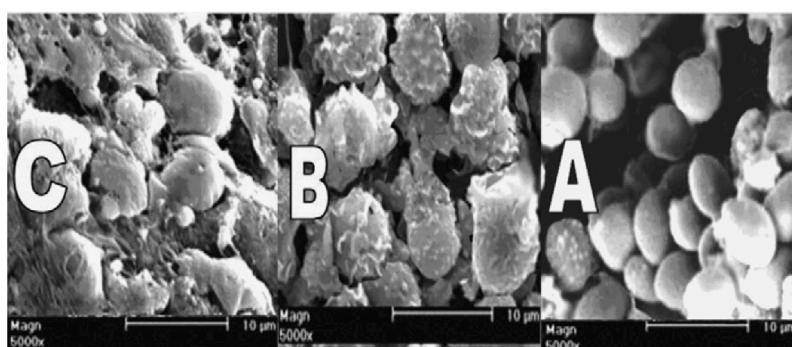
#### 4.1.3 Kitosans påvirkninger av celleveggen til gjær

Som beskrevet tidligere er det flere studier som belyser kitosans påvirkning av plasmamembranen. Studier som tar for seg hvordan kitosan påvirker elastisiteten til celleveggen til *S. cerevisiae* er det derimot færre av.

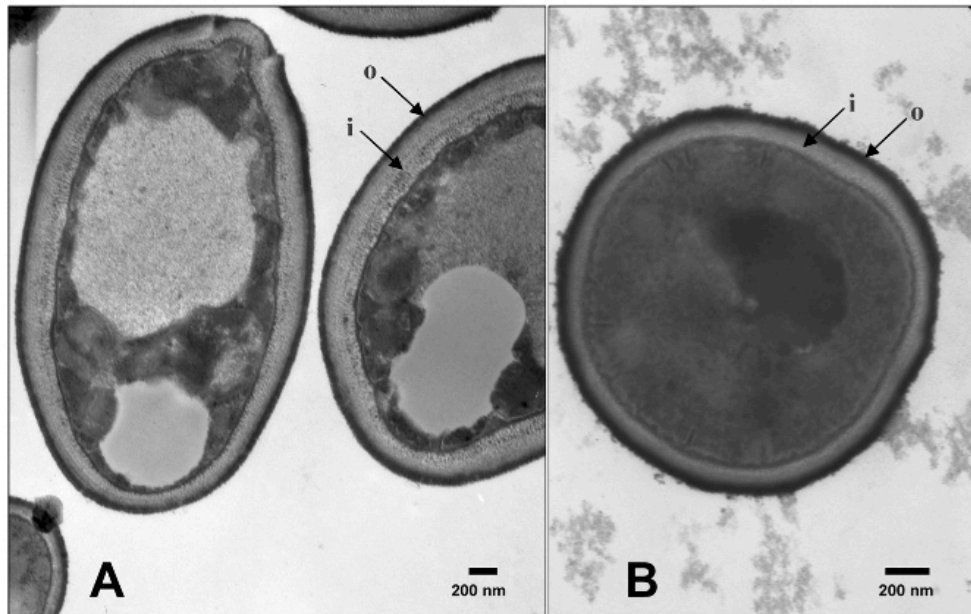
Ut fra genetiske analyser om påvirkningene av kitosan på *S. cerevisiae* er det kommet fram at gener som påvirker integriteten til celleveggen blir aktivert ved nærvær av kitosan(6, 52). Dette inkluderer gener for celleveggsbiogenese, -vedlikehold og -remodelering(52). Fysiologiske undersøkelser av celleveggenes påvirkninger av kitosan ble utført på grunnlag av en av de genetiske analysene. Det ble da funnet at *S. cerevisiae* ble mer motstandsdyktig mot  $\beta$ -1,3-glukanase under påvirkning av kitosan. Det ble foreslått at motstandsdyktigheten for  $\beta$ -1,3-glukanase kan ha økt på grunn av integrering av kitin i celleveggen og/eller økning av proteiner i det ytre laget slik at glukane skjermes for enzymet. Dette stemte overens med deres observasjoner at gener for kitinbiogenese, *CHS1* og *CHS3*, og celleveggsproteiner, *CWP1* og *PIR3*, ble induisert av kitosan.

Om en ser til andre gjær kan det finnes flere observasjoner om kitosans påvirkning på gjærcellers cellevegg. Behandling av *C. albicans* med MIK av kitosan over lengre tid er for eksempel vist til å gi destruktive krefter på celleveggen. De destruktive kreftene

innebar svelling og andre alvorlige endringer. Etter et døgn er det blitt vist omfattende lysering av celleveggen (Figur 4.1.1)(70) og frigjøring av intracellulære komponenter(35). Selv *C. albicans* behandlet ved sub-MIK er blitt vist til å få endringer i celleveggen. Det indre celleveggslaget ble tynnere og det ytre laget var mer svellet (Figur 4.1.2 B) sammenlignet med ubehandlede celler (Figur 4.1.2 A)(35). Samtidig er det i et studie utført med *C. albicans* og *S. cerevisiae* er det blitt vist at en større ødeleggelse av plasmamembranen på grunn av behandling med kitosan kun fører til en strøm av små molekyler, men ikke proteiner ut gjennom celleveggen. Denne studien observerte endringene riktignok over en langt kortere tidsperiode(53).



Figur 4.1.1 Skanning elektron mikrografi (SEM) av *C.albicans* tatt ved ulike tidspunkt etter behandling av MIK av kitosan. Ubehandlet kontroll (A), 6 timer etter behandling (B), og 24 timer etter behandling (C). (hentet fra (70))



Figur 4.1.2 Transmisjonselektronmikroskopi (TEM) av *C.albicans* før (A) og etter (B) behandling med  $\frac{1}{4}$  MIK av kitosan. o – ytre lag av cellevegg, i – indre lag av cellevegg (hentet fra(35))

#### 4.2 Immobilisering av celler på glassoverflater

Bruk av AFM for målinger av elastisitet krever visse betingelser for å oppnå gode resultater. Et viktig kriterium er at gjærcellene immobiliseres til en overflate. Tidligere studier har ofte benyttet seg av filterpapir for å gjøre dette. Gjærcellene har blitt filtrert gjennom filterpapir og blitt fanget i porene som ble valgt til å ha en tilnærmet lik størrelse som diameteren til gjærcellen, omlag  $5\mu\text{m}$ (61-65). Det er nylig blitt konstruert en ny metode for å immobilisere gjærceller. Den tar i bruk polydimetylsiloksan (PDMS) stempler som har et konstruert nettverk av kvadratiske brønner med ønsket dybde og diameter (for gjær  $2,1\mu\text{m}$  dybde og  $5\mu\text{m}$  bredde). Etter aktivering av PDMS-stemplerne med enten en ultrafiolett-ozon (UV- $\text{O}_3$ ) behandling eller biofunksjonalisert med lektinet concanavalin A, kan gjærcellene tilføres ved bruk av konvektiv kapillær avsetning(60).

I studier der andre typer mikroorganismer er blitt studert har det blitt benyttet en rekke andre metoder for immobilisering. Flere av disse metodene baserer seg på fiksering av mikroorganismene på en flat overflate. For eksempel har glassoverflater blitt behandlet med kjemikalier som enten gir grunnlag for elektrostatiske interaksjoner(71, 72), kovalente bindinger med mikroorganismen eller har en mer

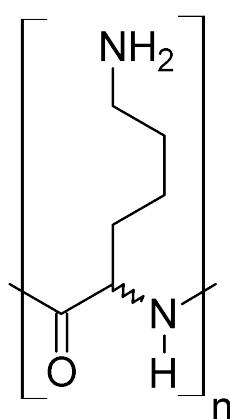
kompleks sammensetning som gir grunnlag for å danne en klebrig overflate(72). En annen enkel metode går ut på å immobilisere mikroorganismer ved lufttørring på en glassoverflate(73). Agar har i tillegg blitt benyttet for å immobilisere mikroorganismene i en gel(74).

Utviklingen av bakterielle matriser(75) på en flat glassoverflate som kan brukes for en rekke ulike eksperimenter behøver også behandling av anti-klebende substanser. For dette er det blant annet benyttet BSA eller polyetylenglykol.

#### 4.2.1 Poly-L-lysin

En av de mest vanlige metodene som blir brukt for immobilisering av mikroorganismer er ved utnyttelse av de elektrostatiske interaksjoner som oppstår mellom mikroorganismen og en overflate som blir dekket av en positivt ladd substans. Et av de positivt ladde substansene som ofte blir benyttet er poly-L-lysin (72).

Poly-L-lysin er en homopolymer bestående av lysinmonomerer. Lysin har to aminogrupeer som gir mulighet for polymerisering, en på  $\alpha$ - og en på  $\epsilon$ -karbonatomet. Poly-L-lysin deles derfor inn i  $\alpha$ -poly-L-lysin (PLL)(Figur 4.2.1) og  $\epsilon$ -poly-L-lysin (EPL) etter hvilken aminogruppe som er blitt benyttet i polymeriseringen.



Figur 4.2.1: Strukturen til  $\alpha$ -poly-L-lysin

Både EPL og PLL har antimikrobielle egenskaper. EPL viser lavere minimum inhiberingskonsentrasjoner (MIK) enn PLL for en rekke ulike bakterier. Ovenfor

gjærsopp og andre fungi har EPL MIK-verdier som 16-30 ganger større enn MIK-verdiene for bakterier(76). EPL blir derfor benyttet som et naturlig antimikrobielt middel i matvarer, mens PLL blir brukt som immobiliseringsmiddel.

Poly-L-lysin har en  $pK_a$  verdi på 9-11(77-79). Dette gjør at PLL er kationisk i sure og nøytrale løsninger der aminogruppene protoneres(80). Ut fra elektrostatikken vil det kunne skje elektrostatiske interaksjoner mellom to substanser når IEP til substratet er lavere enn  $pK_a$  til substansen. Dette danner grunnlaget for adsorpsjon av PLL til en overflate. Den lokale heterogeniteten i overflateladning til substratet kan derimot bidra med adsorpsjon ved normalt ugunstige betingelser for elektrostatiske interaksjoner. Ved lav pH blir det registrert dårligere adsorpsjon av PLL som gir et mindre homogent lag av PLL på overflaten(81).

PLL er vist til å kunne adsorberes til både glassoverflater, metaller, polymerer og metalloksider. Denne adsorpsjon av PLL til en overflate foregår i 2 faser. I den første fasen øker konsentrasjonen til PLL-laget raskt. Konsentrasjonsøkningen er tilnærmet lineær inntil en kritisk konsentrasjon i laget oppnås. Fra den kritiske konsentrasjonen går adsorberingen inn i en bremsende fase helt til metning av laget med PLL oppnås(81).

Den positive ladningen legger også grunnlag for immobilisering av celler ved hjelp av en PLL-funksjonalisert overflate. Mikroorganismer og celler har anionsk cellemembran eller cellevegg. Disse kan derfor immobiliseres på overflater som er dekket med PLL ved hjelp av elektrostatiske interaksjoner(82).

En nylig studie har sett på hvordan den antimikrobielle effekten av PLL påvirker levedyktigheten til *E.coli* når PLL brukes for å immobilisere *E.coli* til en overflate. Studien viste at *E.coli* ble påvirket av PLL-laget. Hvor stor den antimikrobielle effekten var kom an på hvor tykt PLL-laget var og i hvilken væske substratet med *E.coli* var omgitt av. Om ione-fritt vann ble benyttet i stedet for buffer ble det en betraktelig større effekt av PLL-laget som ga en raskere inhibering av celledeling. Ved bruk av PLL hydrobromid ble også registrert en større antimikrobiell effekt, men langt mindre økning enn ved benyttelse av ione-fritt vann. Et tynt dekke med PLL ga en vesentlig mindre effekt på *E.coli*(83).

## 5 Teori for anvendt apparatur

### 5.1 Optisk tetthet

Bestemmelse av optisk tetthet til en løsning blir i mikrobiologi ofte benyttet som et mål for konsentrasjonen av celler i en løsning. Prinsippet for måling av optisk tetthet er at monokromatisk lys blir sendt gjennom en løsning av celler og andre partikler og blir dempet slik at intensiteten blir lavere enn det opprinnelige lyset. Forskjellen i intensitet mellom det opprinnelige lyset fra lyskilden og lyset som passerer en løsning med celler kommer av celler og andre partikler har mulighet til å spre og absorbere lys. Celler er ofte gjennomsiktige, derfor reflekterer intensitetsforskjellen spredningen av lyset og i liten grad absorbans av lys til cellene. Optisk tetthet gir dermed en beskrivelse av turbiditeten til løsningen og gir derfor en indikasjon på konsentrasjonen av celler i løsning. Ved lave konsentrasjoner vil det være en enkel sammenheng mellom lyset som passerer cellene uten å spres og konsentrasjonen av celler. Lys som gjennomtrenger celler uten å spres minker eksponentielt ved en økning av celler i løsning. Optisk tetthet er derfor gitt ved:

$$OD = -\log(I/I_0) \quad (\text{Funksjon 1})$$

Der OD er en positiv verdi som øker med økt konsentrasjon av partikler i løsning, I er intensiteten av lyset som har passert løsningen uten spredning og  $I_0$  er intensiteten til det opprinnelige lyset før passering av løsningen(84).

Beer-Lamberts lov (Funksjon 2) gir en sammenheng mellom OD og konsentrasjonen, C, av celler i løsningen. Loven beskriver sammenhengen som en lineær proporsjonalitet der stigningen kommer an på lengden av kyvetten, L, og den molare absorptiviteten,  $\epsilon$ , som er karakteristisk for partiklene som blir bestemt.

$$OD = \epsilon LC \quad (\text{Funksjon 2})$$

Ved høyere konsentrasjon av celler vil den oppgitte optiske tettheten bli lavere enn forventet for en slik sammenheng. Dette kommer blant annet av at lys som spres av en celle kan treffe en annen celle og dermed komme tilbake i banen med det udiffrakterte lyset. Verdien for blir derfor lavere en den teoretiske verdien. Det er derfor vanlig å fortynne løsninger som gir en optisk densitet ved 1. Før målingen gjennomføres

kalibreres instrumentet ved å måle den optiske tettheten til løsningen som cellene er suspendert i, men uten cellene. Slik sørges det for at løsningens optiske tetthet ikke blir inkludert ved måling av den optiske tettheten til de suspenderte cellene(84).

## 5.2 Lysmikroskopi

Lysmikroskopi blir ofte brukt til å studere levende celler. Celler er ofte gjennomsiktige noe som gjør det vanskelig å observere dem under mikroskopet med vanlig lysmikroskopi. Derfor blir det ofte benyttet justeringer på mikroskopet for å gi bedre kontrast for observasjon av cellene. For å gi best mulig resultat for alle de forskjellige mikroskopimetodene blir mikroskopet innstilt i henhold til Köhlers prinsipp for belysning(85).

Et mikroskop er bygget opp av en lyskilde, en kondensator som fokuserer lyset mot prøven og to linser som samler lyset og forstørrer bildet av prøven. Köhlers belyningsprinsipp sørger for en jevn belysning av prøven samtidig som lyskilden ikke blir synlig i bildet. Dette er mulig ved å benytte noen flere optiske elementer som til sammen danner to konjugerte bildeplan, der det ene er bildeplanet til lyskilden, blenderplanet, mens det andre er bildeplanet til prøven, feltplanet. De optiske elementene som behøves er kollektorlinse, felt diafragma, kondenser diafragma (aperturblender) og kondenserlinse. Prinsippene som tilfredsstilles ved å innstille et mikroskop i henhold til Köhlers belyningsprinsipp er at:

- parallelt lys fra lyskilden treffer prøven gjennom det samme punktet
- lysstråler fra samme punkt i lyskilden går parallelt gjennom prøven.

Dette utføres i praksis ved å justere feltdiafragma slik at den avgrenser det belyste feltet til det område som mikroskopet viser av prøven og justere aperturblender slik at den er plassert i kondenserens fokalplan og bidrar med å kontrollere oppløsningen til prøven(85).

Oppløsningen som kan oppnås med et mikroskop kommer an på lyskildens bølgelengde,  $\lambda$ , og numerisk apertur, NA, til objektivet gitt av

$$d = 0,61 \frac{\lambda}{NA} \quad (\text{Funksjon 3})$$



der  $d$  er minste avstanden man kan skjelve mellom to punkter og 0,61 er en konstant bestemt av Besselfunksjonen som gjenspeiler et system med emitterende objekt og et linsesystem med sirkulære blendere. Numerisk apertur er gitt av brytningsindeksen,  $n$ , av mediet mellom prøven og objektivet og den største innfallsvinkelen på lyset som går inn i objektivet:

$$NA = n \sin \theta \quad (\text{Funksjon 4})$$

Oppløsningen begrenser muligheten for å forstørre bildet av prøven. Om bildet allikevel forstørres ytterligere vil det være en tom forstørrelse uten bedre oppløsning(85).

### 5.2.1 Fasekontrast

Når lys passerer gjennomsiktige celler vil en del av lyset bli absorbert eller spredd av cellen. Dette skyldes at cellens ulike komponenter har forskjellig brytningsindeks som fører til ulik diffraksjon av lys som passerer cellen. Det diffrakterte lyset får også en liten endring i fasen. I vanlig lysmikroskopi vil som regel interferensen mellom det diffrakterte lyset og det lyset som ikke blir avvøyd av preparatet (det udiffrakterte lyset) ikke være tilstrekkelig for å gi en kontrastforskjell. Strukturen forblir derfor usynlig(85).

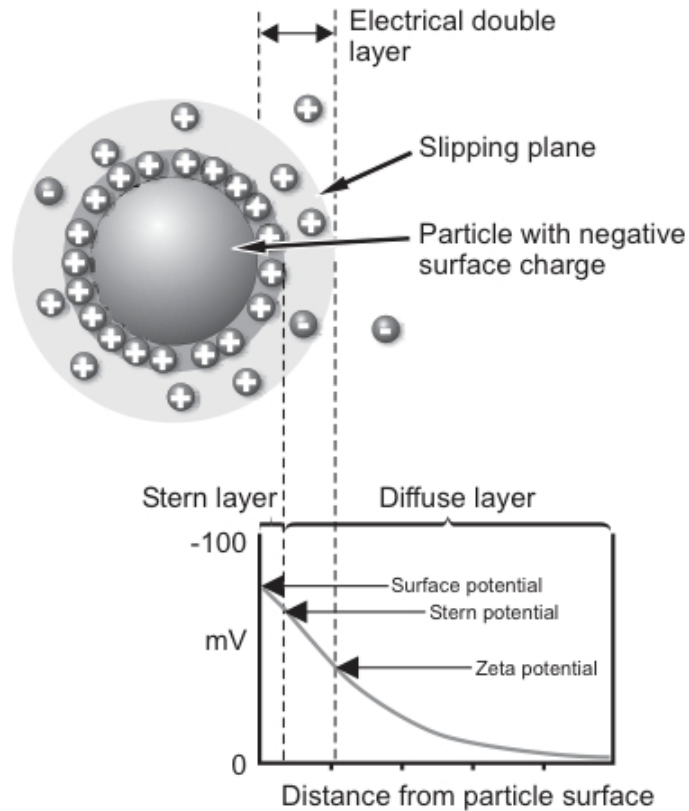
I fasekontrastmikroskopi utnyttes faseforskyvningen til det diffrakterte lyset. Denne faseforskyvningen gir konstruktiv eller destruktiv interferens på ca  $\frac{1}{4}$  bølgelengde i forhold til det udiffrakterte lyset. Om det udiffrakterte lyset endres med  $\frac{1}{4}$  bølgelengde i tillegg, vil det oppstå ytterligere interferens som blir konvertert til intensitetsforskjell, altså kontrast. For at å oppnå en slik behandling av det udiffrakterte lyset blir aperturblanderer byttet ut med en ringformet diafragma i tillegg til at det settes inn en ringformet modulator i bakre fokalplan til objektivlinsen. Modulatorens ringformede område demper og faseforskyver det udiffrakterte lyset for å skape interferens med lyset som er blitt faseforskjøvet av cellen(85).

### 5.2.2 Kvantitativ fasekontrast

Ved kvantitativ fasekontrast blir både registrering av et fasekontrastbilde og en kvantifisering av faseforskyvningen registrert av en digital sensor. Den kvantifiserte faseforskyvningen kan dermed gi informasjon om høyden til det som studeres(86).

### 5.3 Zetapotensial

Når en ladd partikkel er i en løsning vil ionene av motsatt ladning i nærheten av partikkelen bli påvirket av partikkelens ladning. Motionene vil tilknyttes partikkelen slik at den lokale konsentrasjonen av motionene blir høyere enn i resten av løsningen. Det dannes et elektrisk dobbeltlag rundt partikkelen (Figur 5.3.1). Det elektriske dobbeltlaget er delt i et indre og et ytre lag. I det innerste laget, kalt akterlaget (Stern layer), er ionene bundet tett til overflaten av partikkelen, mens i det ytterste laget er ionene mer løst assosiert med partikkelen. Om partikkelen beveger seg gjennom løsningen oppstår det en klar grense på det ytre laget der motionene på innsiden av grensen beveger seg sammen med partikkelen, mens motionene på utsiden ikke assosierer seg med partikkelen. Zetapotensialet er potensialet som er på grensen mellom det ytterste laget og omgivelsene der ionene i løsningen ikke assosierer seg med partikkelen når den forflytter seg(87).



Figur 5.3.1: Modell av det dobbelte elektriske laget rundt en partikkel med tilhørende grafisk fremstilling av elektrisk potensial som funksjon av avstanden fra partikkelen. (hentet fra (87))

### 5.3.1 Elektroforetisk mobilitet

Når det påføres et elektrisk felt til en suspensjon med ladde partikler vil partiklene bevege seg mot elektroden med motsatt ladning. Partiklene oppnår dermed en hastighet, kalt elektroforetisk mobilitet, som kan benyttes til å finne zetapotensialet ved hjelp av Henrys formel:

$$U_E = \frac{2\varepsilon z f(ka)}{3\eta} \quad (\text{Funksjon 5})$$

der  $U_E$  er den elektroforetiske mobiliteten,  $\varepsilon$  er den dielektriske konstanten til mediumet,  $z$  er zetapotensialet,  $f(ka)$  er Henrys funksjon og  $\eta$  er viskositeten til mediumet. Henrys funksjon blir approksimert med enten 1 eller 1,5 avhengig av hva slags system som studeres. Ved zetapotensialbestemmelse i vandig media, der saltkonsentrasjonen er mer enn  $10^{-3}$  molar og partiklene større enn  $0,2 \mu\text{m}$  blir 1,5

benyttet. Denne approksimasjonen kalles Smoluchowski-approksimasjonen. Huckelapproksimasjonen med  $f(ka) = 1$  benyttes for små partikler i løsning med lav dielektrisk konstant. Ved å benytte en av approksimasjonene kan zetapotensialet enkelt regnes ut etter å ha målt den elektroforetiske mobiliteten til partiklene i løsningen(87).

### 5.3.2 Laser Doppler Velosimetri

For å måle hastigheten til partikler som beveger seg i eller med en væske blir Laser Doppler Velosimetri (LDV) brukt. Prinsippet går ut på at en laserstråle treffer partiklene og bøyes av. Disse avbøyningene blir registrert av en detektor som sammen med referanselyset danner en intensitetskurve. Ut fra frekvensen til avbøyningene gjenspeilet i en fluktuerende økning i intensitet kan hastigheten til partiklene beregnes(87).

I en celle der den elektroforetiske mobiliteten til partikler i løsning skal beregnes er det ikke bare det elektriske feltet, viskositeten, dielektrisk konstant og zetapotensial som har innvirkning på hastigheten. Veggene til cellen har en overflateladning. Denne statiske ladningen vil påvirke partiklene som beveger seg forbi. Dette kalles elektroosmotisk effekt. I et lukket system vil den elektroosmotiske effekten gi et ekstra tillegg til den elektroforetiske mobiliteten ved en strømning langs kanten av veggene og et tilsvarende tillegg av en strømning i motsatt retning i midten av cellen mellom veggene. Disse motgående strømmene vil skape et punkt i cellen der netto elektroosmotisk effekt er null. I dette punktet, kalt det stasjonære laget, er det derfor mulig å måle den elektroforetiske mobiliteten ved hjelp av LDV(87).

Det er blitt utformet en metode for å kunne måle den elektroforetiske mobiliteten hvor som helst i cellen, altså uten at elektroosmose gir en begrensning i målepunkt. Denne metoden er utviklet av Malvern Instruments (MI) og blir benyttet i deres Zetasizer. Metoden går ut på å benytte to forskjellige målinger av zetapotensial. Ved vanlig LDV blir det elektriske feltet benyttet for målingen reversert periodisk. Dette er en sakte feltreversering (SFR, Slow Field Reversal) der reverseringen skjer etter ca 1 sekund for å la væsken stabilisere seg. Dette blir gjort for å redusere polariseringen av elektrodene, men er nødvendig å måle i det stasjonære laget for å unngå elektroosmotisk effekt. MI benytter seg i tillegg til SFR en rask feltreversering (FFR,

Fast Field Reversal). FFR måler zetapotensialet ved en raskere reversering noe som gjør at den elektroosmotiske effekten ikke blir signifikant for målingen. Det blir dermed oppnådd en korrekt gjennomsnittlig verdi av zetapotensialet, men gir ikke noe godt estimat av fordelingen av zetapotensialet til partiklene. SFR gir derimot en bedre oppløsning, men siden Zetasizeren utfører begge målingene i midten av cellen vil zetapotensialet fra SFR være forskjøvet på grunn av elektroosmotisk effekt. De to målingene gir mulighet for å beregne bidraget fra den elektroosmotiske strømmingen slik at SFR kan normaliseres og zetapotensialet til cellens vegg kan kalkuleres(87).

Kombinert med denne metoden benytter MI fase analyse lyssprednings (PALS) teknikk for å måle mobiliteten til partikkelen. I stedet for å registrere avbøyningen er det altså faseskiftet som oppstår når en partikkel passerer lysstrålen som blir målt og sammenlignet med en referanselysstråle. Den elektroforetiske mobiliteten blir målt i FFR. PALS gir en mer korrekt måling av elektroforetisk mobilitet, siden registrering av faseskifter er mer sensitiv for mobilitet enn det LDV er(87).

## 5.4 Atomær kraftmikroskopi

Atomær kraftmikroskopi (AFM) kan bli brukt som avbildningsverktøy der registrering av ulike krefter danner basis for konstruksjon av et bilde(88).

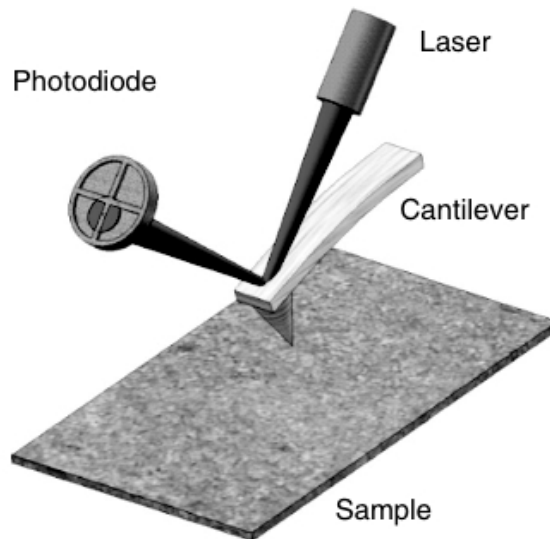
Kraftmålingene gjør det mulig å registrere annen informasjon om de mekaniske egenskapene til for eksempel polymerer og celler(88, 89).

### 5.4.1 Prinsipp for AFM spektroskopi

Det er utviklet forskjellige metoder for hvordan kraften kan bli registrert ved AFM. Elektrontunnelering, kapasitans, piezoelektrisk cantilever og optisk avbøyning er noen av metodene som er blitt utformet for å registrere kraften. For prøver som blir utført i væske er det vanlig å ta i bruk optisk avbøyning ved bruk av laser, såkalt laserstråleavbøyning(89).

Prinsippet for laserstråleavbøyning går ut på at en laser reflekteres på en fleksibel utkragnende fjær (cantilever) og registreres på en fotodiode (Figur 5.4.1). Fotodioden er en halvleder som konverterer lys om til elektrisk spenning. Når laseren reflekteres til fotodioden registreres en spenning. Rettes laseren mot den utkrangende fjær som bøyer seg ved kontakt og indentering med en overflate vil laserens indukere en

spenning et annet sted på fotodioden enn normalt. Endringen i hvor spenningen treffer registreres enten som en økning eller nedgang i spenning. Spenningen sier derfor noe om avbøyningen til fjæren og dermed stivheten til det som indenteres(89).



Figur 5.4.1: Illustrasjon av oppsettet til AFM der en laser reflekteres på av fjær og rettes mot en fotodiode som registrerer en spenning. Når fjæren bøyes ved kontakt med prøven reflekterer laserens på et annet punkt på fotodioden. (hentet fra (89))

For prøver i væske vil små bølger i gass-væske-grensesnittet gjøre at laserstrålen sperrer seg over et større areal på fotodioden som gir en mindre presis registrering av spenningen. Derfor blir det benyttet en tuppholder med en hard overflate i for eksempel glass som stikker ned i væsken og danner et fast stoff-væske-grensesnitt der de små bølgene unngås og signalet fra laserens blir mer stabilt(89).

#### 5.4.2 Kalibrering

Som allerede nevnt blir signalet fra laserens omgjort til et mål på elektrisk spenning. For å danne kraftkurver blir det derfor gjennomført en kalibrering av systemet før forsøkene settes i gang eller etterpå avhengig av hva som er best egnet for forsøket. Kalibreringen blir gjort ved å utføre en måling på en hard overflate slik at sensitiviteten og fjærkonstanten til den utkragnende fjæren kan bli bestemt(90).

Sensiviteten til fjæren blir funnet ved å registrere sammenhengen mellom avstandsendingen og den tilsvarende endingen i elektrisk spenning der fjæren bøyer

av. Dette utføres ved å lage en spenningskurve der av indenteringsspissen presses mot en hard overflate som for eksempel en glassoverflate. Spenningskurven vil da få en lineær stigningskurve der sammenhengen mellom avbøyningen og avstanden enkelt kan kalkuleres. Sensitiviteten er avhengig av hva slags fjær som benyttes og den optiske banen til laserstrålen. Fra gang til gang kan det være små endringer i den optiske banen til laserstrålen. Derfor er det nødvendig å utføre kalibrering av sensitiviteten hver gang fjæren monteres(90).

Det finnes flere metoder for å bestemme fjærkonstanten til den utkragnede fjæren. En av metodene kalles termisk støy metoden. Den tar utgangspunkt i fluktueringen som finnes i systemet og deres innvirkning på fjæren. Fluktueringene kan for eksempel være små partikler som diffunderer i en væske. Termisk fluktuering påvirker myke fjær. Disse fluktueringene kan registreres med AFM og fjærkonstanten kan derfor bestemmes ved å utforme et termiskstøyspektrum. I et termiskstøyspektrum vises fluktueringene av fjæren som funksjon av frekvensen. Fluktueringene som gir den høyeste frekvensen gjenspeiler fjærens resonansfrekvens. Ved å utføre en Lorentzfunksjonstilpasning av termiskeresonanskurven blir fjærkonstanten til fjæren funnet(90).

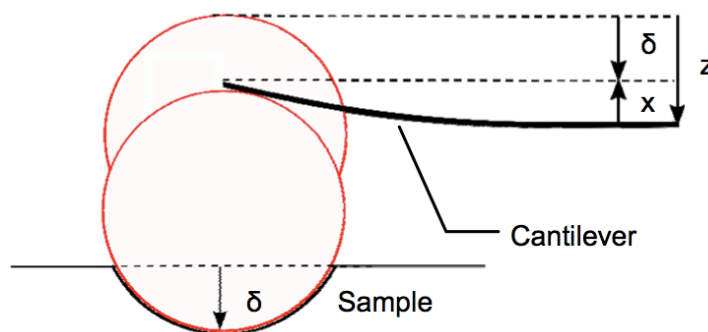
#### 5.4.3 Youngs modulus og Hertz-Sneddon modellen

Youngs modulus er et mål på elastisiteten til en prøve(88). Det vil si et mål på hvor stor resistans et materiale har for å bli deformert elastisk når en kraft påføres materialet. For å finne elastisiteten ut fra kraftmålingene gjort med AFM blir blant annet Hertz-Sneddon-modellen brukt(69).

Grunnprinsippene for Hertz-Sneddon-modellen er utviklet av Hertz(91) og senere utvidet av Sneddon for indentering av overflater med indenteringsspisser med konisk og sylindrisk geometri(92). I Hertz-Sneddon-modellen blir prøven approksimert som en isotropisk og lineær elastisk prøve. Videre approksimeres det at prøven opptar et uendelig utstruktet halvrom, noe som gjør at Hertz-Sneddon-modellen bare gyldig for små indenteringer på 5-10% av cellehøyden (100-500nm) slik at substratet ikke påvirker kalkuleringene. I tillegg til at indenteringsspissen ikke deformeres og det ikke finnes andre interaksjoner mellom prøven og indenteringsspissen(93). På grunn av approksimasjonene for prøven ikke samsvarer med systemet som utforskes ved

indentering av gjærceller er det blitt utformet en ny utregningsmetode, dobbeltlagmodellen, som allerede er blitt omtalt i Seksjon 4.1.1(69).

Kraftkurvene som blir registrert med AFM plottes kraften mot høyden,  $z$ . Denne høyden inkluderer den lengden der fjæren blir avbøyd,  $x$ , sammen med lengden der indenteringsspiessen går inn i prøven,  $\delta$ . I Hertz-Sneddon-modellen er det kun dybden som indenteringsspiessen går inn i prøven som blir benyttet for beregning av Youngs modulus. Før Hertz modulus kan benyttes er det derfor nødvendig å trekke høyden der fjæren avbøyes fra høyden for hele fjærens forflytning (Figur 5.4.2) (93).



Figur 5.4.2: Illustrasjon av utkragnende fjær med sfærisk indenteringsspiess som danner en forsenkning i en prøve. Lengden  $z$ , er hele forflytningen av fjæren,  $x$  er den lengden der fjæren avbøyes og  $\delta$  tilsvarer dybden på forsenkningen som indenteringsspiessen danner i prøven. (hentet fra (93))

For å bruke Hertz-Sneddon-modellen er det nødvendig å beskrive enkelte parametere til indenteringsspiess og prøve. Poissonsforholdet,  $\nu$ , brukes for å beskrive prøven. For mykt biologisk materiale settes denne ofte til 0,5. Geometrien til indenteringsspiessen bestemmer hvilken funksjonen som blir benyttet i Hertz-Sneddon-beregning av Youngs modulus. For en kjegleformet indenteringsspiess blir følgende formel benyttet:

$$F = \frac{E}{1-\nu^2} \frac{2 \tan \alpha}{\pi} \delta \quad (\text{Funksjon 6})$$

der  $\nu$  er Poissonsforholdet,  $\alpha$  er halvkjeglervinkelen,  $\delta$  er dybden som indenteringsspiessen går inn i prøven med og  $E$  er Youngs modulus(93).



## 6 Materialer og eksperimentell metode

### 6.1 Løsninger og kjemikalier

- 0,1% PLL løsning MW: 150 000 - 300 000 Da Sigma-Aldrich P8920 (utløpsdato: mars 2007)
- PLL-hydrobromid MW: 300 000 Da Sigma-Aldrich P1524
- PLL-hydroklorid MW: 15 000 - 30 000 Da Sigma-Aldrich P2658
- Bovint serumalbumin (BSA)
- Nitrogengass
- Gjærekstrakt
- Bakteriell pepton
- Glukose
- MQ-vann
- 10 mM 3-(N-Morfolino)propansulfonsyre(MOPS)-buffer ved pH 6,5 og 7
- 10 mM 4-(2-Hydroksyetyl)piperazine-1-etanesulfonsyre(HEPES)-buffer ved pH 6,5 og 7
- 66% deacetykert kitosan, ( $F_A = 0,34$ ) Intrinsik viskositet: 100 mL/g
- 94,4% deacetykert kitosan, ( $F_A = 0,056$ ) Intrinsik viskositet: 120 mL/g
- HCl for pH justeringer
- NaOH for pH justeringer
- Cetipur Bufferløsning potassium hydrogen ftalat pH 4,01
- Cetipur Bufferløsning potassium dihydrogen fosfat/dinatrium hydrogenfosfat pH 7,00

### 6.2 Instrumenter

- Analysevekt: Mettler Toledo MT5
- Radiometer analytical, MeterLab PHM210 standard pH meter
- Branson Ultrasonic cleaner 3510E-DTH
- Eppendorf Microcentrifuge 5415R

### 6.3 Utstyr

- Dekkglass VWR International 22x22mm Tykkelse nr. 1,5 borosilikatglass (Cat-No. 631-0125)
- Teip
- Objektivglass VWR Super Premium Microscope Slides, matt ende
- WillCo brønn

### 6.4 Eksperimentell metode

#### 6.4.1 Kultivering av gjærceller

En koloni gjærceller av gjærlinjen BY4741a ble kultivert i 25 mL gjærekstrakt pepton dekstrose (YPD) medium i inkubator med 250 rotasjoner per minutt ved 30°C.

YPD-medium ble laget ved å blande 10g/L gjærekstrakt, 20g/L bakteriell pepton og 20g/L glukose med destillert vann. Blandingen ble autoklavert ved 120°C i 20 min

#### 6.4.2 Bestemmelse av optisk tetthet

Optisk tetthet av gjærkultur ble målt ved 600 nm med Helios Epsilon fra Spectronic Unicam. Målingene av optisk tetthet ble benyttet for å fastsette gjærcellenes stabile fase etter det diauxiske skiftet og for å få en beskrivelse av konsentrasjonen av gjær i løsning ved undersøkelse av zetapotensialets konsentrasjonsavhengighet med tanke på gjærkonsentrasjonen. Fastsetting av gjærcellenes stabile fase ble utført ved å måle optisk tetthet til løsningen hver time, første gang etter 16 timers inkubasjon. Ved undersøkelse av zetapotensialets konsentrasjonsavhengighet ble det gjennomført en fortykning av gjærkulturen før optisk tetthet til alle løsningene benyttet i forsøket ble bestemt. Fortyningen og bestemmelse av optisk tetthet av gjærkulturen ble utført i YPD-media. Løsningene ble deretter sentrifugert i 5 min ved 4000 rpm før supernatanten ble erstattet med MOPS-buffer. Dette steget ble utført 2 ganger for å fjerne YPD-media fra løsningen og ble utført på samme tidspunkt for alle løsningene. Zetapotensialet ble deretter bestemt.

### 6.4.3 Bestemmelse av zetapotensial for gjærceller i ulike løsninger

For bestemmelse av zetapotensial ble Malvern Zetasizer Nano ZS benyttet. Denne hadde en MPT-2 Multifunksjonell titrator tilknyttet som ble tatt i bruk ved bestemmelse av zetapotensialet til gjærceller ved en økning i pH og konsentrasjon av NaCl.

Zetapotensialet ble målt for gjærceller i YPD-medium, MQ-vann, HEPES- og MOPS-buffer med pH på henholdsvis 6, 5 og 6,5 eller 7 for bufferne. Målinger ble utført i nærvær og fravær av kitosan. For prøvene i MQ-vann og buffer ble ca. 1-2 mL gjærkultur sentrifugert, vasket i ønsket væske 2 ganger før pelleten ble oppløst i 1mL av ønsket væske eller fortynnet ytterligere slik at en lett turbid løsning ble oppnådd. En lett turbid løsning ble benyttet for alle bestemmelser av zetapotensial med unntak av løsningene som ble benyttet for undersøkelse av zetapotensialets konsentrasjonsavhengighet med tanke på gjærkonsentrasjonen som beskrevet i Seksjon 6.4.2.

Ved benyttelse av den multifunksjonelle titratoren for bestemmelse av zetapotensialet til gjærceller ved en økning i pH og konsentrasjon av NaCl ble 10 mL med gjærceller suspendert i henholdsvis MQ-vann og MOPS-buffer ved pH 6,5 koblet til instrumentet. En magnetrører ble benyttet for at gjærcellene ikke sedimenterte under gjennomkjøringen av forsøkene. For bestemmelse av zetapotensialet til gjærceller ved en økning i pH ble HCl benyttet for innstilling av løsningens start pH på 3 før NaOH ble benyttet for justering av pH til 9 under gjennomkjøring av forsøket. Innstilling ble gjort for at måling av zetapotensial skulle gjennomføres ved en økning av pH på 0,5. For økning i NaCl-konsentrasjon ble det innstilt at målinger skulle utføres i et NaCl-konsentrasjonsintervall fra 0 M til 0,25 M med gjennomføring av målinger ved en økning i konsentrasjon av NaCl på 0,025 M. Måling av zetapotensialet til gjærceller ved tilstedeværelse av NaCl i løsning ble i tillegg utført uten bruk av den multifunksjonelle titratoren. 3 løsninger ble benyttet med gjærceller suspendert i MOPS-buffer ved pH 6,5 med en konsentrasjon av NaCl på 0,2M, 0,1M og 0,05M. I tillegg ble en kontroll der zetapotensialet til MOPS-buffer med NaCl-konsentrasjon på 0,2 M og pH 6,5 uten gjærceller ble målt.

Måling av zetapotensial ble utført ved tilsats av løsningene i en Malvern Brettet Kapillær Zetacelle DTS1070 med et volum på 1mL. Tre celler ble benyttet for målingene. Mellom målingene, eller måleseriene når den multifunksjonelle titratoren ble benyttet, ble den brukte cellen vasket med MQ-vann ca. 10 ganger. For hver prøve ble det utført en måleserie på minst 5 målinger av zetapotensial. Ytterligere målinger ble utført dersom det ble oppdaget uregelmessige målinger. Hver måling bestod av minst 10 gjennomkjøringer utført av Zetasizer.

I programvaren Zetasizer software ble ulike innstillingene valgt som dannet grunnlaget for programvarens beregning av zetapotensialet. Materialet ble satt til å være protein med brytningsindeks på 1,45 og absorbering på 0,001. Løsningen ble satt til å være vann med viskositet på 0,8872cP, brytningsindeks på 1,33 og dielektisk konstant på 78,5. Smoluchowski-approksimasjonen ble valgt med Henrys funksjon satt til 1,5.

#### 6.4.4 Immobilisering av gjærceller på glassoverflate

For å funksjonalisere en glassoverflate ble ønsket område på glasset dekket av ønsket løsning inneholdende kjemikalier som var antatt å fremme eller hindre immobilisering av gjærceller. Glassoverflaten ble deretter inkubert i romtemperatur på benk i 10-60 min. Løsningene som ble forsøkt benyttet bestod av 0,1% PLL, 0,1 mg/mL PLL-hydroklorid, 0,1 mg/mL PLL-hydrobromid og 0,1 mg/mL BSA. Etter endt inkubasjonstid ble løsningen fjernet med en pipette og glasset tørket ved hjelp av nitrogengass.

Preparering av prøver for bruk til undersøkelse av immobiliseringen av gjærceller til funksjonaliserte glassoverflater og nanoindentering av gjærceller ble utført med justeringer i prosedyren i løpet av arbeidet. Følgene er en gjennomgang av prosedyren sammen med forbedringene som ble gjort ved innføring av vaskeprosedyrer for å sikre immobilisering av gjærcellene.

2 mL gjærkultur ble sentrifugert i 5 min ved 4000 rpm. Supernatanten ble kastet og pelleten ble enten tilsatt 20-100 $\mu$ L YPD-media eller vasket ved å tilsette 1mL av ønsket buffer eller MQ-vann for så å sentrifugere gjærcellene på nytt.

Vaskeprosedyren ble utført 2 ganger. For gjærcellene som ble vasket ble 20-100 $\mu$ L MQ-vann, MOPS- eller HEPES-buffer tilsatt etter siste vaskeprosedyre. Den

konsentrerte gjærløsningen ble deretter påført glassoverflaten og inkubert på benk i romtemperatur i 10 min. Ufunksjonaliserte glassoverflater ble benyttet for kontroll. Etter inkubasjon ble glassoverflatene med den konsentrerte gjærløsningen enten benyttet videre for avbildning eller nanoindentering eller vasket for å fjerne ikke eller løst bundne gjærceller før prøven ble benyttet i videre forsøk. For objektivglass brukt til avbildning bestod vaskeprosedyren enten av en langsom bevegelse av glassoverflaten frem og tilbake i en skål med MQ-vann eller buffer eller en forsiktig påføring og fjerning av buffer ved hjelp av en pipette. Ved bruk av pipette for vaskingen ble objektivglasset forsiktig påført en liten mengde buffer med pipetten slik at vannet dekket cellene, men ikke fløt for mye over hele objektivglasset. For WillCo-brønner benyttet for nanoindentering ble 1-2 mL MOPS-buffer tilsatt ved hjelp av en pipette. Etter påføring av væske ved hjelp av pipette til enten objektivglass eller WillCo-brønn ble glassoverflaten rotert og vendt på slik at det ble dannet en svak strømning ved forflytning av vannet over gjærcellene. De løse gjærcellene ble på den måten avskilt og kunne fjernes ved hjelp av pipetten. Denne prosedyren ble gjentatt inntil det ikke kunne observeres løse gjærceller med øyet.

Det ble i tillegg undersøkt om eksponering av gjærcellene for kitosan ville føre til immobilisering på en ufunksjonalisert overflate. Metoden som ble benyttet var som den beskrevet ovenfor der begge vaskeprosedyrene ble gjennomført, men der væsken som ble tilsatt etter sentrifugering var MOPS-buffer med en konsentrasjon av kitosan på 0,2 mg/mL ved pH 6,5.

#### 6.4.5 Avbildning av glassoverflater med immobiliserte gjærceller

For avbildning av glassoverflater ble en semimekanisk Axio Imager.Z2 tilkoblet kameraet AxioCam MR Rev3 benyttet. Objektivene som ble benyttet var Zeiss Plan-Apochromat 40x/0,95 ph 3 korr og Zeiss Plan Apochromat 20x/0,8 ph 2

Ved hjelp av programvaren AxioVision v 4.8.2.0 ble det tatt både bilder og filmer ved bruk av multidimensjonal registrering av z-stabel (Multidimensional Acquisition z-stack). Mikroskopet ble stilt inn i henhold til Köhler og fasekontrast ble benyttet for avbildningen.

Immobilisering av gjærceller for lysmikroskopi ble utført på objektivglass. To biter dobbeltsidig teip ble montert på hver side av de immobiliserte gjærcellene og et dekkglass ble plassert hvilende på disse igjen. YPD-media, MOPS- eller HEPES-buffer ble deretter tilført prøven før avbildningen ble utført. Ved undersøkelse om observerbare endringer i morfologien til gjærcellene ved eksponering av kitosan ble MOPS-buffer med en konsentrasjon av kitosan på 0,2 mg/mL tilført objektivglasset etter plassering av dekkglass.

#### 6.4.6 Kvantitativ fasekontrast

Avbildning av gjærceller med kvantitativ fasekontrast mikroskop ble utført med objektivet EC Plan-Neofluar 40x/0.75 Ph2 på kvantitativ fasekontrast mikroskopet SLIME Q100 fra Phi Optics Inc tilknyttet kameraet ORCA Flash 4 v2 fra Hamamatsu.

For avbildningen ble to PLL-funksjonaliserte WillCo-brønner tilsatt ca 40 $\mu$ L løsning av gjærceller suspendert i YPD-media. Løsningen ble spredd utover med spissen til en pipette. Etter avbildning av gjærcellene ble 20  $\mu$ L 1 mg/mL kitosan ble tilsatt gjærløsningen. Avbildning av gjærcellene ble deretter utført innenfor et tidsintervall fra 5 – 20 minutter etter tilsats av kitosan. Tidspunktene for avbildning av gjærceller eksponert enten for 66% eller 94,4% deacetyleret kitosan var ikke like.

#### 6.4.7 AFM-basert nanoindentasjon

Nanoindenteringer ved AFM ble utført med kraftroboten JPK00402 ForceRobot 300 tilknyttet JPK Precision Mapping Stage Control Unit. Kraftroboten ble kontrollert i programvaren JPK ForceRobot 300 Control Software v.4.2.50 der ulike parametere for målingene ble innstilt. Etter montering av fjæren til kraftroboten ble laserstrålen plassert og signalet på fotodioden ble optimalisert. Deretter ble en dråpe YPD-media, MQ-vann eller MOPS-buffer plassert slik at fjæren med indenteringsspiss ble dekket av væske før signalet på fotodioden ble optimalisert igjen. Fjæren var av typen BRUKER Cantilever: T: 0,3-0,5 $\mu$ m L:180-220 $\mu$ m W:28-32 $\mu$ m  $f_0$  8-14 kHz k: 0,02N/M Waffer 366651 og 2C0921 med en kjegleformet indenteringsspiss med halvkjeglervinkel på 35°.

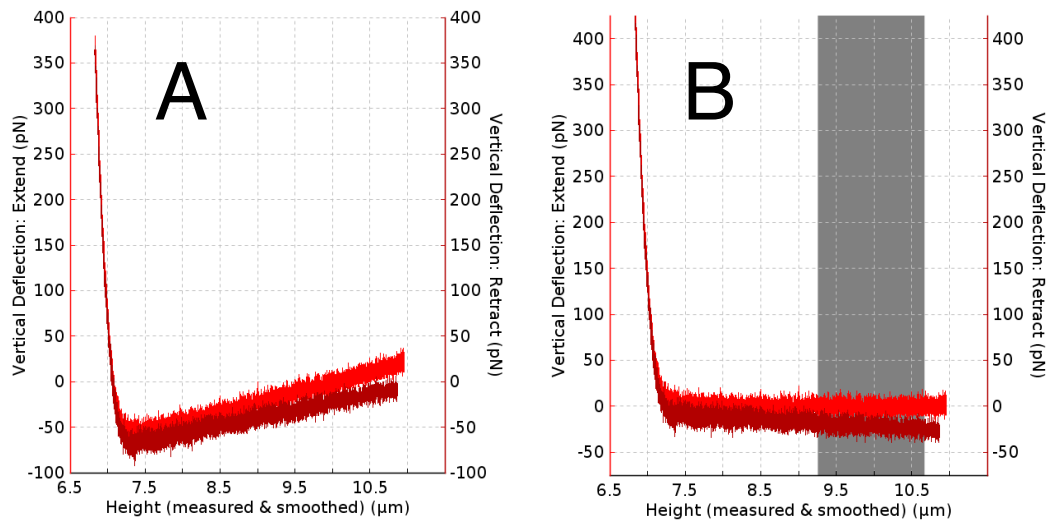
Målingene ble gjort med 5 kontinuerlige repetisjoner av hvert punkt eller repetert 5 ganger i serie i et kvadratisk mønster med 3x3 punkter fordelt på enten 5x5, 10x10

eller 15x15  $\mu\text{m}$ . Hastigheten til bevegelsen av fjæren ble satt til å være konstant 0,6 $\mu\text{m/s}$ , uten pauser ved maksimal utstrekning eller tilbaketrekning av fjæren. Høyden for utstrekningene (z-lengden) var på 0,6 $\mu\text{m}$ , 2,5  $\mu\text{m}$ , 3,0 $\mu\text{m}$  eller 5,0 $\mu\text{m}$ . Maksimal kraft (Rel.setpoint) ble satt til 0,362 nN. Z-loop var aktivert. Fjæren ble kalibrert på glassoverflaten av en WillCo-brønn i MQ-vann og sensitivitet og fjærkonstant ble kalkulert av programvaren. All væske benyttet i forbindelse med kraftmålingene ble filtrert med 0,45 $\mu\text{m}$  sprøytefilter.

For gjennomføring av indenteringer av gjærceller ble WillCo-brønner med immobiliserte gjærceller ble tilsatt 3mL YPD-medium, MQ-vann eller MOPS-buffer før kraftmålingene ble gjennomført. For å undersøke hvordan kitosan påvirket celleveggenes elastisitet til *S. cerevisiae* ble kraftmålinger utført på gjærceller uten eksponering for kitosan før kitosan ble tilsatt den samme prøven og nye kraftmålinger ble utført. 66% og 94% deacetyleret kitosan ble tilsatt slik at sluttkonsentrasjonen av kitosan i løsningen ble 0,05 mg/mL. Prøvene tilsatt kitosan ble deretter inkubert i 10 min før de nye kraftmålinger ble gjennomført.

I tillegg til nanoindentering av gjærceller ble det utført enkelte forsøk for å bestemme Youngs modulus til PLL-laget MQ-vann og MOPS-buffer. Undersøkelser ble utført for å kartlegge hvorvidt støy i kraft mot avstandskurvene var forårsaket av interaksjoner mellom kitosan og en PLL-funksjonalisert glassoverflate dekket av MOPS-buffer eller YPD-media.

Nanoindenteringene dannet kraft mot avstandskurvene som ble analysert ved bruk av JPK Data Processing Software versjon spm-4.2.50. I kraft mot avstandskurvene ble X-aksen satt til målt og utjevnet høyde (height measured and smoothed) mens Y-aksen viste vertikal avbøyning (deflection). For beregning av Youngs modulus ble kurven som representerer fjærens utstrekning mot overflaten (rød kurve i Figur 6.4.1), indenteringskurven (extend), tilpasset Hertz-Sneddon-modellen ved hjelp av programvaren. For å få en tilstrekkelig plan grunnlinje på indenteringskurven slik at tilpasningen kunne utføres, ble det utført en korreksjon av grunnlinjen ved justering av helning (tilt) og forskyvning (offset) av grunnlinjen slik at den ble sentrert rundt null på y-aksen. Et eksempel for en slik korreksjon kan observeres i Figur 6.4.1.



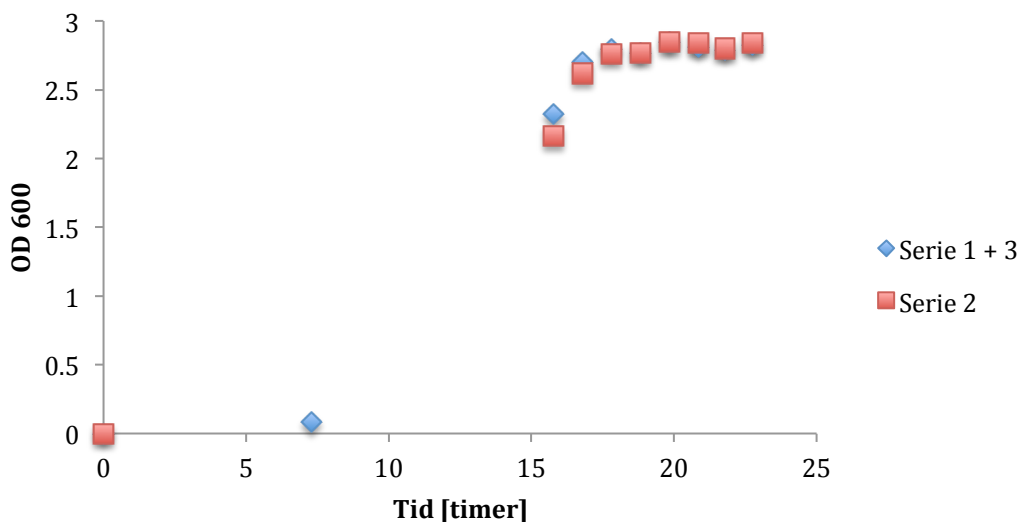
Figur 6.4.1: En kraftkurve oppnådd ved nanoindentering av gjær før (A) og etter (B) korreksjon av helning og forskyvning av kurven vertikalt i analyseprogramvaren. Rød og brun kurve representerer henholdsvis utstrekning og tilbaketrekning av fjæren under utføring av nanoindentering. Korreksjonen er utført med hensyn til den røde indenteringskurven.



## 7 Resultater

### 7.1 Vekstkurve for *S. cerevisiae*

For å bekrefte at gjærcellene var passert det diauxiske skiftet og oppnådd en stabil vekstfase under utførelsen av forsøkene ble det gjennomført måling av optisk tetthet av cellekulturen. Den optiske tettheten ble plottet mot tiden for å få en vekstkurve. Ut fra vekstkurven ble det observert at gjærcellene oppnådde stabil fase etter om lag 17 timer (Figur 7.1.1). Målingen ved 7 timer ble tatt av en annen cellekultur enn de som hovedsakelig var en del av forsøket for å registrere stasjonær fase. Etter at tidspunktet for stabil fase ble fastsatt, ble det sørget for at de andre forsøkene ikke ble påbegynt før gjærkulturen hadde blitt inkubert i minst 18 timer. Dette ble gjort for å være sikker på at gjærcellene var i samme fase under alle forsøkene.



Figur 7.1.1 En vekstkurve for *S. cerevisiae* der optisk tetthet av gjærkulturen ble målt ved 600nm for to prøver gjærceller over en tidsperiode på 23 timer.

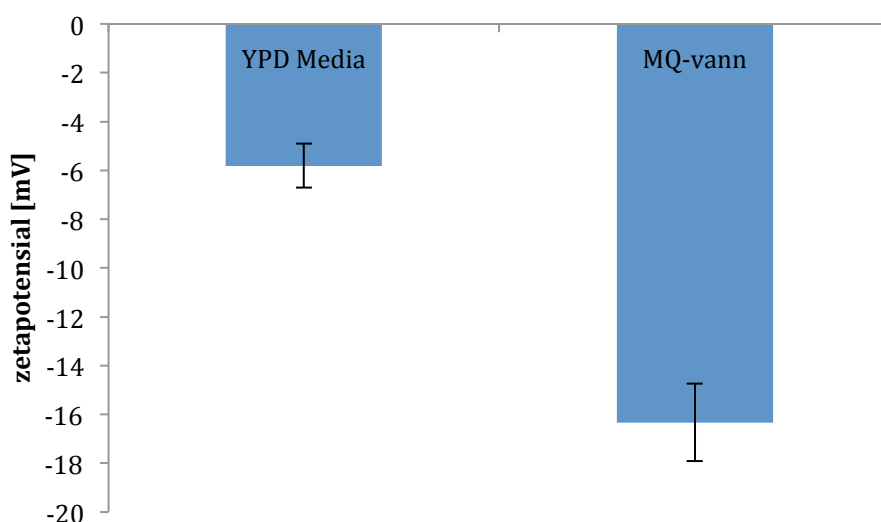
### 7.2 Zetapotensial

Zetapotensialet til gjærcellene ble undersøkt i ulike buffere ved forskjellig pH og ionestyrke, tilsats av kitosan og ved forskjellig konsentrasjon av gjærceller i løsning. Det ble funnet at zetapotensialet til gjærcellene var avhengig av pH i løsningen (Figur 7.2.2, Figur 7.2.3), konsentrasjon av gjærceller i løsning (Figur 7.2.4) og hva slags buffer som ble benyttet (Figur 7.2.1, Figur 7.2.2). Ved måling av zetapotensial av

gjær i løsninger tilsatt NaCl til ulike sluttkonsentrasjoner ble det observert en rosa felling (Figur 7.2.7). Denne utfellingsreaksjonen umuliggjorde pålitelig bestemmelse av zetapotensialet. Etter tilsats av kitosan ble det observert en økning i verdien for zetapotensial relativt til verdien bestemt i fravær av kitosan (Figur 7.2.6).

### 7.2.1 Bestemmelse av zetapotensial for gjærceller løst i YPD-medium, buffer eller MQ-vann.

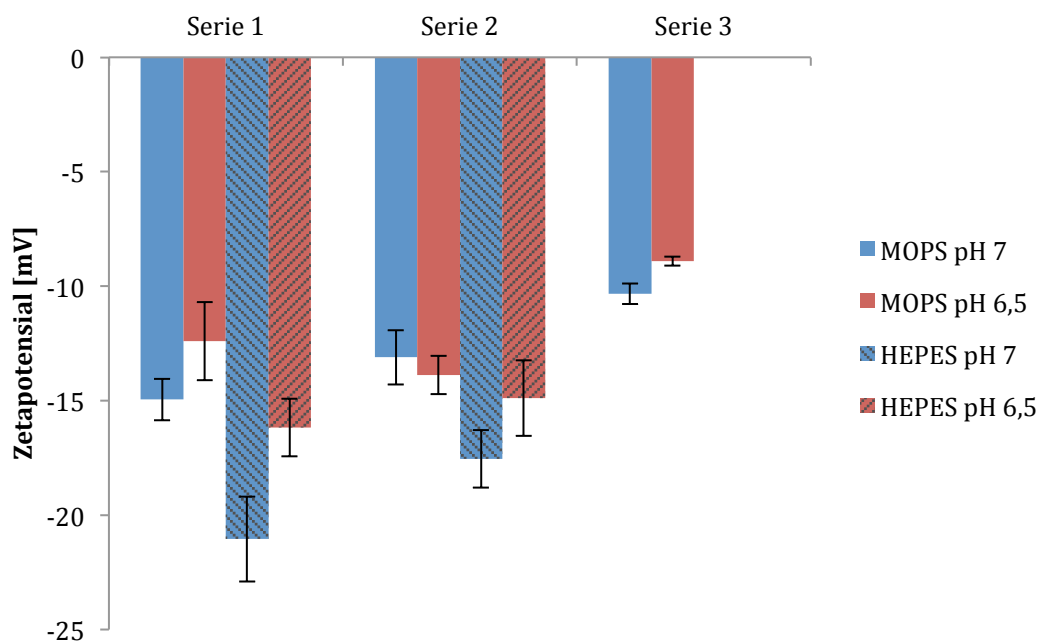
Det ble undersøkt hvordan zetapotensialet til gjærceller ble påvirket av å være suspendert i ulike løsninger. Resultatene viste et samsvar i zetapotensialet til gjærcellene ved at zetapotensialet ble funnet å være negativt i YPD-media, MQ-vann, MOPS- og HEPES-buffer. Verdien av zetapotensialet varierte etter hvilken væske gjæren ble suspendert i. I YPD-media ble det observert at zetapotensialet var høyere enn i MQ-vann (Figur 7.2.1). Sammenlignet med verdiene funnet for gjærceller i buffer var zetapotensialet også høyere for gjærceller i YPD-media.



Figur 7.2.1: Zetapotensial for gjærceller løst i YPD media eller MQ-vann med tilhørende enkelt standardavvik.

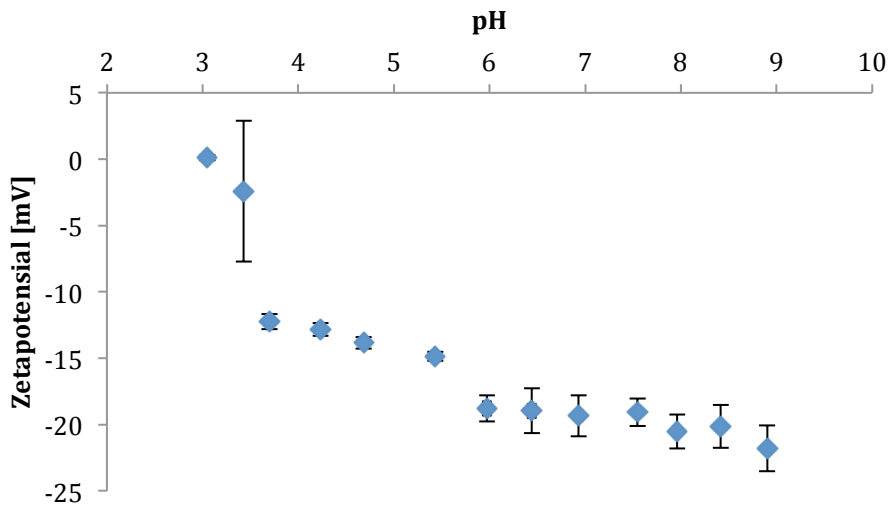
En sammenligning mellom zetapotensialet til gjærceller suspendert i HEPES- og MOPS-buffer ble utført. Disse målingene ble i tillegg utført ved to forskjellige pH. 2 uavhengige gjentakelser ble utført. En ekstra gjentakelse ble utført med MOPS siden MOPS serie 2 viste motsatt tendens i avhengigheten for pH i løsningen. Zetapotensialet til gjærceller suspendert i HEPES-buffer var generelt lavere enn

tilsvarende i MOPS-buffer (Figur 7.2.2). Det ble observert at zetapotensialet til gjærcellene i MOPS-buffer og HEPES-buffer ved pH 7 var lavere enn zetapotensialet til gjærceller i korresponderende buffer ved pH 6,5, som nevnt med unntak for MOPS serie 2 (Figur 7.2.2).



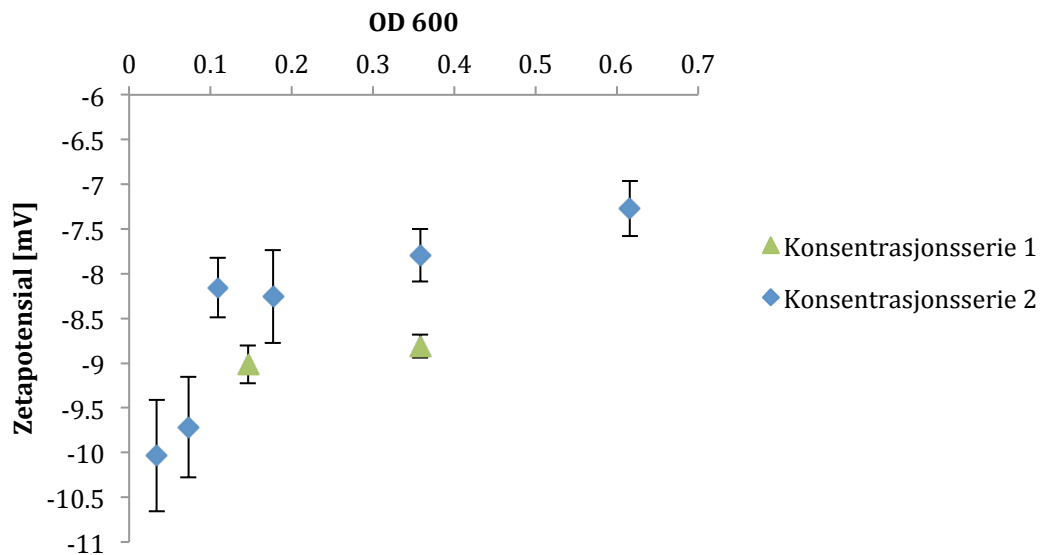
Figur 7.2.2: Zetapotensial for gjærceller i MOPS- eller HEPES-buffer utført med henholdsvis 3 og 2 uavhengige gjentakelser ved pH 7 og 6,5 med tilhørende enkelt standardavvik.

Det ble utført en måling av zetapotensialet til de samme gjærcellene ved endring av pH i løsningen. Gjærcellene ble i utgangspunktet løst i MQ-vann. Det ble observert at zetapotensialet falt fra å ligge noe positivt ved pH 3 til -12,5mV ved pH 3,5 før zetapotensialet ble gradvis lavere ved økende pH (Figur 7.2.3).



Figur 7.2.3: Zetapotensial av gjærceller i MQ-vann ved ulike pH med tilhørende enkelt standardavvik.

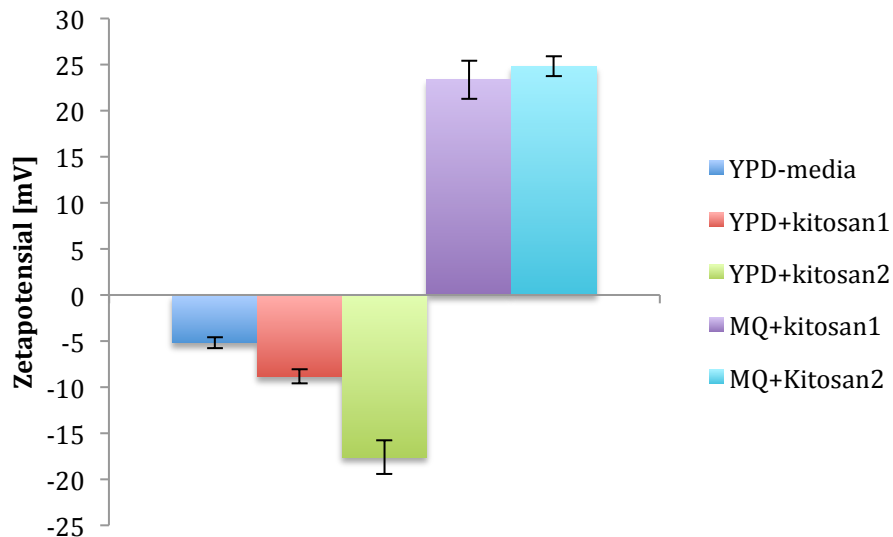
Ved måling av zetapotensialet til prøver med ulike konsentrasjoner av gjærceller i løsning ble det funnet at en lav konsentrasjon av gjærceller viste lavere zetapotensial enn mer konsentrerte prøver (Figur 7.2.4). Den første konsentrasjonsserien inkluderte kun to prøver fordi denne konsentrasjonsserien ble gjennomført først og fremst for å måle zetapotensialet til gjærceller suspendert i MOPS-buffert ved ulike pH. Konsentrasjonsserie 1 tilsvarer derfor MOPS serie 3 ved pH 6,5. Begge konsentrasjonsseriene ble forberedt samtidig. Konsentrasjonsseriene skilte seg derfor med hensyn av hvor lang tid det hadde gått før målingen av den enkelte konsentrasjonsserien ble gjennomført. Forskjellen på tiden mellom måling av konsentrasjonsseriene var på opptil 1,5 timer. Gjærceller som ikke hadde tilbrakt lang tid i buffer (konsentrasjonsserie 1) ga lavere zetapotensial enn de som hadde lik konsentrasjon, men der gjærcellene hadde vært suspendert i bufferen over en lengre tid (konsentrasjonsserie 2).



Figur 7.2.4: To serier med zetapotensial for prøver med ulik konsentrasjon av gjærceller, representert ved løsningsens optiske densitet ved 600nm, suspendert i MOPS-buffer ved pH 6,5. Gjærcellene i de to seriene tilbragte ulik tid i MOPS-buffer etter fortykning. Forskjellen i tiden tilbragt i buffer for de to seriene var på opptil 1,5 timer. Konsentrasjonsserie 1 tilbragte kortest tid i MOPS-buffer før måling. Feilmarginen viser enkelt standardavvik.

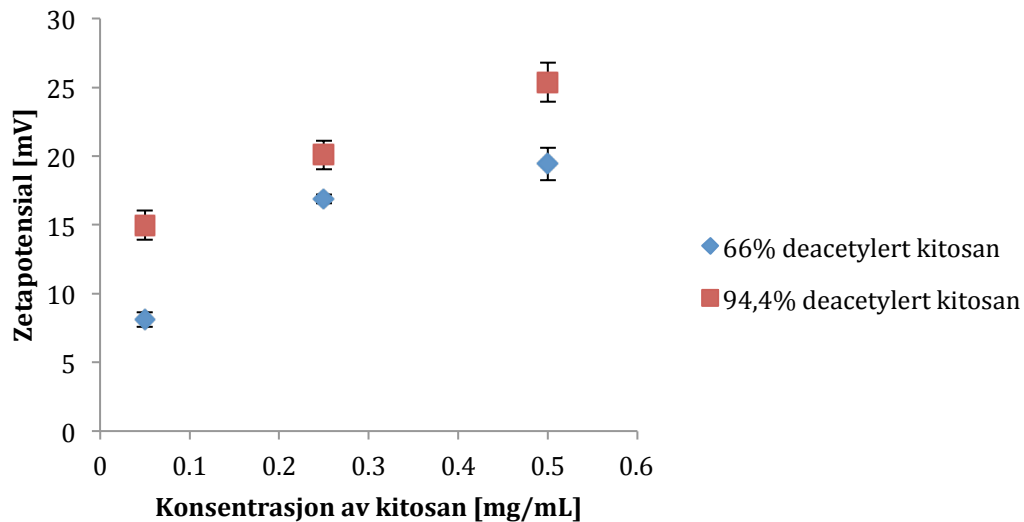
### 7.2.2 Bestemmelse av zetapotensial for gjærceller etter tilsats av kitosan

For å undersøke hvordan tilsats kitosan innvirker på zetapotensialet til gjærceller suspendert i YPD-media, MQ-vann og MOPS-buffer ble det utført to eksperimenter. I det første eksperimentet ble lik konsentrasjon av kitosan tilsatt gjærceller suspendert i YPD-media og MQ-vann. Ved tilsats av kitosan i gjærløsningen med YPD-media ble det observert et lavere zetapotensial sammenlignet med kontrollen av gjærceller suspendert i YPD-media uten kitosan. Tilsats av 94,4% deacetyleret kitosan ga lavest zetapotensial. Ved tilsats av kitosan i gjærløsning med MQ-vann ble det observert en økning i zetapotensialet til en positiv verdi der 94,4% deacetyleret kitosan ga høyest zetapotensial (Figur 7.2.5).



Figur 7.2.5: Zetapotensial av gjærceller suspendert i YPD-media, YPD-media med 66%deacetyllert kitosan (kitosan 1) og 94,4%deacetyllert kitosan (kitosan 2) og i MQ-vann med kitosan 1 og kitosan 2. Sluttkonsentrasjonen av kitosan er lik for alle prøver med tilsatt kitosan. Feilmarginen viser enkelt standardavvik.

I det andre eksperimentet ble det tilsatt kitosan til gjærceller suspendert i MOPS-buffer slik at sluttkonsentrasjonen av kitosan varierte. Etter tilsats av kitosan til gjærceller suspendert i MOPS-buffer ble det observert et positivt zetapotensial for gjærcellene. Det ble observert at gjærceller i løsning med høyere konsentrasjon av kitosan ga høyere zetapotensial. 66% deacetyllert kitosan ga generelt lavere zetapotensial enn 94,4% deacetyllert kitosan (Figur 7.2.6).

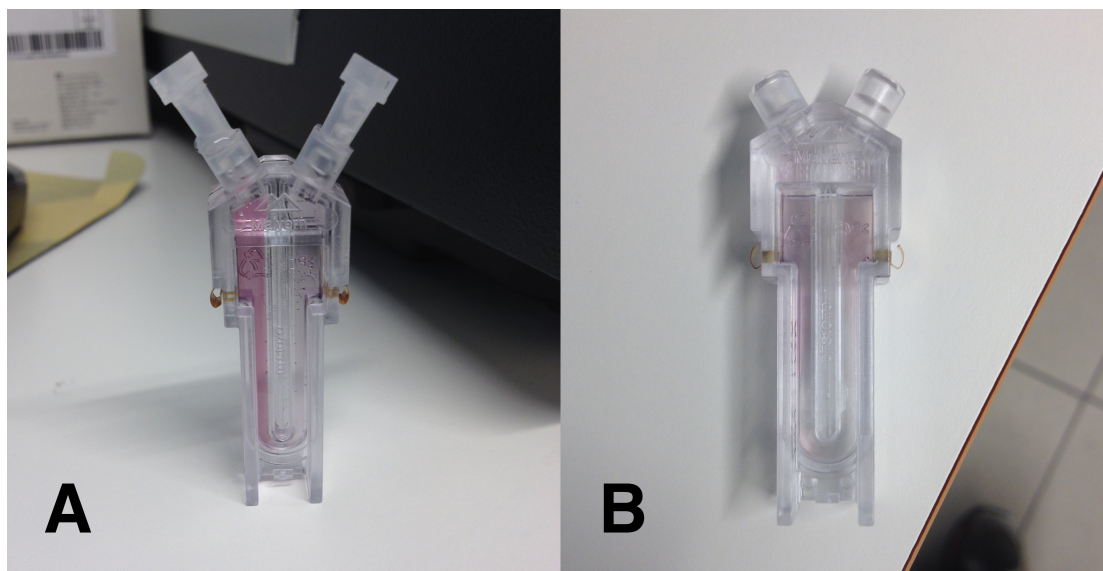


Figur 7.2.6: Zetapotensial av gjærceller suspendert i 10 mM MOPS-buffer ved pH 6,5 med ulik sluttkonsentrasjon av 66% deacetylert kitosan og 94,4% deacetylert kitosan. Feilmarginen viser enkelt standardavvik.

### 7.2.3 Bestemmelse av zetapotensial for gjærceller etter tilsats av NaCl

Det ble forsøkt å undersøke hvordan ionestyrken til løsningen med gjærceller ville påvirke zetapotensialet til gjærcellene. Ved måling av zetapotensial til gjærceller i MOPS-buffer tilsatt NaCl ble det observert en rosa felling. Utfellingen gjorde det dermed ikke mulig å bestemme zetapotensialet. Den rosa fellingen ble først oppdaget under gjennomkjøring av en NaCl konsentrasjonsserie ved hjelp av den multifunksjonelle titratoren som er montert på Zetasizerinstrumentet. Dette ble fulgt av eksperiment hvor det ble tilsatt NaCl til en løsning av gjærceller i MOPS-buffer til en sluttkonsentrasjon lik 0,2 M, 0,1 M og 0,05 M NaCl i løsningen samt en kontroll med kun MOPS-buffer og NaCl uten gjærceller. Felling ble kun observert i prøvene med gjær etter utføring av måling i Zetasizer. For enkeltprøvene ble det observert at fellingen var størst ved høy konsentrasjon av NaCl (Figur 7.2.7). Kontrollen ga ingen rosa felling, men det ble observert svart felling i nærheten av elektrodene etter måling av zetapotensial. Under målingen av kontrollen ble det observert at zetapotensialet sank for hver måling i serien. Dette ble generelt sett ikke observert for enkeltprøvene med gjærceller suspendert i MOPS-buffer tilsatt NaCl. Unntaket var for 0,2M NaCl-prøven som totalt sett viste en nedgang i zetapotensial i løpet av måleserien. Videre

undersøkelser av felling eller ionestyrkens effekt på gjærceller i løsning ble ikke utført.



Figur 7.2.7 Rosa felling etter måling av zetapotensial av gjærceller suspendert i MOPS-buffer tilsatt NaCl. (A) viser løsning med 0,2 M NaCl, (B) viser løsning med 0,1 M NaCl.

### 7.3 Immobilisering av gjærceller på glassoverflate

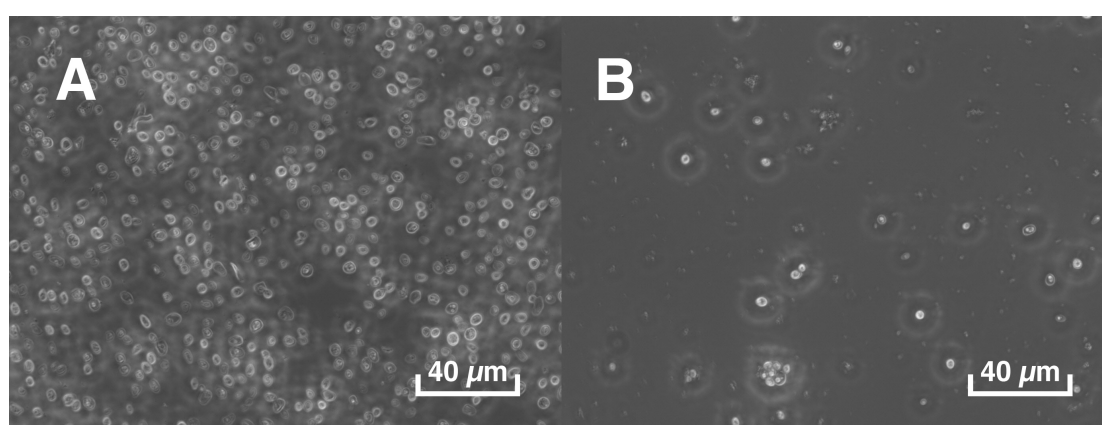
En metode for å immobilisere gjær til en glassoverflate ble gjennomført ved å inkubere en glassoverflate med forskjellige kjemikalier før gjærceller ble tilsatt. Overflatene ble deretter observert gjennom mikroskop for å evaluere resultatet av immobilisering.

Inkubasjonstiden for 0,1% PLL-løsning ble funnet til å kunne reduseres fra 60 minutter til 10 minutter uten noen forskjell i immobiliseringen av gjærcellene. 10 min inkubasjonstid ble deretter brukt i de resterende forsøkene.

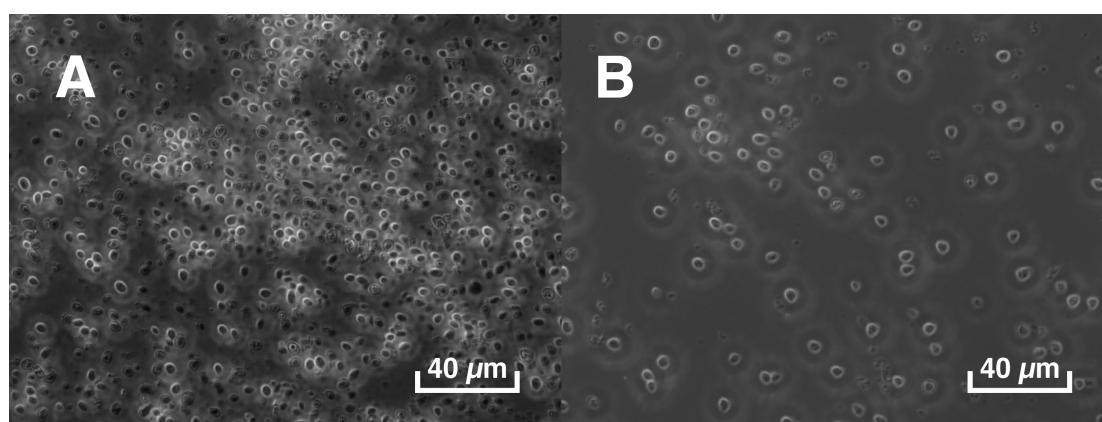
Ved påføring av en konsentrert løsning med gjærceller løst i ca 20-50 $\mu$ L YPD media ble det oppnådd et godt dekke av gjærceller på glassoverflaten behandlet med 0,1% PLL (Figur 7.3.1A, Figur 7.3.2A). Det kunne observeres at gjærcellene hadde en liten bevegelse rundt hvert sitt definerte punkt på glassoverflaten. Graden av bevegelighet så ut til å være identisk for immobiliserte celler dekket av YPD-media, HEPES- eller



MOPS-buffer under dekkglasset etter immobilisering. Ingen kvantitativ analyse av bevegelighet ble utført. I de påfølgende eksperimenter ble det innført en vaskeprosedyre etter påføring av den konsentrerte gjærøsningen på den PLL-funksjonaliserte glassoverflaten. Vaskeprosedyren bestod i langsom bevegelse av glassoverflaten frem og tilbake i en skål med MQ-vann. Deretter ble dekkglass plassert over glassflaten og væske ble tilført for å dekke gjærcellene. Etterfølgende mikroskopis inspeksjon viste at det tette laget med gjærceller som følge av vaskingen var blitt redusert til et mer spredt fordelt lag med gjærceller både for gjærcellene dekket med YPD-media (Figur 7.3.1B) og HEPES-buffer (Figur 7.3.2B).



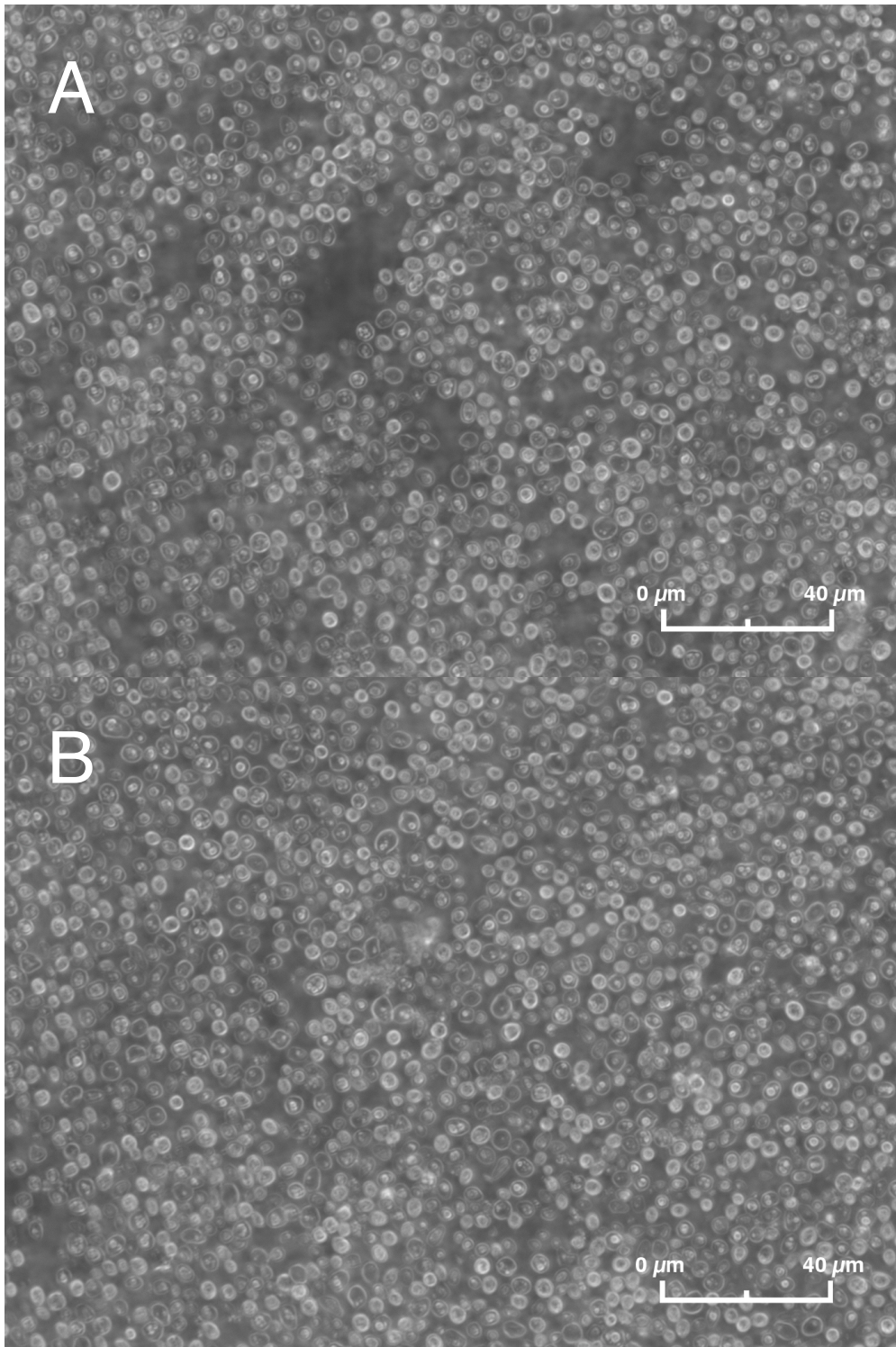
Figur 7.3.1: Fasekontrastbilde (40x) av gjærceller på PLL-funksjonalisert glassoverflate. Gjærcellene ble påført løst i YPD-media. Venstre viser før skylling med MQ-vann og høyre viser etter skylling.



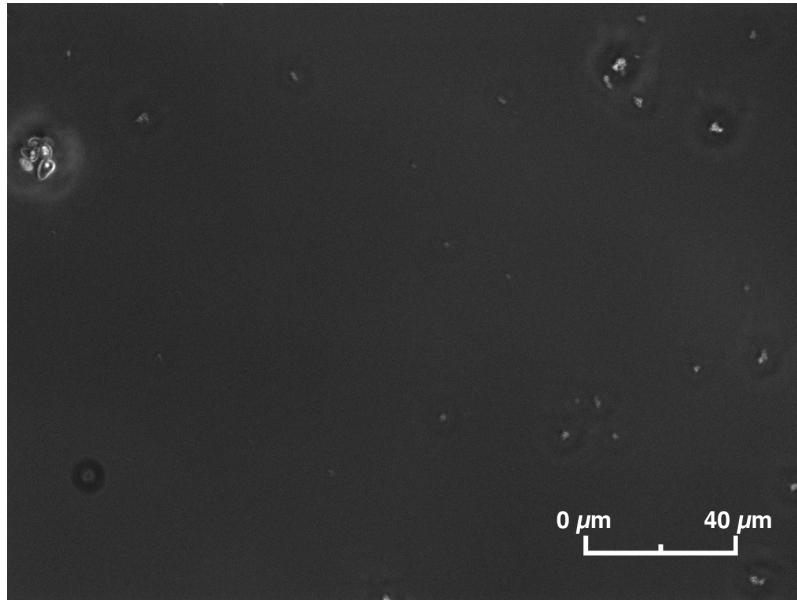
Figur 7.3.2: Fasekontrast (40x) av gjærceller løst i YPD-media tilført PLL-funksjonalisert glassoverflate med påfølgende tilsats av HEPES-buffer. (A) uten skylling og (B) etter skylling med MQ-vann før tilsats av HEPES-buffer.

Det ble deretter forsøkt å innføre en vaskeprosedyre for den konsentrerte gjærløsningen ved å sentrifugere gjærløsningen for så å tilsette 1mL HEPES- eller MOPS-buffer. Dette ble utført 2 ganger før gjæren ble suspendert i 20-50 $\mu$ L HEPES- eller MOPS-buffer for deretter å fortsette den allerede etablerte prosedyren inkludert vasking av den PLL-funksjonaliserte glassoverflaten etter påføring av den konsentrerte gjærløsningen. Ved inspeksjon av glassoverflaten ble det observert et godt dekke av gjærceller. Overflaten var tilnærmet fullstendig dekket av gjærceller (Figur 7.3.3). Til forskjell fra de første forsøkene hadde gjærcellene lite bevegelighet. Kun enkelte gjærceller hadde en viss bevegelighet rundt et definert punkt på glassflaten. En kontroll for å avgjøre om PLL stod for immobiliseringen ble utført med gjærceller suspendert i MOPS-buffer påført en ubehandlet glassoverflate. Inspeksjon av kontrollen viste en overflate nesten helt uten gjenværende gjærceller (Figur 7.3.4).

Immobiliseringen oppnådd med den forbedrede metoden var synlig også uten mikroskop. Gjærcellene dannet et grått lag på den PLL-funksjonaliserte glassoverflaten der de hadde blitt påført. Under skyllingen av glassoverflaten etter immobilisering ble det observert at gjærcellene som ikke lå i direkte kontakt med glassoverflaten ble skylt bort. Etter skylling var det fortsatt et grått lag på glassoverflaten som var observerbart. For kontrollen på ubehandlet glassoverflate og med gjær løst i YPD-media ved påføring på PLL-funksjonalisert overflate ble det ikke observert noe gjenværende grått lag etter skylling.



Figur 7.3.3: Fasekontrastbilde (40x) av immobiliserte gjærceller på PLL-funksjonalisert glassoverflate. Gjærcellene ble løst i MOPS buffer (A) eller HEPES buffer (B) før påføring til behandlet glassoverflate og skylt med MQ-vann etter 5 min inkubasjon.



Figur 7.3.4: Fasekontrast (40x) av kontroll med ubehandlet glassflate. Gjærceller løst i MOPS buffer ble påført og inkubert i 5 min før glassflaten ble skylt med MQ-vann.

De neste undersøkelsene som ble utført undersøkte hvordan funksjonalisering av glassoverflater med PLL-hydrobromid (300 000 Da), PLL-hydroklorid (15 000 Da) og BSA innvirket på gjærcellene med hensyn til immobilisering. Den etablerte prosedyren fra de tidligere forsøkene ble benyttet i disse undersøkelsene med en liten endring i vaskeprosedyren etter påføring av den konsentrerte gjærløsningen.

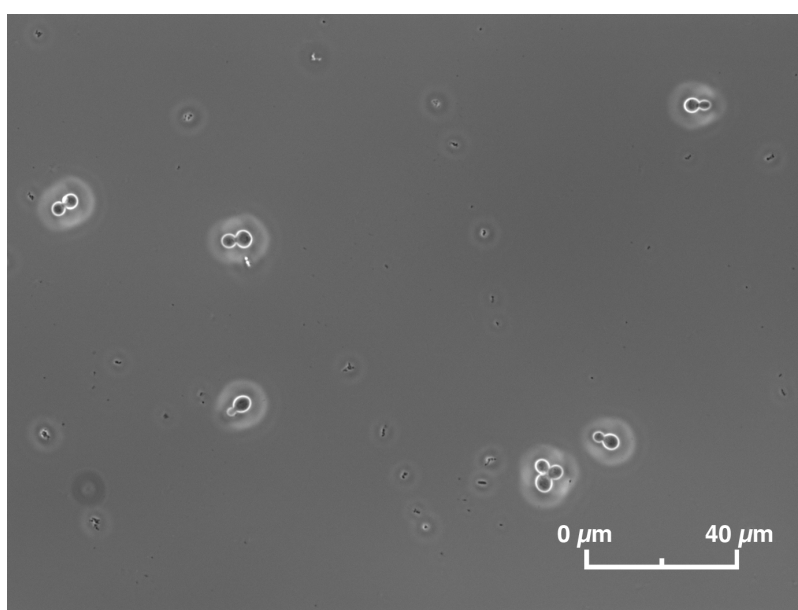
Endringen ble innført for å hindre kontaminering av baksiden av glassoverflaten som ble observert i enkelte forsøk. I stedet for å legge glassoverflaten i en skål med MQ-vann for å skylle ved å føre glassoverflaten frem og tilbake, ble en pipette benyttet.

Det ble påført væske over gjærcellene som ved hjelp av rotering skapte svake strømning som separerte de løse gjærcellene som deretter kunne fjernes ved hjelp av pipetten.

Glassoverflate behandlet med PLL-hydrobromid ga lignende resultater som for 0,1% PLL-løsning (150 000 - 300 000 Da). Det ble observert under vaskingen at et grått dekke med gjærceller var oppnådd. Dette ble bekreftet ved mikroskopi, men til forskjell fra PLL var det noe mer bevegelse på enkelte celler. Over laget med gjærceller ble det observert løse gjærceller som beveget seg i henhold til strømninger i væsken.

Ved skylling av gjærcellene påført en glassoverflate funksjonalisert med PLL-hydroklorid ble det ikke observert et like tydelig grått dekke som med de PLL- og PLL-hydrobromidfunksjonaliserte glassoverflatene. Den innledende skyllingen med pipette var noe kraftig og løsnet i tillegg en del gjærceller. I mikroskopet ble det observert et lag med spredt fordelte gjærceller som beveget seg noe rundt et punkt.

De aller fleste gjærcellene ble skylt vekk etter å ha blitt forsøkt immobilisert til en BSA-funksjonalisert glassoverflate. Sammenlignet med eksperimentet med en ubehandlet glassoverflate (Figur 7.3.4) ble det observert litt flere gjærceller spredt utover glassflaten (Figur 7.3.5).



Figur 7.3.5: Fasekontrast (40x) av gjærceller på glassoverflate behandlet med BSA. Gjærceller ble påført suspendert i MOPS-buffer før skylling med MQ-vann.

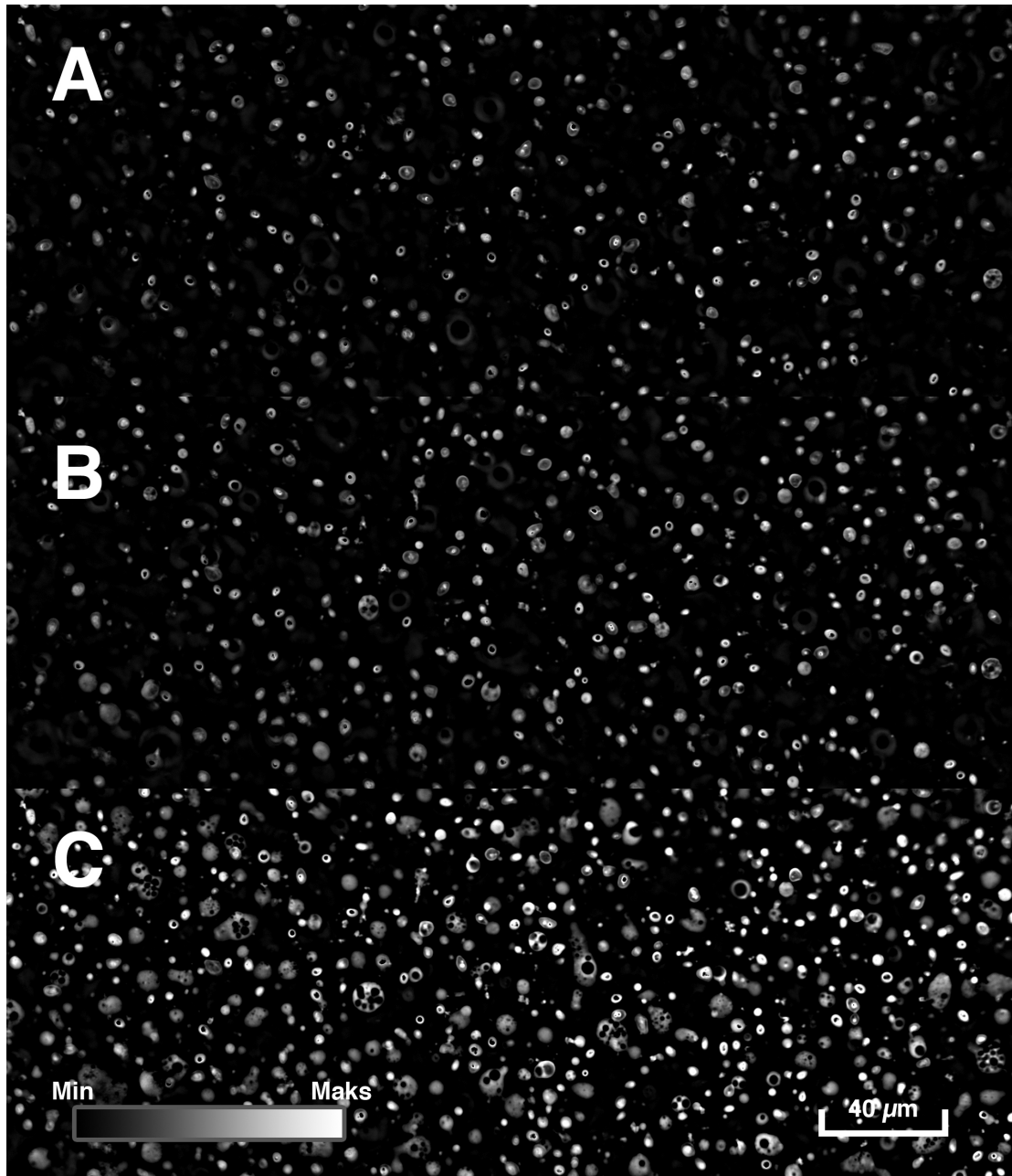
I et forsøk ble gjærcellene eksponert for kitosan før de ble forsøkt immobilisert til en ubehandlet glassoverflate. Ved inspeksjon viste det ingen binding av gjærceller til glassoverflaten.

I tillegg til inspeksjon av immobilisering ble det undersøkt om det kunne observeres en endring av gjærcellenes morfologi ved eksponering for kitosan ved avbildning med fasekontrastmikroskopi. En PLL-funksjonalisert glassoverflate dekket med gjærceller ble eksponert for kitosan og avbildet med fasekontrastmikroskopi med både 40X og 100X objektiv. Ingen synlig effekt av tilsatsen av kitosan ble avdekket.

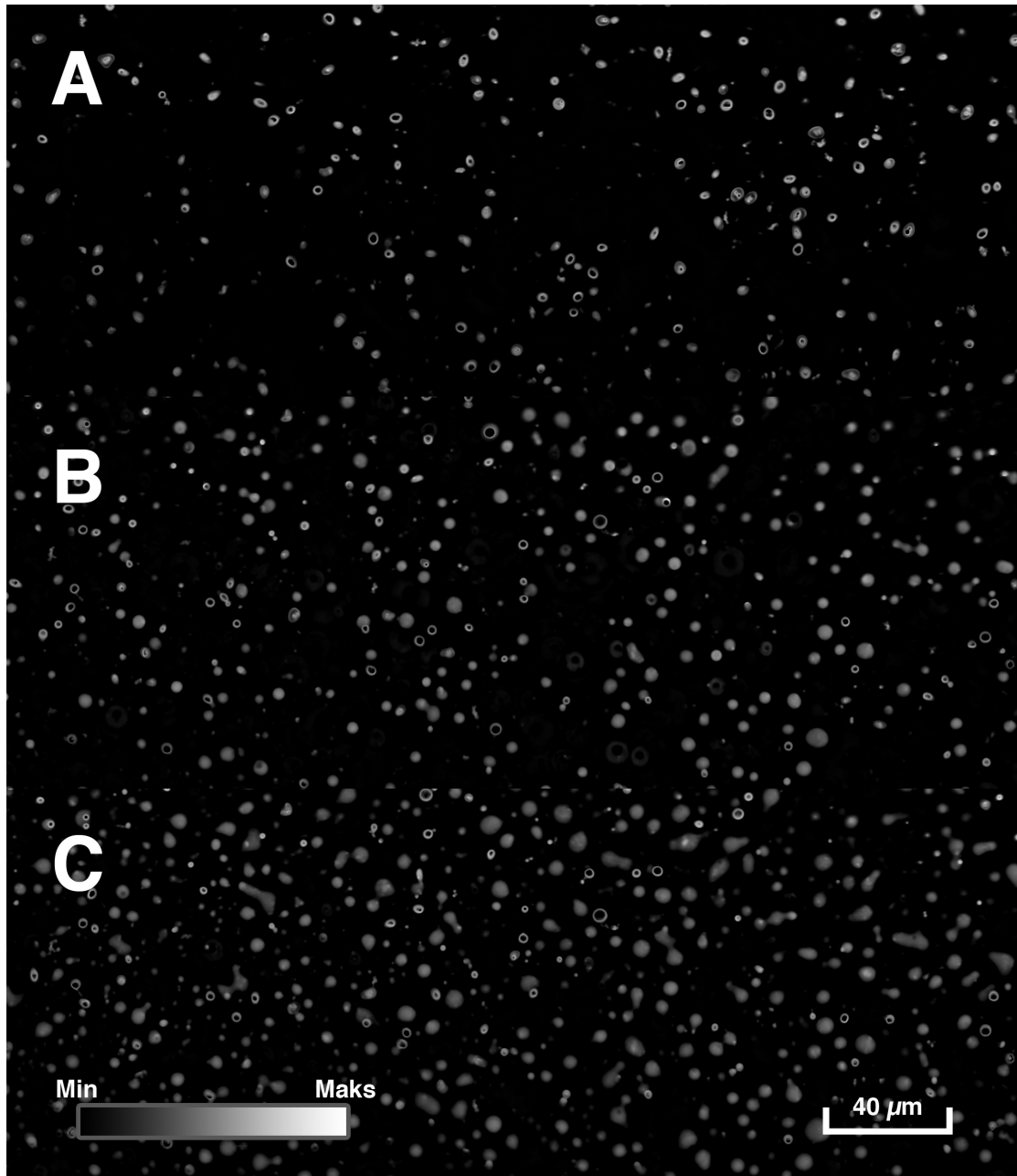
## 7.4 Kvantitativ fasekontrast

Kvantitativt fasekontrast mikroskopi ble benyttet for å undersøke mulige endringer i morfologi for gjærceller eksponert for kitosan. WilliCo-brønnene som ble tatt i bruk til dette ga mulighet til å observere i sann tid hvordan tilsats av kitosan påvirket gjærcellene. De samme gjærcellene kunne dermed sammenlignes før og etter tilsats av kitosan.

Avbildning med kvantitativ fasekontrast resulterte i et bilde der høydeforskjellene i prøven ble fremstilt ved en fargegradient fra svart til hvit, der de hvite områdene representerte de høyeste og de svarte de laveste delene av utsnittet. Ved inspeksjon av gjærcellene før tilsats av kitosan ble det observert at gjærcellene hadde klare hvite områder som indikerte det høyeste punktet på gjærcellene. Noen av gjærcellene ga en avbildning som en hvit sirkel med svart fyll (Figur 7.4.1, Figur 7.4.2). Tilsats av kitosan ga en observert endring etter ca 5-10 min. Etter tilsats av 94,4% deacetykert kitosan kunne det observeres at færre hvite områder på gjærcellene. Dette ga en indikasjon på at gjærcellene ikke lenger hadde en høy rund form, men en flatere struktur. Disse flatere strukturene kan observeres som grå sirkler i Figur 7.4.1 B og C og. Da 66% deacetykert kitosan ble tilsatt kunne det observeres enkelte store runde avtrykk med flere forsenkninger eller hull i seg. I tillegg ble de samme grå, flate strukturene observert slik som ved tilsats av 94,4% deacetykert kitosan (Figur 7.4.2 B og C). Det ble i tillegg observert for begge prøver at ved tilsats av kitosan ble en del gjærceller revet løs fra glassoverflaten. Dette var på grunn av strømmingene som ble dannet ved tilsats av kitosan i prøvene. Gjærcellene som ble suspendert i løsningen på grunn av løsrivelsen sedimenterte etter hvert ned på glassflaten igjen (Figur 7.4.1 C, Figur 7.4.2 C).



Figur 7.4.1 Kvantitativt fasekontrastbilde (40x) av gjærceller før (A), ca 5 minutter etter (B) og ca 15 minutter etter (C) tilsats av 66% deacetylert kitosan med intrinisk viskositet på 100mL/g. Høyden blir representert av en gråtonegradient der svart tilsvarer den laveste høyden, mens hvit tilsvarer de høyeste delene registrert av mikroskopet.



Figur 7.4.2: Kvantitativ fasekontrastbilde av gjærceller før, ca. 5 minutter etter og ca. 20 minutter tilsats av 94,4% deacetylerert kitosan med intrinsik viskositet på 120 mL/g. Høyden blir representert av en gråtonegradient der svart tilsvarer den laveste høyden, mens hvit tilsvarer de høyeste delene registrert av mikroskopet.

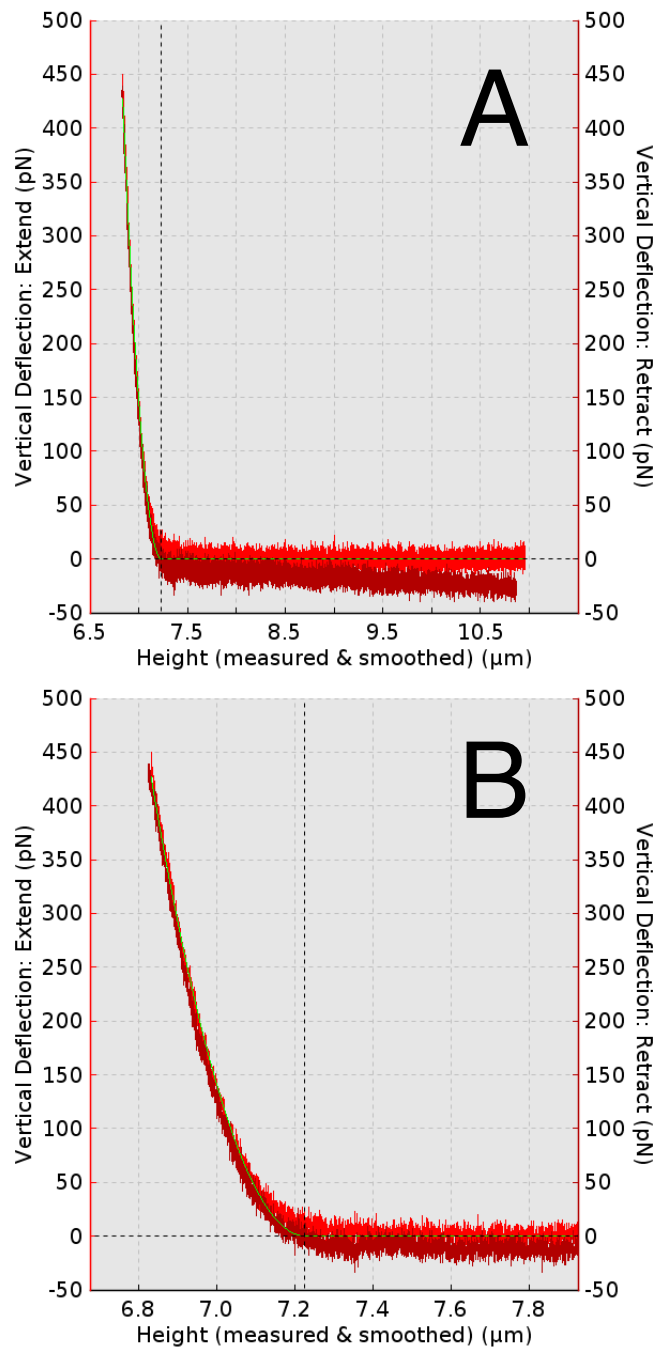


## 7.5 Resultater fra AFM

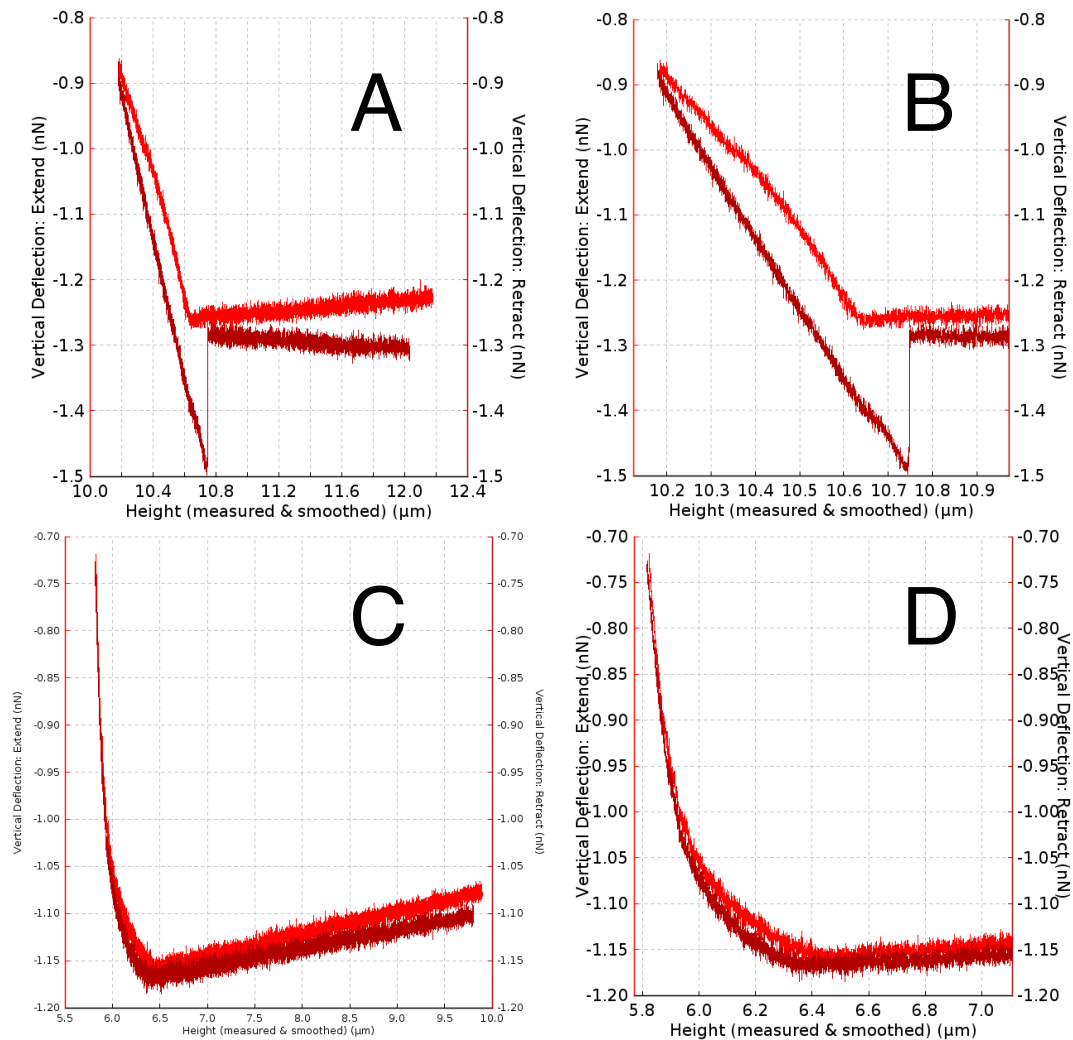
AFM ble benyttet for å utføre nanoindentasjon på gjærceller immobilisert på en PLL-funksjonalisert glassoverflate. Det ble utført nanoindenteringer både på den PLL-funksjonaliserte overflaten, gjærceller og gjærceller som var blitt eksponert for kitosan.

Nanoindentering gir kraftkurver der kraften påført det som indenteres plottes mot høyden eller avstanden som fjæren forflytter seg. Kraft mot avstandskurver består av en kurve som representerer fjærens utstrekning mot overflaten, indenteringskurven, (røde kurver i Figur 7.5.1, Figur 7.5.2 og Figur 7.5.3) og en kurve som representerer fjærens tilbaketrekning fra overflaten igjen, strekkkurven (brune kurver i Figur 7.5.1, Figur 7.5.2 og Figur 7.5.3). X-verdien angir den relative avstanden fra fjæren til overflaten av det som måles og minker derfor etter hvert som fjæren nærmer seg overflaten. Kurvene blir derfor tolket og omtalt i denne oppgaven ved å lese kurven fra høyre til venstre. Det som ut fra kurven kan observeres å ha et negativt stigningstall vil derfor omtales som en stigning i kurven i stedet for en nedgang der tankegangen er at det observeres en stigning i motstanden fjæren møter og graden av stigning gjenspeiler overflatens elastisitet. I det første område av kurven oppstår det derfor en grunnlinje i det område der fjæren ikke har fått kontakt med overflaten. Kontaktpunktet mellom indenteringsspissen og underlaget defineres som det punktet der kraften begynner å øke i forhold til grunnlinjen.

Kraft mot avstandskurvene som ble oppnådd ved indentering av gjærceller hadde ulike signaturer. Det var indenteringskurver som hadde en tydelig stigning etter kontaktpunkt (Figur 7.5.1, Figur 7.5.2A og B) og enkelte som hadde en slakere start etter kontaktpunkt før stigningen i kraftkurven ble høyere (Figur 7.5.2C og D). For en PLL-funksjonalisert glassoverflate hadde kraftkurven er bratt stigningskurve ofte fulgt av en karakteristisk strekksignatur i strekkkurven ved tilbaketrekning av fjæren (Figur 7.5.3A). Indenteringskurvene ble tilpasset Hertz-Sneddon-modellen for bestemmelse av Youngs modulus. Ikke alle kurvene fikk en like god tilpasning. Et eksempel på en indenteringskurve med en god tilpasning til Hertz-Sneddon-modellen vises i Figur 7.5.1.

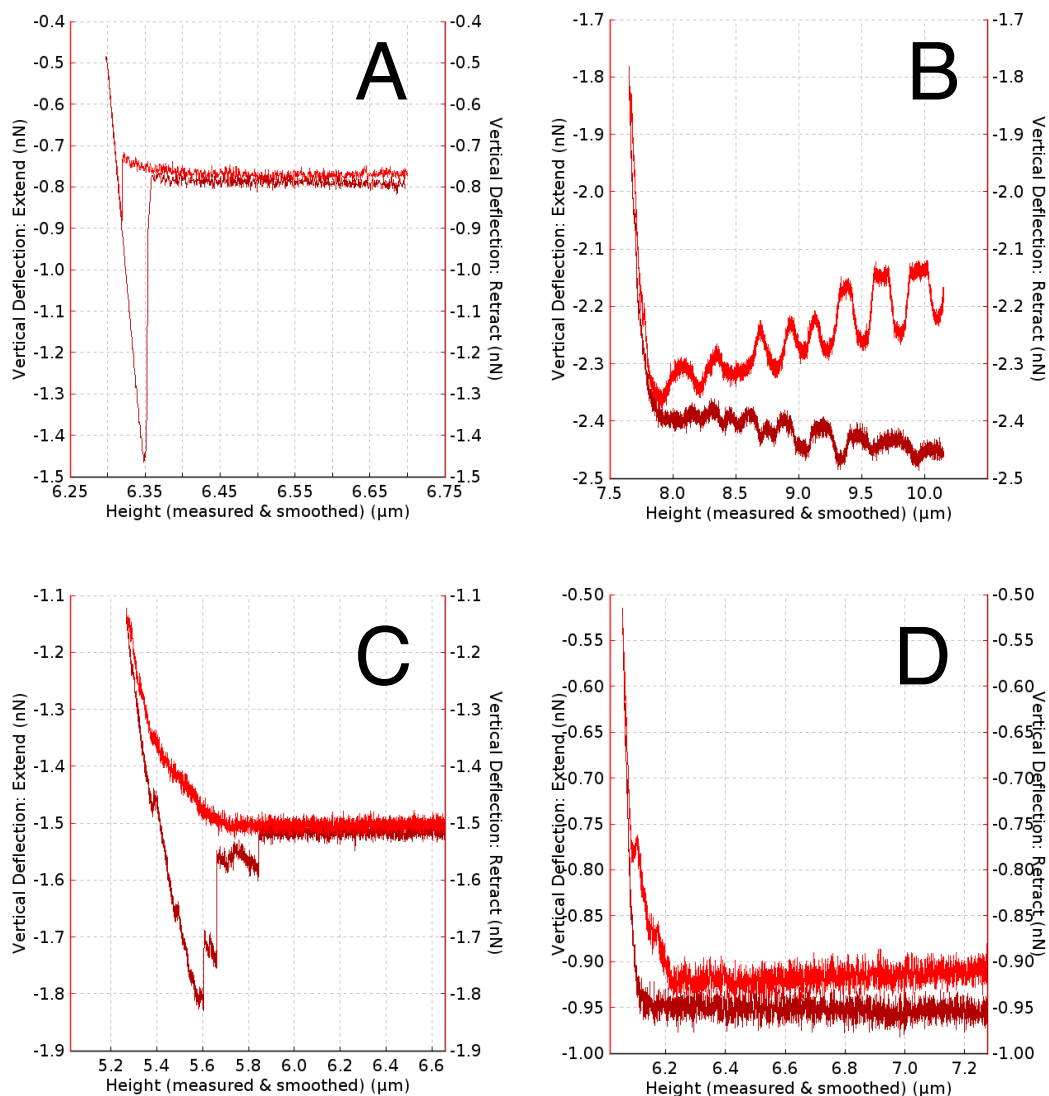


Figur 7.5.1: En Hertz-Sneddon-tilpasset kraftkurve (grønn linje) for bestemmelse av Youngs modulus til en nanoindentering av en gjærcele. Hertz-Sneddon-tilpassningen er utført på den røde kurven som representerer utstrekningen av fjæren ved nanoindenteringen. Den brune kurven representerer fjærens tilbaketrekning ved nanoindenteringen. De striplede linjene krysser ved kontaktpunktet programvaren har funnet. De to kraftkurvene er den samme, der en er forstørret (B) og en er ikke forstørret (A)



Figur 7.5.2: Eksempler på kurver med en svak start etter kontaktpunkt som ble inkludert i bestemmelsen av Youngs modulus. Kurvene er eksempler på to kraftkurver der (B,D) er en forstørrelse av henholdsvis (A,C).

Noen kurver ble ikke inkludert i analysen for bestemmelse av Youngs modulus. Dette gjaldt kurver som hadde store ujevnheter i grunnlinjen (Figur 7.5.3B), hadde et tydelig skille mellom en slakere start før en hardere struktur ble møtt (Figur 7.5.3C) eller hadde signaturer som indikerte en delvis relaksjon av fjæren (Figur 7.5.3D).



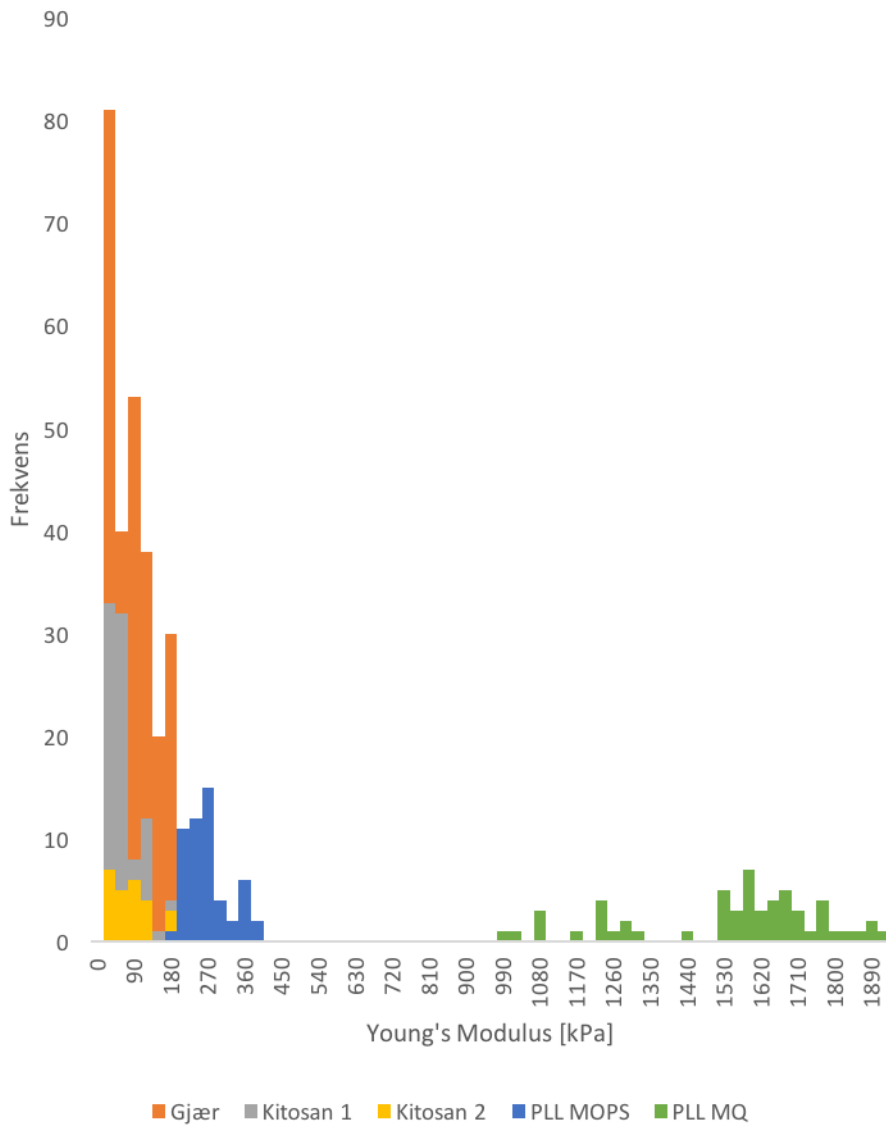
Figur 7.5.3: Kraftkurver oppnådd ved nanoindentering. Rød og brun kurve representerer henholdsvis utstrekning og tilbaketreking av fjæren under utføring av nanoindentering. (A) viser en typisk signatur for nanoindentering av en PLL-funksjonalisert overflate. (B, C, D) viser eksempler på kraftkurver som ikke ble inkludert i analysen for bestemmelse av Youngs modulus.

Etter utvelgelse av indenteringskurver ble Youngs modulus for bestemt for gjærceller og PLL-funksjonaliserte glassoverflater uten gjærceller. Gjærcellene var enten uekspontert eller eksponert for enten 66% deacetyleret kitosan eller 94,45 deacetyleret kitosan. Medianen var lavere enn gjennomsnittsverdien av Youngs modulus for alle forsøkene med unntak av medianen for en PLL-funksjonalisert glassoverflate dekket med MQ-vann (Tabell 7.5.1). Youngs modulus for en PLL-funksjonalisert glassoverflate dekket med MQ-vann ble observert til å være høyere enn for en PLL-

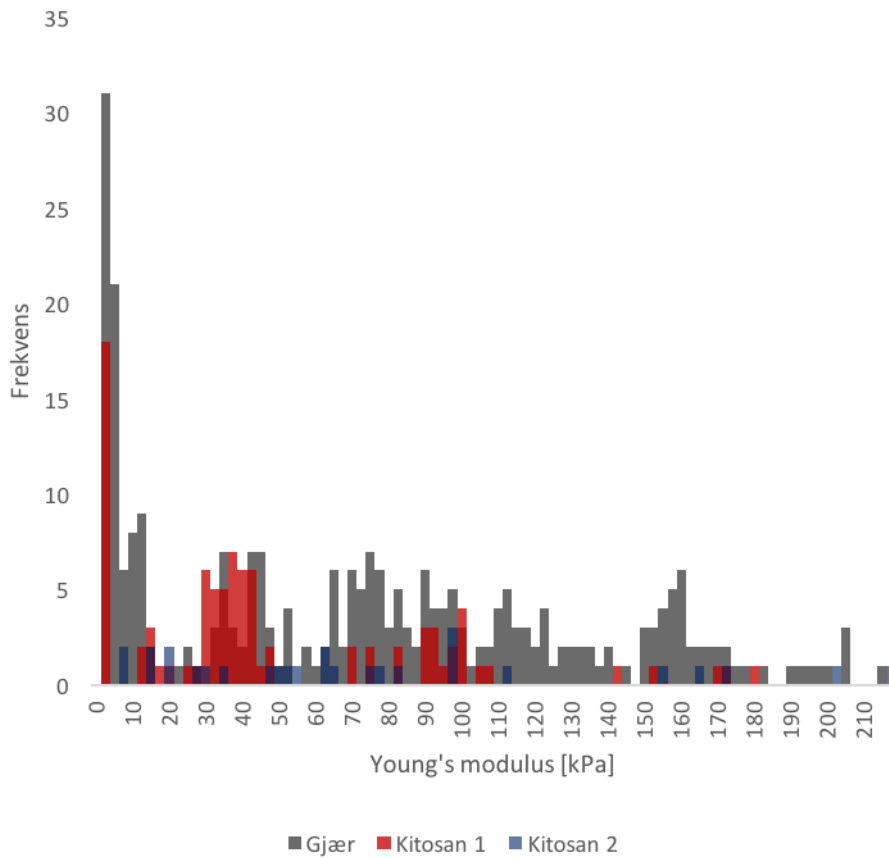
funksjonalisert glassoverflate dekket med MOPS og målingene av immobiliserte gjærceller (Tabell 7.5.1, Figur 7.5.4). Spredningen av Youngs modulus for en PLL-funksjonalisert overflate dekket med MOPS viste et overlapp sammenlignet med spredningen av Youngs modulus for gjærceller (Figur 7.5.4). For de immobiliserte gjærcellene eksponert eller ikke for kitosan ble Youngs modulus funnet til å ligge under 210 kPa (Figur 7.5.5).

Tabell 7.5.1: Gjennomsnittlig verdi av Youngs modulus for gjærceller med og uten eksponering for 66% deacetykert kitosan eller 94,4% deacetykert kitosan, PLL-funksjonaliserte glassoverflater uten gjær dekket av MOPS-buffer eller MQ-vann med tilhørende enkelt standardavvik, median og antall analyserte indenteringskurver.

	Gjennomsnittlig Youngs modulus	Median	Antall analyserte kurver
<b>Gjær</b>	72±58 kPa	68 kPa	272
<b>Gjær + 66% deacetykert kitosan</b>	46±42 kPa	36 kPa	91
<b>Gjær + 94,4% deacetykert kitosan</b>	79,8±76 kPa	61 kPa	28
<b>PLL MOPS-buffer</b>	252±52 kPa	245 kPa	54
<b>PLL MQ-vann</b>	1 531±237 kPa	1 580 kPa	57



Figur 7.5.4: Histogram som viser fordelingen av Youngs Modulus for prøver tatt av immobilisert gjær i MOPS (oransje), immobilisert gjær dekket av MOPS-buffer tilsatt 66% deacetyleret kitosan (grå, kitosan 1), immobilisert gjær dekket av MOPS-buffer tilsatt 94,4% deacetyleret kitosan (gul, kitosan 2), PLL-funksjonalisert glassoverflate dekket av MOPS-buffer (blå) og PLL-funksjonalisert glassoverflate dekket med MQ-vann (grønn).



Figur 7.5.5: Histogram som viser fordelingen av Young's modulus for prøver tatt av immobilisert gjær i MOPS (grå), immobilisert gjær dekket av MOPS-buffer tilsatt 66% deacetylert kitosan (rød, kitosan 1), immobilisert gjær dekket av MOPS-buffer tilsatt 94,4% deacetylert kitosan (blå, kitosan 2),

## 8 Diskusjon

Kartlegging av mekaniske egenskaper til gjær er viktig for å forstå hvordan en rekke cellulære prosesser blir påvirket av de mekaniske egenskapene. Mekaniske egenskaper er for eksempel viktig for kontroll av cellevekst og –deling i gjær samt adhesjon og formgiving til celler. I det antimikrobielle arbeidet er det også viktig å vite hvordan ulike antimikrobielle midlene virker på mikroorganismene. Dette kan avdekke de svake punktene i mikroorganismenes mekanismer som igjen kan gi en målrettet utvikling av mer effektive antimikrobielle midler. Bakgrunnen for å velge å studere de antimikrobielle egenskapene til kitosan var at der tidligere er vist å være en bionedbrytbar polymer som også har lav toksisitet sammenlignet med andre naturlige polysakkarider. Videre er det tidligere påpekt at god karakterisering er nødvendig for å kunne utvide bruken av dette kjemikalet(94). Kitosans første møte med gjærcellen er celleveggen som ligger som et beskyttende lag rundt cellemembranen. Det ble derfor valgt å fokusere på hvordan elastisiteten til celleveggen endres ved eksponering for kitosan. Siden celleveggen til ulike gjær har ganske stor likhet i oppbygning og molekylær sammensetning(11) antas det at resultatene for *S. cerevisiae* til en viss grad kan være overførbare til andre typer gjær som for eksempel patogene *C. albicans*. Siden en stor del av oppgaven gikk ut på metodeutvikling primært for å kunne utføre målinger av elastisiteten til gjærceller med AFM var det viktig å avdekke oppførselen til gjærceller som ikke var eksponert for kitosan, inkludert naturlig variasjon i denne og avhengighet av ulike eksterne parametre slik at metodeutviklingen ikke bare baserte seg på prøving og feiling.

Ladningstetthet er en viktig parameter for immobilisering(72) og mulig interaksjoner med kitosan. Måling av zetapotensial viste seg derfor å være nyttig for oppgaven. Det ga god informasjon om hvordan zetapotensialet ble påvirket av ulike løsninger som var nyttig for å forutsi hvordan interaksjonene med glassoverflater kunne påvirkes av løsningen. Siden kitosan er en kationisk polymer i det pH-område som ble benyttet ga zetapotensialet også god informasjon om hvilke interaksjoner kitosan har med gjærcellens overflate i ulike løsninger. Zetapotensialmålingene bidro derfor med en forklaring på utfordringer møtt under metodeutviklingen for både immobilisering og ved måling av Youngs modulus ved bruk av AFM.



Immobilisering av gjærceller på en overflate var nødvendig for å kunne utføre bestemmelse av Youngs modulus. Dette skyldes at en eventuell forflytning av gjærcellene under målingen ville påvirke nøyaktigheten i målingen negativt. En slik immobilisering sørget i tillegg for at det ikke var flere lag med gjærceller på overflaten, noe som ville gitt store feilkilder til elastisiteten. Valg av glass som overflate kom av behovet for gjennomlysning av prøven for avbildning ved hjelp av mikroskopi slik at immobiliseringen kunne inspiseres. Glassoverflater er i tillegg et godt karakterisert materiale og det er tidligere blitt brukt som substrat for immobilisering av gjær(71, 95). Siden PLL er blitt benyttet for immobilisering av bakterier(75, 83) ble det i denne oppgaven valgt å undersøke PLL også kunne benyttes for immobilisering av gjær. Det ble også undersøkt om BSA inhiberer immobilisering. Dette ble primært utført for å innhente informasjon som er relevant for en annen pågående studie ved universitetet der dannelsen av matriser av immobiliserte gjærceller på glassoverflater er målet.

Det ble i denne oppgaven valgt å benytte AFM for måling av elastisiteten til *S. cerevisiae* cellevegg. Denne metoden er mer lokal enn for eksempel mikromanipulasjonsmetoden der hele celleveggen blir påført stress(66, 69). AFM gir derfor mulighet til å danne et bilde av hvordan lokal elastisiteten varierer for ulike deler av celleveggen med forskjellig sammensetning av celleveggskomponenter som for eksempel knoppskytingsarr(63). En utfordring er at AFM-målinger kan påvirkes i større grad av lokale underliggende strukturer og organeller(93). Uten spesifisering av hva som faktisk måles vil resultatene ha en større spredning noe som kan gjøre det mer vanskelig å sammenligne målingene. I denne oppgaven ble AFM-målingene utført uten bruk av mikroskop noe som gjenspeiles i resultatene oppnådd. Da det ikke var mulig å observere hvor på overflaten av gjærcellen fjæren ble ført mot, ble variasjonen i målingene sannsynligvis større og kan ha ført til noen av de observerte effektene som tas opp senere i diskusjonen. Derfor kan det sies at bare hovedtrendene kunne sammenlignes ved bruk av denne metoden. Observasjon av to ulike lineære områder i kraft mot avstandskurvene har også bidratt med utfordringer knyttet til tolkningen av de oppnådde kraft mot avstandskurvene og sikker bestemmelse av hvorvidt det var skapt kontakt med en gjærcelle eller bare PLL-laget. Dette var med på å hindre fremdriften i forsøkene.

Som det ble nevnt i Seksjon 4.1.1 er det flere muligheter som kan benyttes for å beregne Youngs modulus basert på kraft mot avstandskurver. Hertz-Sneddon-modellen ble benyttet i denne oppgaven. Det er blitt påpekt at denne modellen gir et feilaktig resultat siden approksimasjonene som blir benyttet ligger alt for langt vekk fra de reelle forholdene(69). En annen mulighet for å få mer realistiske resultater hadde vært å ta i bruk numerisk utregning(67). For denne oppgaven ville sannsynligvis denne metoden ikke gitt et så mye bedre bilde av elastisiteten siden antall registrerte verdier ikke kan antas å være tilstrekkelig for numeriske beregninger. I tillegg ville usikkerheten i indenteringsforsøkene, som ble utført uten tilgang til samtidig mikroskopisk inspeksjon av prøven, gjøre det vanskelig å finne en riktig tilpasning. Hertz-Sneddon-metoden ble derfor valgt til tross for sine begrensninger både på grunn av utstrakt bruk av metoden i relevant litteratur for oppgaven, at metoden var inkorporert i programvaren som ble benyttet for analysen av kraftkurven og det ble antatt at resultatene uansett ville kunne sammenlignes innbyrdes.

En av approksimasjonene til Hertz-Sneddon-modellen som har innvirkning på resultatene er antagelsen om at strukturen som indenteres er absolutt elastisk. Dette er ikke nødvendigvis tilfellet for celler. Er indenteringshastigheten for langsom kan derfor området som indenteres få tid til å relaxeres samtidig som indenteringen finner sted. Dette gir derfor en lavere målt stivhet og er derfor en viktig parameter å bestemme(93). Det ble imidlertid ikke utført noen slik undersøkelse.

Indenteringshastigheten ble satt til  $0,6 \mu\text{m/s}$  som ble funnet til å være i området av det som er blitt benyttet i tilsvarende studier utført på gjær som har oppgitt indenteringshastigheten(63, 65).

Det blir anbefalt av produsenten av AFM instrumnetet benyttet i dette arbeidet å benytte sfæriske indenteringsspisser for indentering av myke biologiske strukturer. Dette fordi lokal inhomogenitet blir mindre fremtredende i målingene av elastisiteten når slike spisser benyttes. Bruk av konisk indenteringsspiss gjør derfor målingene mer sensitive for heterogeniteten i sammensetningen av celleveggen til gjær. Det er også en større fare for penetrering av prøven ved benyttelse av konisk indenteringsspiss, men fordelen er at en konisk form blir mindre hindret av ekstracellulære strukturer som glykocalix. Disse strukturene vil for en sfærisk indenteringsspiss gi uklare

kontaktpunkt med overflaten som kan gjøre det vanskelig med tilpasningen av kraft mot avstandskurvene(93). Konisk indenteringsspiss ble allikevel benyttet siden andre relevante studier hadde i hovedsak benyttet koniske eller pyramidale indenteringsspisser. En indentering av celleveggen kan også føre til en irreversibel reorganisering av cellen som gir større spredning i resultatene(93). Tidligere studier tar imidlertid ikke opp denne problematikken og finner signifikante forskjeller i det som blir undersøkt. Det antas derfor at en slik reorganisering ikke har en for stor innvirkning på indentering av gjærceller og at endringer i celleveggens elastisitet ved eksponering for kitosan vil kunne observeres.

Hvorvidt stivheten til fjæren er av betydning for er det ikke blitt funnet informasjon om annet enn en anbefaling om at stivheten bør være i område til prøvens stivhet. Det ble heller ikke her blitt gjennomført en analyse om hvilken stivhet som er best egnet for måling av elastisiteten til gjærceller. Dette ville for metoden benyttet være ekstra krevende da det ikke kan kontrolleres hvilken del av cellen som blir indentert. En slik undersøkelse ville derfor kreve et høyt antall målinger for å kunne sammenligne effektene av stivheten til fjæren.

Til tross for usikkerheten i en del parameters innflytelse på gjengivelse av den reelle elastisiteten til celleveggen til gjærceller, er allikevel AFM blitt benyttet for dette formålet i denne oppgaven. Resultatene vil til tross for usikkerheten kunne sammenlignes innbyrdes og til en viss grad kunne sammenlignes med de studier som har oppgitt like parametere.

### **8.1 Zetapotensial til gjærceller suspendert i ulike løsninger med eller uten kitosan**

Immobilisering av celler til overflater kan oppnås ved at det dannes interaksjoner mellom cellen og overflaten. For gjærceller er det funnet at interaksjon ved immobilisering foregår primært ved elektrostatiske interaksjoner(71). I denne oppgaven ble derfor gjærceller forsøkt immobilisert til positivt ladede overflater. Ved bruk av denne strategien vil vellykket immobilisering forutsette at overflaten av gjærcellene er tilstrekkelig negativt ladede. Bestemmelse av zetapotensialet til gjærcellene suspendert i YPD-media, MQ-vann HEPES- og MOPS-buffer ble derfor

utført. I tillegg ble bestemmelse av zetapotensial benyttet for å undersøke hvordan eksponering for kitosan påvirker gjærcellen.

Løsningene som ble benyttet til zetapotensialmålingene hadde varierende tetthet av celler. Siden det ble observert at forsøk utført på forskjellige dager fikk ulikt zetapotensial, ble det derfor undersøkt om konsentrasjonen av gjærceller hadde noe å si for utfallet av zetapotensialmålingene. Disse antagelsene viste seg å stemme. Høyere konsentrasjon av gjærceller ga høyere zetapotensial (Figur 7.2.4). Årsaken til en økning av zetapotensialet ved høyere konsentrasjon er usikkert. Det kan hende at de to høyeste konsentrasjonene som ble undersøkt ligger i sjiktet der målinger av zetapotensial med Zetasizeren blir upålitelig da det ble anbefalt av produsenten å benytte så vidt turbide løsninger(87) og disse ble observert til å være langt mer turbid enn det som ble benyttet ved de andre forsøkene utført i denne oppgaven. Det observeres allikevel et høyere zetapotensial ved høyere konsentrasjon av gjærceller for de resterende målingene i serien som antas å ikke være for konsentrerte for Zetasizeren. Forsøkene utført samme dag vil derimot kunne sammenlignes siden de ble utført med samme gjærkultur. Fra gjærkulturen ble det tatt ut like mengder volum for hvert forsøk. Det antas derfor at forskjellen i konsentrasjonen mellom forsøk utført samme dag er minimal.

Det ble gjennomført to serier med målinger av zetapotensial for å undersøke konsentrasjonen av gjærceller suspendert i løsning innvirkning på zetapotensialet. Den første serien (konsentrasjonsserie 1 i Figur 7.2.4) inneholdt to målinger, mens den andre inneholdt 6 målinger (konsentrasjonsserie 2 i Figur 7.2.4). Grunnen til at den første konsentrasjonsserien bare inkluderte to prøver var at denne serien egentlig bare var en utvidelse av undersøkelsene av zetapotensialet til gjærceller i MOPS-buffer ved ulik pH der målingene ble utført ved to ulike konsentrasjoner i stedet for å holde lik konsentrasjon på løsningene. Det bemerkes at selv om konsentrasjonsserie 2 viste en økning i zetapotensialet for løsninger med høyere konsentrasjon av gjærceller, så observeres det en mindre signifikant forskjell i konsentrasjonsserie 1. Innbyrdes i konsentrasjonsserie 2 kan det også observeres en mindre signifikant forskjell mellom løsninger som ikke har stor forskjell i konsentrasjon av gjærceller. Løsninger som har stor forskjell i konsentrasjon av gjærceller viser derimot

signifikant forskjell i zetapotensial. Det antas derfor at variasjon i zetapotensial med hensyn til konsentrasjon av gjærceller i løsning forekommer.

Ved sammenligning mellom konsentrasjonsserie 1 og 2 ble det observert at gjær i løsninger som har stått i ulik tid i MOPS-buffer før måling hadde ulikt zetapotensial. Begge konsentrasjonsseriene ble forberedt samtidig og det var opptil 1,5 timers forskjell fra første måling til siste måling ble gjennomført. Gjærcellene som hadde tilbrakt kortest tid i MOPS-bufferen før måling hadde lavere zetapotensial enn gjærcellene som hadde tilbrakt lenger tid i MOPS-bufferen. Ved fravær av næring er det lite sannsynlig at celledeling forekommer slik at den observerte økningen av zetapotensial i liten grad antas å være på grunn av dette. Det antas imidlertid at gjærcellene fortsatt kan være metabolsk aktive i suspendert i bufferløsningen. Dette kan gi grunnlag for frigivelse av avfallsstoffer fra gjærcellene som kan bidra til skjerming av de eksisterende gjærcellene og gi et økt zetapotensial. Cellefragmenter fra lyserte gjærceller kan også gi et bidrag til skjerming. Disse resultatene antyder nødvendigheten av å måle zetapotensialet raskt etter preparering av løsninger og behandle hver prøve likt med tanke på tidspunktet for måling etter preparering for gjær og mulig andre mikroorganismer.

En viktig parameter for bestemmelse av zetapotensial er løsningens pH. Dette er fordi partiklene som undersøkes vil bli utsatt for ulik grad av skjerming avhengig av hvilken pH løsningen har(87). Denne sammenhengen ble bekreftet ved sammenligning mellom zetapotensialet til gjærceller suspendert i buffer ved pH 7 og 6,5 samt utførelsen av en serie med måling av zetapotensialet til samme prøve gjærceller over et pH-intervall fra 3-9. Ut fra disse forsøkene ble det observert som forventet at zetapotensialet til gjærceller avtar ved en økning av pH. Ved pH 3 ble zetapotensialet til gjærceller funnet til å være noe positivt. Det er derimot vanskelig å definere det IEP på grunn av den store usikkerheten i måleserien utført ved pH 3,5. Årsaken til den store usikkerheten for denne måleserien er ikke kjent. Siden måleserien for pH 3,4 inkluderer en utligger som befant seg i området for zetapotensial til gjærcellene ved pH 3,7 kan det virke som at det har skjedd en feil i apparaturens funksjon. En slik feil ble derimot ikke observert noen annen gang i løpet av forsøket, men er allikevel den mest sannsynlige årsaken til utliggeren. Det er imidlertid klart at det IEP ligger mellom pH 3 og 4 og at zetapotensialet av gjærceller

i MQ-vann synker ganske raskt etter å ha passert IEP for deretter å ha en tilsynelatende grov lineær nedgang i zetapotensialet etter hvert som pH øker.

Det var ble også forsøkt å undersøke hvordan ionestyrken til løsningen påvirker zetapotensiale til de suspenderte cellene. Påvirkningen av ionestyrken til løsningen ble derimot ikke videre utforsket på grunn utfelling av en rosa substans ved måling av zetapotensialet til gjærceller suspendert i MOPS-buffer med NaCl. Siden det ikke ble dannet rosa felling i kontrollen med MOPS-buffer og NaCl antas det at gjærcellene var essensielle for den rosa fargen som ble oppnådd ved utfelling. Ut fra dette eksperimentet er kan det ikke spesifiseres ytterligere hva som var årsaken til den rosa fargen, men det antas at et av ionene har hatt innvirkninger på andre strukturer i gjærcellen som har ført til en farget utfelling.

En viktig observasjon som ble gjort ved bestemmelse av zetapotensial var innvirkningen av løsningen som gjærcellene var suspendert i på verdien av zetapotensialet. Gjærcellene ble funnet til å ha et høyere zetapotensial i YPD-media enn i MQ-vann og buffer. Det antas at en del av komponentene til YPD-media er positivt ladd og kan være med på å øke zetapotensialet ved assosiering med overflaten til gjærcellen som fører til skjerming av overflateladningen til gjærcellen. pH til mediet ble målt til å være 6 som vil si at den også bidrar til det høyere zetapotensialet i forhold til forsøkene gjort i buffer ved pH 6,5 og MQ-vann ved pH 5.

Både HEPES- og MOPS-buffer ble undersøkt i zetapotensialbestemmelse av gjærceller. For bufferne ble det funnet at gjærceller suspendert i HEPES-buffer hadde lavere zetapotensial enn gjærceller suspendert i MOPS-buffer. Dette indikerer at MOPS muligens skjærmer gjærcellene mer enn HEPES. HEPES-målingen ble gjort senere enn MOPS-målingene. Tiden tilbrakt i buffer har dermed ikke vært årsaken til denne forskjellen. Selv om HEPES-bufferen ikke ble testet for samme type tidsavhengige innvirkning på zetapotensialet som MOPS-bufferen antas det at denne effekten også vil være til stede for gjærceller i HEPES-buffer. Tiden tilbrakt i bufferne antas dermed å ha innvirket litt, men det er fortsatt en vesentlig forskjell mellom målingene. Forskjellen i zetapotensial for gjærcellene i bufferne antas derfor å være noe større enn målingen tilsier.

De aller fleste kitosaner er løselig ved pH 6(36). Ved tilsats av kitosan i YPD-mediet med pH 6 ble det imidlertid observert en hvit felling. Fellingen var kortvarig og ble antagelig suspendert i løsningen igjen. Dette var derfor en uforutsett hendelse, men kan fortsatt skyldes felling av kitosan etterfulgt av oppløsning eller suspensjon av fellingen. Ved måling av zetapotensial av gjærceller i YPD-media tilsatt kitosan ble zetapotensialet funnet til å være negativt for begge kitosanene. Det negative zetapotensialet var ikke forventet ut fra de elektrostatiske betraktninger med tanke på kitosans polykationkarakter og den registrerte negative overflaten til gjærcellene. Den forventede økningen i zetapotensial ble derimot funnet da zetapotensialet av gjærceller i MQ-vann tilsatt kitosan ble bestemt. Dette ga et positivt zetapotensial. I tillegg til at zetapotensialet ble funnet til å være negativt ga begge kitosanene en signifikant nedgang i gjærcellenes zetapotensial i YPD-media tilsatt kitosan sammenlignet med zetapotensialet til gjærceller i YPD-media uten kitosan tilsatt. Gjærceller i YPD-media med 94,4% deacetylerert kitosan ga lavere zetapotensial enn gjærceller i YPD-media med 66% deacetylering. Ut fra disse observasjonene kan det antas at kitosanene danner komplekser med negative partikler i YPD-media og kitosanet blir dermed utilgjengelig for assosiering med gjærcellene. Denne nedgangen antas å ha innvirkning på konsentrasjonen som er nødvendig for å observere en antimikrobiell effekt ved eksponering av mikroorganismer for kitosan(53).

Observasjonen av at det ble oppnådd lavere zetapotensial kan derfor komme av at færre partikler blir tilgjengelige for å skjerme gjærcellene. Negative partikler bør egentlig ikke gi et bidrag i skjerming av gjærcellene med tanke på at gjærcellens negativt ladde overflate skaper frastøtende elektrostatiske interaksjoner med negativt ladde partikler. Det kan imidlertid antas at assosiering av positivt ladde partikler til overflaten vil gi mulighet for assosiering av negativt ladde partikler til disse igjen. Dette kan dermed føre til en større skjerming av gjærcellene siden enda flere positive partikler kan danne en omslutning rundt gjærcellene når enkelte negative partikler legger seg imellom de positive ladde partiklene. Som en illustrasjon kan det tenkes at det dannes en lagvis assosiasjon med vekslende positive og negative partikler på gjærcellens overflate. Siden 94,4% deacetylerert kitosan har en større ladningstetthet enn 66% deacetylerert kitosan ved lik pH vil muligens 94,4% deacetylerert kitosan ha mulighet til å danne kompleks med flere partikler noe som kan forklare en enda mindre skjerming av gjærcellene. Det kan hende at kompleksdannelse og aggregering av har ført til mindre ideelle forhold for måling av zetapotensial. Miljøet til

gjærcellene vil derfor ha noe å si for effekten av kitosan. Ut fra ulike studier der kitosan blir testet kan det observeres at konsentrasjonen av kitosan som blir tilsatt og regnet som effektiv varierer mye. Disse studiene har valgt ulike typer media noe som ut fra zetapotensialmålingene gjennomført kan forklare de varierende resultatene. Hvorvidt antagelsene for årsaken til det negative zetapotensialet til gjærceller suspendert i YPD-media tilsatt kitosan stemmer bør belyses ved ytterligere eksperimenter, men det kan allikevel konkluderes ut fra resultatene fra denne og andre studier med at valg av media eller buffer i videre studier er viktig.

For å minimere sannsynligheten for felling av kitosan under forsøkene ble det ut fra observasjonene med felling og unormalt zetapotensial for gjærceller eksponert for kitosan i YPD-media nødvendig å benytte en buffer med en tilstrekkelig lav pH. Siden løseligheten ikke er blitt bestemt spesifikt for kitosanene benyttet i denne oppgaven ble utgangspunktet for pH-område valgt på bakgrunn av rapporterte verdier for kitosaner med tilsvarende AG i litteraturen(47). En Goods-buffer ble valgt siden Goods-buffere er blitt utviklet spesifikt for biologisk arbeid med liten innvirkning på biokjemiske reaksjoner og lav toksisitet(96, 97). MOPS-buffer egner seg til bruk fra pH 6,5-7,9(98), mens HEPES-buffer egner seg bedre til bruk ved pH 6,8-8,2(99). Derfor ble MOPS-buffer valgt til bruk i forsøkene med kitosan siden de fleste kitosaner er løselig ved pH 6,5. Det bemerkes at løseligheten til kitosan med AG på 1% ble i en studie funnet til å være lite løselig ved pH 6,5(47). Det ble imidlertid ikke observert store problemer med felling av kitosanet med AG på 5,6% i denne oppgaven.

Kitosan er polymerer som har mulighet for protonering av aminogruppen på C2-karbonatomet til GlcN(33). Derfor vil kitosan ha en positiv ladning ved sin  $pK_a$ -verdi.  $pK_a$ -verdien til kitosanene benyttet i denne oppgaven er ikke blitt bestemt, men det ble antatt ut fra litteraturen at kitosanene ville være positivt ladd ved pH 6,5(47). Zetapotensialmålingene av gjærceller i MOPS-buffer med kitosan viste at kitosan gjorde gjærcellene positivt ladet. En suspensjon av gjærceller tilsatt 66% deacetylert kitosan hadde lavere zetapotensial enn en suspensjon av gjærceller eksponert for 94,4% deacetylert kitosan. Effekten som kitosan har hatt på gjærcellens overflate stemmer derfor med det som kunne antas på forhånd, nemlig at det ville føre til et høyere zetapotensial på grunn av kitosans positive karakter. Gjærcellens negativt



ladde overflate tiltrekker kitosan via elektrostatiske krefter i så stor grad at overflaten til cellen blir dekket med disse polymerene og blir positivt ladd. Det at gjærcellen ender opp med å bli positivt ladd kan være et resultat av polymerenes lange kjeder. En del av kjeden er kanskje knyttet til overflaten, mens resten kanskje ligger lenger fra og er løsere assosiert med overflaten av gjærcellen. Det kan også forklares helt enkelt ved at pH på 6,5 ligger nær det området der kitosan begynner å felle(47) slik at det dannes et tykkere lag av kitosan rundt gjærcellen. Kitosanet med høyere grad av deacetylering ga et høyere zetapotensial. Dette kan være på grunn av at en kitosan med høyere grad av deacetylering vil ha en større ladningstetthet og dermed blir mer positivt ladd. I tillegg kan årsaken være at en mer deacetylert kitosan har mindre strukturelle hindringer i og med at det er færre acetylgrupper på monomerene. Dette kan gi en bedre tiltrekning til den negative overflaten til gjærcellen. Polymeren kan i tillegg ha større grad av kjede-kjede interaksjoner med ytterligere polymerer som ”feller” på gjæroverflaten noe som dermed gir et tykkere elektrisk dobbeltlag. 66% deacetylert kitosan har mye mindre grad av kjede-kjede interaksjoner og er derfor mer løselig ved pH 6,5. Prøvene gjort av gjærceller med kitosan i MQ-vann kan ikke sammenlignes direkte med prøvene utført med buffer siden disse prøvene ikke ble utført på samme dag. Ulikheter i konsentrasjon kan dermed være større. Forskjellen mellom zetapotensialet til de ulike kitosanene på prøvene i MQ-vann med pH 5 var derimot mye mindre enn for prøvene i buffer. Årsaken til dette kan være at ved lavere pH blir færre kjede-kjede interaksjoner siden kitosan blir bedre løselig i løsningen. Dette er fordi ladningstettheten blir høyere for begge kitosaner. De strukturelle hindringene til 66%deacetylert kitosan blir kanskje også mindre fremtredene som gir en bedre binding til gjærcellene og dermed likere zetapotensial. Usikkerheten i MQ-vann målingene var imidlertid ganske stor slik at forskjellen mellom virkningen av kitosanene ikke er signifikante.

## 8.2 Immobilisering av gjærceller på glassoverflate

AFM kraftroboten som ble benyttet i dette studiet var ikke tilknyttet et mikroskop. Dette gjorde at det ble stilt høye krav til preparering av prøvene. Siden det ikke kunne observeres hvor gjærcellene befant seg i forhold til indenteringsspissen ble det nødvendig å ha et tett immobilisert dekke av gjærceller på glassoverflaten for at målingene i høyest mulig grad ville treffe gjærcellene og ikke et tomt område på

glassoverflaten i WillCo-brønnen. Siden både glass(100) og gjærceller er negativt ladd ved pH-området benyttet var det nødvendig å behandle glassoverflatene med et kjemikalie for å fremme immobilisering av gjærcellene. PLL er et polykation som blir benyttet for immobilisering av blant annet bakterier(75, 83). Det ble derfor forsøkt å benytte PLL som immobiliseringsagent for gjærceller. Det ble også undersøkt om funksjonalisering av glassoverflaten med BSA ville hindre immobilisering av gjærceller.

De første forsøkene med funksjonalisering av glassoverflater med ulike kjemikalier for å fremme eller hindre immobilisering av gjærceller ble utført uten å kontrollere hvor stabil innbindingen av de immobiliserte cellene var til glassoverflaten. Dette ble i senere forsøk undersøkt ved å legge inn et vasketrinn, mer nøyaktig ble glassoverflatene med immobiliserte celler beveget frem og tilbake i en løsning av vann for å se hvor mye gjenværende gjærceller det var på glassoverflaten etter denne forsiktige vaskeprosedyren. Resultatene oppnådd i disse innledende forsøkene er derfor ikke vist i oppgaven, siden det er usikkert om disse prøvene vil gi samme resultat ved en innføring av skylling i forsøkene. Noen av disse forsøkene inkludert funksjonalisering av glassoverflater med BSA, PLL-hydrobromid og PLL-hydroklorid ble imidlertid gjentatt og viste tydelige forskjeller fra de første forsøkene. Forskjellene bestod av i hvilken grad gjærcellene ble immobilisert herunder hvor godt dekke av gjærceller som ble oppnådd og i hvilken grad gjærcellene viste mobilitet. Denne forskjellen kommer både av forskjellen ved å skylle prøvene fri for løse gjærceller før inspeksjon og det innførte steget med vasking av gjærcellene før påføring til den funksjonaliserte overflaten uten å være suspendert i YPD-media.

Inkubasjonstiden for å danne et PLL-lag på glassoverflaten var en av faktorene som ble undersøkt i de første forsøkene. Selv om det ikke ble gjort noen gjentagelse av dette forsøket ble allikevel den reduserte inkubasjonstiden på 10 min bekreftet. Dette på grunn av at de resterende forsøkene der prøvene ble skylt før inspeksjon viste et kontinuerlig dekke av gjærceller for PLL-funksjonaliserte glassoverflater i motsetning til ufunksjonaliserte glassoverflater som viste tilnærmet ingen immobilisering. Denne immobiliseringen av gjærceller bekreftet derfor at 10 min var tilstrekkelig for å oppnå et godt dekke av PLL for immobilisering av gjærceller.

Likeledes som at det kan være nyttig å immobilisere mikroorganismer kan det være nyttig å ha mulighet til å hindre immobilisering på deler av en overflate. Spesielt ved utforming av mikromatriser (engelsk microarrays) med mikroorganismer på glassoverflater. Det ble i denne oppgaven forsøkt å benytte BSA for å hindre immobilisering av gjærceller på en glassoverflate. Ut fra resultatene som ble oppnådd kan det imidlertid virke som at det under de eksperimentelle betingelsene benyttet i denne oppgaven ikke er nødvendig å tilføre et kjemikalium for å hindre immobilisering av gjærceller til en glassoverflate. Ved funksjonalisering av glassoverflaten med BSA for dette formålet ble det observert mer uønsket binding av gjærceller enn ved en ren glassoverflate. Dette bør riktignok bekreftes ved ytterligere forsøk.

Som tidligere nevnt var bestemmelse av zetapotensialet til gjærcellene nyttig for metodeutviklingen for immobilisering av gjærceller. Ved hjelp av resultatene fra zetapotensialmålingene ble altså metoden for immobiliseringen av gjærceller på glassoverflaten funnet. Det ble antatt at siden gjærcellene hadde lavere zetapotensial i buffer og MQ-vann så ville gjærcellene få bedre binding til en PLL-funksjonalisert glassoverflate hvis de ble påført suspendert i buffer eller MQ-vann. Dette ble bekreftet med et positivt utfall av immobiliseringen. Gjærcellene som ble påført suspendert i YPD-media ga et mer spredt dekke av gjærceller og hadde en viss bevegelighet ut fra det stedet de var festet til glassoverflaten der de beveget seg noe fram og tilbake på dette stedet. Gjærcellene som hadde blitt påført suspendert i buffer skapte et godt dekke av gjærceller og lå derimot helt ubevegelige på glassoverflaten, noe som er antatt å reflektere en sterkere innbinding til overflaten. En annen årsak til at det ble betraktelig mye bedre binding ved denne metoden kan være at gjærfragmentene i YPD media kan diffundere raskere til overflaten med PLL og hindre tilstrekkelig binding av gjærcellene til overflaten. Ved nærmere observasjoner av det immobiliserte laget med gjærceller påført suspendert i buffer ble det observert enkelte steder der det virket som om det var noen få celler som lå over noen av de andre cellene. Disse hadde en viss bevegelighet. Årsaken til at disse ble værende og ikke skylt vekk kan være at de er blitt knyttet til overflaten ved en PLL-kjede som strakk seg mellom noen gjær i det første laget. Det er også mulig at noen løsere bundne PLL-molekyler, som ikke hadde kontakt med glassoverflaten, kunne fungere som et bindingsledd mellom gjærceller på glassoverflaten og de enkelte gjærcellene

som ble funnet over laget av gjærcellene. Det ble også observert en forskjell i dekket mellom gjærceller suspendert i MOPS- og HEPES-buffer ved påføring. Det kunne se ut som om det var mer mellomrom og tomrom mellom de immobiliserte gjærcellene på overflater preparert ved suspensjon av gjærcellene i MOPS-bufferen. Dette kan være et resultat av en noe ujevn fordeling med pellet eller et resultat av høyere skjerming av gjærceller suspendert i MOPS-buffer som ble observert ved bestemmelse av zetapotensialet for gjærceller i buffer. Det kan også være en tilfeldig observasjon uten samsvar med resten av glassoverflaten siden det ikke ble undersøkt om denne forskjellen var konsekvent over en større del av prøveområdet.

Både bruk av 0,1% PLL-løsning, PLL-hydroklorid og PLL-hydrobromid for funksjonalisering av glassoverflaten ga immobilisering av gjærceller til denne. Av disse var det PLL-hydroklorid som viste svakest immobilisering av gjærceller. Denne observasjonen kan ha vært på grunn av en innledende kraftig skylling ved bruk av pipette etter immobilisering av gjærcellene som kan ha gjort gjærcellene mer mobile. Sammenlignet med gjærceller immobilisert ved hjelp av PLL og PLL-hydrobromid virket det allikevel som at det var lettere å løsne gjærcellene med strømminger for en PLL-hydrokloridfunksjonalisert glassoverflate. Observasjonene gjort i mikroskop viste en større mobilitet av gjærcellene immobilisert på en PLL-hydrokloridfunksjonalisert glassoverflate sammenlignet med glassoverflatene funksjonalisert med PLL og PLL-hydrobromid. Gjærcellene beveget seg i en viss grad i immobiliseringspunktet i tillegg til at laget med gjærceller var mer spredt fordelt på overflaten til glassoverflaten funksjonalisert med PLL-hydroklorid. Denne forskjellen mellom immobilisering på glassoverflater funksjonalisert med PLL-hydroklorid, 0,1% PLL og PLL-hydrobromid, kan skyldes ulik molekylvekt mellom disse. PLL-hydroklorid (15 000 Da) hadde en lavere molekylvekt enn både PLL (150 000 - 300 000 Da) og PLL-hydrobromid (300 000 Da). Lav molekylvekt og dermed kortere PLL-polymerer kan derfor se ut til å ikke være tilstrekkelig for immobilisering av gjærceller.

Til tross for en relativt liten ulikhet molekylvekt kunne det observeres enkelte forskjeller mellom gjærceller immobilisert på glassoverflater funksjonalisert med 0,1% PLL-løsning og PLL-hydrobromid. Glassoverflater funksjonalisert med PLL-hydrobromid ga noe mer bevegelse på gjærcellene og hadde flere løse gjærceller som

beveget seg over det immobiliserte laget i forhold til gjærceller immobilisert på en glassoverflate funksjonalisert med 0,1% PLL. Spredningen i oppgitt molekylvekt kan være en av årsakene til denne forskjellen. Der det blir antatt at PLL-hydroklorid har for korte polymerer for immobilisering kan det virke som om PLL-hydrobromid har større bevegelse grunnet lange polymerer. 0,1% PLL har derimot en bredere distribusjon av molekylvekt slik det vil være en mindre andel av de lengste polymerene og derfor færre gjærceller med en observerbar bevegelse. Et ytterlig bidrag til forskjellen mellom 0,1% PLL og PLL-hydrobromid kan komme av tilstedeværelse av bromidioner under funksjonaliseringen av glassoverflaten. En økt ionestyrke er vist til å endre konformasjonen til kationisk polyakrylamid adsorbent på glass(101). Ved en senkning av ionestyrken til løsningen som dekker en PLL-funksjonalisert overflate er det funnet at PLL-laget sveller(102). Ut fra disse studiene kan det antas at en slik svelling kan muligens være årsaken til den raskere immobilisering av bakterier og større antibakteriell effekt(83) ved at PLL-laget får en mer åpen konfigurasjon og mulig løse assosierte polymerer som i større grad kan omslutte bakteriene. Overført til denne oppgaven kan disse studiene gi grunnlag for en forståelse av forskjellen i mobiliteten observert mellom 0,1% PLL- og PLLhydrobromidfunksjonalisert overflate.

PLL-hydrobromidet benyttet har omtrent et bromidion per lysinmonomer(103). Grunnet lav ionestyrke på MOPS-bufferen samt en prosedyre der gjærcellene skylles for å fjerne overflødig gjærceller kan det antas at bromidionene til PLL-laget til en PLL-hydrobromidfunksjonalisert glassoverflate vil diffundere slik at PLL-laget sveller. Denne svellingen kan ha bidratt til en løsere konfigurasjon av PLL på glassoverflaten som kan være årsak til den observerte forskjellen i mobiliteten til de immobiliserte gjærcellene mellom en løsning av PLL og PLL-hydrobromid. Det er ikke kjent om den økte ionestyrken ved adsorbering, med en mulig annen konformasjon av PLL-laget sammenlignet med adsorbering ved lav ionestyrke, påvirker hvor mye PLL som adsorberes til overflaten. Om det skulle ha gitt en økning i adsorbent PLL er det mest sannsynlig det meste av dette skylles bort i vaskesteget i immobiliseringsprosedyren. Skaper det derimot tilstrekkelig med forbindelser mellom PLL-molekylene og gjærceller seg imellom eller mellom glassoverflate og gjærceller slik at de ikke forsvinner fra overflaten ved skylling kan det da bidra med den observerte økte mobiliteten. Det antas derimot at svellingen uansett mengde PLL i

forhold til glassoverflater funksjonalisert med PLL uten tilstedeværelse av bromidioner vil gi den observerte forskjellen i mobilitet til gjærcellene. Observasjonen av flere løse celler som fløt over det immobiliserte laget kan antas er på grunn av at svellingen gir større fleksibilitet i PLL-laget og at enkelte PLL-molekyler kan være løsere assosierte til glassoverflaten. Dette kan ha ført til at PLL-molekylene lettere kan dissosiere fra overflaten og binde sammen flere gjærceller i løsningen med eller uten noen forbindelse med det immobiliserte laget av gjærceller.

Årsaken til den observerte forskjellen i mobilitet for gjærceller immobilisert på en PLL- og PLL-hydrobromidfunksjonalisert glassoverflate kan altså være på grunn av både ulikheter i molekylvekt og en løsere konfigurasjon grunnet tilstedeværelse av bromidioner under funksjonaliseringen av glassoverflaten. Det kan også bemerkes at PLL-løsningen som hadde utløpsdato i 2007 hadde tilsvarende gode immobiliseringsegenskaper som PLL-hydrobromid.

Siden kitosan er en kationisk polymer i likhet med PLL og zetapotensialmålingene viste en positiv overflateladning av gjærceller eksponert for kitosan ble det forsøkt å se om gjærceller eksponert for kitosan ville feste seg til en ubehandlet glassoverflate. Resultatet viste ingen binding av gjærceller til overflaten. Dette kan være fordi kitosan har en større affinitet til gjærcellene enn glassoverflaten mulig på grunn av ulikheter i ladningstetthet. Dette fører til at grunnlaget for elektrostatisk interaksjon begrenses av arealet til den delen av gjærcellen som danner kontakt med glassoverflaten og at denne interaksjonen ikke er tilstrekkelig for immobilisering. Ved funksjonalisering av en glassoverflate med en polymer kan det tenkes at nærliggende polymerer kan bidra med interaksjoner ved at en ende av polymeren assosieres til glassoverflaten, mens den andre tilknyttes gjærcellen. Dette øker arealet som bidrar med elektrostatiske interaksjoner. Om kitosan har større affinitet til gjærcellens overflate enn glassoverflaten vil kitosanet i liten grad kunne fungere som et bindeledd mellom overflatene og dermed ikke bidra med økt kontaktareal mellom gjærcellene og glassoverflaten.

### 8.3 Morfologiske endringer til gjærceller ved tilsats av kitosan

Tidligere studier har det blitt observert morfologiske endringer til gjærceller ved eksponering av kitosan (Figur 4.1.1)(70). I denne oppgaven ble det undersøkt om en ved hjelp av mikroskopi kunne observere noen morfologiske endringer.

Kvantitativ fasekontrast mikroskopi viste seg å være et nyttig verktøy for å lettere observere spesifikke morfologiske endringer knyttet til endringer i høyden til mikroorganismen som studeres. Det ble derfor benyttet for å innhente informasjon om hvordan eksponering av gjærceller for kitosan påvirket høyden av gjærcellene. Etter tilsats av kitosan til en prøve med gjærceller tok det ca 5-10 minutter før endringer av høyden til gjærcellene kunne observeres. Det kunne se ut som at gjærcellene ikke lenger hadde en høy rund form. Formen hadde da skiftet til en mer flatere struktur og det kunne se ut som gjærcellene hadde ”kollapset”. Disse flatere strukturene kan observeres som grå sirkler i Figur 7.4.1 B og C og Figur 7.4.2 B og C. Denne ”kollapsen” ble observert ved tilsats av begge kitosanene, spesielt etter tilsats av 94,4% deacetyleret kitosan. I tillegg sedimenterte gjærcellene som var i løsningen for begge prøvene. Dette kan skyldes en naturlig sedimentering etter at tilsatsen av kitosan virvlet opp en del celler, men det er også en annen mulig effekt av kitosan. Da 66% deacetyleret kitosan ble tilsatt kunne det observeres store runde avtrykk med flere forsenkninger eller sorte hull i seg (Figur 7.4.1 C). Det er uklart hva disse avtrykkene representerer. Allikevel kan det konstateres at det ble observert en klar forskjell på hvordan de to versjonene for kitosan påvirket høyden og muligens formen på gjærcellene.

Det ble derimot ikke observert noen morfologiske endringer ved inspeksjon i vanlig fasekontrastmikroskopi. Dette kan være fordi oppløsningen ikke er tilstrekkelig, eller at det tar lenger tid før strukturelle endringer i celleveggen kan observeres. I tillegg kan det være på grunn av at konsentrasjonen av kitosan som ble tilsatt ved kvantitativ fasekontrast var større enn konsentrasjonen av kitosan tilsatt prøven for bruk i vanlig mikroskopi.

Videre forsøk med kvantitativ fasekontrast ble ikke utført siden instrumentet er i en innkjøringsfase ved universitetet.

## 8.4 Indentering og elastisitet

For å måle celleveggenes elastisitet ble det i denne oppgaven benyttet en AFM kraftrobot som ved hjelp av nanoindentering av celleveggen registrerte kraft mot avstandskurver som ble analysert for bestemmelse av Youngs modulus.

Nanoindenteringer ved AFM er gir en registrering av svært små endringer i kraft ved indentering, men er også svært sensitive for uregelmessigheter spesielt for partikler som flyter i løsning(89). Det ble derfor brukt tid på utvikling av metoden før det ble oppnådd gode kraft mot avstandskurver som kunne benyttes for bestemmelse av Youngs modulus.

### 8.4.1 Eliminering av støy i kraft mot avstandskurver

Ved måling av elastisiteten til gjærcellene ble det observert støy i kraft mot avstandskurvene i form av avbøyninger og relaksjoner av fjæren i områder der dette normalt sett ikke skulle inntreffe. Det ble derfor gjennomført en rekke forsøk for å kartlegge mulige påvirkninger til resultatene og for å finne den metoden som ga minst støyutslag i kraft mot avstandskurvene. Løse gjærceller ga store problemer under kraftmålingene. I begynnelsen skyldtes dette at gjærcellene løsnet fra overflaten ved endring av posisjonen til indenteringsspissen. Dette var både på grunn av svakere binding til glassoverflaten siden disse gjærcellene var påført suspendert i YPD-media og antagelig fordi det ikke var benyttet skylning etter immobilisering slik at gjærcellene lå i flere lag oppå hverandre. Etter at immobiliseringsmetoden ble funnet ble derimot WillCo-brønner med gjærceller skylt forsiktig med MOPS slik at det kun ble igjen ett enkelt lag med immobiliserte gjærceller. Dersom for mye strømminger påført det immobiliserte laget, for eksempel fra en pipette, kunne gjærcellene løsne fra overflaten. Det var derfor viktig å unngå dette ved tilsats av all væske i løpet av forsøkene. Ved påføring av gjærceller suspendert i litt buffer var det også viktig å unngå å dytte pipettespissen over overflaten for å spre den konsentrerte løsningen utover et større område av WillCobrønner siden det da skapte opp PLL-dekket og ga områder uten gjærceller. Dette ødela dermed det tette dekket av gjærceller og gjorde det mer vanskelig å finne et godt område for indenteringsforsøk med kraftroboten.

Utfellingen av kitosan i YPD-mediet skapte støy i kraft mot avstandskurvene i form av blant annet regelmessige svingninger mulig på grunn av avbøyning og følgende



relaksering av fjæren eller partikler som passerer laserstrålen (Figur 7.5.3 B). For å minske problemet ble derfor MOPS-buffer tatt i bruk som væske under målingene. Ved tilsats av 94,4% deacetylerert kitosan i MOPS-buffer ble det også observert svingninger i kraftmålingene ved enkelte anledninger. Dette burde undersøkes nærmere siden det ikke var tilstrekkelig med tid for utprøvinger av dette i denne masteroppgaven. En mulig forklaring er at den høye graden av deacetylering gir muligheter for at kitosanet kan få gjærcellene til å løsne helt fra overflaten. Siden løseligheten av 94,4% deacetylerert kitosan ved pH 6,5 kan være begrenset(47) er det mulig at kitosanet feller og danner større strukturer ved hjelp av kjede-kjedeinteraksjoner som gir grunnlag for støy. Det kan også hende at fjæren som spissen er heftet til i AFM mikroskopet hadde løsnet og selv var årsak til svingningene. Dette bør undersøkes nærmere ved flere forsøk der spesielt pH til bufferen bør undersøkes.

#### 8.4.2 Utregning av Youngs modulus

Youngs modulus ble i denne oppgaven bestemt ved å analysere kraft mot avstandskurvene ved hjelp av programvaren JPK ForceRobot 300 Control Software v.4.2.50. Det ble i ettertid oppdaget at metoden benyttet for analysering av indenteringskurvene ikke var optimal. Hertz-Sneddon-modellen benytter seg av dybden som indenteringsspissen trenger ned i prøven med. Høyden som ble benyttet (height (smoothed and measured)) var derimot den totale høyden av fjærens forflytning inkludert høyden der fjæren ble avbøyd. For å få den rette høyden skulle det ha blitt benyttet en funksjon i programvaren som sørger for separering av høyden tilknyttet avbøyningen til fjæren (tip sample separation) fra den registrerte høyden(93). Resultatene for Youngs modulus viser derfor en lavere verdi enn det en riktig beregning ville gitt.

Ved utregning av Youngs modulus for prøvene ble det stilt noen krav til kraft mot avstandskurven. Indenteringskurven tolkes som tidligere omtalt i Seksjon 7.5 fra høyre mot venstre etter hvor fjæren henholdsvis starter og slutter sin bevegelse i retning mot overflaten som indenteres. Blant annet ble kurver som viste uregelmessige svingninger eller ”topper” ikke tatt med i den videre analysen (Figur 7.5.3 D), spesielt etter kontaktpunktet. Disse toppene i stigningskurven gjenspeiler en delvis relaksjon av fjæren ved indentering. Årsakene til de delvise relaksjonene av

fjæren ved indentering av gjærcellen er uklart. En mulighet er at indenteringsspissen har truffet et punkt der det har ligget en noe stivere struktur som etter en viss påført kraft har blitt dyttet til side. For celler uten cellevegg er dette et kjent tilfelle der ulike organeller, som for eksempel cellekjernen, blir dyttet til siden av indenteringsspissen(93). Youngs modulus vil i det tilfellet bli beregnet med en ukjent uregelmessighet. En kontinuerlig avbøyning av fjæren ble derfor foretrukket og målinger som viste uregelmessigheter ble ekskludert. Dette gjorde at antall målinger for analyse ble redusert i forhold til antall målinger utført. Det ble utført nøyere undersøkelser av en del kurver under utvelgelsen. Da ble det observert at selv om det ved iakttagelse av den fullstendige kurven så ut som det ikke fantes slike uregelmessigheter, så kunne de observeres ved forstørring av området rundt stigningskurven. Det antas derfor at en del av disse kurvene ble inkludert i analysen. Disse toppene kan derfor ha bidratt med uregelmessigheter i utregnet Youngs modulus i liten eller stor grad.

Under målingene og under arbeidet med analysen av kraft mot avstandskurvene ble det for enkelte kurver observert at stigningen i kraften som følge av motstand like etter kontaktpunktet var lav over en viss avstand før stigningen ble større. Ved utvelgelsen av kurver for beregning av Youngs modulus ble enkelte av disse kurvene undersøkt nærmere. Det ble observert at tilpasningen for utregning av Youngs modulus ikke alltid fulgte stigningen over hele kurven. For eksempel kunne det observeres at tilpasningen henviste til et annet kontaktpunkt enn kontaktpunktet til den virkelige kurven. I dette tilfellet ville tilpasningen ligge under den virkelige kurven i begynnelsen ved kontaktpunktet for deretter å følge stigningen bedre mot slutten av indenteringskurven. Dette gjaldt også for de kurvene som ble funnet til å være godt tilpasset den største stigningen av kurven (Figur 7.5.1: En Hertz-Sneddon-tilpasset kraftkurve (grønn linje) for bestemmelse av Youngs modulus til en nanoindentering av en gjærcelle. Hertz-Sneddon-tilpasningen er utført på den røde kurven som representerer utstrekningen av fjæren ved nanoindenteringen. Den brune kurven representerer fjærens tilbaketrekning ved nanoindenteringen. De striplede linjene krysser ved kontaktpunktet programvaren har funnet. De to kraftkurvene er den samme, der en er forstørret (B) og en er ikke forstørret (A)). Disse observasjonene gir et inntrykk at målingene har registrert ulik elastisitet ved kontaktpunktet og lengre inn ved indenteringen, med en indentering av en mykere

struktur etter kontaktpunkt før en stivere struktur blir registrert. For de kurvene som ble studert nærmere ble det derfor forsøkt å få en bedre tilpasning av Youngs modulus som gjenspeilet den delen av kurven med høyest stigningstall altså delen som kom etter den mykere starten. De kurvene som hadde et tydelig skille med knekkpunkt i kurven for to ulike elastisiteter ble derimot forkastet (Figur 7.5.3 C).

Et overslag over lengden på indenteringsdybden der den mykere delen ble registrert varierte fra 200 nm – 500 nm. Noen av de mykere delene ved kontaktpunktet var heller ikke like tydelig (Figur 7.5.2 C). Siden indenteringsdybden som regel lå rundt 500nm for alle kurver er det rimelig å anta at den mykere delen har ført til registrering av lavere verdier for Youngs modulus. Det kunne også observeres at enkelte kurver bare hadde én elastisitet uten et tydelig skille mellom to strukturer med ulik elastisitet (knekkpunkt) eller noen form for utydelig kontaktpunkt (Figur 7.5.2 A og B). Disse kurvene ble ikke ekskludert fra beregningene. På grunn av dette og siden ikke alle kurvene fikk en individuell vurdering og ble tilpasset etter den minst elastiske delen av indenteringskurven, er det sannsynlig at dette er en vesentlig feilkilde for resultatet. Det er derfor rimelig å anta at verdien for Youngs modulus, både observert for *S. cerevisiae* med og uten eksponering for kitosan, som ligger i det lave sjiktet fra 186 Pa er en konsekvens av beregninger av Youngs modulus for den første mykere delen eller sterkt påvirket av denne delen.

Tykkelsen på celleveggen til *S. cerevisiae* er målt til å ligge rundt 100 nm(59). Det er derfor uklart avbøyningen av fjæren hva denne første mykere strukturen er siden celleveggenes tykkelse er langt mindre enn den indenteringsdybden som er blitt registrert for den mykere strukturen som er funnet. Det kan ut fra dette antas at det finnes en annen struktur som omslutter gjærcellen og som indenteringsspiessen treffer før den får kontakt med celleveggen. Det kan hende at det er en effekt av et mulig PLL-lag som kan ha lagt seg rundt gjærcellen, men siden det rapporteres om et svært tynt PLL-lag på en behandlet overflate(81) så antas det at dette ikke gir grunnlag for denne mykere strukturen. Siden en kjegleformet spiss ble benyttet burde det også være relativt små bidrag fra eventuelle ekstracellulære strukturer, som er vanligere å ha ved bruk av sfærisk spiss(93). Det er derfor vanskelig å si hva denne strukturen kan være. En annen forklaring kan være at celleveggen oppfører seg på en spesiell måte ved indentering med en kjegleformet spiss. Spiessen kan kanskje fange opp en

lokal fleksibilitet av celleveggen. Det kan da bli en lokal forsenkning av celleveggen der spissen trykker, inntil fleksibiliteten ikke kan økes ytterligere. Deretter ”drar” spissen med seg resten av celleveggen og en får registreringer av hvordan celleveggen fungerer som en helhet. Den myke delen av kraft avstandskurvene kan i tillegg være et resultat av hvilket punkt på cellen som indenteringspissen treffer. Siden det ikke har vært mulig å observere hvor indenteringen finner sted på gjærcellen kan det hende at den mykere delen kommer av indenteringer som ikke er sentrert i midten av gjærcellene. Hvis indenteringsspissen har truffet på siden av gjærcellen der overflaten ikke danner en perpendikulær kontaktvinkel med indenteringsspissen kan den myke delen kanskje representere at en del av veggen glir unna før en forsenkning i celleveggen oppnås. Siden gjærcellene er immobiliserte vil denne måten veggen glir unna på i bunn og grunn igjen kunne tilskrives veggens elastisitet noe som kompliserer hypotesens validitet. Tidligere tilsvarende studier for *S. cerevisiae* har ikke beskrevet indenteringskurvene oppnådd. I samtaler med Etienne Dague(104) bekreftes det at lignende oppførsel blitt ble observert i deres AFM baserte studier av *S. cerevisiae*. Dague og samarbeidspartnere benyttet imidlertid en AFM som var kombinert med et lysmikroskop, og dette muliggjorde å sørge for at alle indenteringer ble utført på et punkt sentrert i midten av gjærcellene. Det eksisterer heller så langt forfatteren av denne teksten er kjent med ingen tidligere publiserte studier hvor sfæriske spisser er tatt i bruk for bestemmelse av Youngs modulus for *S. cerevisiae*. En sammenligning med slike studier kunne kanskje kunne gitt bedre innsikt i egenskapene til den mykere delen. Det er derfor vanskelig å si om lokal fleksibilitet av celleveggen er en mulig forklaring i stedet for antagelsen om tilstedeværelsen av en ekstracellulær struktur.

#### 8.4.3 Forskjell i Youngs modulus mellom en glassoverflate med eller uten et dekke av immobiliserte gjærceller

Siden det ikke var tilknyttet mikroskop til kraftroboten under utførelsen av denne oppgaven var det viktig å vite om en måling utført på immobiliserte gjærceller virkelig beskrev en gjærcele og ikke et punkt av overflaten som bare beskrev en PLL-dekket overflate. Det ble derfor gjennomført indenteringer av glassoverflater funksjonalisert med PLL uten gjærceller dekket med enten MOPS-buffer eller MQ-vann. Resultatene av disse kraftmålingene viste et skille mellom en PLL-

funksjonalisert overflate uten gjærceller og en PLL-funksjonalisert overflate med gjærceller (Figur 7.5.4). Gjennomsnittsverdien av Youngs modulus til gjærcellene er lav noe som indikerer en mykere overflate, mens PLL-behandlede overflater uten gjær gir høyere gjennomsnittsverdier av Youngs modulus som indikerer en hardere overflate (Tabell 7.5.1). Forskjellen i Youngs modulus var høyest mellom gjærceller ( $72\pm 58$  kPa) og en PLL-funksjonalisert glassoverflate dekket med MQ-vann ( $1\ 531\pm 237$  kPa). En MOPS-dekket PLL-funksjonalisert glassoverflate har en noe lavere Youngs modulus som ligger nærere Youngs modulus for gjærceller. Til tross for at spredningen av verdiene gir noe overlapp er det fortsatt et skille mellom Youngs modulus til gjærcellene og en PLL-funksjonalisert overflate dekket med MOPS-buffer gjenspeilet av forskjellen i den gjennomsnittsverdien av Youngs modulus på henholdsvis  $72\pm 58$  kPa og  $252\pm 52$  kPa.

Den observerte forskjellen mellom en PLL-funksjonalisert overflate dekket med enten MOPS-buffer eller MQ-vann kan være på grunn av forskjellen i pH mellom MQ-vann og MOPS-buffer, som igjen kan ha innvirket på konformasjonen av PLL-polymerene. Tykkelsen av laget dannet ved forskjellige adsorberte polyelektrolytter inkludert PLL er vist til å variere ved utskiftninger av pH. Dette blir forklart ved endringene de elektrostatiske interaksjonene til polyelektrolyttene ved ulike pH(77, 102).

Ladningstetthet til PLL øker ved lavere pH noe som kan skape større intramolekylær repulsjon slik at PLL-kjedene kan få en mer utstrakt konformasjon(77). Ved høyere pH er det derimot mindre grad av intramolekylær repulsjon slik at PLL-polymerene danner et tettere lag. Foruten dette er det vist at pH nær IEP til overflaten gir et mindre homogent PLL-lag(81). IEP til borosilikatglass er 3,6(100). I dette forsøket hadde MQ-vann pH 5, mens MOPS-buffer hadde pH 6,5. PLL-laget i MQ-vann kan derfor være mer utstrakt og har kanskje et lite bidrag fra et mer heterogent dekke som gjør at indenteringsspissen lettere passerer mellom PLL-polymerene. Dette kan dermed føre til at PLL-laget gir en mindre innvirkning på målingen av Youngs modulus og det registreres en høy verdi av Youngs modulus som beskriver en hard overflate. For PLL-laget dekket av MOPS buffer vil PLL-laget være mer kompakt og ikke være preget av noen heterogenitet i laget. Derfor kan det antas at indenteringsspissen i mindre grad unngår effekter av PLL-laget og registrerer en mykere overflate. Denne mulige forskjellen i tetthet og heterogenitet i PLL-laget kan være med på å forklare at PLL-laget dekket av MQ-vann viser større spredning i

Youngs Modulus enn PLL-laget dekket av MOPS-buffer. Et annet bidrag til den høyere elastisiteten til PLL-laget dekket med MOPS-buffer kan være på grunn av MOPS. Ved observasjon av strekkkurvene for PLL-laget dekket av MOPS-buffer og MQ-vann ble det observert færre strekkprofiler til PLL for PLL-funksjonaliserte glassoverflater dekket av MOPS-buffer sammenlignet med MQ-vann. Den høyere graden av skjerming ved måling av zetapotensialet av gjærceller suspendert i MOPS-buffer sammenlignet med HEPES-buffer underbygger denne hypotesen. Det kan derfor hende at MOPS-buffers amfolyttegenskaper gir en viss tilknytning til glassoverflaten og PLL-laget som er med på å senke Youngs modulus sammenlignet med Youngs modulus til PLL-funksjonaliserte glassoverflater dekket av MQ-vann. Forskjellen i Youngs modulus til et PLL-lag dekket av MOPS-buffer og MQ-vann kan derfor komme av både ulikheter i pH som gir ulikheter i konformasjon og tetthet i laget samt innvirkninger av MOPS-molekyler i løsningen. For å få et enda klarere skille mellom Youngs modulus til gjærceller og PLL-funksjonaliserte glassoverflater bør flere forsøk gjennomføres for å avklare bufferens påvirkninger til Youngs modulus.

#### 8.4.4 Youngs modulus for gjærceller

For å kunne undersøke hvordan kitosan påvirker celleveggenes elastisitet var det nødvendig å beskrive celleveggenes elastisitet uten nærvær av kitosan. Indentering av immobiliserte gjærceller dekket av MOPS-buffer ble derfor gjennomført. Analysing av indenteringskurvene viste at gjær uten tilsats av kitosan ga en Youngs modulus som strakk seg fra 0,186 kPa til 214,673 kPa. Dette er lavt sammenlignet med hovedvekten av andre studier der celleveggenes elastisitet er studert for *S. cerevisiae*. Resultatene oppnådd i denne oppgaven tenderer allikevel mot resultatene utført av Bui *et.al.*(64). Disse registrerer en Youngs modulus på 0,15MPa – 0,24MPa. Det er allikevel bemerkelsesverdig at det i denne oppgaven er registrert en stor andel gjærceller med svært lav elastisitet. Foruten de mulige årsakene beskrevet i Seksjon 8.4.2 kan dette komme av at gjærcellene var behandlet på ulik måte før forsøkene ble gjennomført. På et tidspunkt ble det observert at agaren på petriskålen med gjær der gjærkolonier ble hentet til kultivering hadde til en viss grad tørket inn. I tillegg ble det observert dårlig vekst ved kultivering. Da det ikke fantes noen andre plater med gjær for bruk ble allikevel gjæren benyttet for målinger inntil det ble anskaffet nye

gjærceller. Disse forholdene kan ha hatt en innvirkning på gjærcellens elastisitet og dermed bidratt til å gi svært lave verdier for Youngs modulus sammenlignet med tidligere studier.

Noe annet som er viktig å bemerke ved sammenligning av resultatene i denne oppgaven med andre studier er forskjellen i metoden benyttet i hver av studiene. Dessverre er ikke alle parametere for eksperimentene spesifisert i artiklene. Den generelle metoden for immobilisering er beskrevet, men det finnes mangler i informasjonen om hvilke parametere som er benyttet under indenteringsmålingene. Manglene spenner seg fra hvilken pH som er benyttet(62, 63, 65) til indenteringshastigheten(59-62). pH er en spesielt viktig parameter å oppgi siden vekst ved ulik pH gir en ulik sammensetning av celleveggen(23). Det kan dermed antas med rimelig sikkerhet pH har innvirkning på elastisiteten. De få studier oppgir pH(59, 60, 64) begrenser det muligheten for å kunne sammenligne resultatene. Hyperosmotiske løsninger er også vist til å ha stor innvirkning på gjærcellers volum(26) og dermed muligens elastisiteten til celleveggen. Ut fra de parameterne som blir oppgitt kan en derfor nærmest utelukke de som ikke oppgir pH eller har ulik saltkonsentrasjon på løsningen.

Ut fra studien til Bui *et.al.*(64) viser resultatene at valg av parametere for løsningen er viktige. Bui *et.al.* utførte målinger av *S. cerevisiae* i ionefritt vann ved pH 6,9 og i PBS ved pH 7,4. Gjærcellene i ionefritt vann ble registrert til å ha lavere Youngs modulus enn gjærcellene i PBS. Den lavere verdien kan både være på grunn av pH og effekten av forskjellen på sammensetningen av væskene. Hvis det antas at forskjell på sammensetningen av væskene i liten grad står for denne effekten kan det være interessant å sammenligne resultatene med resultatene oppnådd i denne oppgaven. Gjennomsnittsverdien for Youngs modulus ble i denne oppgaven funnet til å være  $72 \pm 58$  kPa. For ionefritt vann og PBS ble gjennomsnittet oppgitt til henholdsvis 150 kPa og 240 kPa. Det kan derfor virke som om pH elastisiteten kan ha en lineær innvirkning på elastisiteten. I en studie utført av Schiavone *et.al.*(59) ble måling av elastisiteten foretatt ved pH 5,5 i acetatbuffer. Resultatene fra deres målinger viser derimot en elastisitet på 673,9 kPa. Dette bryter derfor med at det kan være en lineær sammenheng mellom pH og elastisitet. Det kan bemerkes at kultivering ved ulik pH ikke har vist en lineær sammenheng mellom pH på mediet og celleveggen

sammensetning(23). Dette sammenfaller godt med indisiene fra hittil publiserte artikler om måling av elastisitet til *S. cerevisiae* selv om det ikke kan trekkes konklusjoner uten å utføre en studie med bedre kontrollert sammenligning. En annen studie av Dague *et.al.*(60) viser nemlig en Youngs modulus som varierer fra 158 til 429 kPa for 5 individuelle gjærceller dekket av acetatbuffer med pH 5,5. Dette er riktignok et lite antall gjærceller, men kan gi grunnlag for indikasjon av trender. Årsaken til disse forskjellene kan komme av andre parametere for forsøket. Om fjærkonstanten kan ha en innvirkning på målingene er det for eksempel blitt benyttet fjær med ulik fjærkonstant i alle de nevnte studiene i dette avsnittet. Dette illustrerer vanskeligheten med å sammenligne resultatene fra de ulike studiene som er funnet.

#### **8.4.4.1 Innvirkninger av immobiliseringsmetode**

PLL er vist til å ha en viss antimikrobiell aktivitet. Dette kan være en av årsakene til at verdiene for Youngs modulus er lave. Sammenlignet med EPL er riktignok den antimikrobielle aktiviteten til PLL lavere(76). Når PLL heller ikke ligger løst i løsningen, men er festet til en glassoverflate vil arealet av gjærcellen som har kontakt med PLL være lavere enn i tidligere studier og vil dermed påvirke gjærcellen mindre og kanskje på en noe annen måte enn normalt. Det er imidlertid mulig at PLL-laget ved kontakt med gjærcellene vil endre konformiteten ved å legge polymerkjedene rundt gjærcellen og dermed gi større innvirkning på gjærcellen. Hvorvidt og i hvor stor grad dette har hatt innvirkning på elastisiteten er vanskelig trekke slutninger om siden det ikke foreligger mange målinger av elastisiteten av *S. cerevisiae* i litteraturen og det er som nevnt vanskelig å sammenligne resultatene i denne oppgaven med de andre studiene.

Det er imidlertid blitt gjennomført studier der den antimikrobielle virkningen av en PLL-dekket overflate på immobiliserte *E. coli* er blitt studert. I disse studiene er det vist at det var en observerbar forskjell på *E. coli* tilknyttet PLL i forhold til kontrollen(75, 83). Det var riktignok en større og tydeligere antibakteriell effekt når det ble benyttet et tykt lag med PLL som ofte er nødvendig ved immobilisering av *E. coli*. Allikevel ble det registrert en forskjell også med de tynne lagene.

Konsentrasjonen av PLL som ble benyttet for å lage PLL-dekket overflate var 0,01% (w/v) og molekylvekten var 70-150 kDa(83). Dette er lavere verdier enn det som er



benyttet i denne oppgaven. Påføringen av PLL i denne oppgaven tilsvarer den metoden som ble brukt i nevnt studie for dannelse av et tynt lag PLL. Siden laget med PLL er tynt og det for EPL er bekreftet en langt høyere MIK for *S. cerevisiae* sammenlignet med *E. coli* og igjen en lavere antimikrobiell aktivitet av PLL sammenlignet med EPL(83), er det rimelig å anta at det kan være påvirkninger av PLL-laget på målt elastisitet, men at disse også mest sannsynlig er små.

#### 8.4.4.2 Variasjon i elastisitet

Som tidligere nevnt varierte verdien av Youngs modulus for gjærceller fra 0,186 kPa til 214,673 kPa. Variasjonen i elastisiteten kan foruten allerede beskrevne årsaker være et resultat av heterogenitet mellom gjærcellene i kulturen samt variasjoner i elastisitet på celleveggen ulike strukturer. Knoppskytingsarr er vist til å ha en lavere elastisitet en resterende deler av celleveggen til gjær(63, 65). Om organeller eller andre cellulære strukturer ligger i nærheten av celleveggen kan dette bidra med variasjonen ytterligere(93). Andre variasjoner i strukturen av celleveggen og hvor indenteringsspissen treffer gjærcellen kan også ha bidratt med variasjonen. Siden det i disse forsøkene ikke har vært mulig å observere hvor indenteringsspissen treffer på gjærcellens overflate er det sannsynlig at en del av den store spredningen har sin årsak i den tilfeldige målingen av elastisiteten i eller i nærheten av knoppskytingsarr. Under mikroskopi av gjærcellene ble det også observert at til tross for at kulturen var kommet i stabil fase med tilnærmet uendret konsentrasjon av gjærceller var det allikevel en del knoppskyttende gjær i kulturen. Dette kan også ha bidratt til den store spredningen i målt elastisitet.

#### 8.4.5 Hvordan tilsats av kitosan påvirket elastisiteten til gjærcellene

Sentralt for denne oppgaven var å undersøke hvordan tilstedeværelse av kitosan påvirker celleveggen elastisitet til *S. cerevisiae*. Det ble derfor tilsatt kitosan til prøvene av gjærceller som allerede hadde blitt benyttet for bestemmelse av celleveggen elastisitet uten eksponering for kitosan. Både 66% og 94,4% deacetyleret kitosan ble benyttet. Forskjellene på målingene av gjær med og uten tilsats av kitosan er uklart. Tallgrunnlaget for spesielt 94,4% deacetyleret kitosan er knapt og det er dermed vanskelig å trekke konklusjoner på effekten av 94,4% deacetyleret kitosan på elastisiteten til gjærceller. For 66% deacetyleret kitosan er det et noe bedre grunnlag,

men fortsatt vil et lavt antall målinger gjøre det vanskelig å si noe konkret. Ut fra en sammenligning av gjennomsnittsverdien av Youngs modulus (Tabell 7.5.1) kan det se ut som at tilsats av 66% deacetyleret kitosan har gjort gjærens cellevegg mer elastisk da Youngs modulus ble bestemt til å være  $72\pm 58$  kPa og  $46\pm 42$  kPa for henholdsvis ueksponerte og eksponerte gjærcele.

Mekanismen for en økt elastisitet til gjærcellens cellevegg ved eksponering for kitosan kan ikke direkte konkluderes ut fra arbeidet utført i denne oppgaven. Det er i litteraturen indikert at plasmamembranen er det primære målet til kitosan(52, 58). En studie viser at plasmamembranedeformering er årsaken til at celleveggen til *S. cerevisiae* blir mykere ved etanolstress(59). Det er også vist en sammenheng mellom fluiditeten til plasmamembranen og resistens mot kitosan. I den studien antydes det at kitosans penetrering av plasmamembranen tar utgangspunkt i bindinger til de negativt ladde hodene på fosfolipider og danner en stiv struktur som vil øke forskjellen i fluiditet på ulike områder av plasmamembranen(58). Dette kan kanskje føre til en utstrekning av plasmamembranen som kan knyttes til en lavere stivhet i celleveggen slik som ble observert i studien der celleveggenes elastisitet ble undersøkt ved eksponering for etanol(59). Derfor kan indikasjonene funnet i denne oppgaven virke sannsynlige ut fra den informasjonen som til nå er kjent om virkningen av kitosan. I tillegg støtter resultatene fra kvantitativ fasekontrast hypotesen om at elastisiteten øker siden det kunne se ut som at formen til gjærcellene kollapset. Det kan derfor hende at kitosan påvirker de formdannende komponentene til gjærcellens cellevegg eller virker indirekte ved interaksjon med plasmamembranen.

En effekt av PLL på elastisiteten er som tidligere beskrevet mulig, men minimal. Derimot er det blitt vist at en protein-polysakkarid konjugering av EPL og kitosan har større antimikrobiell effekt enn kitosan alene mot ølgjær(105). Om det kan være en lignende effekt mellom en PLL-dekket overflate og kitosan er ikke blitt undersøkt. Det er imidlertid mulig at de kan ha en synergistisk effekt. PLL-dekket kan ha en viss utstrekning rundt gjærcellen. Det ble i denne metoden ikke utført skylling av PLL-laget før immobilisering. Derfor kan det være en større andel løse bundne PLL-molekyler tilstede i det ytre laget, som ikke har direkte kontakt med overflaten, enn om det hadde blitt utført skylling før immobilisering. Disse løst assosierte PLL-ene har da større mulighet for å dissosiere seg fra overflaten og heller legge seg rundt

gjærcellene. Når kitosan tilsettes kan da enten PLL og kitosan virke synergisk eller kompetitivt. Om PLL ikke har nøyaktig de samme målene som kitosan kan PLL og kitosan utfylle hverandre og antagelig gi en sterkere antimikrobiell effekt. Det kan også bli en økt antimikrobiell effekt selv om målene er de samme, ved at konsentrasjonen blir høyere enn normalt. Dette vil sannsynligvis ikke kunne registreres ved måling av elasticitet siden kontrollen muligens allerede er påvirket av PLL fra før av. Om det er konkurrerende krefter vil den som har høyest affinitet til målet fortrenge den andre. Da vil sannsynligvis elasticitetsmålingene ha en liten feilmargin som kommer an på PLLs påvirkninger på gjærcellen før tilsetning av kitosan. Som tidligere beskrevet så er det heller rimelig å anta at bidraget fra PLL til antimikrobiell effekt er minimal.

## 9 Konklusjon

Det ble i denne oppgaven undersøkt hvordan kitosan påvirker *S. cerevisiae*. For dette arbeidet ble det utviklet en metode for immobilisering av *S. cerevisiae* til funksjonaliserte overflater slik at undersøkelser av endringer i celleveggen elastisitet kunne bestemmes ved nanoindenteringer av celleveggen med AFM.

Som et ledd i metodeutviklingen for immobilisering av gjærceller til en glassoverflate ble zetapotensialet til gjærceller i ulike system bestemt. Zetapotensialet til gjærceller ble funnet til å være negativt i YPD-media, MQ-vann, HEPES- og MOPS-buffer. IEP til gjærceller suspendert i MQ-vann ble funnet til å ligge mellom pH 3 og 4.

Gjærceller suspendert i YPD-media viste en høyere verdi for zetapotensialet enn for gjærceller suspendert i MQ-vann, HEPES- og MOPS-buffer. Dette indikerer en større skjerming av gjærcellene i YPD-media sammenlignet med MQ-vann, HEPES- og MOPS-buffer. Skjermingsforskjellen mellom bufferne benyttet i oppgaven viste at MOPS-buffer skjærmer gjærcellene mer enn HEPES-buffer da zetapotensialet til gjærcellene var høyere i MOPS-buffer enn HEPES-buffer. Foruten dette ble det funnet en mulig sammenheng mellom konsentrasjonen av gjærceller i løsning og zetapotensialet. En høyere konsentrasjon av gjærceller ble vist til å gi et høyere zetapotensial, men årsaken til denne observasjonen ble ikke undersøkt. Det ble også oppdaget en indikasjon på at zetapotensialet til en prøve med gjærceller kan øke over tid. Denne observasjonen kan muligens forklares ved lysering av celler og dermed frigivelse av cellefragment som innvirker på de resterende cellenes zetapotensial. Ut fra disse observasjonene kan det konkluderes at ved måling av zetapotensial for gjærceller og mulig andre levende mikroorganismer er det nødvendig å behandle alle prøvene likt under utførelsen av eksperimentene.

Bestemmelse av zetapotensial ble i tillegg benyttet for å undersøke effekter av kitosan på gjærcellene. Det ble funnet at tilsatts av kitosan til en suspensjon av gjærceller i MQ-vann viste en signifikant økning av zetapotensialet fra en negativ til en positiv verdi sammenlignet med ueksponerte gjærceller. Et viktig funn ved måling av zetapotensialet for gjærceller suspendert i YPD-media tilsatt kitosan var at det ble en nedgang i zetapotensialet til gjærcellene sammenlignet med gjærceller suspendert i YPD-media uten tilsatt av kitosan. Ved videre forsøk ble det funnet at både 66% og

94,4% deacetykert kitosan tilsatt en suspensjon av gjærceller i MOPS-buffer førte til en konsentrasjonsavhengig økning av zetapotensialet for konsentrasjoner av kitosan fra 0,05 mg/mL til 0,5 mg/mL. Videre ble det funnet at 94,4% deacetykert kitosan ga en større økning i zetapotensialet enn 66% deacetykert kitosan. Disse resultatene kan gi en indikasjon på at de elektrostatiske kreftene mellom negativt ladede gjærcellene og positivt ladede kitosan ved pH 6,5 fører til at kitosan danner et omsluttende lag rundt gjærcellen.

For å gjennomføre nanoindentering av gjærceller var det nødvendig å immobilisere gjærcellene til en overflate. En metode for immobilisering av gjærceller på en glassoverflate ble derfor utviklet. Det ble funnet at en PLL-funksjonalisert glassoverflate vil gi god immobilisering av gjærceller med lav mobilitet når gjærcellene blir påført den PLL-funksjonaliserte glassoverflaten suspendert i MOPS- eller HEPES-buffer. Indikasjoner om molekylvektens innvirkning på immobiliseringsevne til PLL ble etablert da funksjonalisering med PLL-hydroklorid med en molekylvekt på 15 000 Da viste et mer spredt dekke og mer mobilitet på gjærcellene til forskjell fra PLL med molekylvekt høyere enn 150 000 Da. Det ble i tillegg antatt at en mulig svelling og en molekylvekt på 300 000 Da av et PLL-lag adsorbent til en glassoverflate fra en PLL-hydrobromidløsning kan ha bidratt med en økt mobilitet og et økt antall gjenværende semipelagiske gjærceller over det immobiliserte laget med gjærceller.

Av interesse for pågående studier ved universitetet ble det i tillegg undersøkt hvorvidt funksjonalisering av en glassoverflate med BSA hindret immobilisering av gjærceller. Resultatene antydte at en ubehandlet overflate kan være tilstrekkelig for dette formålet da en BSA-funksjonalisert glassoverflate viste et større antall gjenværende gjærceller enn en ubehandlet glassoverflate.

Nanoindentering ved hjelp av AFM ble som nevnt benyttet for bestemmelse av elastisiteten til gjærcellers cellevegg. Resultatene var preget av usikkerhet der det blir antatt av verdiene for Youngs modulus i realiteten er høyere enn det som ble funnet i denne oppgaven. Youngs modulus til gjærceller ble funnet til å ligge under 210 kPa med en gjennomsnittsverdi på  $72 \pm 58$  kPa som derfor kunne skilles fra verdiene for Youngs modulus til en PLL-dekket glassoverflate dekket av MOPS-buffer eller MQ-vann funnet til å være henholdsvis  $252 \pm 52$  kPa og  $1\,531 \pm 237$  kPa. Den lave verdien

for en PLL-funksjonalisert glassoverflate dekket med MOPS-buffer ble antatt at kom av en endring av PLL-lagets konformasjon på grunn av MOPS-buffers og MQ-vanns ulike pH på henholdsvis 5 og 6,5 der den lave pH-en til MQ-vann kan ha gitt en mer åpen struktur som indenteringsspissen lettere kunne passere. MOPS-buffersens amfolytteegenskaper kan i tillegg ha gitt en større assosiasjon til glassoverflaten og PLL-laget, men ytterligere forsøk er nødvendig for å avklare MOPS-buffersens påvirkninger ved bestemmelse av Youngs modulus.

Etter kartleggingen av celleveggens elastisitet ble kitosans effekt på celleveggens elastisitet undersøkt. Ved eksponering av gjær for 66% deacetyleret kitosan ble det funnet en indikasjon på en økning av celleveggens elastisitet ved observasjon av en gjennomsnittsverdi av Youngs modulus på  $72 \pm 58$  kPa og  $46 \pm 42$  kPa for henholdsvis ueksponerte og eksponerte gjærcele. 94,4% deacetyleret kitosan ble også undersøkt, men grunnet liten mengde eksperimentelle data kan det ikke trekkes noen konklusjoner om i hvilken grad 94,4% deacetyleret kitosan påvirker elastisiteten til gjærcellens cellevegg. Kvantitativ fasekontrast mikroskopi ga imidlertid ytterligere indikasjoner på en økning i elastisiteten da det ble observert en reduksjon i høyden til gjærcellene eksponert for kitosan. I tillegg ble det observert en mulig forskjell mellom virkningen av 66% og 94,4% deacetyleret kitosan ved observasjon av ulike strukturer på kvantitativ fasekontrastbildene. Det ble derfor antatt at kitosan kan gi en økning av elastisiteten til gjærcellers cellevegg, men ytterligere eksperimenter bør utføres for å bekrefte dette.

## 10 Videre studier

Under arbeidet med denne masteroppgaven er det avdekket flere områder som kan undersøkes nærmere i videre studier. Dette inkluderer rene reproduksjoner av eksperimentene utført i denne oppgaven, men også utvidelser inspirert av funn i litteratursøket.

Når det gjelder immobilisering av gjærceller på glassoverflater kan det åpne seg nye muligheter for anvendelse av teknikken. De alle fleste studiene av elastisiteten til gjærceller har blitt gjennomført ved filtrering av gjærcellene. Med en slik metode kan små gjærceller ekskluderes fra forsøket og dermed vil ikke resultatet gjenspeile heterogeniteten til en kultur av gjærceller. Ved bruk av PDMS-stempler er det derimot mulig å få et mer reelt bilde av variasjonen i elastisitet for en gjærkultur. Bruk av PDMS-stempler immobiliserer gjærceller ved en kombinasjon av mekanisk sortering av gjærceller fordelt i en matrise av brønner og funksjonalisering av områdene for immobilisering. En slik immobilisering letter arbeidet med AFM da matrisen gjør det enklere å vite hvor gjærcellene befinner seg. Dette vil dermed kunne øke effektiviteten i datainnhenting og gi tilgang til et større statistisk materiale. Om det lykkes å utvikle en metode for dannelsen av matriser av immobiliserte gjær på glassoverflater kan det være et alternativ til PDMS-stempler der ingen form for mekanisk isolering vil finne sted. Immobiliseringsmetoden utviklet i denne oppgaven er derfor et bidrag i en slik utvikling av gjærmatriser.

Immobilisering av gjærceller blir både utført med mekanisk isolasjon og ved fysiokjemiske interaksjoner eller for PDMS-stempler sin del en kombinasjon av begge metoder. Det er imidlertid viktig å understreke at enhver metode for immobilisering vil mest sannsynlig påvirke mikroorganismene. Det er derfor av interesse for videre studier å kartlegge hvordan og i hvor stor grad immobiliseringsmetoden påvirker mikroorganismene som blir undersøkt, slik at det deretter er mulig å velge immobiliseringsmetode som i minst mulig grad påvirker det som skal studeres.

For indenteringskurvene i denne oppgaven ble det observert en innledende myk struktur fulgt av en hardere struktur ved indentering av celleveggen til *S. cerevisiae*. Det er ikke kjent om dette er blitt rapportert om tidligere, men videre undersøkelser

om hvorvidt årsaken er knyttet til plassering av indenteringsspissen på gjærcellen, tilstedeværelsen av en ekstracellulær struktur eller andre årsaker kan være interessant.

Da det ikke er kjent om det er utført studier på hvordan de ulike parameterene for utførelsen av nanoindentering på gjærceller kan det være nyttig å undersøke hvilke innstillinger og parametere som egner seg til bruk for gjærceller. Dette kan for eksempel være fastsetting av ideell geometri på indenteringsspissen og indenteringshastighet.

Ut fra indikasjonene som ble funnet for kitosans påvirkning på celleveggenes elastisitet er det klart at benyttelse av AFM i videre studier av kitosans mekanisme er av interesse. I nye AFM studier av gjærceller kan det derimot være nyttig ta i bruk dobbeltlagsmodellen i stedet for Hertz-Sneddon modellen for utregningen av Youngs modulus for å bedre kunne sammenligne bruk av forskjellige metoder for bestemmelse av elastisitet. En kombinasjon av genetiske studier og nanoindentering der godt karakteriserte kitosan blir benyttet vil kunne gi større innblikk i kitosans mekanisme enn det som er blitt utført i denne oppgaven. Det kan også være av interesse å undersøke ved hjelp av zetapotensial målinger om det dannes en metning av kitosan på gjærceller samt om kitosan forblir knyttet til gjærcellene ved skylling av gjærcellene. For de konsentrasjonene som ble benyttet for dette i oppgaven var det ingen antydninger til at kitosan var mettet til tross for at zetapotensialet hadde økt til en positiv verdi. I litteraturen er det foreslått at kitosaner med lav molekylvekt har mulighet til å passere plasmamembranen og hindre transkripsjon og mRNA syntese. Det hadde derfor vært interessant å se om kitosaner med lav molekylvekt virker inn på celleveggenes elastisitet og hvordan en eventuell endring kan sammenlignes med virkningen av kitosaner med høyere molekylvekt.

Celleveggen er det første hinderet kitosan møter på vei inn til plasmamembranen. En studie har foreslått at etanol senker celleveggenes elastisitet indirekte ved interaksjoner med plasmamembranen(59). I en annen studie er det funnet at kitosan virker gjennom interaksjoner med plasmamembranen(58). Det kan derfor være av interesse å undersøke hvordan sammenhengen er mellom indikasjonen funnet i denne oppgaven om at elastisiteten senkes kommer av en interaksjon direkte med celleveggen eller om mekanismen fungerer indirekte via interaksjoner med plasmamembranen. I sistnevnte



tilfelle vil det i så fall også være av interesse og kartlegge hvordan kitosan forserer det første hinderet for å nå plasmamembranen.

## 11 Referanser

1. Pereira AP, Mendes-Ferreira A, Oliveira JM, Estevinho LM, Mendes-Faia A. Effect of *Saccharomyces cerevisiae* cells immobilisation on mead production. *Lwt-Food Science and Technology*. 2014;56(1):21-30.
2. Dervakos GA, Webb C. On the Merits of Viable-Cell Immobilization. *Biotechnol Adv*. 1991;9(4):559-612.
3. Suzana CuSM, Claudia M, a M, Larissa Guedes Fiuacute za MCo, ra TdS. Immobilization of microbial cells: A promising tool for treatment of toxic pollutants in industrial wastewater. *African Journal of Biotechnology*. 2013;12(28):4412-8.
4. Cheung RCF, Ng TB, Wong JH, Chan WY. Chitosan: An Update on Potential Biomedical and Pharmaceutical Applications. *Marine Drugs*. 2015;13(8):5156-86.
5. Samseth Å. Kampen mot bakteriene [Dokumentar]. 2016. p. 22 minutter.
6. Jaime MD, Lopez-Llorca LV, Conesa A, Lee AY, Proctor M, Heisler LE, et al. Identification of yeast genes that confer resistance to chitosan oligosaccharide (COS) using chemogenomics. *BMC Genomics*. 2012;13:267.
7. Madigan MT, Martinko JM, Stahl DA, Clark DP. Brock biology of microorganisms. 13. utgave. San Francisco: Pearson Education; 2012.
8. *Saccharomyces cerevisiae* Genome Snapshot [Internett]. Standford: Standford University; 2016 [22.10.2016; 22.10.2016 k11600]. Tilgjengelig fra: <http://www.yeastgenome.org/genomesnapshot>.
9. Bergman LW. Growth and maintenance of yeast. *Methods Mol Biol*. 2001;177:9-14.
10. Wernerwashburne M, Braun E, Johnston GC, Singer RA. STATIONARY-PHASE IN THE YEAST *SACCHAROMYCES-CEREVISIAE*. *Microbiological Reviews*. 1993;57(2):383-401.
11. Klis FM, Boorsma A, De Groot PWJ. Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. 2006;23(3):185-202.
12. Klis FM, Mol P, Hellingwerf K, Brul S. Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. *Fems Microbiology Reviews*. 2002;26(3):239-56.
13. Manners DJ, Masson AJ, Patterson JC. The structure of a beta-(1 leads to 3)-D-glucan from yeast cell walls. *Biochem J*. 1973;135(1):19-30.
14. Kollar R, Reinhold BB, Petrakova E, Yeh HJ, Ashwell G, Drgonova J, et al. Architecture of the yeast cell wall. Beta(1-->6)-glucan interconnects mannoprotein, beta(1-->3)-glucan, and chitin. *J Biol Chem*. 1997;272(28):17762-75.
15. Molano J, Bowers B, Cabib E. Distribution of chitin in the yeast cell wall. An ultrastructural and chemical study. *J Cell Biol*. 1980;85(2):199-212.

16. Shaw JA, Mol PC, Bowers B, Silverman SJ, Valdivieso MH, Duran A, et al. The function of chitin synthases 2 and 3 in the *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle. *J Cell Biol.* 1991;114(1):111-23.
17. Cabib E, Roh DH, Schmidt M, Crotti LB, Varma A. The yeast cell wall and septum as paradigms of cell growth and morphogenesis. *J Biol Chem.* 2001;276(23):19679-82.
18. Holan Z, Pokorny V, Beran K, Gemperle A, Tuzar Z, Baldrian J. The Glucan-Chitin Complex in *Saccharomyces-Cerevisiae* .5. Precise Location of Chitin and Glucan in Bud Scar and Their Physicochemical Characterization. *Arch Microbiol.* 1981;130(4):312-8.
19. Manners DJ, Masson AJ, Patterson JC, Bjorndal H, Lindberg B. The structure of a beta-(1--6)-D-glucan from yeast cell walls. *Biochem J.* 1973;135(1):31-6.
20. Boone C, Sommer SS, Hensel A, Bussey H. Yeast KRE genes provide evidence for a pathway of cell wall beta-glucan assembly. *J Cell Biol.* 1990;110(5):1833-43.
21. Fujii T, Shimoi H, Iimura Y. Structure of the glucan-binding sugar chain of Tip1p, a cell wall protein of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta.* 1999;1427(2):133-44.
22. Kapteyn JC, Montijn RC, Vink E, de la Cruz J, Llobell A, Douwes JE, et al. Retention of *Saccharomyces cerevisiae* cell wall proteins through a phosphodiester-linked beta-1,3-/beta-1,6-glucan heteropolymer. *Glycobiology.* 1996;6(3):337-45.
23. Aguilar-Uscanga B, Francois JM. A study of the yeast cell wall composition and structure in response to growth conditions and mode of cultivation. *Lett Appl Microbiol.* 2003;37(3):268-74.
24. Singh J, Kumar D, Ramakrishnan N, Singhal V, Jervis J, Garst JF, et al. Transcriptional response of *Saccharomyces cerevisiae* to desiccation and rehydration. *Applied and Environmental Microbiology.* 2005;71(12):8752-63.
25. Dupont S, Rapoport A, Gervais P, Beney L. Survival kit of *Saccharomyces cerevisiae* for anhydrobiosis. *Applied Microbiology and Biotechnology.* 2014;98(21):8821-34.
26. Morris GJ, Winters L, Coulson GE, Clarke KJ. Effect of Osmotic-Stress on the Ultrastructure and Viability of the Yeast *Saccharomyces-Cerevisiae*. *Journal of General Microbiology.* 1986;132:2023-34.
27. Ene IV, Walker LA, Schiavone M, Lee KK, Martin-Yken H, Dague E, et al. Cell Wall Remodeling Enzymes Modulate Fungal Cell Wall Elasticity and Osmotic Stress Resistance. *Mbio.* 2015;6(4).
28. Tran VS, Ngo HH, Guo W, Zhang J, Liang S, Ton-That C, et al. Typical low cost biosorbents for adsorptive removal of specific organic pollutants from water. *Bioresour Technol.* 2015;182:353-63.

29. Boamah PO, Huang Y, Hua M, Zhang Q, Wu J, Onumah J, et al. Sorption of heavy metal ions onto carboxylate chitosan derivatives--a mini-review. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2015;116:113-20.
30. Strand SP, Vandvik MS, Varum KM, Ostgaard K. Screening of chitosans and conditions for bacterial flocculation. *Biomacromolecules.* 2001;2(1):126-33.
31. Strand SP, Varum KM, Ostgaard K. Interactions between chitosans and bacterial suspensions: adsorption and flocculation. *Colloid Surface B.* 2003;27(1):71-81.
32. Roller S, Covill N. The antifungal properties of chitosan in laboratory media and apple juice. *International Journal of Food Microbiology.* 1999;47(1-2):67-77.
33. Christensen BE. Compendium TBT4135 BIOPOLYMERS. Trondheim: NOBIPOL Department of Biotechnology NTNU; 2014.
34. Mellegard H, Strand SP, Christensen BE, Granum PE, Hardy SP. Antibacterial activity of chemically defined chitosans: influence of molecular weight, degree of acetylation and test organism. *Int J Food Microbiol.* 2011;148(1):48-54.
35. Kulikov SN, Lisovskaya SA, Zelenikhin PV, Bezrodnykh EA, Shakirova DR, Blagodatskikh IV, et al. Antifungal activity of oligochitosans (short chain chitosans) against some *Candida* species and clinical isolates of *Candida albicans*: molecular weight-activity relationship. *Eur J Med Chem.* 2014;74:169-78.
36. Varum KM, Smidsrod O. Structure-Property Relationship in Chitosans. I: Dumitriu S, red. *Polysaccharides - structural diversity and functional versatility.* New York: CRC Press; 2004. s. 625-39.
37. Blackwel.J. Structure of Beta-Chitin or Parallel Chain Systems of Poly-Beta-(1-4)-N-Acetyl-D-Glucosamine. *Biopolymers.* 1969;7(3):281-&.
38. Jang M-K, Kong B-G, Jeong Y-I, Lee CH, Nah J-W. Physicochemical characterization of  $\alpha$ -chitin,  $\beta$ -chitin, and  $\gamma$ -chitin separated from natural resources. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry.* 2004;42(14):3423-32.
39. Hajji S, Younes I, Ghorbel-Bellaaj O, Hajji R, Rinaudo M, Nasri M, et al. Structural differences between chitin and chitosan extracted from three different marine sources. *International Journal of Biological Macromolecules.* 2014;65:298-306.
40. Kurita K, Tomita K, Ishii S, Nishimura SI, Shimoda K. Beta-Chitin as a Convenient Starting Material for Acetolysis for Efficient Preparation of N-Acetylchitoooligosaccharides. *J Polym Sci Pol Chem.* 1993;31(9):2393-5.
41. Vishu Kumar AB, Varadaraj MC, Gowda LR, Tharanathan RN. Characterization of chito-oligosaccharides prepared by chitosanolysis with the aid of papain and Pronase, and their bactericidal action against *Bacillus cereus* and *Escherichia coli*. *Biochem J.* 2005;391(2):167-75.

42. Kumar BAV, Varadaraj MC, Tharanathan RN. Low molecular weight chitosan - Preparation with the aid of pepsin, characterization, and its bactericidal activity. *Biomacromolecules*. 2007;8(2):566-72.
43. Park JW, Choi KH, Park KK. Acid-Base Equilibria and Related Properties of Chitosan. *B Kor Chem Soc*. 1983;4(2):68-72.
44. Domard A. Ph and Cd Measurements on a Fully Deacetylated Chitosan - Application to Cu-Ii-Polymer Interactions. *International Journal of Biological Macromolecules*. 1987;9(2):98-104.
45. Terbojevich M, Carraro C, Cosani A, Focher B, Naggi AM, Torri G. Solution Studies of Chitosan 6-O-Sulfate. *Makromol Chem*. 1989;190(11):2847-55.
46. Strand SP, Tommeraas K, Varum KM, Ostgaard K. Electrophoretic light scattering studies of chitosans with different degrees of N-acetylation. *Biomacromolecules*. 2001;2(4):1310-4.
47. Varum KM, Ottoy MH, Smidsrod O. Water-Solubility of Partially N-Acetylated Chitosans as a Function of Ph - Effect of Chemical-Composition and Depolymerization. *Carbohydrate Polymers*. 1994;25(2):65-70.
48. Anthonsen MW, Smidsrod O. Hydrogen-Ion Titration of Chitosans with Varying Degrees of N-Acetylation by Monitoring Induced H-1-Nmr Chemical-Shifts. *Carbohydrate Polymers*. 1995;26(4):303-5.
49. Sorlier P, Denuziere A, Viton C, Domard A. Relation between the degree of acetylation and the electrostatic properties of chitin and chitosan. *Biomacromolecules*. 2001;2(3):765-72.
50. Younes I, Sellimi S, Rinaudo M, Jellouli K, Nasri M. Influence of acetylation degree and molecular weight of homogeneous chitosans on antibacterial and antifungal activities. *Int J Food Microbiol*. 2014;185:57-63.
51. Jeon YJ, Park PJ, Kim SK. Antimicrobial effect of chitoooligosaccharides produced by bioreactor. *Carbohydrate Polymers*. 2001;44(1):71-6.
52. Zakrzewska A, Boorsma A, Brul S, Hellingwerf KJ, Klis FM. Transcriptional response of *Saccharomyces cerevisiae* to the plasma membrane-perturbing compound chitosan. *Eukaryot Cell*. 2005;4(4):703-15.
53. Pena A, Sanchez NS, Calahorra M. Effects of chitosan on *Candida albicans*: conditions for its antifungal activity. *Biomed Res Int*. 2013;2013:527549.
54. Weir S, Ramsden DK, Hughes J, Le Thomas F. The flocculation of yeast with chitosan in complex fermentation media: The effect of biomass concentration and mode of flocculant addition. *Biotechnology Techniques*. 1993;7(3):199-204.
55. Sudarshan NR, Hoover DG, Knorr D. Antibacterial Action of Chitosan. *Food Biotechnology*. 1992;6(3):257-72.

56. Xing K, Zhu X, Peng X, Qin S. Chitosan antimicrobial and eliciting properties for pest control in agriculture: a review. *Agronomy for Sustainable Development*. 2014;35(2):569-88.
57. Zakrzewska A, Boorsma A, Delneri D, Brul S, Oliver SG, Klis FM. Cellular processes and pathways that protect *Saccharomyces cerevisiae* cells against the plasma membrane-perturbing compound chitosan. *Eukaryotic Cell*. 2007;6(4):600-8.
58. Palma-Guerrero J, Lopez-Jimenez JA, Perez-Berna AJ, Huang IC, Jansson HB, Salinas J, et al. Membrane fluidity determines sensitivity of filamentous fungi to chitosan. *Mol Microbiol*. 2010;75(4):1021-32.
59. Schiavone M, Formosa-Dague C, Elsztein C, Teste MA, Martin-Yken H, De Morais MA, et al. Evidence for a Role for the Plasma Membrane in the Nanomechanical Properties of the Cell Wall as Revealed by an Atomic Force Microscopy Study of the Response of *Saccharomyces cerevisiae* to Ethanol Stress. *Applied and Environmental Microbiology*. 2016;82(15):4789-801.
60. Dague E, Jauvert E, Laplatine L, Viallet B, Thibault C, Ressler L. Assembly of live micro-organisms on microstructured PDMS stamps by convective/capillary deposition for AFM bio-experiments. *Nanotechnology*. 2011;22(39).
61. Dague E, Bitar R, Ranchon H, Durand F, Yken HM, Francois JM. An atomic force microscopy analysis of yeast mutants defective in cell wall architecture. *Yeast*. 2010;27(8):673-84.
62. Pelling AE, Sehati S, Gralla EB, Valentine JS, Gimzewski JK. Local nanomechanical motion of the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *Science*. 2004;305(5687):1147-50.
63. Touhami A, Nysten B, Dufrene YF. Nanoscale mapping of the elasticity of microbial cells by atomic force microscopy. *Langmuir*. 2003;19(11):4539-43.
64. Bui VC, Kim YU, Choi SS. Physical characteristics of *Saccharomyces cerevisiae*. *Surf Interface Anal*. 2008;40(10):1323-7.
65. Svaldo Lanero T, Cavalleri O, Krol S, Rolandi R, Gliozzi A. Mechanical properties of single living cells encapsulated in polyelectrolyte matrixes. *J Biotechnol*. 2006;124(4):723-31.
66. Mashmouhy H, Zhang Z, Thomas CR. Micromanipulation measurement of the mechanical properties of baker's yeast cells. *Biotechnology Techniques*. 1998;12(12):925-9.
67. Stenson JD, Hartley P, Wang CX, Thomas CR. Determining the Mechanical Properties of Yeast Cell Walls. *Biotechnology Progress*. 2011;27(2):505-12.
68. Smith AE, Zhang ZB, Thomas CR, Moxham KE, Middelberg APJ. The mechanical properties of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2000;97(18):9871-4.

69. Mercade-Prieto R, Thomas CR, Zhang ZB. Mechanical double layer model for *Saccharomyces Cerevisiae* cell wall. *European Biophysics Journal with Biophysics Letters*. 2013;42(8):613-20.
70. Tayel AA, Moussa S, El-Tras WF, Knittel D, Opwis K, Schollmeyer E. Anticandidal action of fungal chitosan against *Candida albicans*. *Int J Biol Macromol*. 2010;47(4):454-7.
71. Mozes N, Marchal F, Hermesse MP, Haecht JLV, Reuliaux L, Leonard AJ, et al. Immobilization of Microorganisms by Adhesion: Interplay of Electrostatic and Nonelectrostatic Interactions. *Biotechnology and Bioengineering*. 1987;30:439-50.
72. Meyer RL, Zhou XF, Tang LN, Arpanaei A, Kingshott P, Besenbacher F. Immobilisation of living bacteria for AFM imaging under physiological conditions. *Ultramicroscopy*. 2010;110(11):1349-57.
73. Canetta E, Adya AK, Walker GM. Atomic force microscopic study of the effects of ethanol on yeast cell surface morphology. *Fems Microbiology Letters*. 2006;255(2):308-15.
74. Gad M, Ikai A. Method for immobilizing microbial cells on gel surface for dynamic AFM studies. *Biophys J*. 1995;69(6):2226-33.
75. Wong I, Ding XT, Wu CS, Ho CM. Accurate and effective live bacteria microarray patterning on thick polycationic polymer layers co-patterned with HMDS. *Rsc Adv*. 2012;2(20):7673-6.
76. Shima S, Matsuoka H, Iwamoto T, Sakai H. Antimicrobial Action of Epsilon-Poly-L-Lysine. *J Antibiot*. 1984;37(11):1449-55.
77. Burke SE, Barrett CJ. pH-responsive properties of multilayered poly(L-lysine)/hyaluronic acid surfaces. *Biomacromolecules*. 2003;4(6):1773-83.
78. Wang YL, Chang YC. Synthesis and conformational transition of surface-tethered polypeptide: Poly(L-lysine). *Macromolecules*. 2003;36(17):6511-8.
79. Kenausis GL, Voros J, Elbert DL, Huang NP, Hofer R, Ruiz-Taylor L, et al. Poly(L-lysine)-g-poly(ethylene glycol) layers on metal oxide surfaces: Attachment mechanism and effects of polymer architecture on resistance to protein adsorption. *Journal of Physical Chemistry B*. 2000;104(14):3298-309.
80. Jiang M, Popa I, Maroni P, Borkovec M. Adsorption of poly(L-lysine) on silica probed by optical reflectometry. *Colloid Surface A*. 2010;360(1-3):20-5.
81. Choi JH, Kim SO, Linardy E, Dreaden EC, Zhdanov VP, Hammond PT, et al. Influence of pH and Surface Chemistry on Poly(L-lysine) Adsorption onto Solid Supports Investigated by Quartz Crystal Microbalance with Dissipation Monitoring. *J Phys Chem B*. 2015;119(33):10554-65.

82. Mazia D, Schatten G, Sale W. Adhesion of Cells to Surfaces Coated with Polylysine - Applications to Electron-Microscopy. *Journal of Cell Biology*. 1975;66(1):198-200.
83. Colville K, Tompkins N, Rutenberg AD, Jericho MH. Effects of Poly(L-lysine) Substrates on Attached Escherichia coli Bacteria. *Langmuir*. 2010;26(4):2639-44.
84. Koch AL. Growth measurements. I: Gerdhardt P, Murray RGE, Wood WA, Krieg NR, editors. *Methods for General and Molecular Bacteriology*. Washington D.C: American Society for Microbiology; 1994. s. 262-7.
85. Murray RGE, Robinow CF. Light Microscopy. I: Gerdhardt P, Murray RGE, Wood WA, Krieg NR, editors. *Methods for General and Molecular Bacteriology*. Washington D.C: American Society for Microbiology; 1994. s. 7-16.
86. Kim MK. Principles and techniques of digital holographic microscopy. *Journal of Photonics for Energy*. 2010:018005.
87. Zetasizer Nano Series User Manual [Internet]. Worcestershire: Malvern Instruments 2004 [2016 23.september]. 1.1:[Tilgjengelig fra: [http://www.biozentrum.unibas.ch/fileadmin/redaktion/Forschung/Research\\_Groups/BF/instruments/zetasizer\\_manual.pdf](http://www.biozentrum.unibas.ch/fileadmin/redaktion/Forschung/Research_Groups/BF/instruments/zetasizer_manual.pdf)].
88. Formosa C, Dague E. Imaging Living Yeast Cells and Quantifying Their Biophysical Properties by Atomic Force Microscopy. 2015:125-41.
89. Moreno-Herrero F, Gomez-Herrero J. AFM: Basic Concepts. I: Baro AM, Reifengerger RG, editors. *Atomic Force Microscopy in Liquid: Biological Application Part 1 General Atomic Force Microscopy*. 1. ed: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.; 2012. s. 3-33.
90. Technical Note: A practical guide to AFM force spectroscopy and data analysis [Internet]. JPK Instruments; [2016 17.oktober]. Tilgjengelig fra: <http://www.jpk.com/afm.230.en.html>.
91. Hertz H. Über die berührung fester elastischer Körper (On the contact of rigid elastic solids). Jones, Schott, editors. London: Macmillan and co. Ltd; 1896.
92. Sneddon IN. A Relation Involving Hankel Transforms with Applications to Boundary Value Problems in Potential Theory. *J Math Mech*. 1965;14(1):33-&.
93. Application Note: Determining the elastic modulus of biological samples using atomic force microscopy [Internet]. JPK Instruments; [2016 12.oktober]. Tilgjengelig fra: <http://www.jpk.com/jpk-app-elastic-modulus4.download.5fb2f841667674176fd945e65f073bad>.
94. Raafat D, Sahl HG. Chitosan and its antimicrobial potential - a critical literature survey. *Microbial Biotechnology*. 2009;2(2):186-201.



95. Dsouza SF, Melo JS, Deshpande A, Nadkarni GB. Immobilization of Yeast-Cells by Adhesion to Glass-Surface Using Polyethylenimine. *Biotechnology Letters*. 1986;8(9):643-8.
96. Good NE, Winget GD, Winter W, Connolly TN, Izawa S, Singh RMM. Hydrogen Ion Buffers for Biological Research. *Biochemistry*. 1966;5(2):467-&.
97. Good's buffers (biological buffers) [Internett]. Montluçon: Life Sciences Interchim; 2016 [2016 11.november]. Tilgjengelig fra: <http://www.interchim.fr/ft/0/062000.pdf>.
98. Biological buffers - MOPS [Internett]. Sigma-Aldrich; 2016 [2016 04.november]. Tilgjengelig fra: <http://www.sigmaaldrich.com/life-science/core-bioreagents/biological-buffers/mops-specific-comparison.html>.
99. Biological buffers - HEPES [Internett]. Sigma-Aldrich; 2016 [2016 4.november]. Tilgjengelig fra: <http://www.sigmaaldrich.com/life-science/core-bioreagents/biological-buffers/hepes-specification.html>.
100. Blass J, Kohler O, Fingerle M, Muller C, Ziegler C. Properties and characteristics of wet (HF) and dry (RIE) etched borosilicate glass. *Phys Status Solidi A*. 2013;210(5):988-93.
101. Al-Hashmi AR, Luckham PF. Characterization of the adsorption of high molecular weight non-ionic and cationic polyacrylamide on glass from aqueous solutions using modified atomic force microscopy. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2010;358(1-3):142-8.
102. Porus M, Maroni P, Borkovec M. Response of Adsorbed Polyelectrolyte Monolayers to Changes in Solution Composition. *Langmuir*. 2012;28(50):17506-16.
103. Product information sheet - Poly-L-lysine hydrobromide [Internett]. Saint Louis: Sigma-Aldrich; 2016 [2016 28.10]. Tilgjengelig fra: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/p1524?lang=en&region=NO>.
104. Dague E. Seniorforsker. Muntlig kommunikasjon 8.november 2016.
105. Liang CX, Yuan F, Liu FG, Wang YY, Gao YX. Structure and antimicrobial mechanism of epsilon-polylysine-chitosan conjugates through Maillard reaction. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2014;70:427-34.