

CHALMERS



Uttryck av antimikrobiella peptider i jäst *som en metod att förhindra bakteriekontamination vid industriell fermentation*

JOHANNA ASSERLIND
ANGELICA GYLLING
FRIDA LARSSON
ALEXANDER RADENKOVIC
LOTTA SAVONEN FLODERUS
VICTOR VERDIER

Kandidatarbete KBTX01-14-04
Institutionen för kemi- och bioteknik
CHALMERS TEKNISKA HÖGSKOLA
Göteborg, Sverige, 2014

Sammanfattning

Ett problem under industriella jästfermentationer är förekomsten av kontaminerande bakterier i systemen, som kan försämra produktutbytet. För att förebygga detta problem kan konventionell antibiotika tillsättas under fermentationsprocessen, något som bidrar till utvecklingen av antibiotikaresistenta bakterier. En mer hållbar ersättning till antibiotika kan vara antimikrobiella peptider, som är peptider med en bakteriedödande effekt.

Syftet med studien var att genmodifiera de två jäststammarna *Saccharomyces cerevisiae* JBA och *S. cerevisiae* CEN.PK113-7D till att uttrycka de antimikrobiella peptiderna L50A från *Enterococcus faecium* och humant β -defensin-3, samt undersöka om dessa peptider hade någon detekterbar avdödningseffekt på *Lactobacillus buchneri* och *Lactobacillus brevis*, när de uttrycktes av jästen.

Avdödningseffekten av den genmodifierade jästen på *Lactobacillus brevis* och *Lactobacillus buchneri* undersöktes med ympningsförsök mellan de genmodifierade jäststammarna och *Lactobacillus*, som är en vanligt förekommande kontaminant under industriella jästfermentationer.

En lyckad genmodifiering av jäststammarna verifierades med PCR och gelelektroforeser. Ympningsförsöken som gjordes för att undersöka de genmodifierade jäststammarnas avdödande effekt på *Lactobacillus* gav inga entydiga resultat. Detta på grund av osäkra mätvärden från ympningsförsöken.

Abstract

A problem during industrial yeast fermentations is the presence of contaminating bacteria in the systems, that may decrease the product yield. To prevent this problem, conventional antibiotics are sometimes added during the fermentation process, which contributes to the development of antibiotic-resistant bacteria. A more durable replacement for antibiotics may be antimicrobial peptides, which are peptides with a germicidal effect.

The purpose of this study was to genetically modify the two yeast strains *Saccharomyces cerevisiae* JBA and *S. cerevisiae* CEN.PK113-7D to express the antimicrobial peptides L50A from *Enterococcus faecium* and human β -defensin-3. The purpose was also to investigate whether these peptides had a detectable killing effect on *Lactobacillus buchneri* and *Lactobacillus brevis*, when expressed by the yeast.

The killing effect of the genetically modified yeasts on *Lactobacillus brevis* and *Lactobacillus buchneri* was investigated by conducting inoculations of the genetically modified yeast strains and *Lactobacillus*, which is a common contaminant during industrial yeast fermentations.

Successful genetic modifications of the yeast strains were verified by PCR and gel electrophoresis. The inoculations conducted to investigate the genetically modified yeast strains' killing effect on *Lactobacillus* yielded no conclusive results. This was due to uncertain measurements from the inoculations.

Innehåll

1	Inledning	1
1.1	Syfte	2
1.2	Avgränsningar	2
2	Teori	2
2.1	Antimikrobiella peptider	2
2.1.1	L50A	3
2.1.2	β -defensin-3	4
2.2	Genmodifierad jäst	5
2.2.1	Promotor och terminator	5
2.2.2	Ledarsekvens	6
2.3	Kontaminerande bakterier	7
2.3.1	<i>Lactobacillus</i>	7
2.3.2	<i>Lactobacillus brevis</i> och <i>Lactobacillus buchneri</i>	8
3	Material och metod	8
3.1	Amplifiering av plasmider genom transformation in i <i>E. coli</i>	8
3.2	Extraktion och verifiering av målplasmider bland upptagna plasmider från <i>E. coli</i>	9
3.3	Amplifiering av insert till transformation av jäststammar	9
3.4	Transformation av jäststammar	9
3.5	Ympning av <i>Lactobacillus</i> med jäst	10
4	Resultat och diskussion	11
4.1	Verifieringar med gelelektrofores	11
4.1.1	Verifiering av målplasmider från <i>E. coli</i>	11
4.1.2	Verifiering av linjärt insert för jästtransformation	14
4.1.3	Verifiering av insert i jästgenomen	15
4.2	Ympkulturer med bakterier och jäst	17
4.2.1	Ympkulturer med <i>Lactobacillus</i> och <i>S. cerevisiae</i> CEN.PK	18
4.2.2	Ympkulturer med <i>Lactobacillus</i> och <i>S. cerevisiae</i> JBA	22
5	Slutsats	25
5.1	Förslag på vidare studier	26
	Referenser	27
	Bilagor	31
A	Ledarsekvens	31
B	Beställda gensekvenser	32

C	Målplasmider (amplifierade <i>E. coli</i>-plasmider)	33
C.1	L50A	33
C.2	β -defensin-3	36
D	Linjärt insert för inkorporering i jästgenomet	39
D.1	L50A-insert	39
D.2	β -defensin-3-insert	40
E	Protokoll för transformation av jäst	42
F	Beräkningar	43
F.1	Exempelberäkning av förväntade band	43
F.2	Koncentration, medelvärde, standardavvikelse och medelfel	43
G	Räkning av kolonier	44
H	Grafer över koncentrationsförändring av bakterier och jästceller i ympkulturer	47

1 Inledning

Jästfermentering utnyttjas av flera olika industrier för framställning av etanol eller andra produkter. Jästen bryter ner sockerarter till alkohol vid öl- och vinproduktion och utnyttjas av bagerier för att jäsa degen och göra den luftig, då den producerar koldioxid. Jästfermentering är även grunden för bioetanolproduktion. Gemensamt för dessa industrier är att det krävs kontrollerbara processer för att få fram den önskvärda produkten. Jästen måste verka under rätt förutsättningar för att uppnå ett effektivt produktutbyte. Detta kräver att förhållandena i fermentorsystemen är optimerade med avseende på näringsämnen, temperatur, pH och syrehalt. (Gibson et al., 2007, Lin et al., 2012)

Ett problem inom jästbaserade fermentationsprocesser på industriell nivå är kontaminering av bakterier i systemen. Bakteriekontamination påverkar produktiviteten genom att reducera jästens tillväxt och inhibera produktutbytet, vilket kan få både tidsödande och ekonomiska konsekvenser (Beckner et al., 2011, Chang et al., 1995). Till de vanligast kontaminerande bakteriestammarna hör bakterier av släktet *Lactobacillus*, som frodas under samma levnadsförhållanden som är optimala för många jäststammar (Jespersen och Jakobsen, 1996, Weber et al., 2008, Skinner och Leathers, 2004).

För att åtgärda problemet med kontaminerande bakterier odlas jästen ibland i lågt pH, en metod som inte alltid är tillförlitlig (Gibson et al., 2007). En studie av Albers et al. (2011) visade att tillsats av NaCl och etanol kunde reducera bakterietillväxt vid fermentation av trähydrolysat. Denna metod kan dock vara problematisk på industriell nivå, på grund av tillåtna gränsvärden för natriumjoner i slutprodukten, där avlägsnandet av överflödiga joner skulle innebära ett kostnadspålägg i produktionen (C. Larsson, personlig kommunikation, 15 maj 2014). I dagsläget används ibland även antibiotika för att reducera bakterietillväxten i fermentorsystemen (Compart et al., 2013). Denna typ av konventionell antibiotikaanvändning bidrar till utvecklingen av antibiotikaresistenta bakteriestammar, vilket är ett växande problem i dagens samhälle (Levy, 2002).

Om alternativet hade funnits att effektivt minska bakteriekontaminering i system med jästfermentering, utan att använda konventionell antibiotika, vore detta mer hållbart, både ekonomiskt och ur miljösynpunkt. En metod för att åstadkomma detta skulle kunna vara att få jästen att uttrycka antimikrobiella peptider som kan bekämpa bakterierna i systemen. Jästen skulle då på egen hand kunna utföra samma arbete som den tillsatta antibiotikan gör idag (James et al., 2013, Jin et al., 2013). Den konventionella antibiotikan som idag används har funktioner som bekämpar väldigt specifika processer i bakterier, något som gör dess effektivitet känslig för mutationer i bakterierna. Detta problem skulle kunna undvikas med antimikrobiella peptider, eftersom de har en mer generell effekt mot bakteriernas cellmembran (Chan et al., 2006).

Att genmodifiera jästen till att uttrycka antimikrobiella peptider kan göras genom att ett insert, innehållande en genssekvens som kodar för en antimikrobiell peptid, förs in i jästens genom via homolog rekombination (Jin et al., 2013). Insertet behöver även innehålla en ledarsekvens för att de uttryckta peptiderna ska transporteras ut ur jästens cellmembran (Das et al., 1989).

1.1 Syfte

Syftet med studien var att framställa två genmodifierade jäststammar som uttryckte de antimikrobiella peptiderna L50A från *Enterococcus faecium* och humant β -defensin-3, samt undersöka om dessa genmodifierade jäststammar hade någon detekterbar avdödningsseffekt på *Lactobacillus buchneri* och *Lactobacillus brevis*.

1.2 Avgränsningar

Studien var begränsad till att undersöka två olika peptider: L50A, som visat en antimikrobiell effekt på *Lactobacillus* (Basanta et al., 2009), och β -defensin-3, som visat sig reducera bakteriekontamination vid öltillverkning (James et al., 2013). Jäststammarna som användes var *Saccharomyces cerevisiae* JBA, en svensk industriell bagerijäststam, och *S. cerevisiae* CEN.PK, en laboratoriestam. Effekten av de uttryckta peptiderna från de olika jäststammarna undersöktes på två olika stammar av släktet *Lactobacillus*, då studier visat att bakterier ur detta släkte är de vanligast förekommande kontaminanterna vid industriell jästfermentering (Jespersen och Jakobsen, 1996, Weber et al., 2008).

2 Teori

Följande avsnitt behandlar teori och begrepp som är centrala för denna studie. Det som beskrivs är antimikrobiella peptider, med fokus på L50A och β -defensin-3, samt teori kring genmodifiering av jäststammarna *Saccharomyces cerevisiae* JBA och *S. cerevisiae* CEN.PK, med sekvenser kodandes för dessa antimikrobiella peptider. Dessutom beskrivs effekten av kontaminerande bakterier under jästfermentering, med en fördjupad beskrivning av bakteriestammarna *Lactobacillus brevis* och *Lactobacillus buchneri*.

2.1 Antimikrobiella peptider

Antimikrobiella peptider är ribosomproducerade peptider med antimikrobiell effekt. De är en naturligt förekommande del av det ospecifika immunförsvaret hos multicellulära organismer, men förekommer även hos encelliga organismer, och är därmed en utbredd företeelse bland många livsformer. De antimikrobiella peptiderna är ett viktigt försvar mot mikroorganismer och kan delas in i ett flertal olika grupper och undergrupper. Antimikrobiella peptider från bakterier kallas för bakteriociner. (Guilhelmelli et al., 2013)

Gemensamt för bakteriociner och eukaryotiska antimikrobiella peptider är att de är små (20 till 50 aminosyror), katjoniska och hydrofoba eller amfifila (Hassan et al., 2012). En viktig skillnad är dock att bakteriociner oftast är verksamma redan vid piko- till nanomolära koncentrationer, medan det krävs mikromolära koncentrationer för aktivitet från eukaryotiska antimikrobiella peptider (Nissen-Meyer och Nes, 1997). Många bakteriociner har ett väldigt smalt spektrum, det vill säga att de endast är aktiva mot ett fåtal arter eller ett släkte, ofta väldigt närbesläktade med den bakteriocinproducerande bakterien ifråga (Nissen-Meyer och Nes, 1997), medan eukaryotiska antimikrobiella peptider generellt är mindre specifika (Hassan et al., 2012).

Till skillnad från konventionell antibiotika, som ofta angriper en specifik process i bakterier, angriper många antimikrobiella peptider cellmembranet på vad som verkar vara mer av ett semispecifikt sätt. De angripna cellerna dör genom bildanden av porer i cellmembranet och den initiala mekanismen som möjliggör detta involverar ofta attraktiva krafter mellan en positivt laddad antimikrobiell peptid och en negativt laddad cellmembranyta. Till följd av en del antimikrobiella peptiders (i synnerhet vissa bakteriocinerna) höga specificitet mot endast ett fåtal arter spekuleras det dock att de även binder till specifika receptorer på cellen i fråga, och några sådana bakteriocinreceptorer har de facto identifierats. (Hassan et al., 2012).

Mekanismen för antimikrobiella peptider tros, bland annat på grund av dess semispecifika angreppssätt mot cellmembranen, vara mycket svårare för mikroorganismer att utveckla resistens mot, jämfört med konventionell antibiotika (Boman, 2003, Hancock och Sahl, 2006, Hancock, 1997). Trots detta har dock några resistensmekanismer till antimikrobiella peptider identifierats (Gunn, 2008, Kraus och Peschel, 2008).

För att skydda sig från sina egna antimikrobiella peptider har bakterier ibland gener som medför immunitet mot peptiderna (Nes et al., 1996, Hassan et al., 2012). Dessa gener är ofta lokaliserade i närheten av genen till den antimikrobiella peptiden och regleras på samma eller snarlika sätt (Hassan et al., 2012). Mekanismen för hur dessa proteiner medför immunitet är i vissa fall oklar. I andra fall har mekanismen klarlagts, exempelvis under en studie av Diep et al. (2007), där immunitetsproteinet visade sig binda till bakteriocinreceptorn, på den bakteriocinproducerande bakteriens cellmembran, på ett sådant sätt att bakteriocinen inte kunde binda där, vilket omöjliggjorde porbildning.

Det är i litteraturen inte alltid tydligt vad som är skillnaden mellan antimikrobiella peptider och antibiotika, och antimikrobiella peptider kallas ibland rent av för antibiotika. Beroende på vilken definition på antibiotika som tillämpas kan detta vara korrekt. En enkel och ofta använd avskiljning mellan antimikrobiella peptider och konventionell antibiotika är dock att konventionell antibiotika inte är ribosomalt syntetiserade (Papaigianni, 2003) och att konventionell antibiotika, till skillnad från antimikrobiella peptider, inte är peptider.

2.1.1 L50A

L50A är en 44 aminosyror lång plasmidkodad bredspektrum-bakteriocin producerad av vildtypsstammen *Enterococcus faecium* L50. I själva verket kodar genen för två peptider, L50A och L50B, som har 72% sekvenshomologi (Cintas et al., 1998). De är båda små, katjoniska och hydrofoba och *in vitro* transkriptions/translationsexperiment tyder starkt på att de ej är posttranslationellt modifierade (Cintas et al., 1998). De syntetiseras hos *E. faecium* L50 mellan 16 °C och 42 °C, och optimalt vid en temperatur på 25 °C (Criado et al., 2006).

I en studie av Basanta et al. (2008) visade sig *E. faecium* L50 verka hämmande mot 26 av 34 undersökta vanliga öl-kontaminerande mikroorganismer (bl.a. *Lactobacillus brevis* NFBC108 och *Pediococcus damnosus* CECT4797), alla tillhörande familjen Lactobacillaceae. Samma studie indikerade också att dessa antimikrobiella bred-spektrumegenskaper hos *E. faecium* L50 främst kunde tillskrivas produktionen av L50 (A och B). Vidare

klargjordes det att både L50A och L50B innehar antimikrobiell effekt utan närvaro av varandra, men att de båda peptiderna tillsammans innehar en kraftigare antimikrobiell effekt än motsvarande additiva effekt av peptiderna, var för sig (så kallad synergistisk effekt, även antydd innan av Cintas et al. (1998)). När peptidernas effekt jämförts med varandra har dock L50A visat sig ha större antimikrobiell effekt än L50B (Cintas et al., 1998, Basanta et al., 2008, 2009). Studien av Basanta et al. (2008) visade sedermera på en varierande grad av antimikrobiell verkan av L50A beroende på vilket steg i öl-bryggningsprocessen som var aktuellt, men att det är möjligt att helt eliminera *L. brevis* NFBC108 från vört och färdig lageröl även vid höga kontaminationsnivåer ($4\text{--}5 \cdot 10^5$ CFU/ml), och att L50 klarar de temperaturbehandlingar som generellt används inom bryggningsindustrin.

I ytterligare en studie av Basanta et al. (2009) har stammar av *Saccharomyces cerevisiae* modifierats med stabila plasmider innehållande genen för L50A, L50B eller L50AB, med varierande resultat. Bland annat visade sig L50AB-mutanten endast producera L50A och inte L50B, och de observerade maximala mängderna av L50A och L50B från de modifierade jäststammarna motsvarade bara 4 respektive 11 procent av den maximalt observerade produktionen hos *E. faecium* L50. Resultaten ansågs ändå i stora drag som lovande (Basanta et al., 2009), men att fler studier krävs för att optimera bakteriocinproduktion, öka bakteriocinstabiliteten under oxidativ stress och uppnå kombinerad produktion av L50A och L50B med en och samma genmodifierade jäststam.

2.1.2 β -defensin-3

Defensiner är små katjoniska antimikrobiella peptider som utgör ett led mellan det ospecifika och det adaptiva immunförsvaret i både växter och djur (Yang et al., 1999). I däggdjur är de indelade i α -, β - eller θ -defensiner beroende på sekvenshomologi och distributionen av disulfidbindningar mellan sex konservativa cysteinregioner (Klotman och Chang, 2006).

Den antimikrobiella effekten hos defensiner beror på deras katjoniska laddning, som tillåter dem att elektrostatiskt binda till de negativt laddade plasmamembranen hos olika mikroorganismer. På så vis försvagas strukturen på plasmamembranen och de börjar läcka, vilket resulterar i att mikroorganismen dör (White et al., 1995).

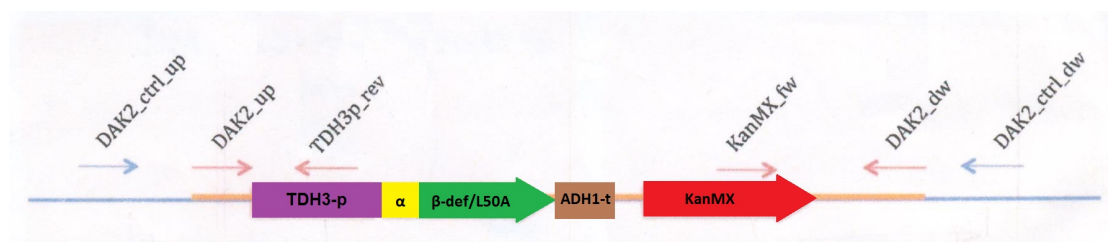
Humant β -defensin-3 är en 45 aminosyror lång antimikrobiell peptid som är verksam inom ett brett spektrum, mot såväl grampositiva som gramnegativa bakterier, svampar och adenovirus (Hoover et al., 2003). James et al. (2013) undersökte effekten av β -defensin-3 mot en rad vanliga kontaminanter vid ölproduktion, från släktena *Lactobacillus*, *Pediococcus* and *Pectinatus*. Studien visade att så mycket som 95 procent av bakteriekontaminationen kunde begränsas in vitro. En signifikant effekt mot bakteriekontamination, bland annat av *L. brevis*, uppmättes även när peptiden integrerades i genomet på lagerjästen *Saccharomyces pastorianus* och uttrycktes under fermentationsförhållanden, på pilotskala. James et al. (2013) kunde även dra slutsatsen att jästen utsöndrade peptiden, men att den till stor del satt kvar på jästens cellyta. En syntetisk

version av peptiden tillsattes i buteljerad öl och även där uppmättes en signifikant effekt mot kontaminerande bakterier (James et al., 2013).

2.2 Genmodifierad jäst

En väl beprövad metod för att genmodifiera jäst är att introducera en gen i jästgenomet via homolog rekombination. I denna studie används homolog rekombination för att inkorporera insertet (Figur 1), innehållande genen för någon av de antimikrobiella peptiderna, 1000 baspar nedströms om stop-kodonet i DAK2, en gen belägen på kromosom 6 i *Saccharomyces cerevisiae*.

I studien användes *S. cerevisiae*-stammarna JBA och CEN.PK113-7D. JBA är en tetraploid, svensk industriell bagerijäststam från Jästbolaget AB, Rotebro, som har visat sig vara relativt etanoltolerant (Albers och Larsson, 2009). CEN.PK113-7D är en haploid laboriörestam som används frekvent i laboriörestudier på grund av dess snabba tillväxt. Dessutom innehåller dess genom gener som återfinns både hos industriella stammar och laboriörestammar, vilket gör den fördelaktig att använda i jästförsök (Canelas et al., 2010, Nijkamp et al., 2012).



Figur 1: Visualisering av insertet (orange) i jästgenomet. TDH3p (lila) är en promotor för valfri inkorporerad gen, β -def-3 eller L50A (grön), flankerad av alfaledaren (gul). ADH1-t (brun) är en terminator för att avsluta transkriptionen av den inkorporerade genen. KanMX (röd) är en kanamycinresistensgen (med tillhörande promotor och terminatorsekvenser) som möjliggör selektering av jäst som inkorporerat insertet i genomet. För att säkerställa att insertet inkorporerats på rätt plats i jästgenomet används primrar som binder till sekvenser strax uppströms (DAK2_ctrl_up) och nedströms (DAK2_ctrl_dw) om det område där insertet önskas inkorporeras. Dessa kombineras med TDH3p_rev och KanMX_fw i två PCR-omgångar, där produkten ska bli två segment om 498 bp (övre) och 744 bp (nedre). DAK2_up och DAK2_dw kan användas för att amplifiera insertet med hjälp av PCR.

2.2.1 Promotor och terminator

I studien användes en TDH3-promotor och en ADH1-terminator för att kunna uttrycka de antimikrobiella peptiderna i de genmodifierade jäststammarna.

TDH3 (triosfosfatdehydrogenas-3) är en gen i *S. cerevisiae* kodande för glyceraldehyd-3-fosfatdehydrogenas (GAPDH), ett glykolytiskt enzym, som är det mest förekommande proteinet i jästen (Esnault et al., 1993). Det finns tre olika gener i jästgenomet som kodar för GAPDH (Holland et al., 1983): TDH1, TDH2 och TDH3. Av

dessa är det TDH3 som visat sig transkriberas mest (McAlister och Holland, 1985), och promotorn (eller viktiga delar av promotorn) till TDH3 har därför utnyttjats flitigt till att åstadkomma en hög expression av heterologa gener i olika experiment, exempelvis av Yoshimura et al. (1987), Kuroda et al. (1992) och Kniskern et al. (1986). TDH3-promotorn är en stark så kallad konstitutiv promotor, vilket innebär att den är aktiv i alla normalt förekommande odlingsförhållanden i laboratorie-, pilot- och industriskala (Kuroda et al., 1994).

ADH1 är en gen i *S. cerevisiae* som kodar för alkoholdehydrogenas-1, som bryter ned acetaldehyd till etanol i glykolysen (Bennetzen och Hall, 1982). ADH1-terminatorn är stark och därför en vanligt förekommande terminator i biotekniska försök med jäst (Ghazal et al., 2009, Dobi och Winston, 2007, Bennetzen och Hall, 1982).

2.2.2 Ledarsekvens

För att säkerställa att de antimikrobiella peptiderna lämnar jästcellen efter translation, behöver en ledarsekvens integreras i det insert som förs in i jästens genom. När denna ledarsekvens uttrycks ihop med önskad peptid, guidas de uttryckta peptiderna genom den korrekta sekretoriska vägen och ut genom cellmembranet. En sådan ledarsekvens är den α -ledare som ursprungligen är kodad från genen MF α 1 (Bitter et al., 1984, Flessel et al., 1989).

MF α 1 kodar för en preprotein- α -faktor, som är 165 aminosyror lång (Kurjan och Herskowitz, 1982). Detta preprotein består av en 19 aminosyror lång signalpeptid, som orsakar en förflyttning av preproteinet till det endoplasmatiska nätverket (ER), och en 64 aminosyror lång region som innehåller tre platser för glykosylering. I sin glykosylerade form tros regionen leda preproteinet genom rätt reaktionsväg i cellen. De resterande 82 aminosyror består av fyra upprepningar av en α -faktorsekvens, som åtskiljs av länkande peptider. α -faktorsekvenserna kan bytas ut mot valfri gen, som kommer att bearbetas på samma sätt som om den vore en α -faktorsekvens. (Bitter et al., 1984, Caplan et al., 1990)

I ER påbörjas preproteinets posttranslationella modifieringar där peptiden glykosyleras och signalsekvensen klyvs, vilket omvandlar preproteinet till en pro- α -faktor. Peptiden förs vidare till golgiapparaten där ytterligare glykosyleringar tillkommer. Ett antal olika enzymer i golgiapparaten bryter sedan särskilda peptidbindningar i pro- α -faktorn. Endopeptidaset KEX2 klipper vid N-terminalen på varje länkande peptid och bildar fyra α -faktorpeptider, varpå STE13 klipper bort de återstående aminosyror av de länkande peptiderna från α -faktorerna. Dessa utsöndras slutligen ut i det extracellulära mediet. (Julius et al., 1984a,b, Caplan et al., 1990)

I denna studie kommer endast en del av α -ledaren att användas, bestående av 89 aminosyror från α -ledarens N-terminal (Bilaga A). Denna oligopeptid består av de 64 plus 19 aminosyror som leder peptiden genom rätt reaktionsväg, samt en länkande peptid för att säkerställa att proteinet får de egenskaper som eftersöks (Polyak et al., 1997). Nedströms α -ledaren, där α -faktorsekvenserna vanligtvis sitter, placeras genen till den peptid som jästen ska utsöndra, L50A eller β -defensin-3. På så sätt kan även främmande protein utsöndras av jästcellens naturliga mekanismer.

2.3 Kontaminerande bakterier

Vid jästfermentationer för produktion av etanol beror behovet av en semisteril omgivning till stor del på produktens natur. Vid livsmedelsproduktion såsom vin och andra alkoholhaltiga drycker krävs en miljö så fri som möjligt från oönskade kontaminationer, för att försäkra sig om en produkt med önskad kvalitet och smak (Suzuki et al., 2006). Vid produktion av etanol, till exempelvis drivmedel, ligger inte fokus på en semisteril miljö utan syftet är främst att få ett så högt produktutbyte som möjligt. Detta kan, utan behandling av exempelvis antibiotika, innebära en ökad risk för förekomst av produktionsinhiberande bakterier (Bischoff et al., 2007). I en studie av Skinner och Leathers (2004) påvisades att vanligt förekommande grupper av kontaminerande bakterier i etanolvermentationer med jäst, är arter av mjölksyrabakterier samt *Bifidobacter*. Albers et al. (2011) konstaterar även att förekomst av *Acetobacter* kan inhibera etanolproduktionen vid bioetanolframställning.

2.3.1 *Lactobacillus*

Lactobacillus är grampositiva, stavformade bakterier som tillhör gruppen mjölksyrabakterier. Mjölksyrabakterier karakteriseras av deras förmåga att bryta ned hexoser till främst mjölksyra, men även ättiksyra (Kandler, 1982). *Lactobacillus* delas in i tre undergrupper: obligat homofermentativa, fakultativt heterofermentativa och obligat heterofermentativa (Du Toit et al., 2001). Majoriteten tillhör den första kategorin (Kandler, 1982). Obligat homofermentativa *Lactobacillus*-stammar använder sig främst av glykolysen, i vilken glukos bryts ned till pyruvat och sedan mjölksyra. Heterofermentativa stammar använder en annan reaktionsväg, pentosfosfatvägen, som producerar mjölksyra, men även ättiksyra och etanol (Kandler, 1982).

Lactobacillus används ofta som startkultur i många växtbaserade fermentationer, exempelvis för produktion av ensilage. Detta för att inhibera jästtillväxt, vilket skulle kunna leda till förstört foder. *Lactobacillus* används också tillsammans med jäst vid bakning av surdeg för att förhindra tillväxt av mögel eller som startkultur i mjölkprodukter, såsom yoghurt och ost. (Filya et al., 2006, Corsetti et al., 1998).

Vid förekomst av *Lactobacillus* i en fermentation med jäst konkurrerar de två organismerna med varandra om näring (hexoser, såsom glukos), vilket kan leda till en inhibering av jästens tillväxt (Alexander, 1971). Detta kan även ske genom *Lactobacillus* produktion av mjölksyra, vars olösta form kan ta sig in i jästcellens cytosol och inhibera tillväxt. Tillväxt av *Lactobacillus* leder alltså till att jästen har mindre substrat att tillgå för att växa och producera etanol, vilket minskar lönsamheten vid etanolproduktion (Beckner et al., 2011, Chang et al., 1995).

I studien användes två arter för att undersöka de genmodifierade jäststammarnas antimikrobiella effekt: *Lactobacillus brevis* och *Lactobacillus buchneri*.

2.3.2 *Lactobacillus brevis* och *Lactobacillus buchneri*

L. brevis och *L. buchneri* är båda heterofermentativa arter som i anaeroba eller mikroaeroba förhållanden producerar mjölksyra, acetat och etanol från hexoser, såsom glukos, galaktos och xylos (Sharpe, 1979, Kandler, 1982, Liu et al., 2007). *L. brevis* har en optimal tillväxttemperatur på ca 30 °C och växer dåligt över 37 °C (Bergey et al., 1923). *L. buchneri* har en optimal tillväxttemperatur på mellan 32 och 37 °C, men klarar temperaturer på upp till 40-44 °C (Bergey et al., 1923). Detta till trots, så finns det flertalet olika stammar under både *L. brevis* och *L. buchneri* som har olika specifika egenskaper såsom optimal tillväxttemperatur och pH-tolerans (Sharpe, 1979). Detta gör dem toleranta för varierande förhållanden i system med jästfermentation.

3 Material och metod

I följande avsnitt beskrivs de metoder som användes under studien. Dessa inkluderar amplifiering, med hjälp av *Escherichia coli*, av de plasmider med insert som skulle transformeras in i de två jäststammarna JBA och CEN.PK. Avsnittet inkluderar även metoder för extraktion och verifiering av plasmiderna, samt transformering och verifiering av de amplifierade inserten för respektive jäststam. Dessutom beskrivs den ympning som gjordes av de två genmodifierade jäststammarna med *Lactobacillus brevis* och *Lactobacillus buchneri*, för att undersöka bakteriernas tillväxt i förhållande till de genmodifierade jäststammarnas.

3.1 Amplifiering av plasmider genom transformation in i *E. coli*

Plasmider innehållande gensekvenser för L50A respektive β -defensin-3, med tillhörande ledarsekvenser, beställdes från GenScript (Bilaga B). Dessa gensekvenser klipptes ut från vardera plasmid med restriktionsenzymerna BamHI och AscI och verifierades med en post-stained gel och gelelektrofores (80 V, 60 min). Gensekvenserna renades ut från gelen med hjälp av Thermo Scientifics "GeneJET Gel Extraction Kit", varpå de ligerades in i vektorer (pUC57-TDH3-EFE-vektorer) med ampicillin- och kanamycinresistens, homologisekvenser för jäst samt promotor respektive terminator för den inkorporerade genen. Gensekvenserna ersätter EFE-delen av vektorn vid ligering och dessa konstruktioner benämns vidare som målplasmider (Bilaga C). Olika molration (gensekvens/vektor) användes vid ligeringen för att öka sannolikheten för en lyckad ligering. Plasmider transformerades genom heat shock in i *E. coli* DH5 α . Transformationen av *E. coli* utnyttjades för amplifiering av målplasmider (Bilaga C). Selektion av *E. coli* med upptagna plasmider genomfördes genom att bakterierna odlades på LB+ampicillin-plattor (10g/l pepton, 10 g/l NaCl, 5g/l jästextrakt, 16 g/l agar, 80 mg/l ampicillin). Endast de bakterier som tagit upp plasmider innehållande genen för ampicillinresistens överlevde. Bakterierna kultiverades över natt i 37 °C värmeskap.

3.2 Extraktion och verifiering av målplasmider bland upptagna plasmider från *E. coli*

Miniprep-kulturer förbereddes genom att kolonier från två plattor med *E. coli* som transformerats med L50A med två olika molration (gensekvens/vektor), 3:1 och 5:1, samt kolonier från en platta med *E. coli* som transformerats med β -defensin-3, molratio 3:1, valdes ut. Totalt 10 kolonier från respektive platta plockades och överfördes till Eppendorfrör med 2 ml LB-medium+ampicillin (50 μ g/ml). Eppendorfrören sattes i 37 °C skakinkubator över natt.

Plasmider extraherades från odlingarna med hjälp av Thermo Scientifics ”GeneJET Plasmid Miniprep Kit”, och målplasmider verifierades med gelelektrofores (80 V, 40 min) efter att de klippts med restriktionsenzymerna HindIII och PvuII (Figur 2). Ytterligare verifiering av respektive målplasmid genomfördes efter klippning med dels AscI och BamHI, och dels med MfeI, följt av gelelektrofores (80 V, 40 min, Figur 3).

3.3 Amplifiering av insert till transformation av jäststammar

PCR (98 °C i 10 s, 53 °C i 30 s, 72 °C i 2 min, 30 cykler, 72 °C i 10 min) genomfördes med primrarna DAK2_up och DAK2_dw (Tabell 1) på 10x- respektive 100x-spädningar av målplasmider från utvalda kolonier av *E. coli*, för att amplifiera de insert (Bilaga D) som sedan transformerades in i jästen. Verifiering av PCR-produkterna för respektive insert utfördes både med och utan klippning med MfeI, följt av gelelektrofores (75 V, 40 min, Figur 4).

Tabell 1: I metoden använda primrar.

Primer	Sekvens
DAK2_up	5'-CATGCATCTAAGAAATCAACCTATATC-3'
DAK2_dw	5'-CAATTTAAACGGCTCAAATCATTG-3'
DAK2_ctrLup	5'-GTAGTTGATTCTTGTTCTACCAATTAGTG-3'
DAK2_ctrLdw	5'-GATGTCTACATCGTCAGAACTAAGTG-3'
TDH3p_rev	5'-TGGACCTATGAACTGATGGTTGGTG-3'
KanMX_fw	5'-GTGAGTTTTCTCCTTCATTACAGAAACG-3'

3.4 Transformation av jäststammar

Kulturer av jäststammarna JBA och CEN.PK odlades i Falconrör över natten i YPD-medium (20 g/l glukos, 20g/l pepton, 10 g/l jästextrakt) i 30 °C. Transformation av jäststammarna skedde enligt angivet protokoll (Bilaga E), följt av utstryk på YPD-plattor med Geneticin, G418 (20 g/l glukos, 20g/l pepton, 10 g/l jästextrakt, 20 g/l agar, 200 μ g/ml G418). G418 är en kanamycinanalog som bryts ned av kanamycinresistensgenen

i insertet som jäststammarna transformerades med (Bilaga D). Plattorna inkuberades i tre dygn i 30 °C.

Efter tre dygn gjordes en andra utstrykning av fyra större kolonier från vardera platta med de genmodifierade jäststammarna, på YPD-plattor med G418 (200 µg/ml), för att ytterligare selektera för kolonier där homolog rekombination av insertet lyckats. De fyra plattorna inkuberades i 30 °C över natten.

För att verifiera att inserten inkorporerats på rätt plats i jäststammarnas genom, extraherades genomen med hjälp av MP Biomedicals "FastDNA Spin Kit for Soil", varpå verifiering av rekombinationen av insertet utfördes med PCR (98 °C i 10 s, 57 °C i 30 s, 72 °C i 30 s, 30 cykler, 72 °C i 10 min, dels med primrarna DAK2_ctrl_{up} och TDH3p_{rev}, dels med primrarna DAK2_ctrl_{dw} och KanMX_fw (Tabell 1) följt av gelelektrofores (80 V, 45 min, Figur 5 och 6).

Två *Lactobacillus*-stammar, *L. buchneri* (LB-16) och *L. brevis* (SE-31), som skulle användas för att undersöka den bakteriedödande effekten hos den genmodifierade jästen, ströks ut på MRS-plattor och odlades upp i 30 °C.

3.5 Ympning av *Lactobacillus* med jäst

För att undersöka den bakteriedödande effekten av de båda antimikrobiella peptiderna, uttryckta av de två genmodifierade jäststammarna, gjordes en ympning av de genmodifierade jäststammarna, tillsammans med *L. buchneri* och *L. brevis*. För att avgöra vilka spädningar av förkulturer som skulle användas när antalet kolonier av jäststammar och *Lactobacillus*-bakterier skulle räknas, förbereddes kulturer av de genmodifierade jäststammarna, samt av vildtyperna av JBA och CEN.PK i separata Falconrör med YPD-lösning. I ytterligare ett Falconrör förbereddes en kultur av båda de uppodlade *Lactobacillus*-stammarna. Dessa inkuberades över natt i 30 °C. När de uppnått OD över 2 gjordes ympkulturer av dessa (10 ml YPD + 1 ml jästkultur + 1 ml bakteriekultur) som odlades på skakinkubator i 30 °C. En spädningsserie med spädningar om 10x utfördes från dessa ympkulturer och spädningarna placerades som droppar om 10 µL på YPD- och MRS+cykloheximid-plattor, varpå de inkuberades i 30 °C. Nya plattor förbereddes på samma sätt, av samma ympkulturer, efter 3 och 6 timmar efter att de första plattorna inkuberats.

Nya ympkulturer förbereddes därefter med en mindre mängd *Lactobacillus* (10 ml YPD + 1 ml jästkultur + 0,25 ml bakteriekultur) och spädningarna 10⁵ och 10⁶ undersöktes. 100 µL av varje spädning spreds på både YPD- och MRS+cykloheximid-plattor om dubbelprov och inkuberades i 30 °C. Nya plattor förbereddes efter 3, 6 och 24 timmar efter att de första plattorna inkuberats. Kolonierna som uppstod efter två dygns inkubering räknades. Cykloheximiden dödade jästcellerna vilket gjorde det möjligt att endast studera bakteriekolonier på MRS+cykloheximid-plattorna. På YPD-plattorna gick det att se skillnad på jäst- och bakteriekolonier vilket gjorde det möjligt att studera jästtillväxten på dessa plattor.

Antalet kolonier på plattorna användes för att beräkna jäst- och bakteriekoncentrationen i varje ympkultur (Bilaga F).

4 Resultat och diskussion

Detta avsnitt behandlar resultaten av de verifieringar som gjordes för att säkerställa en lyckad genmodifiering av de två jäststammarna, JBA och CEN.PK. Avsnittet behandlar även resultatet av den ympning som gjordes med respektive jäststam tillsammans med *Lactobacillus buchneri* och *Lactobacillus brevis*, för att undersöka de genmodifierade jäststammarnas avdödande effekt på dessa bakterier.

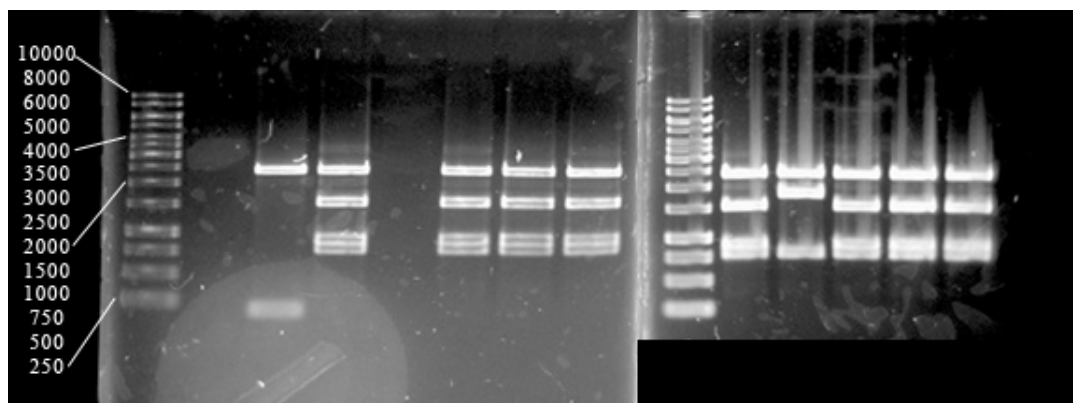
4.1 Verifieringar med gelelektrofores

Nedan följer resultat och diskussion av de verifierande gelelektroforeser som utfördes under studien. Detta inkluderar verifiering av att målplasmider inkorporerats och amplifierats i *Escherichia coli* (Figur 2 och 3), att rätt insert amplifierats från dessa plasmider (Figur 4) och att de transformerats och inkorporerats på rätt plats i jäststammarnas genom (Figur 5 och 6). En exempelberäkning på förväntade bandstorlekar för gelelektroforeserna presenteras i Bilaga F.

4.1.1 Verifiering av målplasmider från *E. coli*

Resultatet från kontrollen av de extraherade plasmiderna, där transformationen av *E. coli* verifierades, visade att L50A och β -defensin-3 hade ligerats in i vektorerna i en majoritet av de undersökta kolonierna (Figur 2). Förväntade längder på banden från de uppklippta plasmiderna innehållande L50A eller β -defensin-3 presenteras i Tabell 2, respektive Tabell 3. Figur 2 visar att resultatet av L50A-plasmiden (vänstra gelen) gav fyra av fem laddade brunnar som motsvarar de förväntade längderna på banden. Den första brunnen från vänster saknar band motsvarande 1526, 892 och 776 bp. De övriga brunnarnas band stämmer överens med de förväntade längderna, vilket tyder på en lyckad ligering av gensekvenserna med pUC57-TDH3-EFE-vektorerna.

Resultatet från kontrollen av β -defensin-3-plasmiden (Figur 2, högra gelen) visar också fyra av fem brunnar med förväntade längder på banden. Det näst största bandet i den andra brunnen från vänster är något längre än motsvarande i övriga brunnar, och det förväntade bandet på 892 bp saknas. Med undantag för de två nämnda brunnarna gav kontrollen av de extraherade plasmiderna från de olika kolonierna de förväntade målplasmiderna.



Figur 2: Kontroll av de, från olika kolonier av *E. coli*, extraherade plasmiderna (Bilaga C) innehållande genen för L50A (vänster gel) eller β -defensin-3 (höger gel), klippta med restriktionsenzymerna HindIII och PvuII.

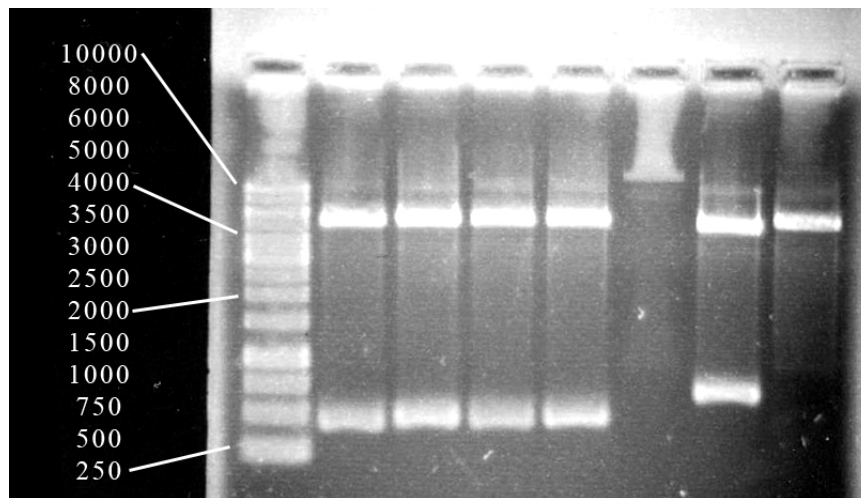
Tabell 2: Brunnar och förväntade band i Figur 2 från kontrollen av L50A-plasmider extraherat från *E. coli*.

Plasmid:	L50A	L50A	L50A	L50A	L50A
Molratio					
(gensekvens/vektor):	3:1	3:1	5:1	5:1	5:1
Koloni:	1	2	1	2	3
REs:	HindIII	HindIII	HindIII	HindIII	HindIII
	PvuII	PvuII	PvuII	PvuII	PvuII
Storlek (bp):	2364	2364	2364	2364	2364
	1526	1526	1526	1526	1526
	892	892	892	892	892
	776	776	776	776	776

Tabell 3: Brunnar och förväntade band i Figur 2 från kontrollen av β -defensin-3-plasmider extraherat från *E. coli*.

Plasmid:	β -def.	β -def.	β -def.	β -def.	β -def.
Molratio (gensekvens/vektor):	3:1	3:1	3:1	3:1	3:1
Koloni:	1	2	3	4	5
REs:	HindIII	HindIII	HindIII	HindIII	HindIII
	PvuII	PvuII	PvuII	PvuII	PvuII
Storlek (bp):	2364	2364	2364	2364	2364
	1529	1529	1529	1529	1529
	892	892	892	892	892
	776	776	776	776	776

Från gelelektroforesen i Figur 3 bekräftades det ytterligare att plasmiderna extraherade ur olika kolonier av *E. coli* var korrekta i en majoritet av fallen. Klippningen med MfeI fastställde skillnaden mellan de två målplasmiderna, då detta restriktionsenzym klippte i genen för L50A, men inte i genen för β -defensin-3. Detta gjordes för att säkerställa att ingen förväxling hade skett mellan de två olika målplasmiderna. Det syns tydligt i de två sista brunnarna i Figur 3 att restriktionsenzymet har klippt två gånger i målplasmiden innehållande L50A; en gång i vektorn och en gång i själva genen, men endast en gång i vektorn innehållande genen för β -defensin-3.



Figur 3: Kontroll av de, från olika kolonier av *E. coli*, extraherade plasmiderna (Bilaga C), klippta med *AscI* och *BamHI* (brunn 1-4). För att säkerställa att de båda målplasmiderna innehöll rätt gensekvens gjordes även en kontroll med restriktionsenzymet *MfeI* (de två sista brunnarna) som klipper i *L50A*-genen men inte i *β -defensin-3*-genen.

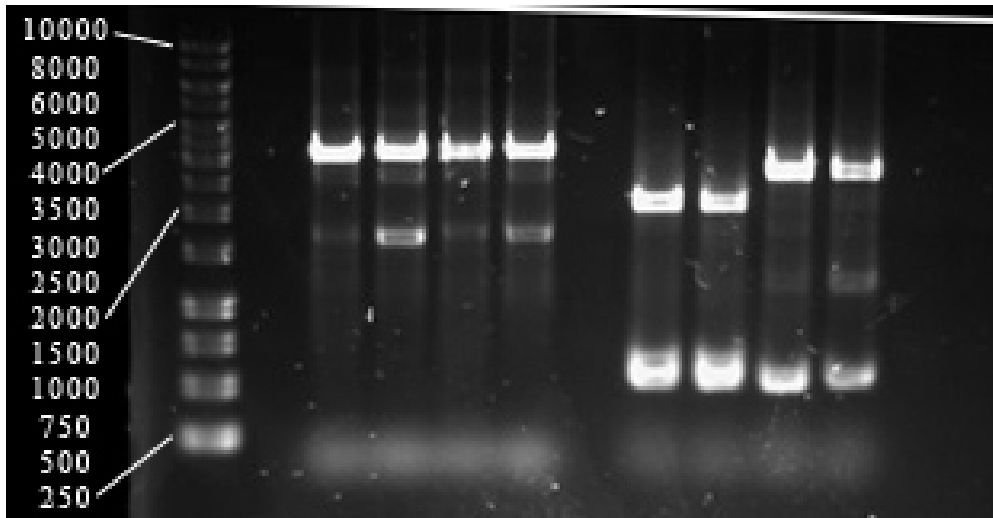
Tabell 4: Brunnar och förväntade band från kontrollen av plasmider i Figur 3.

Plasmid:	L50A	β -def.	L50A	β -def.	L50A	β -def.
Molratio (gensekvens/vektor):	5:1	3:1	3:1	3:1	5:1	3:1
Koloni:	1	1	2	3	1	1
REs:	BamHI AscI	BamHI AscI	BamHI AscI	BamHI AscI	MfeI	MfeI
Storlek (bp):	5149 409	5149 412	5149 409	5149 412	4971 587	5561

4.1.2 Verifiering av linjärt insert för jästtransformation

Samtliga laddade brunnar i Figur 4 visar de förväntade bandstorlekarna för PCR-produkterna (Tabell 5). Ett svagare band kunde dock urskiljas, i synnerhet i brunnarna laddade med oklippt PCR-produkt som späts 100 gånger innan PCR-reaktionen. Det finns ingen uppenbar förklaring till detta kortare fragment på ca 1800 bp. Då intensiteten på detta band jämfört med det förväntade bandet var väldigt svag, och endast det korrekta bandet lär innehålla homologiregioner till jäst, ansågs resultatet vara tillräckligt bra för att transformera jäststammarna med PCR-produkten. Proverna L50A 10x och β -def. 10x (Tabell 5) valdes ut till jästtransformationen, då det oväntade bandet var

svagast för dessa spädningar.



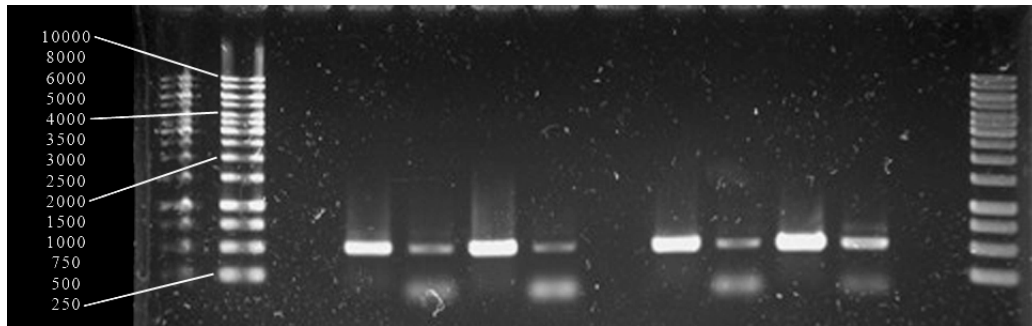
Figur 4: Verifiering av korrekt PCR-produkt (linjärt insert för transformering av jäst, Bilaga D). De fyra första brunnarna laddades med oklippt PCR-produkt och de fyra sista brunnarna laddades med PCR-produkt klippt med MfeI.

Tabell 5: Brunnar och förväntade band för verifiering av PCR-produkt i Figur 4. Med spädning avses spädning innan PCR-reaktionen påbörjades.

Insert:	L50A	L50A	β -def.	β -def.	L50A	L50A	β -def.	β -def.
Spädning:	10x	100x	10x	100x	10x	100x	10x	100x
RE:	-	-	-	-	MfeI	MfeI	MfeI	MfeI
Storlek (bp):	3185	3185	3188	3188	2093	2093	2683	2683
					587	587	505	505
					505	505		

4.1.3 Verifiering av insert i jästgenomen

För verifiering av insert på korrekt plats i jästgenomen genomfördes två PCR-reaktioner med olika primrar enligt Figur 1. Längderna på de erhållna banden i Figur 5 stämde överens med de förväntade längderna för PCR-amplifieringen av den övre delen av inserten i jästgenomen (Tabell 6). De prov som späddes 10 gånger innan PCR-reaktionen gav dock svagare band, samt ett mycket kort band, som skulle kunna vara primrar.

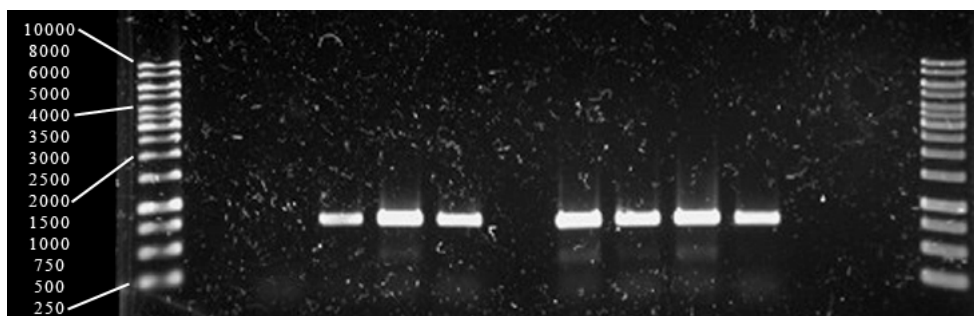


Figur 5: Verifiering av att övre delen av inserten har inkorporerats på korrekt plats i jästgenomen (Figur 1). Verifieringen gjordes med hjälp av gelelektrofores av en PCR av jästgenomen med primrarna DAK2_ctrlUp och TDH3p_rev (Tabell 1). Förväntade storlekar för samtliga prov var 498 bp.

Tabell 6: Brunnar och förväntade band för verifiering av övre delen av inserten i jästgenomen. Med spädning avses spädningen innan PCR-reaktionen påbörjades.

Stam:	JBA	JBA	JBA	JBA	CEN.PK	CEN.PK	CEN.PK	CEN.PK
Mutant:	L50A	L50A	β -def.	β -def.	L50A	L50A	β -def.	β -def.
Spädning:	outspädd	10x	outspädd	10x	outspädd	10x	outspädd	10x
Storlek (bp):	498	498	498	498	498	498	498	498

Verifieringen av den nedre delen av inserten i jästgenomen var också framgångsrik, då längderna på de erhållna banden i Figur 6 stämde överens med de förväntade längderna (Tabell 7). Den första brunnen, laddad med den outspädda PCR-amplifieringen av den nedre delen av L50A-insertet från JBA, visade dock inget band överhuvudtaget. En möjlig förklaring till detta är att inget DNA, utan endast loading dye, fanns i lösningen som brunnen laddades med. Då samma del av insertet som späts 10 gånger innan PCR-reaktionen gav korrekt band, ökar sannolikheten att inget DNA laddades i den första brunnen. Figur 5 och 6 bekräftar att båda verifieringarna lyckades, vilket innebär att inserten inkorporerades på rätt plats i genomen, och att samtliga jäststammar blev korrekt genmodifierade.



Figur 6: Verifiering av att nedre delen av inserten har inkorporerats på korrekt plats i jästgenomen (Figur 1). Verifieringen gjordes med hjälp av gelelektrofores av en PCR av jästgenomen med primrarna DAK2_ctrLdw och KanMX_fw (Tabell 1). Förväntade storlekar för samtliga prov var 744 bp.

Tabell 7: Brunnar och förväntade band för Figur 6. Med spädning avses spädningen innan PCR-reaktionen påbörjades.

Stam:	JBA	JBA	JBA	JBA	CEN.PK	CEN.PK	CEN.PK	CEN.PK
Mutant:	L50A	L50A	β -def.	β -def.	L50A	L50A	β -def.	β -def.
Spädning:	outspädd	10x	outspädd	10x	outspädd	10x	outspädd	10x
Storlek (bp):	744	744	744	744	744	744	744	744

4.2 Ympkulturer med bakterier och jäst

Efter kultivering enligt avsnitt 3.5 räknades de kolonier av *Lactobacillus* som vuxit på plattor med MRS+cykloheximid (Tabell 8, Bilaga G). Cykloheximiden på dessa plattor inhiberade jästtillväxten, vilket innebar att endast bakterier från de två *Lactobacillus*-stammarna kunde växa. Antalet bakteriekolonier räknades om till totalkoncentration av bakterier i respektive ympkultur (Figur 13 och 14, Bilaga H), genom att multiplicera antalet kolonier på plattorna med spädningsfaktorn och dividera med den tillsatta volymen av ympkultur på plattan (Tabell 8, Bilaga G). Koncentrationen av bakterier vid de olika tidpunkterna dividerades med startkoncentrationen av bakterier i respektive ympkultur, för att få fram en procentuell tillväxt i förhållande till startkoncentration för bakterierna (Figur 7 och 10). Detta för att de olika startkoncentrationerna av bakterier och jäst skiljde sig åt mellan ympkulturerna. På samma sätt beräknades den procentuella tillväxten i förhållande till startkoncentration för de olika jäststammarna (Figur 8 och 11). Jästkoncentrationen i ympkulturerna vid olika tidpunkter beräknades genom att räkna antalet jästkolonier som växt på YPD-plattor (Tabell 9, Bilaga G) och relatera antalet till totalkoncentrationen av jästceller i ympkulturerna (Figur 8 och 11).

Förhållandet mellan bakterier och jäst i de olika ympkulturerna jämfördes (Figur 9 och 12), genom att dividera koncentrationen av bakterier (Figur 13 och 14, Bilaga H) med koncentrationen av jäst (Figur 15 och 16, Bilaga H), vid varje mätpunkt. Jämförelsen gjordes för att försöka minimera påverkan av de spädningsfel som uppstod under

utstryken av ympkulturer på de olika MRS+cykloheximid- och YPD-plattorna.

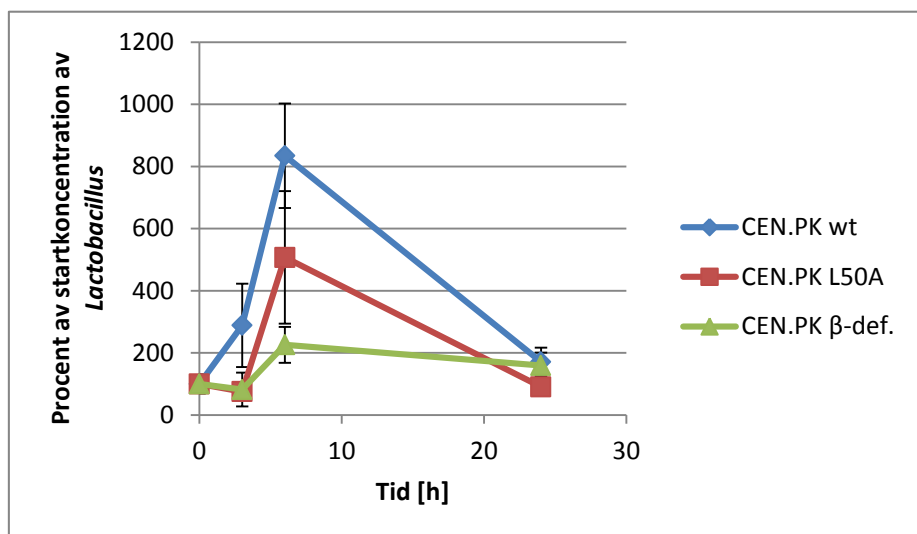
Att spädningssfelen varit stora kan man se på de koloniantal som uppstod på de olika plattorna (Tabell 8 och 9, Bilaga G). En tiopotens skiljer mellan varje spädning, vilket bör resultera i tio gånger så många kolonier på plattan med lägre spädning. Skillnaden mellan antalet bakteriekolonier för de olika spädningarna på MRS+cykloheximid-plattorna skiljer sig ofta endast med en faktor 3 eller 4, och på någon platta har antalet kolonier till och med varit högre på plattan som varit spädd tio gånger så mycket (Tabell 8, Bilaga G). Samma tendens gällde plattorna med YPD, som användes för att beräkna koncentrationen av jästceller i de olika ympkulturerna (Tabell 9, Bilaga G). Dessa spädningssfel tros bero på att pipettspetsarna inte byttes mellan varje spädning, under varje enskild spädningsserie, som gjordes av ympkulturerna för utstryk på alla plattor vid 0, 3 och 6 timmar. Pipettspetsarna byttes dock under spädningsserierna av ympkulturerna för utstryk vid 24 timmar, för vilka plattorna även generellt visar mer förväntade koloniantal (Tabell 8 och 9, Bilaga G).

Vidare hade vissa plattor inga kolonier alls för några av utstrykningarna, vilket tros bero på ett missöde under kultiveringen, då dessa plattor stod för nära en värmefläkt i det rum där de sattes att tillväxa. Dessa värden har tagits bort vid alla utförda beräkningar (Tabell 8 och 9, Bilaga G). De generellt osäkra spädningarna och odlingsförhållandena för alla plattor påverkar naturligtvis även resultaten, eftersom alla vidare beräkningar som gjorts för att tolka den bakteriedödande effekten hos jäststammarna, bygger på räkning av antalet kolonier på de olika plattorna. Detta gör resultaten mycket osäkra och inga definitiva slutsatser bör dras direkt ur kommande figurer.

4.2.1 Ympkulturer med *Lactobacillus* och *S. cerevisiae* CEN.PK

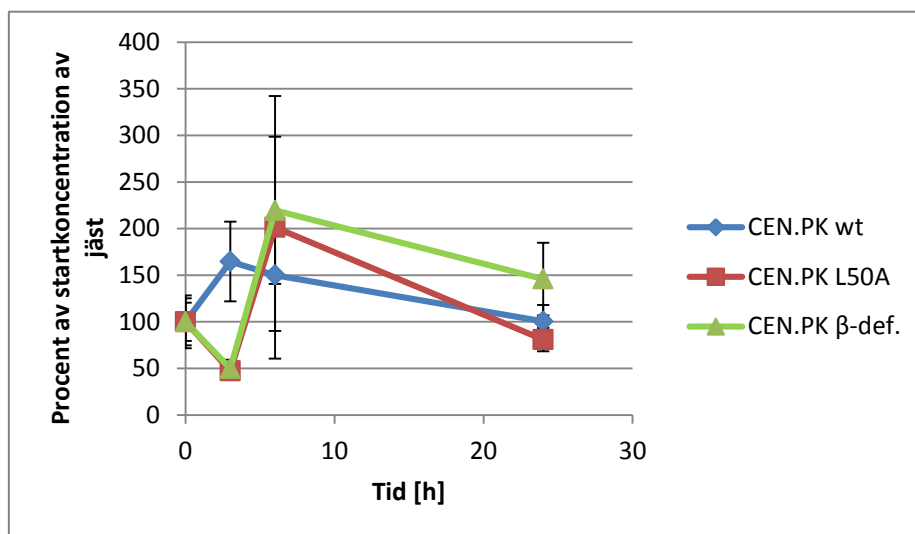
I Figur 7 presenteras den procentuella tillväxten i förhållande till startkoncentration av *L. brevis* och *L. buchneri* vid ympning med CEN.PK vildtypsjäst, CEN.PK genmodifierad med L50A eller CEN.PK genmodifierad med β -defensin-3, vid olika tidpunkter. Bakterietillväxten har undersökts genom odling på MRS+cykloheximidplattor. En signifikant minskad bakterietillväxt uppvisas för både CEN.PK L50A och CEN.PK β -defensin-3, jämfört med bakterietillväxten i CEN.PK vildtypsjäst, efter 3 timmar. Efter 6 timmar kan en signifikant skillnad av bakterietillväxt endast detekteras mellan vildtypsjästen och jästen modifierad med β -defensin-3, där den procentuella tillväxten i förhållande till startkoncentration, varit signifikant mindre i den genmodifierade jäststammen.

Efter 24 timmar har bakteriekoncentrationen i alla ympkulturer sjunkit markant, vilket tyder på en naturlig avdödning, troligtvis på grund av näringsbrist (Figur 7). Att näringsbrist är en trolig orsak till avdödningen av bakterier i alla ympkulturer med CEN.PK efter 24 timmar kan stärkas vid jämförelse med Figur 8, som visar den procentuella jästtillväxten i förhållande till startkoncentration, för samma ympkulturer, där även jästen visar en avdödning fram till denna tid.



Figur 7: Procentuell tillväxt i förhållande till startkoncentration av *L. brevis* och *L. buchneri* över tid, då de ympats ihop med vildtypen av CEN.PK (blå), CEN.PK genmodifierad med L50A (röd) eller CEN.PK genmodifierad med β -defensin-3 (grön). Tillväxten har beräknats från fyra olika MRS+cykloheximid-plattor, två med 10^5 -spädning och två med 10^6 -spädning (Tabell 8, Bilaga G). Plattorna var behandlade med cykloheximid för att inhibera tillväxt av jästceller. Punkterna i grafen är medelvärde av bakterietillväxten, beräknad från de fyra plattorna, för respektive jäststam. Felstaplarna visar medelfelet (Bilaga F).

Figur 8 visar den procentuella tillväxten i förhållande till startkoncentration av CEN.PK vildtypsjäst, CEN.PK genmodifierad med L50A eller CEN.PK genmodifierad med β -defensin-3 vid ympning med *L. brevis* och *L. buchneri*, vid olika tidpunkter. Figuren visar en signifikant skillnad i jästtillväxt mellan de olika ympkulturerna av båda genmodifierade stammar av CEN.PK och vildtypsjäst efter 3 timmar, där vildtypsjästen vuxit signifikant bättre (Figur 8). Denna figur kan användas som ett komplement till Figur 7, för att bekräfta att ett eventuellt minskat bakterieantal i ympkulturerna inte enbart beror på till exempel odlingsförhållanden. En minskad bakteriekontamination i ympkulturerna borde rimligtvis vara följden av en hög koncentration av antimikrobiella peptider och därmed även en hög koncentration av jäst i ympkulturen. Detta skulle leda till att de signifikant lägre värdena av bakterier för de genmodifierade CEN.PK-jäststammarna i Figur 7 efter 3 timmar även skulle visa en signifikant högre koncentration av jästceller vid samma tid (Figur 8). Detta är dock inte fallet, och den signifikanta skillnad som uppvisades mellan bakterietillväxten för de genmodifierade CEN.PK-stammarna och vildtypsjästen (Figur 7) beror därför antagligen inte på de antimikrobiella peptiderna, utan snarare på spädningsfelen. Om ett samband skulle ha uppvisats, kunde avdödningen av bakterier ändå inte med säkerhet kunnat tillskrivas en hög effekt av de antimikrobiella peptiderna. Detta för att ingen studie har gjorts på vare sig translation eller utsöndring av de antimikrobiella peptiderna, av de genmodifierade jäststammarna.



Figur 8: Procentuell tillväxt i förhållande till startkoncentration av vildtypen av CEN.PK (blå), CEN.PK genmodifierad med L50A (röd) eller CEN.PK genmodifierad med β -defensin-3 (grön) då de ympats med *L. brevis* och *L. buchneri*. Tillväxten har beräknats från fyra olika YPD-plattor, två med 10^5 -spädning och två med 10^6 -spädning (Tabell 8, Bilaga G). Punkterna i grafen är medelvärde av jästtillväxten, beräknad från de fyra plattorna för respektive jäststam. Felstaplarna visar medelfelet (Bilaga F).

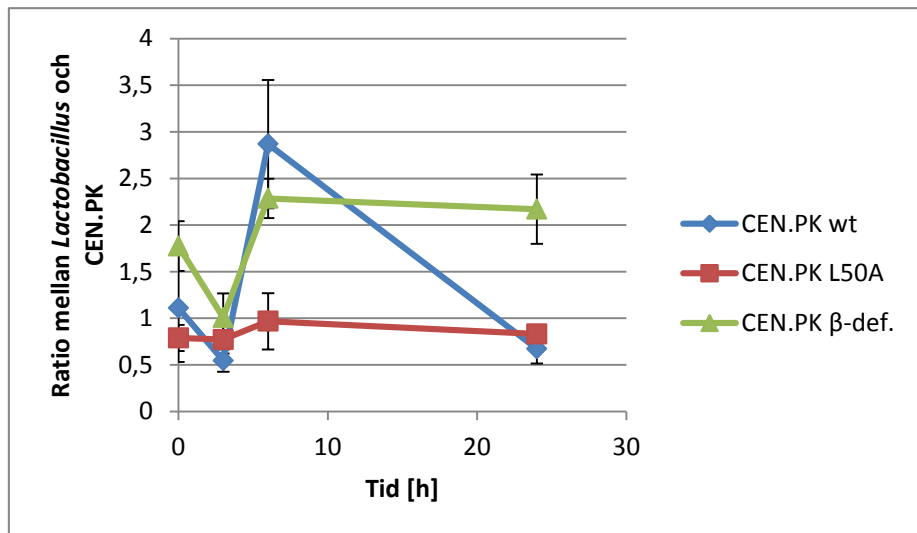
Figur 9 visar hur *L. brevis* och *L. buchneri* har vuxit i förhållande till vildtypen av CEN.PK, CEN.PK genmodifierad med L50A eller CEN.PK genmodifierad med β -defensin-3 i respektive ympkultur. Denna jämförelse har gjorts för att minska resultatens påverkan av de spädningsfel som konsekvent gjordes under utstryken på plattor under hela studien. Eftersom utstryken på plattor gjordes från samma spädningsserie för att undersöka både bakterietillväxten och jästtillväxten i ympkulturerna, borde spädningsfelet som uppstod vara detsamma på båda typer av plattor. Därför bör kvoten mellan den beräknade bakteriekoncentrationen och jästkonsentrationen i ympkulturerna ge en mer korrekt bild av förhållandet i ympkulturerna än vad som kan urläsas enbart ur Figur 7 och Figur 8.

Ur Figur 9 kan urläsas att förhållandet mellan koncentrationen av jästceller och koncentrationen av *Lactobacillus* har varit signifikant olika i ympkulturerna vid inkuberingsstart, med en högre andel bakterier i ympkulturen för CEN.PK β -defensin-3, jämfört med de två andra CEN.PK-stammarna. Jäststammarna i de olika ympkulturerna har därför sannolikt haft olika förutsättningar att konkurrera med bakterierna från början, vilket kan ha påverkat resultatet.

Vid 3 timmar syns en drastisk minskning av bakterier jämfört med jästceller i ympkulturen hos både CEN.PK vildtyp och CEN.PK β -defensin-3, men inte hos CEN.PK L50A (Figur 9). Detta kan bero på att jästen har kommit in i logfasen snabbare än *Lactobacillus*, då dennes förkultur var YPD. *Lactobacillus* odlades i förkultur med MRS vilket kan ha gett en längre lagfas, då bakterierna behövt anpassa sig till det nya medi-

et. Att detta inte skett med CEN.PK L50A beror sannolikt på att båda resultaten från 10^6 -spädningarna har försakats då plattorna inte innehöll några jästkolonier (Tabell 9, Bilaga G). Detta gör den beräknade koncentrationen för CEN.PK L50A mer osäker vid denna tidpunkt vilket i sin tur kan ha ökat ratiot mellan *Lactobacillus* och jäst (Figur 9).

Vid 6 timmar kan konstateras att CEN.PK L50A haft en signifikant begränsande effekt på tillväxten av bakterier i förhållande till de andra CEN.PK-jäststammarna. Denna effekt avtar fram till 24 timmar, då ingen signifikant skillnad längre kan detekteras mellan vildtypsjästen och CEN.PK L50A. CEN.PK β -defensin-3 har från 3 till 6 timmar inte visat någon signifikant skillnad från CEN.PK vildtyp. Däremot kan man efter 24 timmar se en signifikant högre andel bakterier i förhållande till jäst i ympkulturen för β -defensin-3. Hänsyn bör dock tas till att startkoncentrationer av bakterier i CEN.PK β -defensin-3 var signifikant högre än den var hos både vildtypsjästen och den andra mutanten, vilket kan ha försämrat grundförutsättningarna för CEN.PK β -defensin-3 att tillväxa på samma sätt (Figur 9).

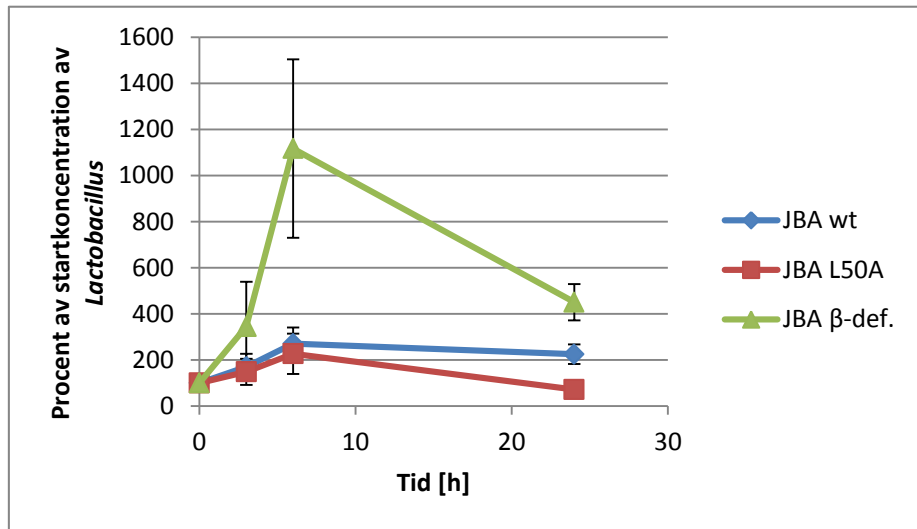


Figur 9: Förhållande mellan *Lactobacillus*-stammarna och vildtypen av CEN.PK (blå), CEN.PK genmodifierad med L50A (röd) och CEN.PK genmodifierad med β -defensin-3 (grön) för respektive ympkultur. Tillväxten har beräknats från fyra olika MRS-plattor, två med 10^5 -spädning och två med 10^6 -spädning, samt fyra YPD-plattor med samma spädningar (Tabell 8, Bilaga G). Resultatet från MRS+cykloheximid-plattorna har dividerats med YPD-plattorna för att eliminera spädningsfel. MRS-plattorna var behandlade med cykloheximid för att inhibera tillväxt av jästceller. Punkterna i grafen är medelvärde av förhållandet mellan varje MRS- och YPD-platta vid given tidpunkt. Felstaplarna visar medelfelet (Bilaga F).

4.2.2 Ympkulturer med *Lactobacillus* och *S. cerevisiae* JBA

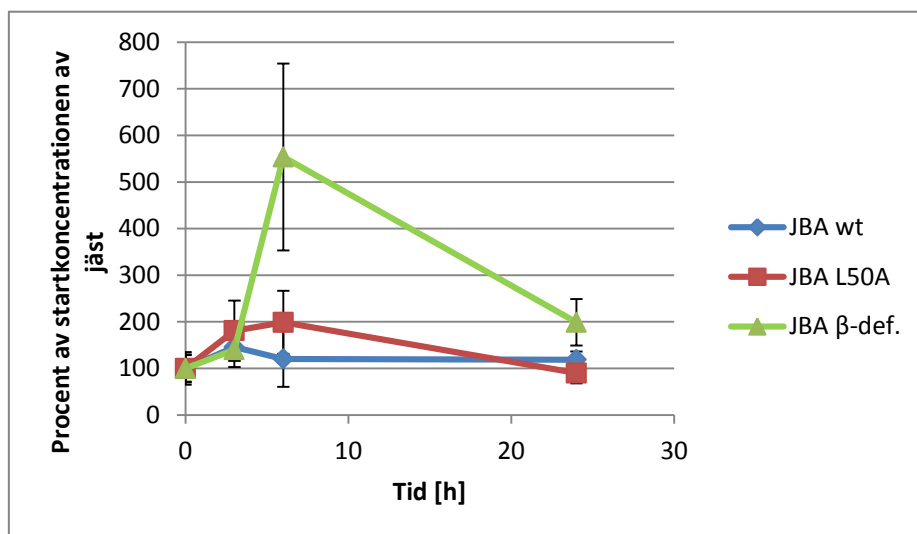
Figur 10 visar procentuell tillväxt i förhållande till startkoncentration av *Lactobacillus* i de olika ympkulturerna med JBA vildtypsjäst, JBA genmodifierad med L50A eller JBA genmodifierad med β -defensin-3, vid olika tidpunkter. Bakterietillväxten har undersökts efter odling på MRS+cykloheximidplattor. En signifikant ökning av bakterietillväxt kan här detekteras för JBA β -defensin-3, jämfört med vildtypsjästen, efter 6 timmar (Figur 10). Detta resultat går tvärt emot studien av James et al. (2013) på β -defensin-3, när den uttrycktes av *Saccharomyces pastorianus* stam CMBS-33, vilka såg en signifikant minskad bakteriekontamination av *Lactobacillus brevis* i odlingar på pilotskala. I vår studie har andra jäststammar använts för att uttrycka de antimikrobiella peptiderna, något som kan påverka resultatet, eftersom de olika jäststammarna kan vara olika bra på att uttrycka peptiden och utsöndra den ur cellen. Detta kan knappast förklara en ökning av bakterietillväxten jämfört med vildtypen, då problem med att utsöndra de antimikrobiella peptiderna snarare skulle leda till att de genmodifierade jäststammarna påverkade bakterierna på samma sätt som vildtypsjästen.

Ökningen skulle istället kunna tillskrivas problemen vid de utförda spädningsserierna av ympkulturerna, eftersom samma ökning av jästceller kan detekteras vid en jämförelse med Figur 11. Skillnaden för bakterietillväxt i ympkulturen med JBA β -defensin-3 jämfört med ympkulturen med vildtypsjäst (Figur 10) beror troligtvis på att de spädningar som gjordes vid utstyken efter 6 timmar antagligen var lägre än avsett, och därför gav en mycket högre koncentration efter beräkningar från MRS+cykloheximid- och YPD-plattorna (Tabell 8 och 9, Bilaga G), än den verkliga koncentrationen av bakterier och jästceller i ympkulturen faktiskt var.



Figur 10: Procentuell tillväxt i förhållande till startkoncentration av *Lactobacillus brevis* och *Lactobacillus buchneri* över tid, då de ympats ihop med vildtypen av JBA (blå), JBA genmodifierad med L50A (röd) eller JBA genmodifierad med β -defensin-3 (grön). Tillväxten har beräknats från fyra olika MRS+cykloheximid-plattor, två med 10^5 -spädning och två med 10^6 -spädning (Tabell 8, Bilaga G). Plattorna var behandlade med cykloheximid för att inhibera tillväxt av jästceller. Punkterna i grafen är medelvärden av bakterietillväxten, beräknad från de fyra plattorna, för respektive jäststam. Felstaplarna visar medelfelet (Bilaga F).

Figur 11 visar den procentuella tillväxten i förhållande till startkoncentration av JBA vildtypsjäst, JBA genmodifierad med L50A eller JBA genmodifierad med β -defensin-3 vid ympning med *L. brevis* och *L. buchneri*, vid olika tidpunkter. Figuren visar inga signifikanta skillnader för jästtillväxten i de olika ympkulturerna med *Lactobacillus*, förutom för jäststammen genmodifierad med β -defensin-3, som har högre tillväxt än de andra jäststammarna mellan 3 och 6 timmar. Denna skillnad tolkas som en effekt av de spädningsfel som förekom vid utstryken på de plattor som användes för att beräkna bakterie- och jästkonzentrationserna i ympkulturerna för JBA β -defensin-3, vilka även nämnts i tidigare stycken.

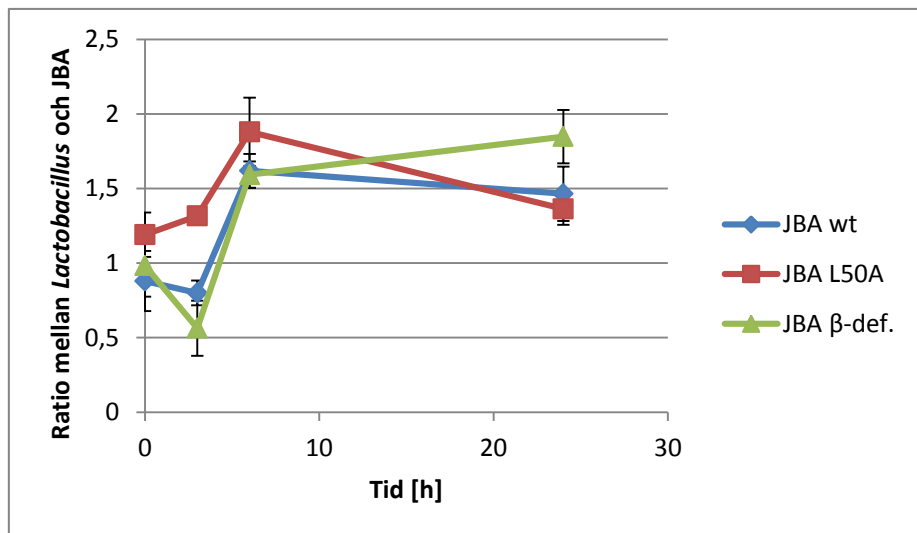


Figur 11: Procentuell tillväxt i förhållande till startkoncentration av vildtypen av JBA (blå), JBA genmodifierad med L50A (röd) eller JBA genmodifierad med β -defensin-3 (grön) då de ympats med *L. brevis* och *L. buchneri*. Tillväxten har beräknats från fyra olika YPD-plattor, två med 10^5 -spädning och två med 10^6 -spädning (Tabell 8, Bilaga G). Punkterna i grafen är medelvärde av jästtillväxten, beräknad från de fyra plattorna för respektive jäststam. Felstaplarna visar medelfelet (Bilaga F).

I Figur 12 har förhållandet mellan bakterietillväxt och jästtillväxt för JBA vildtypsjäst, JBA genmodifierad med L50A och JBA genmodifierad med β -defensin-3 i de olika ympkulturerna studerats, vid olika tidpunkter. Här kan de spädningsfel som påverkat JBA β -defensin-3 i Figur 10 och Figur 11 undvikas, då utstryken på MRS+cykloheximid- och YPD-plattorna gjordes från samma spädning av ympkulturen och därmed bör ge samma koncentrationer. Förhållandet mellan dem är därför oberoende av om koncentrationerna var högre enligt plattorna än i den faktiska ympkulturen, eftersom ökningen bör ha påverkat lika mycket för både bakteriernas och jästens tillväxtberäkningar. Denna figur ger därmed en mer korrekt bild av hur de genmodifierade jäststammarna påverkar bakterietillväxten än Figur 10 och Figur 11 var för sig.

I figuren kan en signifikant skillnad detekteras i förhållandet mellan bakterier och jäst i ympkulturerna för JBA L50A efter 3 timmar, med fler bakterier i denna ympkultur jämfört med ympkulturen för JBA vildtypsjäst och JBA β -defensin-3 (Figur 12). Detta tyder på en motsatt effekt av den genmodifierade jäststammen på bakterietillväxten än den önskvärda. Denna effekt skulle återigen kunna vara en olycklig följd av det osäkra beräkningsunderlaget som resultaten bygger på, men även andra orsaker är naturligtvis möjliga. En sådan kan vara att JBA-stammen själv är känslig för den antimikrobiella peptiden L50A. Ingen garanti finns för att de, av den genmodifierade jästen eventuellt uttryckta antimikrobiella peptiderna, endast påverkar bakterier. Risken finns att de även skulle kunna ha effekt på membranerna hos jästen. Mekanismen hos dessa antimikrobiella peptider har inte undersökts i denna studie. Inget försök gjordes heller där endast jäst-

tillväxten för vildtypsjäst jämfördes med tillväxten för den genmodifierade jästen – utan inblandning av bakterier. Därför kan inte uteslutas att, om den genmodifierade jästen lyckats uttrycka och utsöndra antimikrobiella peptider, dessa inte hade en negativ effekt på jästen själv.



Figur 12: Förhållande mellan *Lactobacillus*-stammarna och vildtypen av JBA (blå), JBA genmodifierad med L50A (röd) och JBA genmodifierad med β -defensin-3 (grön) för respektive ympkultur. Tillväxten har beräknats från fyra olika MRS+cykloheximid-plattor, två med 10^5 -spädning och två med 10^6 -spädning, samt fyra YPD-plattor med samma spädningar (Tabell 8, Bilaga G). Resultatet från MRS+cykloheximid-plattorna har dividerats med YPD-plattorna för att eliminera spädningsfel. MRS+cykloheximid-plattorna var behandlade med cykloheximid för att inhibera tillväxt av jästceller. Punkterna i grafen är medelvärdet av förhållandet mellan varje MRS+cykloheximid- och YPD-platta vid given tidpunkt. Felstaplarna visar medelfelet (Bilaga F).

5 Slutsats

En lyckad genmodifiering av *Saccharomyces cerevisiae* JBA och *Saccharomyces cerevisiae* CEN.PK genomfördes med hjälp av homolog rekombination, för att integrera gener för de antimikrobiella peptiderna L50A eller β -defensin-3 i de två jäststammarnas genom.

Någon undersökning av translationen av de antimikrobiella peptiderna från de två genmodifierade jäststammarna gjordes inte. Därför kan ingen slutsats dras om huruvida jäststammarna faktiskt translaterade de antimikrobiella peptiderna. Detta kunde ha undersökts med exempelvis HPLC, eller western blotting med korrekta antikroppar, som dock kan vara svårt att få tag på kommersiellt i det här fallet. Det faktum att translation av de antimikrobiella peptiderna inte har fastställts för någon av de genmodifierade jäststammarna gör att resultaten av de ympningsförsök som gjordes med de genmodifierade jäststammarna och *Lactobacillus* bör betraktas med försiktighet.

Den avdödande effekten på *Lactobacillus brevis* och *Lactobacillus buchneri* av de antimikrobiella peptiderna L50A och β -defensin-3 kunde inte med säkerhet fastställas. Efter ympningsförsök med de olika genmodifierade jäststammarna tillsammans med *L. brevis* och *L. buchneri* kunde en liten avdödnings effekt detekteras för *S. cerevisiae* CEN.PK genmodifierad med L50A efter 6 timmar. Effekten avtog dock över tid, till att sluta på samma nivå av bakteriekontamination för CEN.PK L50A som för CEN.PK vildtypsjäst. Motsatt effekt på bakteriekontamination av *Lactobacillus* detekterades för den med L50A genmodifierade jäststammen *S. cerevisiae* JBA, som visade sig vara sämre än JBA vildtypsjäst på att bekämpa bakteriekontamination. Detta skulle kunna bero på en känslighet hos JBA-stammen mot denna antimikrobiella peptid. Den initiala positiva effekten på bakteriekontaminationen hos CEN.PK L50A och den negativa effekten hos JBA L50A skulle kunna tillskrivas andra faktorer än den antimikrobiella peptiden L50A. Detta på grund av mycket få och osäkra mätvärden som låg till grund för de beräkningar som gjordes efter ympförsök med *Lactobacillus* och de genmodifierade jäststammarna. Dessutom försäkrades inte att de genmodifierade jäststammarna överhuvudtaget uttryckte några antimikrobiella peptider, något som kunde ha gjorts genom att undersöka supernatanten i de olika ympkulturerna efter antimikrobiella peptider.

Ytterligare försök hade behövt genomföras på fler ympkulturer mellan de genmodifierade jäststammarna *S. cerevisiae* CEN.PK och *S. cerevisiae* JBA med *Lactobacillus*, där även utsöndringen av antimikrobiella peptider i ympkulturen studerades, för att med säkerhet kunna fastställa någon eventuell avdödande effekt av de antimikrobiella peptiderna β -defensin-3 och L50A.

5.1 Förslag på vidare studier

Som efterföljande studie hade effekten av L50A och β -defensin-3 på andra typer av kontaminerande bakterier kunnat studeras. *Acetobacter* konsumerar en stor del av näringen i mediet under industriella fermentationsprocesser (Albers et al., 2011), vilket gör dem intressanta att undersöka.

En annan uppföljning skulle kunna vara att undersöka hur jäststammarna själva påverkas av att ha blivit genmodifierade med L50A respektive β -defensin-3. En studie som analyserar hur de modifierade stammarna växer i förhållande till vildtypsjäst vore passande som utgångspunkt.

Olika odlingsmedier har visat sig ge olika resultat för den antimikrobiella peptiden L50A på bakterier (Basant et al., 2009). En liknande studie för β -defensin-3 vore därför relevant att genomföra.

Referenser

- Albers, E., Johansson, E., Franzén, C.-J., och Larsson, C. (2011). Selective suppression of bacterial contaminants by process conditions during lignocellulose based yeast fermentations. *Biotechnology for Biofuels*, 4(59).
- Albers, E. och Larsson, C. (2009). A comparison of stress tolerance in YPD and industrial lignocellulose-based medium among industrial and laboratory yeast strains. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 36:1085–1091.
- Alexander, M. (1971). *Microbial ecology*. John Wiley and Sons, London.
- Basanta, A., Herranz, C., Gutiérrez, J., och Criado, R. (2009). Development of Bacteriocinogenic Strains of *Saccharomyces cerevisiae* Heterologously Expressing and Secreting the Leaderless Enterocin L50 Peptides L50A and L50B from *Enterococcus faecium* L50[∇]. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(8):2382–2392.
- Basanta, A., Sánchez, J., Gómez-Sala, B., Herranz, C., Hernández, P., och Cintas, L. (2008). Antimicrobial activity of *Enterococcus faecium* L50, a strain producing enterocins L50 (L50A and L50B), P and Q, against beer-spoilage lactic acid bacteria in broth, wort (hopped and unhopped), and alcoholic and non-alcoholic lager beers. *International Journal of Food Microbiology*, 125(3):293–307.
- Beckner, M., Ivey, M., och Phister, T. (2011). Microbial contamination of fuel ethanol fermentations. *Letters in Applied Microbiology*, 53(4):387–394.
- Bennetzen, J. och Hall, B. (1982). The Primary Structure of the *Saccharomyces cerevisiae* Gene for Alcohol Dehydrogenase 1. *The Journal of Biological Chemistry*, 257(6):3018–3025.
- Bergey, D., Harrison, F., Breed, R., Hammer, B., och Huntoon, F. (1923). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. The William and Wilkins Company, Baltimore.
- Bischoff, K., Skinner-Nemec, K., och Leathers, T. (2007). Antimicrobial susceptibility of *Lactobacillus* species isolated from commercial ethanol plants. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 34(11):739–744.
- Bitter, G., Chen, K., Banks, A., och Lai, P.-H. (1984). Secretion of foreign proteins from *Saccharomyces cerevisiae* directed by α -factor gene fusions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 81(17):5330–5334.
- Boman, H. (2003). Antibacterial peptides: basic facts and emerging concepts. *Journal of Internal Medicine*, 254(3):197–215.
- Canelas, A., Harrison, N., Fazio, A., Zhang, J., Pitkänen, J.-P., van den Brink, J., Bakker, B., Bogner, L., Bouwman, J., Castrillo, J., Cankorur, A., Chumnanpuen, P., Daran-Lapujade, P., Dikicioglu, D., van Eunen, K., Ewald, J., Heijnen, J., Kirdar, B., Mattila, I., Mensonides, F., Niebel, A., Penttilä, M., Pronk, J., Reuss, M., Salusjärvi, L., Sauer, U., Sherman, D., Siemann-Herzberg, M., Westerhoff, H., de Winde, J., Petranovic, D., Oliver, S., Workman, C., Zamboni, N., och J. N. (2010). Integrated multilaboratory systems biology reveals differences in protein metabolism between two reference yeast strains. *Nature Communication*, 1(145).
- Caplan, S., Green, R., Rocco, J., och Kurjan, J. (1990). Glycosylation and structure of the yeast MF α 1 α -factor precursor is important for efficient transport through the secretory pathway. *Journal of Bacteriology*, 173(2):627–635.
- Chan, D., Prenner, E., och Vogel, H. (2006). Tryptophan- and arginine-rich antimicrobial peptides: structures and mechanisms of action. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1758(9):1184–1202.

- Chang, I., Byung-Hong, K., Pyong-Kyun, S., och Wan-Kyu, L. (1995). Bacterial Contamination and Its Effects on Ethanol Fermentation. *Microbiology Biotechnology*, 5(6):309–314.
- Cintas, L., Casaus, P., Holo, H., Hernandez, P., Nes, I., och Håvarstein, L. (1998). Enterocins L50A and L50B, Two Novel Bacteriocins from *Enterococcus faecium* L50, Are Related to Staphylococcal Hemolysins. *Journal of Bacteriology*, 180(8):1988–1994.
- Compart, D., Carlson, A., Crawford, G., Fink, R., Diez-Gonzalez, F., Dicostanzo, A., och Shurson, G. (2013). Presence and biological activity of antibiotics used in fuel ethanol and corn co-product production. *Journal of Animal Science*, 91(5):2395–2404.
- Corsetti, A., Gobbetti, M., Rossi, J., och Damiani, P. (1998). Antimould activity of sourdough lactic acid bacteria: identification of a mixture of organic acids produced by *Lactobacillus sanfrancisco* CB1. *Applied Microbiological Biotechnology*, 50(2):253–256.
- Criado, R., Gutiérrez, J., Martín, M., Herranz, C., Hernández, P., och Cintas, L. (2006). Immunochemical Characterization of Temperature-Regulated Production of Enterocin L50 (EntL50A and EntL50B), Enterocin P, and Enterocin Q by *Enterococcus faecium* L50[∇]. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(12):7634–7643.
- Das, R., Shultz, J., och Lehman, D. (1989). α -factor leader sequence-directed transport of *Escherichia coli* beta-galactosidase in the secretory pathway of *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and General Genetics*, 218(2):240–248.
- Diep, D. B., Skaugen, M., Salehian, Z., Holo, H., och Nes, I. F. (2007). Common mechanisms of target cell recognition and immunity for class ii bacteriocins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(7):2384–2389.
- Dobi, K. C. och Winston, F. (2007). Analysis of Transcriptional Activation at a Distance in *Saccharomyces cerevisiae*[∇]. *Molecular and Cellular Biology*, 27(15):5575–5586.
- Du Toit, M., Dicks, L. M., och Holzapel, W. (2001). Taxonomy of obligately homofermentative and facultatively heterofermentative lactobacilli in pig faeces. *Letters in Applied Microbiology*, 32(3):199–204.
- Esnault, Y., Blondel, M.-O., Deshaies, R., Scheckman, R., och Képès, F. (1993). The yeast SSS1 gene is essential for secretory protein translocation and encodes a conserved protein of endoplasmic reticulum. *The EMBO journal*, 12(11):4083–4093.
- Filya, I., Sucu, E., och Karabulut, A. (2006). The effect of *Lactobacillus buchneri* on the fermentation, aerobic stability and ruminal degradability of maize silage. *Journal of Applied Microbiology*, 101(6):1216–1223.
- Flessel, M., Brake, A., och Thorner, J. (1989). The *mfal* gene of *saccharomyces cerevisiae*: Genetic mapping and mutational analysis of promoter elements. *Genetics*, 121(2):223–236.
- Ghazal, G., Gagnon, J., Jacques, P.-E., Landry, J.-R., Robert, F., och Elela, S. (2009). Yeast *rnase iii* triggers polyadenylation-independent transcription termination. *Molecular Cell*, 36(1):99–109.
- Gibson, B., Lawrence, S., Powell, C., och Smart, K. (2007). Yeast responses to stresses associated with industrial brewery handling. *FEMS Microbiology Reviews*, 31(5):535–569.
- Guilhelmelli, F., Vilela, N., Albuquerque, P., Derengowski, L., Silva-Pereira, I., och Kyaw, C. (2013). Antibiotic development challenges: the various mechanisms of action of antimicrobial peptides and of bacterial resistance. *Frontiers in Microbiology*, 4(352).

- Gunn, J. (2008). The salmonella pmrab regulon: lipopolysaccharide modifications, antimicrobial peptide resistance and more. *Trends in Microbiology*, 16(6):284–290.
- Hancock, R. (1997). Peptide antibiotics. *The Lancet*, 349(9049):418–422.
- Hancock, R. och Sahl, H.-G. (2006). Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nature Biotechnology*, 24(12):1551–1557.
- Hassan, M., Kjos, M., Nes, I., Diep, D., och Lotfipour, F. (2012). Natural antimicrobial peptides from bacteria: characteristics and potential applications to fight against antibiotic resistance. *Journal of Applied Microbiology*, 113(4):723–736.
- Holland, J., Labieniec, L., Swimmer, C., och Holland, M. (1983). Homologous Nucleotide Sequences at the 5' Termini of Messenger RNAs Synthesized from the Yeast Enolase and Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase Gene Families. *The Journal of Biological Chemistry*, 258(8):5291–5299.
- Hoover, D., Wu, Z., Tucker, K., Lu, W., och Lubkowski, J. (2003). Antimicrobial characterization of human β 1-defensin 3 derivatives. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(9):2804–2809.
- James, T., Gallagher, L., Titze, J., Bourke, P., Kavanagh, J., Arendt, E., och Bond, U. (2013). *In situ* production of human β defensin-3 in lager yeasts provided bactericidal activity against beer-spoiling bacteria under fermentation conditions. *Journal of Applied Microbiology (epub ahead of print)*, 116(2):368–379.
- Jespersen, L. och Jakobsen, M. (1996). Specific spoilage organisms in breweries and laboratory media for their detection. *International Journal of Food Microbiology*, 33(1):139–155.
- Jin, L., Yuan, D., Wang, Y., Jiang, C., Wang, Z., Zhao, Q., och Wang, Q. (2013). Expression of Antimicrobial Peptide Dybowski-2CAMA in *Pichia pastoris* and Characterization of its Antibacterial Activity. *Advance Journal of Food Science and Technology*, 5(8):1005–1010.
- Julius, D., Brake, A., Blair, L., Kunisawa, R., och Thorner, J. (1984a). Isolation of the putative structural gene for the lysine-arginine-cleaving endopeptidase required for processing of yeast prepro- α -factor. *Cell*, 37(3):1075–1089.
- Julius, D., Schekman, R., och Thorner, J. (1984b). Glycosylation and processing of prepro-alpha-factor through the yeast secretory pathway. *Cell*, 36(2):309–318.
- Kandler, O. (1982). Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 49(3):209–224.
- Klotman, M. och Chang, T. (2006). Defensins in innate antiviral immunity. *Nature Reviews Immunology*, 6(6):447–456.
- Kniskern, P., Hagopian, A., Montgomery, D., Burke, P., Dunn, N., Hofmann, K., Miller, W., och Ellis, R. (1986). Unusually high-level expression of a foreign gene (hepatitis B virus core antigen) in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*, 46(1):135–141.
- Kraus, D. och Peschel, A. (2008). Staphylococcus aureus evasion of innate antimicrobial defense. *Future Microbiology*, 3(4):437–451.
- Kurjan, J. och Herskowitz, I. (1982). Structure of a yeast pheromone gene (mfa): A putative α -factor precursor contains four tandem copies of mature α -factor. *Cell*, 30(3):933–943.
- Kuroda, S., Otaka, S., och Fujisawa, Y. (1994). Fermentable and Nonfermentable Carbon sources Sustain Constitutive Levels of Expression of Yeast Trisosephosphate Dehydrogenase 3 Gene from Distinct Promoter Elements. *The Journal of Biological Chemistry*, 269(8):6153–6162.

- Kuroda, S., Otaka, S., Miyazaki, T., Nakao, M., och Fujisawa, Y. (1992). Hepatitis B Virus Envelope L Protein Particles. *The Journal of Biological Chemistry*, 267(3):1953–1961.
- Levy, S. (2002). Factors impacting on the problem of antibiotic resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 49(1):25–30.
- Lin, Y., Zhang, Wand Li, C., Sakakibara, K., Tanaka, S., och Kong, H. (2012). Factors affecting ethanol fermentation using *saccharomyces cerevisiae* by4742. *Biomass and Bioenergy*, 47:395–401.
- Liu, S., Skinner-Nemec, K., och Leathers, T. (2007). *Lactobacillus buchneri* strain NRRL B-30929 converts a concentrated mixture of xylose and glucose into ethanol and other products. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 35(2):75–81.
- McAlister, L. och Holland, M. (1985). Differential Expression of the Three Yeast Glyceraldehyde-3-phopshate Dehydrogenase Genes. *The Journal of Biological Chemistry*, 260(28):15019–1527.
- Nes, I., Diep, D., Håvarstein, L., Brurberg, M., Eijsink, V., och Holo, H. (1996). Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 70(2-4):113–128.
- Nijkamp, J., van den Broek, M., Datema, E., de Kok, S., Bosman, L., Luttik, M., Daran-Lapujade, P., Vongsangnak, W., Nielsen, J., Heijne, W., Klaassen, P., Paddon, C., Platt, D., Kötter, P., van Ham, R., Reinders, M., Pronk, J., de Ridder, D., och Daran, J.-M. (2012). *De novo* sequencing, assembly and analysis of the genome of the laboratory strain *Saccharomyces cerevisiae* CEN.PK113-7D, a model for modern industrial biotechnology. *Microbial Cell Factories*, 11(63).
- Nissen-Meyer, J. och Nes, I. (1997). Ribosomally synthesized antimicrobial peptides: their function, structure, biogenesis, and mechanism of action. *Archives of Microbiology*, 167(2/3):67–77.
- Papagianni, M. (2003). Ribosomally synthesized peptides with antimicrobial properties: biosynthesis, structure, function and applications. *Biotechnology Advances*, 21(6):465–499.
- Polyak, S., Forsberg, G., Forbes, B., McNiel, K., Aplin, S., och Wallace, J. (1997). Introduction of spacer peptides n-terminal to a cleavage recognition motif in recombinant fusion proteins can improve site-specific cleavage. *Protein Engineering*, 10(6):615–619.
- Sharpe, M. (1979). *Identification Methods for Microbiologists*. Academic Press, London.
- Skinner, K. och Leathers, T. (2004). Bacterial contaminants of fuel ethanol production. *Journal of Industrial Microbiological Biotechnology*, 31(9):401–408.
- Suzuki, K., Iijima, K., Sakamoto, K., Sami, M., och Yamashita, H. (2006). A review of hop resistance in beer spoilage lactic acid bacteria. *Journal of the Institute of Brewing*, 112(2):173–191.
- Weber, D., Sam, K., Polen, T., Wendisch, V., och Antranikian, G. (2008). Oligonucleotide microarrays for the detection and identification of viable beer spoilage bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 105(4):951–962.
- White, S., Wimley, W., och M., S. (1995). Structure, function and membrane integration of defensins. *Current Opinion in Structural Biology*, 5(4):521–527.
- Yang, D., Chertov, O., Bykovskaia, S., Chen, Q., Buffo, M., Shogan, J., Anderson, M., Schröder, J., Wang, J., Howard, O., och Oppenheim, J. (1999). β -defensins: linking innate and adaptive immunity through dendritic and t cell ccr6. *Science*, 286(5439):525–528.
- Yoshimura, K., Toibana, A., Kikuchi, K., Kobayashi, M., Hayakawa, T., Nakahama, K., Kikuchi, M., och Ikehara, M. (1987). Differences between *Saccharomyces cerevisiae* and *Bacillus subtilis* in secretion of human lysozyme. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 145(2):712–718.

Bilagor

A Ledarsekvens

MRFPSIFTAVLFAASSALAAPVNTTTEDETAQIPAEAVIGYLDLEGDFDVAVLPF
SNSTNNGLLFINTTIASIAAKEEGVSLDKREAEA

Efter de två positioner som kan ses som understrukna aminosyror klipper endopeptidaset KEX2. De fyra sista aminosyrorna (blå text) klyvs bort av aminopeptidaset STE13.

B Beställda gensekvenser

Gult: α -ledarsekvens

Grönt: Antimikrobiell peptid

Kodonoptimerad sekvens för antimikrobiell peptid L50A med α -ledare för ligering i pUC57-TDH3-EFE-vektor, klippt med BamHI/AscI

ggatccATGAGATTCCCATCTATTTTCACTGCTGTTTTGTTTCGCTGCTTCTTCT
GCTTTGGCTGCTCCAGTTAATACTACTACTGAAGATGAAACTGCTCAAATT
CCAGCTGAAGCTGTTATTGGTTATTTGGATTTGGAAGGTGATTTTCGATGTT
GCTGTTTTGCCATTCTCTAATTCTACTAATAATGGTTTGTTGTTTCATTAAT
ACTACTATTGCTTCTATTGCTGCTAAAGAAGAAGGTGTTTCTTTGGATAAA
AGAGAAGCTGAAGCTATGGGTGCTATTGCTAAATTGGTTGCTAAATTCGGT
TGGCCAATTGTTAAAAAATATTATAAACAAATTATGCAATTCATTGGTGAA
GGTTGGGCTATTAATAAAATTATTGAATGGATTAAAAACATATTTAAGgcgc
gcc

Kodonoptimerad sekvens för antimikrobiell peptid β -defensin-3 med α -ledare för ligering i pUC57-TDH3-EFE-vektor, klippt med BamHI/AscI

ggatccATGAGATTCCCATCTATTTTCACTGCTGTTTTGTTTCGCTGCTTCTTCT
GCTTTGGCTGCTCCAGTTAATACTACTACTGAAGATGAAACTGCTCAAATT
CCAGCTGAAGCTGTTATTGGTTATTTGGATTTGGAAGGTGATTTTCGATGTT
GCTGTTTTGCCATTCTCTAATTCTACTAATAATGGTTTGTTGTTTCATTAAT
ACTACTATTGCTTCTATTGCTGCTAAAGAAGAAGGTGTTTCTTTGGATAAA
AGAGAAGCTGAAGCTGGTATTATTAATACTTTGCAAAAATATTATTGTAGA
GTTAGAGGTGGTAGATGTGCTGTTTTGTCTTGTTTGCCAAAAGAAGAACAA
ATTGGTAAATGTTCTACTAGAGGTAGAAAATGTTGTAGAAGAAAAAAATAA
ggcgcgcc

C Målplasmider (amplifierade *E. coli*-plasmider)

Nedan följer sekvenserna till de målplasmider som transformerades in i *E. coli* för att sedan amplifieras och renas ut.

C.1 L50A

Orange: Homologiregion för jäst (DAK2_up och DAK2_dw primersites understrukna)

Lila: TDH3-promotor (TDH3p_rev primersite understruken)

Gult: α -ledarsekvens

Grönt: Antimikrobiell peptid (L50A)

Brunt: ADH1-terminator

Röd region: Kanamycinresistensgen (KanMX_fw primersite understruken).

Kanamycinresistensgenen är omringad av en TEF1-promotor och TEF-terminator från *Schizosaccharomyces pombe* (ej utmarkerat).

Blått: Ampicillinresistensgen

```
TCGCGCGTTTCGGTGATGACGGTGAAAACCTCTGACACATGCAGCTCCCGG
AGACGGTCACAGCTTGTCTGTAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCCGT
CAGGGCGCGTCAGCGGGTGTGGCGGGTGTGCGGGCTGGCTTAACTATGC
GGCATCAGAGCAGATTGTACTGAGAGTGCACCATATGCGGTGTGAAATACC
GCACAGATGCGTAAGGAGAAAATACCGCATCAGGCGCCATTGCGCCATTGAG
GCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCCTCTTCGCTATTACG
CcagctgTTCATGCATCTAAGAAATCAACCTATATCAACAGATTTCAATAATTA
CTCTAAACTTATGCTGTAACCTAGAAAGTAACCAGCCTGTGTTGACTGATT
GAGTTGCGTATTAACTGCGCCTAGTCATTTCAACACTTATAATTTGCTTCA
GCTTAAGTGTGGTTCATCTTTTTTTTTTCTGGAAACTTTGCATGCCCTCAA
gtcgacCTGCTGTAACCCGTACATGCCCAAATAGGGGGCGGGTTACACAGAA
TATATAACATCGTAGGTGTCTGGGTGAACAGTTTATTCCTGGCATCCACTA
AATATAATGGAGCCCGCTTTTTTAAGCTGGCATCCAGAAAAAAAAAAGAATC
CCAGCACCAAATATTTGTTTTCTTCACCAACCATCAGTTCATAGGTCCATT
CTCTTAGCGCAACTACAGAGAACAGGGGCACAAACAGGCAAAAAACGGGC
ACAACCTCAATGGAGTGATGCAACCTGCCTGGAGTAAATGATGACACAAGG
CAATTGACCCACGCATGTATCTATCTCATTTTCTTACACCTTCTATTACCTT
CTGCTCTCTCTGATTTGGAAAAAGCTGAAAAAAAAGGTTGAAACCAGTTCC
CTGAAATTATTCCTTACTTGACTAATAAGTATATAAAGACGGTAGGTATT
GATTGTAATTCTGTAAATCTATTTCTTAAACTTCTTAAATTCTACTTTTAT
AGTTAGTCTTTTTTTTAGTTTTTAAAACACCAAGAACTTAGTTTCGAATAAA
CACACATAAACAAACAAAggatccATGAGATTCCCATCTATTTTCACTGCTGTT
TTGTTGCTGCTTCTTCTGCTTTGGCTGCTCCAGTTAATACTACTACTGAA
GATGAAACTGCTCAAATTCAGCTGAAGCTGTTATTGGTTATTTGGATTTG
GAAGGTGATTTGATGTTGCTGTTTTGCCATTCTCTAATTCTACTAATAAT
GGTTTGTGTTTCAATAATACTACTATTGCTTCTATTGCTGCTAAAGAAGAA
GGTGTTCCTTTGGATAAAAGAGAAGCTGAAGCTATGGGTGCTATTGCTAA
```

ATTGGTTGCTAAATTCGGTTGGCCAATTGTTAAAAAATATTATAAAACAAAT
TATGCAATTCATTGGTGAAGGTTGGGCTATTAATAAAATTATTGAATGGAT
TAAAAAACATATTTAAggcgcgcACTTCTAAATAAGCGAATTTCTTATGATTT
ATGATTTTTTATTATTAAATAAGTTATAAAAAAATAAGTGTATACAAATTT
TAAAGTGACTCTTAGGTTTTTAAAACGAAAATTCTTATTCTTGAGTAACTCT
TTCCTGTAGGTCAGGTTGCTTTCTCAGGTATAGTATGAGGTCGCTCTTATT
GACCACACCTCTACCGGCAGATCCGCTAGGGATAACAGGGTAATATgagctca
taacttcgtataatgtatgctatacgaagttatgcggccgctaggtctagagatctgttagcttgccctgcctcccgccggg
tcacccggccagcgacatggaggccagaataccctccttgacagctcttgacgtgcgcagctcaggggcatgatgtgactg
tcgcccgtacatttagcccatatcccatgtataatcatttgcatccatacatttgatggccgcacggcggaagcaaa
aattacggctcctcgtgcgacactgcgagcagggaacgctccctcacagacgcgtgaattgtcccacgcgcgcgcc
ctgtagagaaatataaaaggttaggatttgccactgaggttcttcttcatatacttcttttaaaatcttgctaggatacag
ttctcacatcacatccgaacataaacaaccatgggtaaggaaaagactcacgttcgaggccgcgattaaattccaacat
ggatgctgatttatatgggtataaatgggctcgcgataatgtcgggcaatcaggtgcgacaatctatcgattgtatgggaa
gcccgatgcgcagagttgtttctgaaacatggcaaaggtagcgttgccaatgatgttacagatgagatggtcagactaa
actggctgacggaatttatgcctcttcgaccatcaagcattttatccgtactcctgatgatgcattgactcaccactgcg
atccccggcaaaacagcattccaggtattagaagaatatcctgattcaggtgaaaatattgttgatgcgctggcagtgctc
ctgcgcgggttgcattegattcctgtttgtaattgtccttttaacagcgatgcgctatttcgtctcgcctcaggcgcaatcacg
aatgaataacggttggttgatgcgagtgatttgatgacgagcgtaattggctggcctgtgaacaagctggaagaaat
gcataagcttttgccattctcaccggattcagtcgtcactcatggtgatttctcacttgataaccttattttgacgaggga
aattaataggttgattgatgttgacgagtcggaatcgcagaccgataaccaggtcttgccatcctatggaactgcctcg
gtgagttttctccttcattacagaaacggctttttcaaaaataggattgataatcctgatataaattgcagtttcattt
gatgctcgatgagttttctaatcagtactgacaataaaaagattctgttttcaagaactgtcatttgatagttttttata
ttgtagttgttctattttaatacaaatgttagcgtgatttatatttttttcgcctcgacatcatctgccagatgcgaagttaagt
gcgagaaagtaatatcatgcgtcaatcgatgtgaatgctggtcgctatactgctgtcgattcgataactaacgccgccatcc
agtgtcgaaaacgagctttcgagaacccttaatgcggccgcataacttcgtataatgtatgctatacgaagttatGCATG
AGTAGTTAGTTATCTTTTTGACAATGATCTCTTTTGAAAATATCTACTGTA
GATTTGCATGGACGCACGTCGCCCATACGCCAACTTTGGCAATGATACTC
GTTATTTCGTAATATCAGTCCGTCAAGGTGCTGTGATTTCTCTATTTTTATAT
TGCCTATTATTTTTTTCAAATGATTTGAGCCGTTTTTAAATTGAacagctgCATTAA
TGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCGTATTGGGCGCTCTTC
CGTTCTCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCGTTTCGGCTGCGGCGAGC
GGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGA
TAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAAGGCCAGCAAAAAGGCCAGGAACC
GTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACG
AGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGAC
TATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTG
TTCCGACCCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAA
GCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGG
TCGTTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGTTCAGCCCGACC
GCTGCGCCTTATCCGGTAACATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACG
ACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGT
ATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACA

CTAGAAGAACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCG
GAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCG
GTGGTTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTC
AAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAA
ACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCT
AGATCCTTTTAAATTAAAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATG
AGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCT
CAGCGATCTGTCTATTTTCGTTCCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGT
AGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGA
TACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACAGC
CAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCTGCAACTTTATCCGCCTCCA
TCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCCGCCAGTTA
ATAGTTTTCGCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCT
CGTCGTTTGGTATGGCTTCATTACGCTCCGGTTCCCAACGATCAAGGCGAG
TTACATGATCCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCCTC
CGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGCAGTGTTATCACTCATGGTTATGG
CAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTG
TGA CTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGAC
CGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCA
GAACTTTAAAAGTGCTCATCATTGAAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACTCT
CAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTTCGATGTAACCCACTCGTGCAC
CCA ACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTTACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAA
AAACAGGAAGGC AAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAA
TGTTGAATACTCATACTCTTCCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTTATCAG
GGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAA
CAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTGACGTCTAA
GAAACCATTATTATCATGACATTAACCTATAAAAAATAGGCGTATCACGAGG
CCCTTTCGTC

C.2 β -defensin-3

Orange: Homologiregion för jäst (DAK2_up och DAK2_dw primersites understrukna)

Lila: TDH3-promotor (TDH3p_rev primersite understruken)

Gult: α -ledarsekvens

Grön: Antimikrobiell peptid (β -defensin-3)

Brun: ADH1-terminator

Röd region: Kanamycinresistensgen (KanMX_fw primersite understruken).

Kanamycinresistensgenen är omringad av en TEF1-promotor och TEF-terminator från *Schizosaccharomyces pombe* (ej utmarkerat).

Blått: Ampicillinresistensgen

```
TCGCGCGTTTCGGTGATGACGGTGAAAACCTCTGACACATGCAGCTCCCGG
AGACGGTCACAGCTTGTCTGTAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCCGT
CAGGGCGCGTCAGCGGGTGTGTTGGCGGGTGTGCGGGGCTGGCTTAACATATGC
GGCATCAGAGCAGATTGTACTGAGAGTGCACCATATGCGGTGTGAAATACC
GCACAGATGCGTAAGGAGAAAAATACCGCATCAGGCGCCATTTCGCCATTTCAG
GCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCCTCTTCGCTATTACG
CcagctgTTCATGCATCTAAGAAATCAACCTATATCAACAGATTTCAATAATTA
CTCTAAACTTATGCTGTAACTTAGAAAGTAACCAGCCTGTGTTGACTGATT
GAGTTGCGTATTAACTGCGCCTAGTCATTTCAACACTTATAATTTGCTTCA
GCTTAAGTGTGGTTCATCTTTTTTTTTTCTGGAAACTTTGCATGCCCTCAA
gtcgacCTGCTGTAACCCGTACATGCCCAAATAGGGGGCGGGTTACACAGAA
TATATAACATCGTAGGTGTCTGGGTGAACAGTTTATTCCTGGCATCCACTA
AATATAATGGAGCCCGCTTTTTTAAGCTGGCATCCAGAAAAAAAAAAGAATC
CCAGCACCAAAATATTGTTTTCTTCACCAACCATCAGTTCATAGGTCCATT
CTCTTAGCGCAACTACAGAGAACAGGGGCACAAACAGGCCAAAAAACGGGC
ACAACCTCAATGGAGTGATGCAACCTGCCTGGAGTAAATGATGACACAAGG
CAATTGACCCACGCATGTATCTATCTCATTTTCTTACACCTTCTATTACCTT
CTGCTCTCTCTGATTTGGAAAAAGCTGAAAAAAAAGGTTGAAACCAGTTCC
CTGAAATTATTCCTACTTGACTAATAAGTATATAAAGACGGTAGGTATT
GATTGTAATTCTGTAAATCTATTTCTTAAACTTCTTAAATTCTACTTTTATA
GTTAGTCTTTTTTTTAGTTTTTAAACACCAAGAACTTAGTTTCGAATAAAC
ACACATAAACAAACAAAggatccATGAGATTCCCATCTATTTTCACTGCTGTTT
TGTTGCTGCTTCTTCTGCTTTGGCTGCTCCAGTTAATACTACTACTGAAG
ATGAAACTGCTCAAATTCAGCTGAAGCTGTTATTGGTTATTTGGATTTGG
AAGGTGATTTTCGATGTTGCTGTTTTGCCATTCTCTAATTCTACTAATAATG
GTTTGTTGTTTCATTAATACTACTATTGCTTCTATTGCTGCTAAAGAAGAAG
GTGTTTCTTTGGATAAAAGAGAAGCTGAAGCTGGTATTATTAATACTTTGC
AAAAATATTATTGTAGAGTTAGAGGTGGTAGATGTGCTGTTTTGTCTTGTT
TGCCAAAAGAAGAACAATTGGTAAATGTTCTACTAGAGGTAGAAAATGTT
GTAGAAGAAAAAAATAAggcgcgccACTTCTAAATAAGCGAATTTCTTATGATT
TATGATTTTTATTATTAAATAAGTTATAAAAAAATAAGTGTATACAAATT
TTAAAGTGA
```

TTTCCTGTAGGTCAGGTTGCTTTCTCAGGTATAGTATGAGGTCGCTCTTAT
 TGACCACACCTCTACCGGCAGATCCGCTAGGGATAACAGGGTAATATgagctc
 ataacttcgtataatgtatgctatacgaagttatgcggcgcctaggtctagagatctgttagcttgccctgctccccgcgg
 gtcacccggccagcgacatggaggccagaataccctccttgacagcttgacgtgagcagctcaggggcatgatgtgact
 gtcgcccgtacatttagcccatatcccatgtataatcatttgcatccatacattttgatggccgcacggcggaagcaa
 aaattacggctcctcgctgcagacctgcgagcagggaacgctccccacagacgcgttgattgtccccacggcgcc
 cctgtagagaaatataaaaggttaggatttgccactgaggttcttcttcatatacttcttttaaactctgtaggataca
 gttctcacatcacatccgaacataaacaaccatgggtaaggaaaagactcacgtttcgaggccgcgattaaattccaaca
tggatgctgatttatatgggtataaatgggctcgcgataatgtcgggcaatcaggtgcgacaatctatcgattgtatggga
agcccgatgcgccagagttgtttctgaaacatggcaaaggtagcgttgccaatgatgttacagatgagatgggtcagactaa
actggctgacggaatttatgcctcttcgaccatcaagcattttatccgtactcctgatgatgcaggttactcaccactgcg
atccccggcaaacagcattccaggtattagaagaatactcgtattcaggtgaaaatattgttgatgcgctggcagtgctt
ctgcgcgggttcattcgattcctgtttgtaattgtccttttaacagcgatcgctatttcgtctcgctcaggcgcaatcacg
aatgaataacgggttggtgatgcgagtgattttgatgacgagcgtaatggctggcctgttgacaagtctggaaagaaat
gcataagcttttgccattctcaccggattcagtcgctcactcatggtgattttcacttgataaccttattttgacgagggga
aattaataggttgattgatgttgacgagtcggaatcgagaccgataaccagatcttgccatcctatggaactgcctcg
gtgagttttctccttcattacagaaacggcttttcaaaaataggtattgataatcctgatatgaataaattgcagtttcattt
gatgctcgatgagttttctaatcagtactgacaataaaaagattctgttttcaagaactgtcatttgatatagttttttata
 ttgtagttgttctattttaatacaatgttagcgtgatttatatttttttcgctcgacatcatctgccagatgcgaagttaagt
 gcgcagaaagtaatatcatgcgtcaatcgatgtgaatgctggtcgctatactgctgctgattcgataactaacccgccatcc
 agtgcgaaaacgagcttgcgagaacccttaatgcggccgcataacttcgtataatgtatgctatacgaagttatGCATG
 AGTAGTTAGTTATCTTTTTGACAATGATCTCTTTTGAAAATATCTACTGTA
 GATTTGCATGGACGCACGTCGCCATACGCCAACTTTGGCAATGATACTC
 GTTATTCGTAATATCAGTCCGTCAAGGTGCTGTGATTTCTCTATTTTATAT
 TGCCTATTATTTTTTCAAATGATTTGAGCCGTTTTAAATTGAacagctgCATTAA
 TGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGGGTATTGGGCGCTCTTC
 CGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCTGTTTCGGCTGCGGCGAGC
 GGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGA
 TAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAAGGCCAGCAAAAAGGCCAGGAACC
 GTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACG
 AGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGAC
 TATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTG
 TTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCTTTCTCCCTTCGGGAA
 GCGTGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGG
 TCGTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGTTCAGCCCGACC
 GCTGCGCCTTATCCGGTAACATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACG
 ACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGT
 ATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACA
 CTAGAAGAACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCG
 GAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCG
 GTGGTTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAAGGATCTC
 AAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAA
 ACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCT

AGATCCTTTTAAATTAAAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATG
AGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCT
CAGCGATCTGTCTATTTTCGTTCCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGT
AGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGA
TACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCCAGC
CAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCTGCAACTTTATCCGCCTCCA
TCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTTCGCCAGTTA
ATAGTTTGCGCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCT
CGTCGTTTGGTATGGCTTCATTACGCTCCGGTTCCCAACGATCAAGGCGAG
TTACATGATCCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCCTC
CGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGCAGTGTTATCACTCATGGTTATGG
CAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTG
TGA CTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGAC
CGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCA
GAACTTTAAAAGTGCTCATCATTGGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAA CTCT
CAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCAC
CCA ACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTACCCAGCGTTTCTGGGTGAGCAA
AAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGA
TGTTGAATACTCATACTCTTCCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTATCAG
GGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAA
CAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTGACGTCTAA
GAAACCATTATTATCATGACATTAACCTATAAAAAATAGGCGTATCACGAGG
CCCTTTCGTC

D Linjärt insert för inkorporering i jästgenomet

Nedan följer de linjära insert, erhållen genom PCR av plasmiderna från Bilaga C med primrarna DAK2_up och DAK2_dw, som transformerades in i jästgenomet via homolog rekombination. Samma färgkodning som för Bilaga C används.

D.1 L50A-insert

```
CATGCATCTAAGAAATCAACCTATATCAACAGATTTCAATAATTACTCTAA
ACTTATGCTGTAACCTTAGAAAGTAACCAGCCTGTGTTGACTGATTGAGTT
GCGTATTAACTGCGCCTAGTCATTTCAACACTTATAATTTGCTTCAGCTTA
AGTGTGGTTCATCTTTTTTTTTTCTGGAACTTTGCATGCCCTCAAAGtcgacC
TGCTGTAACCCGTACATGCCCAAAATAGGGGGCGGGTTACACAGAAATATA
TAACATCGTAGGTGTCTGGGTGAACAGTTTATTCCTGGCATCCACTAAATA
TAATGGAGCCCGCTTTTTAAGCTGGCATCCAGAAAAAAAAAAGAATCCCAG
CACCAAAATATTGTTTTCTTCACCAACCATCAGTTCATAGGTCCATTCTCTT
AGCGCAACTACAGAGAACAGGGGCACAAACAGGCAAAAAACGGGCACAAC
CTCAATGGAGTGATGCAACCTGCCTGGAGTAAATGATGACACAAGGCAATT
GACCCACGCATGTATCTATCTCATTTTTCTTACACCTTCTATTACCTTCTGCT
CTCTCTGATTTGGAAAAAGCTGAAAAAAAAGGTTGAAACCAGTTCCTGAA
ATTATTCCCCTACTTGACTAATAAGTATATAAAGACGGTAGGTATTGATTG
TAATTCTGTAAATCTATTTCTTAAACTTCTTAAATTCTACTTTTATAGTTAG
TCTTTTTTTTTAGTTTTTAAAACACCAAGAACTTAGTTTCGAATAAACACACA
TAAACAAACAAAagatccATGAGATTCCCATCTATTTTCACTGCTGTTTTGTTT
GCTGCTTCTTCTGCTTTGGCTGCTCCAGTTAATACTACTACTGAAGATGAA
ACTGCTCAAATTCCAGCTGAAGCTGTTATTGGTTATTTGGATTTGGAAGGT
GATTTTCGATGTTGCTGTTTTGCCATTCTCTAATTCTACTAATAATGGTTTG
TTGTTTCATTAATACTACTATTGCTTCTATTGCTGCTAAAGAAGAAGGTGTT
TCTTTGGATAAAAGAGAAGCTGAAGCTATGGGTGCTATTGCTAAATTGGTT
GCTAAATTCCGGTTGGCCAATTGTTAAAAAATATTATAAACAAATTATGCAA
TTCATTGGTGAAGGTTGGGCTATTAATAAAATTATTGAATGGATTAAAAAA
CATATTTAAGgcgcgccACTTCTAAATAAGCGAATTTCTTATGATTTATGATTT
TTATTATTAAATAAGTTATAAAAAAATAAGTGTATACAAATTTTAAAGTG
ACTCTTAGGTTTTTAAAACGAAAATTCTTATTCTTGAGTAACTCTTTCCTGT
AGGTCAGGTTGCTTTCTCAGGTATAGTATGAGGTCGCTCTTATTGACCACA
CCTCTACCGGCAGATCCGCTAGGGATAACAGGGTAATATgagctcataacttcgtataa
tgtatgctatacgaagtatatgcggccgctaggtctagagatctgttagcttgcctcgtccccgccgggtcacccggccagcg
acatggaggcccagaataccctccttgacagctctgacgtgcgcagctcaggggcatgatgtgactgtcgccgtacattta
gccatacatccccatgtataatcatttgcacccatacattttgatggccgcacggcgcaagcaaaaattacggctcctcgc
tgcagacctgcgagcagggaaacgctccctcacagacgcgtgaattgtccccacgcgcgcccctgtagagaaatataa
aaggttaggatttgccactgaggttcttcttcatatacttcttttaaaatcttgctaggatacagttctcacatcacatccga
acataaacaaccatgggtaaggaaaagactcacgtttcgaggccgcgattaaattccaacatggatgctgatttatatggg
tataaatgggctcgcgataatgtcgggcaatcaggtgcgacaatctatcgattgtatgggaagcccgatgcgccagagttg
ttctgaaacatggcaaggtagcgttgccaatgatgttacagatgagatggtcagactaaactggctgacggaatttatgc
```

ctcttcgaccatcaagcattttatccgtactcctgatgatgcattggttactcaccactgcgatccccggcaaacagcattc
caggtattagaagaatatcctgattcaggtgaaaatattggtgatgcgctggcagtggtcctgcgccggtgcattcgattcc
tggttgtaattgtccttttaacagcgatcgcgtatttcgtctcgtcagggcgcaatcacgaatgaataacggttggtgatgc
gagtgattttgatgacgagcgtaatggctggcctggtgaacaagtctggaagaaatgcataagctttgccattctcaccg
gattcagtcgtcactcatggtgatttctcacttgataaccttattttgacgaggggaaattaataggttgattgatgttga
cgagtcggaatcgcagaccgataccaggatcttgccatcctatggaactgcctcggtgagtttctccttcattacagaaacg
gctttttcaaaaataggtattgataatcctgatataaattgcagtttcatttgatgctcgatgagttttc~~ta~~atcagt
actgacaataaaaagattcttgttttcaagaactgtcatttgtatagttttttatattgtagttgttctattttaatcaaag
ttagcgtgatttatatttttttcgcctcgacatcatctgccagatgcgaagttaagtgcgcagaaagtaatatcatgcgtc
aatcgtatgtgaatgctggctgctatactgctgtcagtcgataactaacgcccatccagtgctgaaaacgagcttcgaga
acccttaatgcggccgcataacttcgtataatgtatgctatacgaagttatGCATGAGTAGTTAGTTATCT
TTTTGACAATGATCTCTTTTGAAAATATCTACTGTAGATTTGCATGGACGC
ACGTCGCCCATACGCCAACTTTGGCAATGATACTCGTTATTCGTAATATC
AGTCCGTCAAGGTGCTGTGATTTCTCTATTTTATATTGCCTATTATTTTTT
CAAATGATTTGAGCCGTTTTAAATTG

D.2 β -defensin-3-insert

CATGCATCTAAGAAATCAACCTATATCAACAGATTTCAATAATTACTCTAA
ACTTATGCTGTAACCTTAGAAAGTAACCAGCCTGTGTTGACTGATTGAGTT
GCGTATTAACTGCGCCTAGTCATTTCAACACTTATAATTTGCTTCAGCTTA
AGTGTGGTTCATCTTTTTTTTTTCTGGAACTTTGCATGCCCTCAAAGtcgacC
TGCTGTAACCCGTACATGCCCAAAATAGGGGGCGGGTTACACAGAATATA
TAACATCGTAGGTGTCTGGGTGAACAGTTTATTCCTGGCATCCACTAAATA
TAATGGAGCCCGCTTTTTTAAGCTGGCATCCAGAAAAAAGAAATCCCAG
CACCAAAATATTGTTTTCTTCACCAACCATCAGTTCATAGGTCCATTCTCTT
AGCGCAACTACAGAGAACAGGGGCACAAACAGGCAAAAAACGGGCACAAC
CTCAATGGAGTGATGCAACCTGCCTGGAGTAAATGATGACACAAGGCAATT
GACCCACGCATGTATCTATCTCATTTTCTTACACCTTCTATTACCTTCTGCT
CTCTCTGATTTGAAAAAGCTGAAAAAAGGTTGAAACCAGTTCCCTGAA
ATTATTCCCCTACTTGACTAATAAGTATATAAAGACGGTAGGTATTGATTG
TAATTCTGTAAATCTATTTCTTAACTTCTTAAATTCTACTTTTATAGTTAG
TCTTTTTTTTAGTTTTTAAACACCAAGAACTTAGTTTCGAATAAACACACA
TAAACAAACAAA~~ggatcc~~ATGAGATTCCCATCTATTTTCACTGCTGTTTTGTTT
GCTGCTTCTTCTGCTTTGGCTGCTCCAGTTAATACTACTACTGAAGATGAA
ACTGCTCAAATTCCAGCTGAAGCTGTTATTGGTTATTTGGATTTGGAAGGT
GATTTTCGATGTTGCTGTTTTTGCCATTCTCTAATTCTACTAATAATGGTTTG
TTGTTTCATTAATACTACTATTGCTTCTATTGCTGCTAAAGAAGAAGGTGTT
TCTTTGGATAAAAGAGAAGCTGAAGCTGGTATTATTAATACTTTGCAAAAA
TATTATTGTAGAGTTAGAGGTGGTAGATGTGCTGTTTTGTCTTGTTTGCCA
AAAGAAGAACAATTGGTAAATGTTCTACTAGAGGTAGAAAATGTTGTAG
AAGAAAAAAATAA~~aggcgcc~~ACTTCTAAATAAGCGAATTTCTTATGATTTATG
ATTTTTATTATTAAATAAGTTATAAAAAAATAAGTGTATACAAATTTTAA
AGTGACTCTTAGGTTTTAAACGAAAATTCTTATTCTTGAGTAACTCTTTC

CTGTAGGTCAGGTTGCTTTCTCAGGTATAGTATGAGGTCGCTCTTATTGAC
CACACCTCTACCGGCAGATCCGCTAGGGATAACAGGGTAATATgagctcataactt
cgtataatgtatgctatacgaagttatgcggccgctaggtctagagatctgttagcttgcctcgtccccgccgggtcaccg
ccagcgacatggaggccagaataacctccttgacagtcttgacgtgcgcagctcaggggcatgatgtgactgtcgccgta
catttagccatacatcccatgtataatcatttgcatacatatttgatggccgcacggcggaagcaaaaattacggct
cctcgtgcagacctgcgagcagggaacgctccctcacagacgcgttgaattgtccacgcgcgccctgtagagaaa
tataaaaggttaggatttgcactgaggttcttcttcatatacttcttttaaatcttgcctaggatacagttctcacatcaca
tcgaacataaacaaccatgggtaaggaaaagactcaggtttcgaggccgcgattaaattccaacatggatgctgatttata
tgggtataaatgggctcgcgataatgtcgggcaatcaggtgcgacaatctatcgattgtatgggaagcccgatgcgcagag
ttgtttctgaaacatggcaaaggtagcgttgccaatgatgttacagatgagatggtcagactaaactggctgacggaattta
tgctcttccgaccatcaagcattttatccgtactcctgatgatgcgttactcaccactgcgatccccggcaaacagcat
tccaggtattagaagaatatcctgattcaggtgaaaaatattgttgatgcgctggcagtggtcctgcgcgggtgcattcgattc
ctgtttgtaattgtccttttaacagcgatcgctatttctcctcagcgcaatcacgaatgaataacggtttggttgatg
cgagtgttttgatgacgagcgtaatggctggcctgttgaacaagtctggaaagaaatgcataagcttttgccattctcaccg
gattcagtcgtcactcatggtgatttctcacttgataaccttattttgacgaggggaaattaataggttgattgatgttga
cgagtcggaatcgagaccgataaccaggtcttgccatcctatggaactgcctcggtgagttttccttcattacagaaacg
gcttttcaaaaatattggtattgataatcctgatatgaataaattgcagtttcatttgatgctcgatgagttttctaatcag
tactgacaataaaaagattcttgttttcaagaactgtcatttgatatagttttttatattgtagttgttctattttaatcaaatg
tttagcgtgattttatatttttttcgcctcgacatcatctgccagatgcgaagttaagtgcgcagaaagtaatatcatgcgtc
aatcgtatgtgaatgctggctgctatactgctgtcgattcgatactaacgccgccatccagtgctgaaaacgagctttcgaga
accttaatgcggccgcataacttcgtataatgtatgctatacgaagttatGCATGAGTAGTTAGTTATCT
TTTTGACAATGATCTCTTTTGAAAATATCTACTGTAGATTTGCATGGACGC
ACGTCGCCCATACGCCAACTTTGGCAATGATACTCGTTATTCGTAATATC
AGTCCGTCAAGGTGCTGTGATTTCTCTATTTTATATTGCCTATTATTTTTT
CAAATGATTTGAGCCGTTTTAAATTG

E Protokoll för transformation av jäst

1. Inoculate 50 ml of YPD with O/N-culture to $OD \approx 0.1$
2. Grow to $OD \approx 0.7$
3. Harvest cells, wash with sterile dest. water. Wash once more with 1 ml milliQ over to eppie.
4. Resuspend cells in 1 ml TE/LiAc (1 part 10xTE, pH 7.5, 1 part 1 M LiAc, 8 parts water)
5. Spin down, 4000 rpm, 1 min.
6. Resuspend in 250 μ l TE/LiAc
7. Mix 50 μ l of cells with 15 μ l DNA (PCR-product) and 5 μ l freshly denaturated herring DNA (10 μ g/ μ l)
8. Add 300 μ l of sterile milliQ, mix carefully and spin at 3000 rpm, 1 min.
9. Incubate 30 °C, 30 min. Heat shock 42 °C for 15 minutes
10. Add 800 μ l of sterile milliQ, mix carefully and spin at 3000 rpm, 1 min.
11. Grow cells for 2 hrs in 1 ml YPD (after this, spin down and resuspend in 100 μ l water or YPD)
12. Spread on selective plate

F Beräkningar

F.1 Exempelberäkning av förväntade band

Nedan följer tillvägagångssättet för beräkningen av de förväntade banden för L50A-plasmiden renad ur *E. coli* och klippt med HindIII och PvuII (Figur 2 och Tabell 2), samt tillvägagångssättet för beräkningen av de förväntade bandstorlekarna för verifieringen av inkorporerat insert på korrekt plats i jästgenomet.

Hela plasmidsekvensen för L50A-plasmiden från Bilaga C kopierades och klistrades in i internetverktyget NEBcutter. Alternativen "Circular" (eftersom det är en plasmid) och "All commercially available specificities" kryssades i innan "Submit" markerades. Därefter användes funktionen "Custom digest", där restriktionsenzymerna HindIII och PvuII kryssades i följt av att alternativet "Digest" valdes. Genom att till sist markera "Fragments" erhöles de förväntade storlekarna på banden: 2364, 1526, 892 och 776 bp.

Alla andra förväntade band räknades ut genom samma tillvägagångssätt, med undantag av de fragment där restriktionsenzym inte användes. I detta fall räckte det att endast räkna ut längden på fragmenten i fråga.

Beräkning av förväntade längder för insertverifieringen i jästgenomet skiljde sig från ovanstående metod, då primrarna DAK2_ctrlUp och DAK2_ctrlDw binder i jästgenomet ett visst antal baspar uppströms respektive nedströms insertet (Figur 1). Genom vetenskap att DAK2_ctrlUp binder 97 bp uppströms insertet och DAK2_ctrlDw binder 131 bp nedströms insertet kunde de förväntade storlekarna räknas ut med hjälp av insertsekvenserna från Bilaga D:

Övre del av insert: $401 + 96 = 498\text{bp}$

Nedre del av insert: $613 + 131 = 744\text{bp}$

F.2 Koncentration, medelvärde, standardavvikelse och medelfel

Koncentrationen har beräknats enligt Ekvation 1, medelvärdet har beräknats enligt Ekvation 2, standardavvikelsen för en finit population har beräknats enligt Ekvation 3 och medelfelet har beräknats enligt Ekvation 4. y är koncentration, N är antal kulturer på platta, V är volym, X är spädning, $\bar{y}$ är medelvärde av koncentrationer och n är antal försöksrepetitioner (antal plattor per mutant och tid).

$$y_n = \frac{N \cdot X}{V} \quad (1)$$

$$\bar{y} = \frac{\sum_1^n y_n}{n} \quad (2)$$

$$s_n = \sqrt{\frac{\sum_1^n (y_n - \bar{y})^2}{n}} \quad (3)$$

$$SE_{\bar{y}} = \frac{s_n}{\sqrt{n}} \quad (4)$$

G Räkning av kolonier

Nedan följer resultaten från räkning av *Lactobacillus*-kolonier från MRS+cykloheximid och jästkolonier från YPD-plattorna efter 0, 3 och 6 timmar. Efter 24 timmar utfördes en sista provtagning för att kunna studera jästens och *Lactobacillus* eventuella påverkan på varandra efter ett längre tidsintervall. Data angivet i rödtext avser plattor där antalet kolonier till viss mån fick uppskattas på grund av nära liggande kolonier. Detta gjorde det exakta antalet kolonier svårt att urskilja.

Tabell 8: Beräkning av bakteriekolonier då ympningar med *L. brevis* och *L. buchneri* ihop med CEN.PK vildtyp, CEN.PK L50A, CEN.PK β -defensin-3, JBA vildtyp, JBA L50A eller JBA β -defensin-3 spridits på MRS-plattor och inkuberats i två dygn. Varje lösning har späatts till 10^5 och 10^6 , varpå varje spädning har spridits på två plattor vardera. MRS-plattorna var behandlade med cykloheximid för att inte jäst skulle kunna växa. De rödmarkerade siffrorna är plattor som varit svårberäknade på grund av ansamling av kolonier.

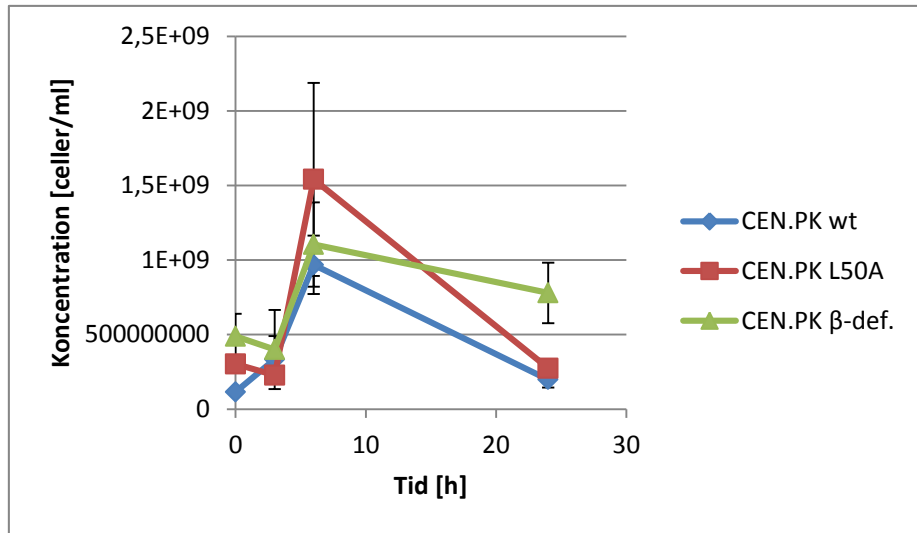
Antal på platta									
Tid/Spädning	CEN.PK wt			CEN.PK L50A			CEN.PK β -def.		
0	10^5	10^5	10^6	10^5	10^5	10^6	10^5	10^5	10^6
3	69	135	15	260	135	46	189	187	82
6	101	168	20	115	197	31	96	74	132
24	449	733	137	469	125	326	552	564	144
	156	227	35	233	218	35	336	413	120
	JBA wt			JBA L50A			JBA β -def.		
Tid/Spädning	10^5	10^5	10^6	10^5	10^5	10^6	10^5	10^5	10^6
0	58	62	26	0	0	51	64	61	14
3	95	65	43	177	186	133	171	93	8
6	183	243	69	278	337	213	313	335	185
24	256	244	24	152	227	39	287	262	58
						47			56

Omräknat till koncentration [celler/ml]									
Tid/Spädning	CEN.PK wt			CEN.PK L50A			CEN.PK β -def.		
0	10^5	10^5	10^6	10^5	10^5	10^6	10^5	10^5	10^6
3	$6,90 \cdot 10^7$	$1,35 \cdot 10^8$	$1,50 \cdot 10^8$	$2,60 \cdot 10^8$	$1,35 \cdot 10^8$	$4,60 \cdot 10^8$	$1,89 \cdot 10^8$	$1,87 \cdot 10^8$	$8,20 \cdot 10^8$
6	$1,01 \cdot 10^8$	$1,68 \cdot 10^8$	$2,00 \cdot 10^8$	$1,15 \cdot 10^8$	$1,97 \cdot 10^8$	$3,10 \cdot 10^8$	$9,60 \cdot 10^7$	$7,40 \cdot 10^7$	$1,32 \cdot 10^9$
24	$4,49 \cdot 10^8$	$7,33 \cdot 10^8$	$1,37 \cdot 10^9$	$4,69 \cdot 10^8$	$1,25 \cdot 10^8$	$3,26 \cdot 10^9$	$5,52 \cdot 10^8$	$5,64 \cdot 10^8$	$1,44 \cdot 10^9$
	$1,56 \cdot 10^8$	$2,27 \cdot 10^8$	$3,50 \cdot 10^8$	$2,33 \cdot 10^8$	$2,18 \cdot 10^8$	$3,50 \cdot 10^8$	$3,36 \cdot 10^8$	$4,13 \cdot 10^8$	$1,20 \cdot 10^9$
	JBA wt			JBA L50A			JBA β -def.		
Tid/Spädning	10^5	10^5	10^6	10^5	10^5	10^6	10^5	10^5	10^6
0	$5,80 \cdot 10^7$	$6,20 \cdot 10^7$	$2,60 \cdot 10^8$	0	0	$5,10 \cdot 10^8$	$6,40 \cdot 10^7$	$6,10 \cdot 10^7$	$1,40 \cdot 10^8$
3	$9,50 \cdot 10^7$	$6,50 \cdot 10^7$	$4,30 \cdot 10^8$	$1,77 \cdot 10^8$	$1,86 \cdot 10^8$	$1,33 \cdot 10^9$	$1,71 \cdot 10^8$	$9,30 \cdot 10^7$	$8,00 \cdot 10^7$
6	$1,83 \cdot 10^8$	$2,43 \cdot 10^8$	$6,90 \cdot 10^8$	$2,78 \cdot 10^8$	$3,37 \cdot 10^8$	$2,13 \cdot 10^9$	$3,13 \cdot 10^8$	$3,35 \cdot 10^8$	$1,85 \cdot 10^9$
24	$2,56 \cdot 10^8$	$2,44 \cdot 10^8$	$2,40 \cdot 10^8$	$1,52 \cdot 10^8$	$2,27 \cdot 10^8$	$3,90 \cdot 10^8$	$2,87 \cdot 10^8$	$2,62 \cdot 10^8$	$5,80 \cdot 10^8$
						$4,70 \cdot 10^8$			$5,60 \cdot 10^8$

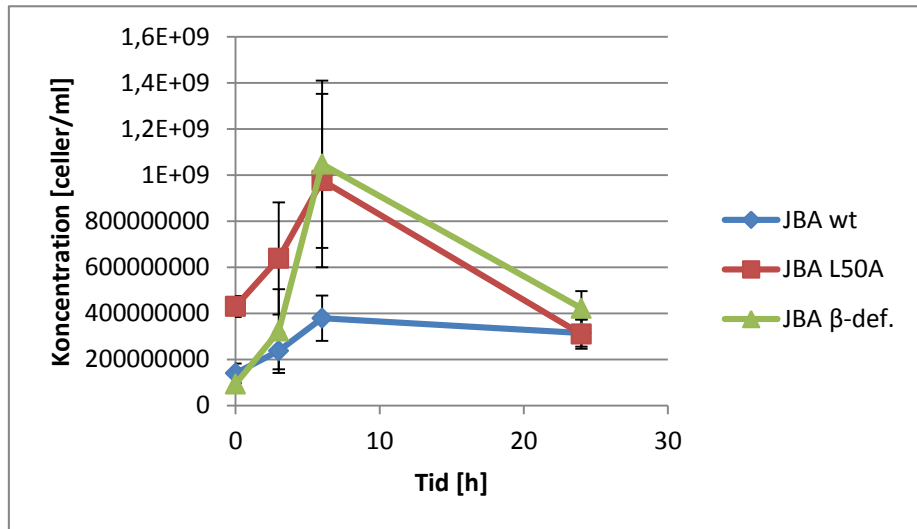
Tabell 9: Beräkning av jästkolonier då ympningar med *L. brevis* och *L. buchneri* ihop med CEN.PK vildtyp, CEN.PK L50A, CEN.PK β -defensin-3, JBA vildtyp, JBA L50A eller JBA β -defensin-3 spridits på YPD-plattor och inkuberats i två dygn. Varje lösning har späts till 10^5 och 10^6 , varpå varje spädning har spridits på två plattor vardera. De rödmarkerade siffrorna är plattor som varit svårberäknade på grund av ansamling av kolonier.

Antal på platta											
Tid/Spädning	CEN.PK WT				CEN.PK L50A				CEN.PK β -def.		
	10^5	10^5	10^6	10^6	10^5	10^5	10^6	10^6	10^5	10^5	10^6
0	214	201	65	25	207	220	61	68	172	128	33
3	254	301	67	94	206	200	0	0	132	45	15
6	157	146	111	56	22	231	234	0	228	218	56
24	192	239	44	45	282	218	39	50	214	214	69
	JBA WT				JBA L50A				JBA β -def.		
Tid/Spädning	10^5	10^5	10^6	10^6	10^5	10^5	10^6	10^6	10^5	10^5	10^6
0	79	75	17	42	151	121	52	25	39	79	27
3	121	122	46	38	137	147	91	69	141	127	26
6	137	167	37	22	172	161	85	89	202	185	110
24	169	144	28	29	128	149	24	42	165	116	44
	CEN.PK WT				CEN.PK L50A				CEN.PK β -def.		
Tid/Spädning	10^5	10^5	10^6	10^6	10^5	10^5	10^6	10^6	10^5	10^5	10^6
0	$2,14 \cdot 10^8$	$2,01 \cdot 10^8$	$6,50 \cdot 10^8$	$2,50 \cdot 10^8$	$2,07 \cdot 10^8$	$2,20 \cdot 10^8$	$6,10 \cdot 10^8$	$6,80 \cdot 10^8$	$1,72 \cdot 10^8$	$1,28 \cdot 10^8$	$3,30 \cdot 10^8$
3	$2,54 \cdot 10^8$	$3,01 \cdot 10^8$	$6,70 \cdot 10^8$	$9,40 \cdot 10^8$	$2,06 \cdot 10^8$	$2,00 \cdot 10^8$	0	0	$1,32 \cdot 10^8$	$4,50 \cdot 10^7$	$1,50 \cdot 10^8$
6	$1,57 \cdot 10^8$	$1,46 \cdot 10^8$	$1,11 \cdot 10^9$	$5,60 \cdot 10^8$	$2,20 \cdot 10^7$	$2,31 \cdot 10^8$	$2,34 \cdot 10^9$	0	$2,28 \cdot 10^8$	$2,18 \cdot 10^8$	$5,60 \cdot 10^8$
24	$1,92 \cdot 10^8$	$2,39 \cdot 10^8$	$4,40 \cdot 10^8$	$4,50 \cdot 10^8$	$2,82 \cdot 10^8$	$2,18 \cdot 10^8$	$3,90 \cdot 10^8$	$5,00 \cdot 10^8$	$2,14 \cdot 10^8$	$2,14 \cdot 10^8$	$6,90 \cdot 10^8$
	JBA WT				JBA L50A				JBA β -def.		
Tid/Spädning	10^5	10^5	10^6	10^6	10^5	10^5	10^6	10^6	10^5	10^5	10^6
0	$7,90 \cdot 10^7$	$7,50 \cdot 10^7$	$1,70 \cdot 10^8$	$4,20 \cdot 10^8$	$1,51 \cdot 10^8$	$1,21 \cdot 10^8$	$5,20 \cdot 10^8$	$2,50 \cdot 10^8$	$3,90 \cdot 10^7$	$7,90 \cdot 10^7$	$2,70 \cdot 10^8$
3	$1,21 \cdot 10^8$	$1,22 \cdot 10^8$	$4,60 \cdot 10^8$	$3,80 \cdot 10^8$	$1,37 \cdot 10^8$	$1,47 \cdot 10^8$	$9,10 \cdot 10^8$	$6,90 \cdot 10^8$	$1,41 \cdot 10^8$	$1,27 \cdot 10^8$	$2,60 \cdot 10^8$
6	$1,37 \cdot 10^8$	$1,67 \cdot 10^8$	$3,70 \cdot 10^8$	$2,20 \cdot 10^8$	$1,72 \cdot 10^8$	$1,61 \cdot 10^8$	$8,50 \cdot 10^8$	$8,90 \cdot 10^8$	$2,02 \cdot 10^8$	$1,85 \cdot 10^8$	$1,10 \cdot 10^9$
24	$1,69 \cdot 10^8$	$1,44 \cdot 10^8$	$2,80 \cdot 10^8$	$2,90 \cdot 10^8$	$1,28 \cdot 10^8$	$1,49 \cdot 10^8$	$2,40 \cdot 10^8$	$4,20 \cdot 10^8$	$1,65 \cdot 10^8$	$1,16 \cdot 10^8$	$4,40 \cdot 10^8$

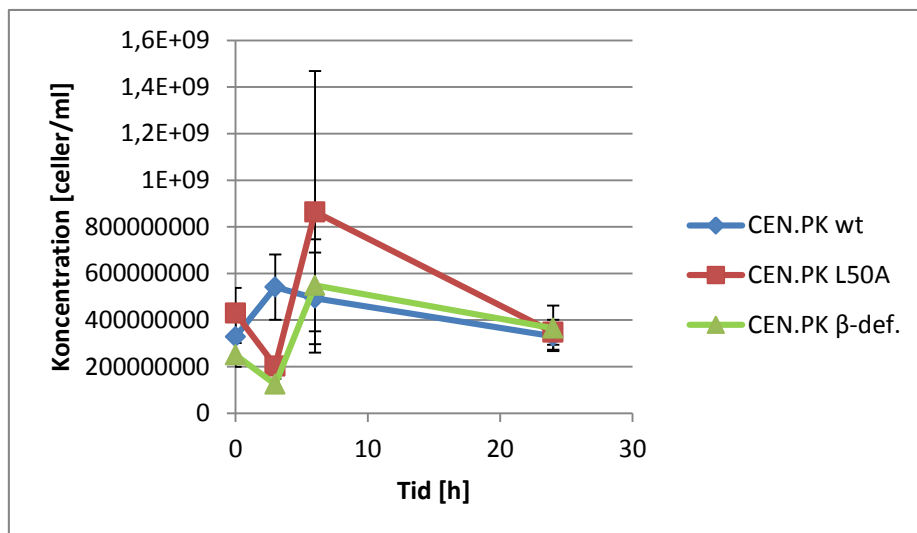
H Grafer över koncentrationsförändring av bakterier och jästceller i ympkulturer



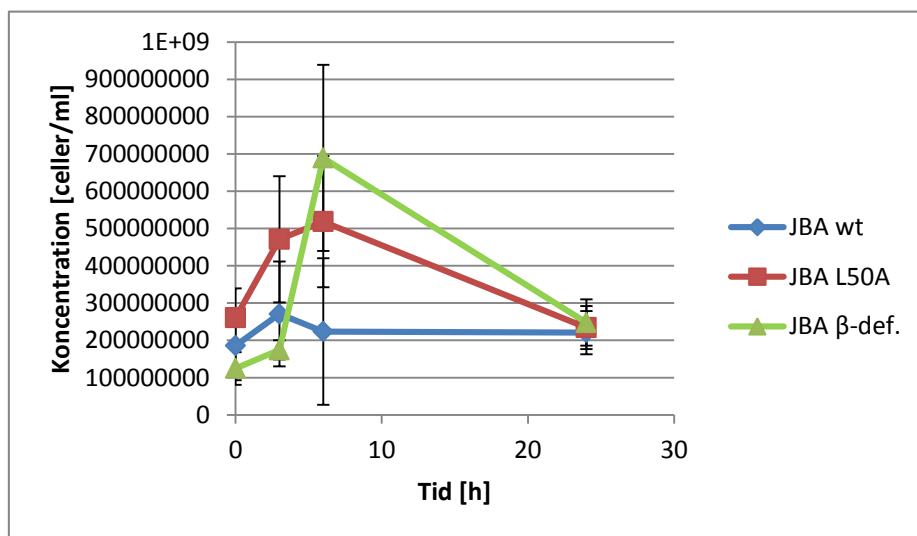
Figur 13: Koncentration bakterieceller över tid då *Lactobacillus brevis* och *Lactobacillus buchneri* ympats med CEN.PK vildtypsjäst (blå), CEN.PK genmodifierad med L50A (röd) och CEN.PK genmodifierad med β -defensin-3 (grön). Resultaten har räknats från fyra olika MRS+cykloheximid-plattor, två med 10^5 -spädning och två med 10^6 -spädning. Plattorna var behandlade med cykloheximid för att inte jästceller skulle växa. Punkterna i grafen är medelvärde, och felstaplar med medelfelet har beräknats enligt Bilaga F.



Figur 14: Koncentration bakterieceller över tid då *Lactobacillus brevis* och *Lactobacillus buchneri* ympats med JBA vildtypsjäst (blå), JBA genmodifierad med L50A (röd) och JBA genmodifierad med β -defensin-3 (grön). Resultaten har räknats från fyra olika MRS+cykloheximid-plattor, två med 10^5 -spädning och två med 10^6 -spädning. Plattorna var behandlade med cykloheximid för att inte jästceller skulle växa. Punkterna i grafen är medelvärde, och felstaplar med medelfelet har beräknats enligt Bilaga F.



Figur 15: Koncentration jästceller över tid då *Lactobacillus brevis* och *Lactobacillus buchneri* ympats med CEN.PK vildtypsjäst (blå), CEN.PK genmodifierad med L50A (röd) och CEN.PK genmodifierad med β -defensin-3 (grön). Resultaten har räknats från fyra olika YPD-plattor, två med 10^5 -spädning och två med 10^6 -spädning. Punkterna i grafen är medelvärde, och felstaplar med medelfelet har beräknats enligt Bilaga F.



Figur 16: Koncentration jästceller över tid då *Lactobacillus brevis* och *Lactobacillus buchneri* ympats med JBA vildtypsjäst (blå), JBA genmodifierad med L50A (röd) och JBA genmodifierad med β -defensin-3 (grön). Resultaten har räknats från fyra olika YPD-plattor, två med 10^5 -spädning och två med 10^6 -spädning. Punkterna i grafen är medelvärde, och felstaplar med medelfelet har beräknats enligt Bilaga F.