



Norges miljø- og
biovitenskapelige
universitet

Masteroppgave 2023 60 stp

Fakultet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap

Identifisering og karakterisering av bakteriocinet amylocyclicin fra *Bacillus velezensis*, og dets potensial mot *Listeria monocytogenes*

Identification and Characterization of the
Bacteriocin Amylocyclicin from *Bacillus velezensis*
and its Potential Against *Listeria monocytogenes*

Jenny Skjeramo Telstad

Bioteknologi

Forord

Denne masteroppgaven ble fullført som en del av masterprogrammet i Bioteknologi ved Norges miljø og biovitenskapelige universitet (NMBU). Arbeidet med denne oppgaven ble gjennomført med forskningsgruppen Laboratoriet for Mikrobiell Genteknologi (LMG) ved Fakultet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap (KBM) i perioden august 2022 – mai 2023.

Jeg vil starte med å takke min nåværende veileder Thomas Førland Oftedal for å ha trådd inn på kort varsel og for all hjelp både på laben og i skriveprosessen. Takk for at du har vært så tålmodig og svart på spørsmål når det måtte være, det setter jeg utrolig stor pris på. Videre ønsker jeg å takke Dr. Morten Kjos som trådte inn som medveileder og alltid har hatt en åpen dør dersom det skulle være noe. Jeg vil også takke min tidligere veileder Dr. Dzung Bao Diep (02.06.1966 – 07.12.2022) for å ha gitt meg tillitt til å gjennomføre min masteroppgave ved LMG og la meg ta en del av deres forskning. Takk for at du alltid var positiv, løsningsorientert og hadde tro på meg og oppgaven min.

Jeg ønsker å takke alle på LMG for å ha tatt meg godt imot og for all hjelp jeg har fått på laben. En spesiell takk til Dr. Kirill Ovchinnikov for all kunnskap du har delt og for all veiledning du har gitt i forbindelse med gjennomførelse av forsøk.

Jeg vil også takke familie for all støtte og oppmuntring i løpet av studietiden, og for å alltid ha troen på meg. Til slutt ønsker jeg å takke mine venner for å ha gjort mine fem år på NMBU til de beste i mitt liv. Jeg sitter igjen med mange gode minner og denne tiden ville ikke vært den samme uten dere.

Jenny Skjermo Telstad

Mai 2023, Ås

Sammendrag

Stadig flere bakterier blir resistente mot antibiotika som brukes for å behandle bakterielle infeksjoner. Verdens helseorganisasjon har erklært antimikrobiell resistens som et av verdens største globale helseutfordringer som menneskeheten står ovenfor. For å kunne løse problemet er det avgjørende å finne alternativer til dagens bruk av antibiotika. En del av løsningen kan være å benytte bakteriers egenproduserte antimikrobielle peptider, også kalt bakteriociner. Bakteriociner er små ribosomalt syntetiserte peptider med stor variasjon i både struktur, aktivitet og målorganismer. Bakteriociner produseres av en rekke ulike bakterier, og syntesen av bakteriociner krever som regel minst to ekstra gener som koder for dedikerte transport- og immunitetsproteiner. Immunitet gjør at produsenten ikke blir hemmet av sitt eget bakteriocin, og på den måten utnyttes bakteriociner i konkurranse om næring og nisjer.

Målet for denne oppgaven var å identifisere og karakterisere et antimikrobielt stoff produsert av en *Bacillus velezensis* stamme. Ved bruk av helgenomsekvensering, revers-fase kromatografi og massespektrometri ble dette stoffet identifisert til å være det sirkulære bakteriocinet amylocyclicin. Amylocyclicin var allerede beskrevet, men det var mye som ikke var kjent om peptidets antimikrobielle aktivitet, virkemåte og immunitet. Dette bakteriocinet ble derfor undersøkt videre.

Amylocyclicin viste seg å være et poredannende bakteriocin med høy stabilitet mot varme- og pH-forandringer, og hadde et bredt inhiberingsspekter mot nesten alle Gram-positive bakterier. Det ble observert spesielt god aktivitet mot den patogene bakterien *Listeria monocytogenes*, en robust bakterie som kan forårsake den alvorlige sykdommen listeriose. *L. monocytogenes* kan også danne biofilm, som er et problem i mat- og helseindustrien. Flere ulike matprodukter, som røkt laks, har tidligere vært smittekilde for denne bakterien. Amylocyclicin var effektiv mot biofilm produsert av *L. monocytogenes*, og konfokal mikroskopi viste at bakteriocinet reduserte både celletettheten og levende celler i biofilmen. I tillegg var amylocyclicin effektiv som preventiv behandling for å hemme vekst av *L. monocytogenes* inokulert på røkt laks.

Denne oppgaven viser at amylocyclicin har flere egenskaper som gjør at det kan være egnet for videre utvikling til bruk i mat- og helseindustrien. Videre forskning anbefales derfor på amylocyclicin og bakteriociner generelt, spesielt med hensyn til deres virkemåte og toksisitet, før de eventuelt kan utnyttes i kampen mot antibiotikaresistens.

Abstract

An increasingly number of bacteria are becoming resistant to antibiotics commonly used to treat infections. The World Health Organization has declared antimicrobial resistance as one of the greatest public threats facing humanity. To solve this problem, it is crucial to find alternatives to how antibiotics are presently used. A part of the solution could be the use of the antimicrobial peptides produced by the bacteria themselves, molecules also known as bacteriocins. Bacteriocins are small ribosomally synthesized peptides that vary considerably in structures, activity, and target organisms. Bacteriocins are produced by many different bacteria, and their biosynthesis most often requires two extra genes encoding dedicated transport and immunity proteins. Immunity enables the producing organisms to inhibit other bacteria in competition for nutrients and niches.

The aim of this thesis was to identify and characterize an antimicrobial substance produced by a *Bacillus velezensis* strains. By the use of whole-genome sequencing, reversed-phase chromatography and mass spectrometry, the antimicrobial substance was identified as the circular bacteriocin amylocyclicin. Amylocyclicin have been previously described, but little is known about its antimicrobial activity, mode of action, and immunity.

Amylocyclicin was shown to have a mode of action involving pore-formation and to have high thermal and pH-stability. Additionally, amylocyclicin exhibited broad-spectrum activity towards most Gram-positive bacteria. The activity was particularly potent against *Listeria monocytogenes*, a robust pathogen that causes the serious illness listeriosis. *L. monocytogenes* is also a strong biofilm producer, which is a problem in the food and health industry. Several ready-to-eat food products, such as smoked salmon, have been the source of numerous listeriosis outbreaks. Amylocyclicin was effective at disrupting biofilms produced by *L. monocytogenes*, and confocal microscopy revealed that the amylocyclicin treatment reduced the cell density and living cells in the biofilm. Additionally, pre-treatment of smoked salmon with amylocyclicin was shown to effectively inhibit the growth of *L. monocytogenes*.

This thesis demonstrates that amylocyclicin has potential for applied use in the food and health industry. Further research on amylocyclicin and bacteriocins in general is thus needed, particularly regarding their mode of action and toxicity, prior to their effective use as a supplement or alternative to antibiotics.

Innholdsfortegnelse

1 Introduksjon.....	3
1.1 Antibiotikaresistens	3
1.2 Bakteriociner	4
1.2.1 Klassifisering av bakteriociner.....	5
1.2.2 Bakteriociners virkemåte.....	10
1.3 Sirkulære bakteriociner	12
1.3.1 Genetikk	13
1.3.2 Biosyntese	14
1.3.3 Virkemåte	15
1.4 <i>Listeria monocytogenes</i>	16
1.4.1 Biofilm.....	16
1.4.2 Forekomst og utbrudd	17
1.4.3 Sykdom og behandling av listeriose.....	18
1.5 Mål med oppgaven	18
2 Material og metode.....	19
2.1 Bakteriestammer.....	19
2.2 Helgenomsekvensering og analyse.....	20
2.3 Optimalisering av bakteriocinproduksjon fra <i>B. velezensis</i> B2002.....	20
2.3.1 Bestemmelse av bakteriocinaktivitet.....	20
2.4 Rensing av bakteriocin	21
2.4.1 MALDI-TOF MS av RPC fraksjoner.....	21
2.5 Inhiberingsspekter amylocyclicin.....	22
2.6 Kloning og karakterisering av immunitetsgener	22
2.6.1 Isolering av plasmid	22
2.6.2 Polymerase chain reaction (PCR).....	23
2.6.3 Gibson assembly® av <i>acnDE</i> og <i>acnDEI</i> inn i pNZ8037.....	23
2.6.4 Kjemisk transformasjon av <i>E. coli</i> GeneHogs®	23
2.6.5 Elektroporering av <i>L. lactis</i> B200	24
2.6.6 Immunitet mot amylocyclicin for <i>L. lactis</i> acnDEI og <i>L. lactis</i> acnDE.....	25
2.7 Karakterisering av fysiokjemiske egenskaper og poredannelse.....	25
2.7.1 Proteasesensitivitet	25
2.7.2 Varmestabilitet	25
2.7.3 pH-stabilitet	25
2.7.4 Analyse av poredannelse ved bruk av propidiumjodid	26
2.7.5 Analyse av poredannelse ved bruk av pHluorin biosensor	26

2.8 Effekt av amylocyclicin mot <i>L. monocytogenes</i> biofilm.....	26
2.8.1 Biofilmdannelse fra <i>L. monocytogenes</i>	26
2.8.2 Biofilm-orientert antimikrobiell test (BOAT).....	27
2.8.3 Bakteriell viabilitet etter BOAT.....	27
2.8.4 Konfokal laserskanningsmikroskopi.....	28
2.9 Effekt av amylocyclicin mot <i>L. monocytogenes</i> på røkt laks.....	28
3 Resultat	29
3.1 Helgenomsekvensering og analyse av <i>B. velezensis</i> B2002.....	29
3.2 Optimalisering av bakteriocinproduksjon fra <i>B. velezensis</i> B2002.....	30
3.3 Rensing av antimikrobielt stoff fra <i>B. velezensis</i> B2002.....	31
3.4 Identifisering av amylocyclicin med MALDI-TOF MS	32
3.5 Kloning og karakterisering av amylocyclicin-gener (immunitetsgener).....	33
3.6 Amylocyclicin har bredspektret aktivitet mot Gram-positive bakterier.....	34
3.7 Fysiokjemiske egenskaper for amylocyclicin	36
3.8 Amylocyclicin er et poredannende bakteriocin.....	37
3.9 Amylocyclicin forstyrrer <i>L. monocytogenes</i> biofilm.....	39
3.9.1 Biofilmdannelse fra utvalgte <i>L. monocytogenes</i> stammer.....	39
3.9.2 Amylocyclicin mot biofilm fra <i>L. monocytogenes</i> LMGT 3744.....	40
3.10 Amylocyclicin hemmer vekst av <i>L. monocytogenes</i> på røkt laks	42
4 Diskusjon	45
4.1 Rensing av amylocyclicin.....	45
4.2 Karakterisering av immunitetsgener.....	46
4.3 Stabilitet amylocyclicin	48
4.4 Aktivitet mot patogener.....	49
4.5 Aktivitet mot <i>Listeria monocytogenes</i>	49
4.5.1 Amylocyclicinbehandling av biofilm fra <i>L. monocytogenes</i>	49
4.5.2 Amylocyclicinbehandling av <i>L. monocytogenes</i> på røkt laks	50
4.6 Amylocyclicin er en poredanner med ukjent virkemåte.....	51
5 Konklusjon og videre arbeid	53
6 Referanser	54
7 Vedlegg	63
Vedlegg 1	63
Vedlegg 2	65
Vedlegg 3	65
Vedlegg 4	66

1 Introduksjon

1.1 Antibiotikaresistens

Antibiotika er antimikrobielle medikamenter som brukes for å bekjempe og forhindre bakterielle infeksjoner hos mennesker og dyr. Siden oppdagelsen av penicillin i 1928 har en rekke ulike antibiotika blitt oppdaget, hvor de fleste ble oppdaget i perioden 1940-1960 som anses som gullalderen for antibiotikaoppdagelser (1). Antibiotika dreper eller hemmer vekst av bakterier ved å angripe essensielle strukturer eller funksjoner hos bakterien. Ulike antibiotika har ulike virkningsmekanismer, hvor de vanligste angrepspunktene er komponenter i syntesen av cellevegg, DNA/RNA, eller protein (2). Det mest kjente antibiotikumet er trolig penicillin, som virker ved å hemme celleveggsyntesen (2). Celleveggen til bakterier består av kjeder av peptidoglykan som er kryssbundet til et beskyttende lag som opprettholder cellens form og indre trykk (3). Dannelsen av kryssbindingene katalyseres av enzymer kjent som penicillinbindende proteiner (PBP), og penicillin hindrer interaksjonen mellom PBP-er og peptidoglykan, slik at celleveggen mister sin integritet og bakteriecellen vil lysere (2,3).

Den omfattende bruken av antibiotika har ført til at antibiotikaresistens er et økende globalt problem. I 2019 ble 4.95 millioner dødsfall estimert til å være assosiert med antibiotikaresistens, hvorav 1.27 millioner var direkte knyttet til antibiotikaresistens (4). Både overbruk, preventiv bruk, og feilbruk av antibiotika bidrar til den økende resistensen (5). Bakterier kan utvikle resistens mot antibiotika på ulike måter som fører til at virkningen av antibiotikumet hemmes eller blokkeres. Det er fire generelle mekanismer for antibiotikaresistens; bakterien kan begrense opptaket av antibiotikumet, modifisere angrepspunktet slik at antibiotikumet ikke gjenkjenner målet, pumpe antibiotikumet raskt ut fra cellen, eller inaktivere og bryte ned antibiotikumet ved hjelp av enzymer (5). Antibiotikaresistens kan enten være naturlig til stede hos bakterien, eller det kan oppstå hos bakterien på grunn av mutasjoner eller bli ervervet ved horisontal genoverføring (5).

Det finnes også bakterier som er resistente mot mer enn én type antibiotika, såkalte multiresistente bakterier. Multiresistente patogene bakterier er en stor trussel som krever nye behandlingsformer, men likevel utvikles det få nye legemidler mot disse. Et eksempel på dette er meticillinresistente *Staphylococcus aureus* (MRSA), som er resistent mot alle typer penicillin

og kan gi alvorlige infeksjoner som er vanskelig å behandle. MRSA ble i 2019 estimert til å være årsaken til 100 000 dødsfall og er den bakterien med flest dødsfall knyttet til resistens (4).

Antibiotikaresistens er også en stor økonomisk byrde for samfunnet da det fører til lengre sykehusopphold og mer kompliserte behandlinger. Verdens helseorganisasjon (WHO) har erklært antimikrobiell resistens som en av de 10 største globale helseutfordringene menneskeheten står ovenfor i dag, og det er helt nødvendig å finne alternativer til eksisterende antibiotika og bruken av disse (6). En gruppe molekyler kalt bakteriociner er foreslått å være et viktig alternativ eller supplement til antibiotika i kampen mot resistente bakterier, og det er disse molekylene som er studert i dette arbeidet.

1.2 Bakteriociner

Bakteriociner er små antimikrobielle peptider som syntetiseres ribosomalt av bakterier (7). Bakteriociner har stor diversitet i struktur, og kan produseres både av Gram-positive og Gram-negative bakterier (8). Bakterier er selv immune mot egenprodusert bakteriocin, og kan dermed produsere bakteriociner for å bekjempe andre bakterier i konkurranse om næring og nisjer (7,9). Bakteriociner har hovedsakelig antimikrobiell aktivitet mot samme eller liknende arter som bakteriocinprodusenten (9). De har altså et smalspektret hemmingsspekter, selv om mange unntak med bakteriociner som er bredspektret og aktive mot arter som ikke er nært beslektet produsenten også har blitt beskrevet (7,10). Bakteriociner produsert av Gram-positive arter er imidlertid som regel aldri/sjelden aktive mot Gram-negative arter (7).

Bakteriociner kodes av strukturelle gener som befinner seg på plasmider eller på kromosomet i nærheten av gener som er nødvendige for biosyntesen, deriblant gener for transport og immunitet (7,8). Bakteriociner syntetiseres som oftest som precursorpeptider som ofte gjennomgår posttranslasjonelle modifiseringer og/eller spalting av et lederpeptid for å omgjøres til en aktiv form (7). I genkluster som koder for bakteriociner finnes det som regel transportere som kan frakte bakteriocinet ut av cellen, i tillegg til immunitetsproteiner som sørger for at bakteriocinprodusenten ikke hemmes av eget bakteriocin (7). For de fleste bakteriociner er biosyntese og virkningsmekanismer fortsatt ikke godt karakterisert og mer kunnskap om dette vil være nyttig og nødvendig for anvendelse av bakteriociner som antimikrobielle substanser.

De mest kjente bakteriocinene er de som produseres av melkesyrebakterier. Melkesyrebakterier har lenge vært benyttet i matproduksjon, noe som gjør at bakteriocinene de produserer ofte anses som trygge (11). De fleste bakteriociner er i tillegg varmemestabile og tolerante mot pH-enderinger, noe som gjør de egnet til å brukes som konserveringsmiddel (7). I dag er det kun et fåtall bakteriociner som er kommersialisert som tilsetningsstoffer i mat, og disse produseres av melkesyrebakterier (11,12). Det ligger dermed et større potensial i å tilsette bakteriociner eller bakteriocinproduserende bakterier i mat for å forhindre vekst av uønskede bakterier og forlenge holdbarheten.

Foruten bruk i matindustrien har bakteriociner flere egenskaper som gjør dem attraktive som et fremtidig alternativ eller tillegg til dagens antibiotika. Slike egenskaper er liten størrelse (<10 kDa), stabilitet, lav toksisitet, og aktivitet mot flere patogene bakterier (10). Studier har vist at kombinasjoner av bakteriociner og penicillin har en synergisk antimikrobiell effekt mot MRSA og effektivt dreper MRSA-stammer *in vitro* og *in vivo* (13,14). I tillegg kan slike kombinasjoner forstyrre biofilm produsert av MRSA-stammer (14). Slike kombinasjoner reduserer også sannsynligheten for utvikling av resistens sammenlignet med antibiotika eller bakteriocin alene, siden disse har ulike virkningsmekanismer (13). Det er også mulig å modifisere bakteriociner for å forbedre stabiliteten og/eller aktiviteten mot spesifikke patogener, og dermed gjøre de bedre egnet til klinisk bruk (10). Tidligere studier viser også at derivater av bakteriociner, og hybrider av bakteriociner sammen med antibiotikum, har aktivitet mot vankomycinresistente enterokokker (15,16). Det kreves fortsatt mer forskning og en dypere forståelse av bakteriociners virkemåte og human toksisitet før de kan benyttes til klinisk bruk, men fra dagens kunnskap ser de ut til å kunne bidra som en del av løsningen på den globale utfordringen knyttet til antibiotikaresistens.

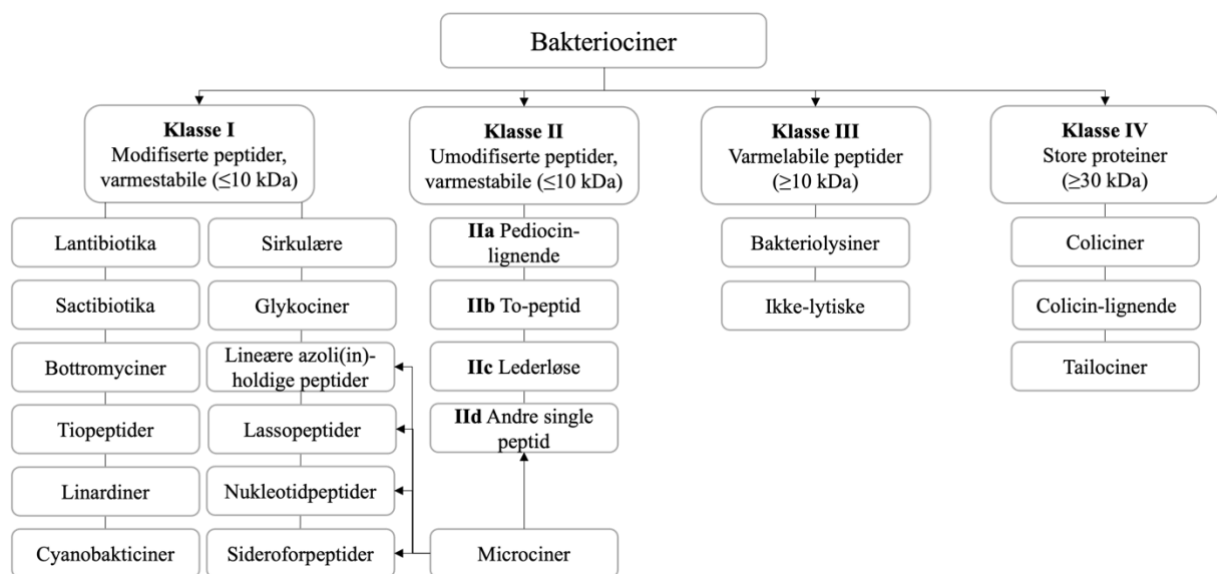
1.2.1 Klassifisering av bakteriociner

Bakteriociner produsert av melkesyrebakterier har lenge vært et forskningsområde, og med økende funn av nye bakteriociner har det vært nødvendig å lage et klassifiseringssystem. I 1993 presenterte Todd R. Klaenhammer ett forslag til klassifisering av bakteriociner produsert av melkesyrebakterier basert på struktur og virkemåte (17). Denne klassifiseringen inneholdt 4 hovedklasser: klasse I kalles lantibiotika og bestod av små peptider (<5 kDa) som inneholder den modifiserte aminosyren lantionin, klasse II bestod av små (<10 kDa) varmemestabile peptider,

klasse III var de større (>30 kDa) varmelabile peptidene, og klasse IV var komplekse bakteriociner bestående av både protein og minst en annen kjemisk komponent (17).

Klaenhammer sitt forslag fra 1993 er blitt brukt som grunnlag for flere nyere klassifiseringssystemer. Det er utfordrende å lage ett klassifiseringssystem som tilstrekkelig dekker alle bakteriociner, og det finnes i dag flere forslag som baserer seg på ulike egenskaper som produsent, struktur, sekvens, og fysiske og kjemiske egenskaper. I tillegg oppdages stadig nye bakteriociner, som medfører at klassifiseringen også konstant endres (8).

Ett oppdatert forslag til klassifisering ble utarbeidet av Antoshina et al. i 2022 og er vist i Figur 1.2.1 (12). Denne klassifiseringen består av fire hovedklasser hvor klasse I og II er varmestabile og ≤ 10 kDa, klasse III er varmelabile og ≥ 10 kDa, og klasse IV er store proteiner ≥ 30 kDa (12). Denne klassifiseringen kan benyttes for bakteriociner produsert av både Gram-positive og Gram-negative, hvor bakteriociner i klasse I-III hovedsakelig produseres av Gram-positive og bakteriociner i klasse IV hovedsakelig produseres av Gram-negative (12).



Figur 1.2.1 Klassifisering av bakteriociner basert på forslag fra Antoshina et al. (2022). Bakteriociner produsert av Gram-positive og Gram-negative bakterier kan deles inn i fire underklasser basert på post-translasjonelle modifiseringer, størrelse og stabilitet. Figur er tilpasset fra Antoshina et al. (2022) (12).

Klasse I

Klasse I består av ribosomalt produserte og posttranslasjonelt modifiserte peptider (RiPPs). Dette betyr at de gjennomgår en form for modifikasjon etter translasjonen som gir de spesielle strukturer og egenskaper (11). Før peptidet er modifisert kalles det et precursorpeptid, og dette

peptidet inneholder en ledersekvens som fjernes som en del av modningen og eksporten ut av cellen (11). Antoshina et al. (2022) deler klasse I inn i minst 12 undergrupper, hvor 6 av disse vil bli presentert her (12). En av de mest studerte underklassene er lantibiotika.

Lantibiotika inneholder 2 av 4 ulike undertyper av lantipeptider; I, II, III og IV. Det er kun type I og II som har antimikrobiell aktivitet og anses som bakteriociner (11). Felles for alle lantipeptider er at de inneholder de uvanlige aminosyrene lantionin og/eller metyllantionin (18). Lantionin og metyllantionin dannes av en posttranslasjonell modifikasjon, hvor henholdsvis serin og treonin kondenserer og danner binding med cystein i en syklisk struktur (18). Denne strukturen gjør lantibiotika stabile mot proteolyse og temperaturforandringer (19). Det er ulike enzymer involvert i denne posttranslasjonelle modifikasjonen for de ulike undertypene lantibiotika, som også gir grunnlaget for inndelingen. For type I lantipeptid drives kondenseringen av serin og treonin av LanB, og sykliseringen katalyseres av LanC (19). For type II lantipeptid drives kondenseringen og sykliseringen av et bifunksjonelt enzym kalt LanM (19). Klasse II lantibiotika kan også bestå av to peptider som synergistisk dreper målbakterien; α -peptid og β -peptid (18).

Det best studerte lantipeptidet er nisin som produseres av *Lactococcus lactis* (11). Nisin ble først oppdaget i 1928, og har lenge blitt brukt som konserveringsmiddel i mat da det har lav toksisitet og et bredt inhiberingsspekter som inkluderer flere patogener og (20). Nisin produserer som et precursorpeptid på 57 aminosyrer, og etter spalting av lederpeptidet består det modne peptidet av 34 aminosyrer inkludert lantionin (20).

Sirkulære bakteriociner er bakteriociner hvor N- og C-terminus er koblet sammen med en peptidbinding (11). De sirkulære bakteriocinene deler en felles tredimensjonal struktur kalt saposin-fold, og den sirkulære strukturen gjør disse bakteriocinene svært stabile mot forandringer i pH og temperatur (21,22). I tillegg er sirkulære bakteriociner ofte bredspektret mot flere ulike matbårne patogener, noe som gjør det interessant å undersøke mulige kliniske bruksområder av denne klassen bakteriociner (23).

Perez et al. (2018) grupperer sirkulære bakteriociner i gruppe I; de kationiske peptidene med høyt isoelektrisk punkt og gruppe II; de hydrofobe peptidene med lavere isoelektrisk punkt (21). Det finnes ulike grenser for isoelektrisk punkt for de to gruppene i litteraturen, men konsensusen er den samme; gruppe I har høyere isoelektrisk punkt enn gruppe II.

Sactibiotika er en undergruppe sactipeptider med antimikrobiell aktivitet (11). Det er stor diversitet blant sactipeptidene, men defineres av en intramolekylær binding mellom svovelatomet i cystein og α -karbonet til en annen aminosyre (11,18). Denne bindingen dannes ved en posttranslasjonell modifikasjon hvor lederpeptidet spaltes av, og gir sactibiotika en hårnålsstruktur med hydrofobe residuer pekende utover (18). Det finnes sactibiotika med både åpen og lukket hårnålsstruktur, og i begge tilfeller bidrar cystein-til- α -karbon-bindingen til stabilitet under sure forhold (18).

Lineære azol(in)-holdige peptider forkortes LAPs. Disse bakteriocinene inneholder ulike sammensetninger av de heterosykliske forbindelsene tiazol og (metyl)oksazol (11). De heterosykliske forbindelsene dannes posttranslasjonelt fra et precursorpeptid som inneholder aminosyrene cystein, serin og/eller treonin (18). Denne modifiseringen er ATP-avhengig og drives av et enzymkompleks bestående av dehydrogenase og syklodehydratase (18). I tillegg kan LAPs gjennomgå ytterligere ulike modifikasjoner, avhengig av deres biosyntetiske genkluster (18).

Glykociner er glykosylerte bakteriociner og er en relativt ny, men raskt voksende undergruppe bakteriociner i klasse I (11,18). Alle kjente glykociner produseres av Gram-positive bakterier og alle inneholder cystein (24). Glykosyleringen kan være enten S- eller O-linket henholdsvis om sukkermolekylet binder cystein eller serin/treonin, hvor førstnevnte er en uvanlig form for glykosylering (18,24). Eksempler på glykociner med S-linket glykosylering er sublancin 168 og glycocin F (25,26). Glykociner har vist seg å ha aktivitet mot flere ulike bakterier, inkludert MRSA, og er i tillegg stabile under høye temperaturer og ulike pH-nivå (24).

Lassopeptider har fått sitt navn grunnet deres karakteristiske struktur. Strukturen dannes posttranslasjonelt ved at lederpeptidet spaltes av, og den N-terminale aminogruppen binder til en sidekjede tilhørende aspartat eller glutamat i posisjon +7 til +9 og danner en ringstruktur på peptidets N-terminale ende (11,18,27). Den C-terminale halen til peptidet tres igjennom ringen, og lassopeptidene oppnår en stabil struktur som gjør at de ofte er resistente mot proteaser og høye temperaturer (27). Lassopeptider deles inn i tre undergrupper basert på antall disulfidbindinger til stede (18). Produksjon av lassopeptider avhenger av minst tre gener som koder for et precursor peptid A, en cysteinprotease B, og en ATP-avhengig syntetase C, og ofte inneholder genklusterne flere gener som blant annet koder for ABC-transportere (18,27).

Klasse II

Klasse II er umodifiserte bakteriociner. Selv om de ikke modifiseres etter translasjonen, så syntetiseres de som precursorpeptider med lederpeptider, med unntak av klasse IIc. Klasse II deles videre inn i fire underklasser; IIa, IIb, IIc og IId.

Klasse IIa er pediocin-lignende bakteriociner. Pediocin-lignende bakteriociner er isolert fra flere ulike Gram-positive bakteriearter (28). Felles strukturelle egenskaper for denne klassen er deres konserverte YGNG-motiv nær N-terminus av peptidet, i tillegg til å inneholde minst én disulfidbro, en amfipatisk α -helix og en positiv ladning ved pH 7 (9). Den C-terminale enden hos pediocin-lignende bakteriociner viser lite sekvenshomologi, og på grunn av variasjoner i denne sekvensen har den blitt foreslått til å være involvert i spesifisitet mot målcellen (28). Basert på sekvenssammenstilling av den mindre konserverte C-terminalen har klasse IIa blitt inndelt i fire undergrupper, men nyere klassifisering som inkluderer flere bakteriociner og tar hensyn til predikert 3D-struktur og virkemåte deler klasse IIa inn i åtte undergrupper (28). For å produsere pediocin-lignende bakteriociner kreves minst fire gener som koder for; precursorpeptid, immunitetsprotein, ABC-transporter og et tilleggsprotein (28).

Klasse IIb bakteriociner kalles to-peptid bakteriociner, da det trengs likt antall av to ulike peptider som fungerer som én enhet for å ha fullstendig antimikrobiell aktivitet (29). Noen to-peptid bakteriociner er avhengig av begge peptidene for å ha antimikrobiell aktivitet, mens for andre kan kun ett peptid gi aktivitet, men denne aktiviteten er mye lavere sammenlignet med når begge peptidene er til stede (11). To-peptid bakteriocinene produseres som precursorpeptid, og genene som koder for de to precursorpeptidene ligger ved siden av hverandre i samme operon (29). I dette operonet ligger også genet som koder for immunitetsprotein og i noen tilfeller gener for ABC-transporter og tilleggsprotein, men de to sistnevnte kan også finnes på et annet nærliggende operon (29).

Klasse IIc er lederløse bakteriociner, og som navnet tilsier syntetiseres disse uten en N-terminal ledersekvens som er unikt for denne klassen. Lederløse bakteriociner har ofte en formylgruppe på N-terminalen av peptidet (21). For de lederløse bakteriocinene enterocin L50A og L50B viser studier at formylgruppen øker den antimikrobielle aktiviteten (30). Andre studier viser at å fjerne formylgruppen ikke påvirker bakteriocinets aktivitet, og det er derfor vanskelig å fastslå

hvilken effekt formyleringen av N-terminalen har å si for aktiviteten (31). Det er identifisert lederløse bakteriociner som består av enten 1 eller 2-4 peptider (9).

Det er mye som enda ikke er forstått når det gjelder lederløse bakteriociner. De gjennomgår ingen posttranslasjonelle modifiseringer eller prosessering som å fjerne lederpeptid, og er derfor aktive med en gang etter translasjon (21). Det er derfor spørsmål knyttet til hvordan verten er immun mot eget bakteriocin før det er utskilt fra cellen, og det gjenstår å identifisere mekanismen bak biosyntesen av flere lederløse bakteriocin (21).

Klasse II d bakteriocin består av ulike bakteriociner som ikke har en signifikant sekvenslikhet til de andre klasse II bakteriocinene. Felles er at de består av ett peptid og er ikke-pediocin-lignende, men utenom dette er det stor diversitet i primærsekvens, struktur, organisering av genkluster, virkemåte og hemmingsspekter (9).

Klasse III og IV

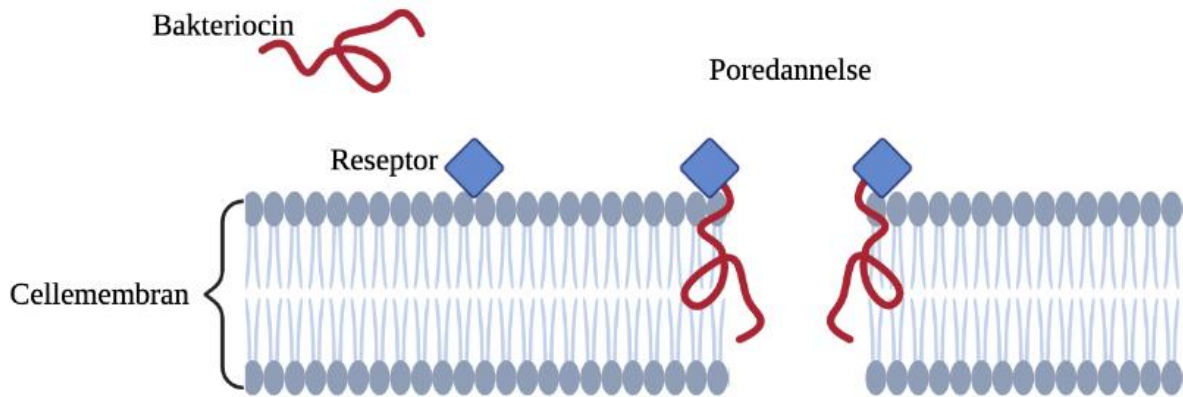
Klasse III består av lytiske og ikke-lytiske bakteriociner. De lytiske bakteriocinene i klasse III kalles bakteriolytiser og lyserer målbakterien ved å degradere celleveggen (9). Bakteriolytiser består av to hoveddomener; ett katalytisk domene på N-terminalen, og ett gjenkjenningsdomene på C-terminalen som er nødvendig for at proteinet skal binde til celleveggen (9). De ikke-lytiske bakteriocinene i klasse III forårsaker ikke direkte lysis hos målbakterien, men kan hemme prosesser som videre fører til celledød (8,32).

Klasse IV består av coliciner, colicin-lignende bakteriociner og tailociner (12). Coliciner produseres av *E. coli* og har en molekylvekt på 30-80 kDa (8). Proteinbakteriociner produsert av andre Gram-negative arter kalles colicin-lignende (8). Tailociner, også kalt faghale-lignende bakteriociner, har en molekylvekt på 20-100 kDa og består av proteinkompleks som ligner på strukturen til bakteriofaghaler (8,9).

1.2.2 Bakteriociners virkemåte

For majoriteten av bakteriociner er den antimikrobielle mekanismen ikke fullstendig forstått. Virkningsmekanismene har imidlertid blitt delvis karakterisert for noen grupper av bakteriociner. Noen bakteriociner er kjent å binde spesifikke molekyler (reseptor) på målbakterien for å forårsake lysis eller hemming av vekst (7). Mange bakteriociner er antatt å

være membran-aktive, hvor interaksjonen med membranen og/eller reseptor fører til poredannelse, noe som øker membranpermeabiliteten og fører til at intracellulære stoffer kan lekke ut av cellen, se Figur 1.2.2 (10). Bakteriociner kan også ta livet av målcellen ved å forstyrre intracellulære prosesser som DNA-, RNA-, og proteinsyntese (15,33,34).



Figur 1.2.2 Virkningsmekanisme for reseptoravhengige poredannende bakteriociner. Bakteriociner kan binde seg til reseptorer som ofte befinner seg på cellemembranen til mål bakterien og dette fører videre til poredannelse i membranen. Gjennom poren kan intracellulære komponenter lekke ut av cellen som fører til hemming eller lysis av cellen. Figur laget i BioRender.

Den antimikrobielle aktiviteten til lantibiotika avhenger ofte av lipid II (11). Lipid II er en viktig komponent i celleveggsyntesen hos bakterier som befinner seg på ekstracellulær side av plasmamembranen, og gjør det til et egnet angrepspunkt for antimikrobielle stoffer (35). Det best studerte bakteriocinet med en slik virkningsmekanisme er nisin. Nisin binder til lipid II som hemmer dannelsen av cellevegg og fører samtidig til poredannelse i bakteriens plasmamembran (35). Gjennom poren kan intracellulære komponenter som aminosyrer og ATP lekke ut av bakteriecellen og føre til celledød (35). Bakteriociner kan også binde til lipid II uten å danne porer i cellemembranen, og klasse IId bakteriocinet lactococcin 972 er et eksempel på dette (36). Lactococcin 972 binder lipid II som fører til hemming av celleveggsyntesen, mer bestemt septumdannelsen hvor det dannes ny cellevegg (36).

En annen karakterisert reseptor er mannose fosfotransferase systemet (Man-PTS), som er ett transmembran proteinkompleks bakterier benytter for sukkeropptak (9). Det antas at de fleste pediocin-lignende bakteriociner benytter Man-PTS som reseptor for å danne porer i cellemembranen (9,37). Dette er også observert for klasse IId bakteriocinet ubericin K (38). Glukose-PTS er foreslått som en mulig reseptor for glykocinet sublancin 168, og sukkertransportsystemer hos bakterier er foreslått å være ett mål også for resterende glykociner (9,39).

Det er også funnet poredannende bakteriociner som ikke ser ut til å benytte seg av reseptormolekyl i deres antimikrobielle virkemåte. Et eksempel er det lederløse bakteriocinet lacticin Q som danner store porer hvor intracellulære proteiner, ATP, og ioner kan lekke ut (40). Porene dannes ved at kationisk lacticin Q binder direkte til den negativt ladde cellemembranen, og når lacticin Q ikke lenger er bundet vil porene lukke seg (40).

Klasse III og IV bakteriociner benytter seg av ulike virkemåter for antimikrobiell aktivitet. Bakteriolysiner angriper bakterier ved at gjenkjenningsdomenet binder til målbakteriens cellevegg, og det katalytiske domenet hydrolyserer bindinger i peptidoglykanlaget slik at celleveggen svekkes og bakterien lyserer og dør (9). Ikke-lytiske bakteriociner benytter seg av ulike virkemåter som ikke fører til direkte lysis hos bakterien. Et eksempel på ett ikke-lytisk bakteriocin er dysgalactin som binder glukose- og/eller mannose-PTS, og dette resulterer i forstyrret membranintegritet og lekkasje av ioner som til slutt vil føre til celledød (32). Tailociner dreper målbakterien ved å binde halekomplekset til reseptorer på celleoverflaten og deretter penetrere og forstyrre cellemembranens permeabilitet (41). Tailocinprodusenten er nødt til å lysere for å frigjøre bakteriocinet, men til gjengjeld er bare noen få molekyler nok til å drepe en målcelle. (9,41).

1.3 Sirkulære bakteriociner

Sirkulære bakteriociner tilhører som nevnt klasse I og oppnår sin struktur via en kovalent binding mellom N- og C-terminus i peptidet (21). Sirkulære bakteriociner er svært stabile grunnet deres sirkulære og kompakte struktur, og gjør at de ofte er resistente mot forandringer i pH, temperatur og mot proteaser (21,23).

Minst 18 sirkulære bakteriociner er blitt beskrevet, se Tabell 1.3.1. Av disse tilhører 13 gruppe I, og som beskrevet i 1.2.1 for sirkulære bakteriociner er disse kationiske og har høyere isoelektrisk punkt enn klasse II. Gruppe II består kun av 5 bakteriociner, og er mer hydrofobe enn de fleste medlemmene i gruppe I (21).

Tabell 1.3.1 Oversikt over sirkulære bakteriociner og deres inndeling i gruppe I eller II. Isoelektrisk punkt (pI) er predikert ved bruk av PepCalc.

Bakteriocin	Produsentstamme	pI	Referanse
Gruppe I			
Enterocin AS-48	<i>Enterococcus faecalis</i> S-48	10.7	(42)
Circularin A	<i>Clostridium beijerinckii</i> ATCC 25752	11	(43)
Uberolysin	<i>Streptococcus uberis</i> 42	10.2	(44)
Carnocyclin A	<i>Carnobacterium maltaromaticum</i> UAL307	10.6	(45)
Lactocyclicin Q	<i>Lactococcus</i> sp. QU 12	10.4	(46)
Garvicin ML	<i>Lactococcus garvieae</i> DCC43	10.7	(47)
Leucocyclicin Q	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> TK41401	10.2	(48)
Amylocyclicin	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> FZB42	10.3	(49)
Aureocyclicin 4185	<i>Staphylococcus aureus</i> 4185	10.7	(50)
Enterocin NKR-5-3B	<i>Enterococcus faecium</i> NKR-5-3	10.4	(51)
Pumilarin	<i>Bacillus pumilus</i> B4107	10.6	(52)
Cerecyclin	<i>Bacillus cereus</i> DDD103	10.7	(53)
Bacicyclcin XIN-1	<i>Bacillus</i> sp. Xin1	10.9	(54)
Gruppe II			
Gassericin A	<i>Lactobacillus gasseri</i> LA39	7.8	(55)
Butyrivibriocin AR10	<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i> AR10	3.5	(56)
Acidocin B	<i>Lactobacillus acidophilus</i> M46	7.8	(57)
Plantaricyclin A	<i>Lactobacillus plantarum</i> NI326	9.9	(58)
Plantacyclin B21AG	<i>Lactobacillus plantarum</i> B21	10.7 ^a	(59)

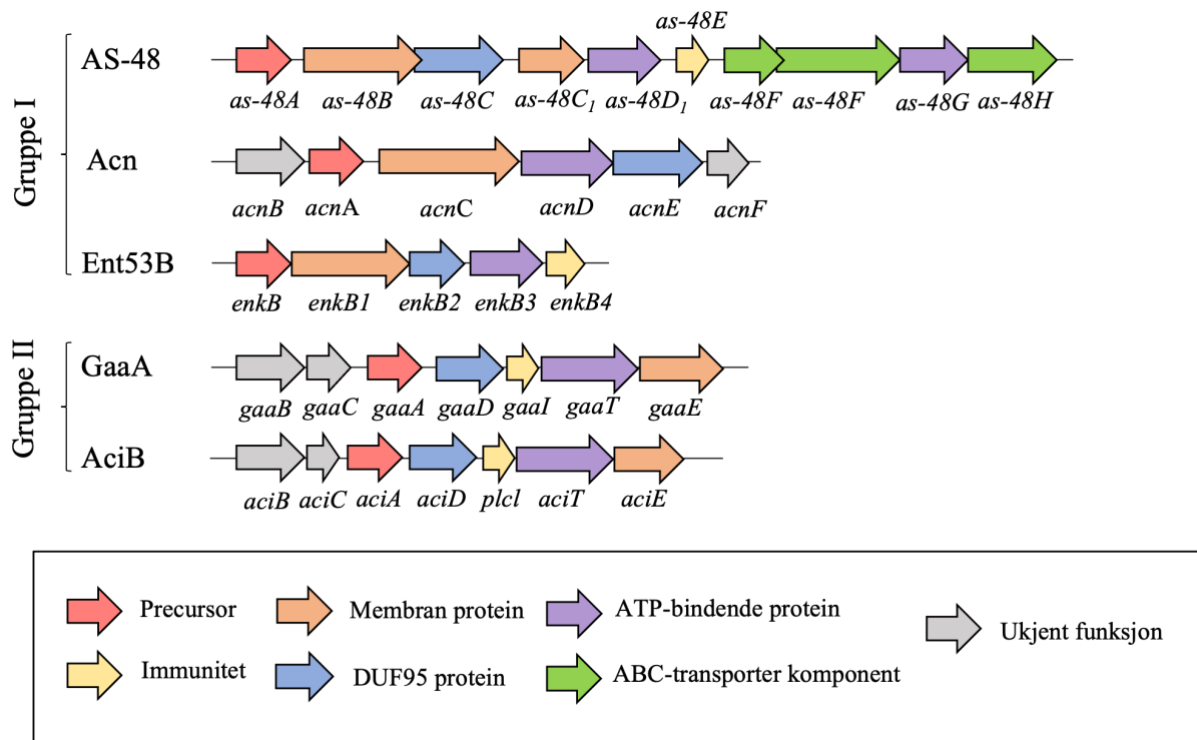
^aPlantacyclin B21AG har høyere pI enn de andre medlemmene i gruppe II, men er plassert her grunnet sekvenslikhet til gruppe II (59).

1.3.1 Genetikk

Sirkulære bakteriociners biosyntetiske genkluster består av minimum fem gener som koder for bakteriocinprecursor, immunitetsprotein, ATP-bindende protein, ABC-transporter, DUF95-superfamilie protein, i tillegg til ett eller flere tilleggsprotein (Figur 1.3.1) (21). Immunitetsproteinet er et lite membranassosiert hydrofobt protein bestående av 49-88 aminosyrer (23). Det ATP-bindende proteinet er involvert i transport, men kan også bidra til immunitet (21). Egenskapen til DUF95 proteinfamilien er ikke fullstendig forstått, men trolig bidrar den til sirkulariseringen av bakteriocinene (11,21).

Det er generelt lite sekvenslikhet mellom de ulike biosyntetiske genklusterne for sirkulære bakteriociner, og antall gener i klusterne varierer (Figur 1.3.1). Enterocin AS-48 er produsert av et relativt stort genkluster bestående av ti gener inkludert tilleggsener som koder for transportere, mens genklusteret til enterocin-NKR-5-3-B består av fem gener (21). For flere

sirkulære bakteriociner gjenstår det å finne funksjonen til alle genene i klusteret eksperimentelt, da noen av tilleggspoteinene de koder for kun er gitt en predikert funksjon basert på sekvenshomologi til andre sirkulære bakteriocingener (21). Disse tilleggspoteinene er ofte predikert til å være hydrofobe, og antas derfor å være membranassosierte (23).



Figur 1.3.1 Organisering av genkluster for utvalgte sirkulære bakteriociner. Fra øverst til nederst viser figuren genkluster tilhørende enterocin AS-48 (AS-48), amylocyclicin (Acn), enterocin-NKR-5-3-B (Ent53B), gassericin A (GaaA) og acidocin B (AciB). Genfunksjoner er vist med farger som er forklart nederst i figuren.

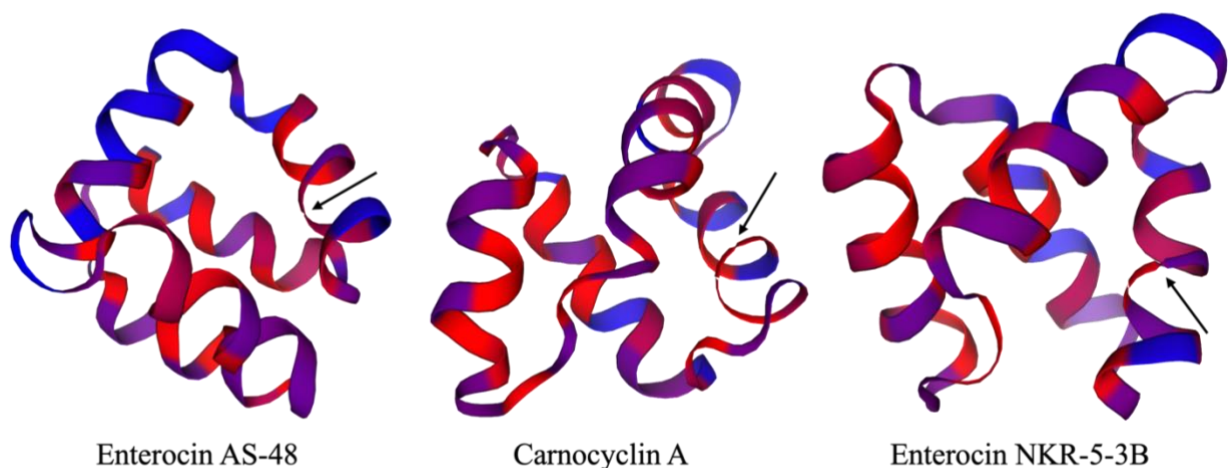
De fleste karakteriserte genkluster for sirkulære bakteriociner koder for små (50-150 aa) kationiske og hydrofobe proteiner predikert å være membranproteiner, vist i gult i Figur 1.3.1. Et gen som koder for et lignende protein (*acnF*) er i genklusteret for amylocyclicin, men funksjonen til dette proteinet er ikke kjent/bekreftet (49).

1.3.2 Biosyntese

De sirkulære bakteriocinene syntetiseres som lineære precursorpeptider med en N-terminal ledersekvens, og tre steg inngår i syntesen: spalting av lederpeptidet, syklisering, og transport ut av cellen (23). Det er fortsatt uklart hvordan de tre stegene i syntesen av sirkulære bakteriociner henger sammen. For modning av garvicin ML er spaltingen av lederpeptidet det første steget i syntesen og nødvendig for sirkulering og eksport (60). I dette tilfellet benytter ikke enzymene involvert i syklisering og eksport lederpeptidet som et gjenkjennessignal,

men de er heller avhengige av en tilgjengelig N-terminal på det modne bakteriocinet (23). Det er store variasjoner i lengden på ledersekvensen, hvor gruppe II som regel har lengre og mer homologe ledersekvenser enn gruppe I (21). Det lengste lederpeptidet tilhører amylocyclicin og består av 48 aminosyrer, og de korteste tilhører lactocyclicin Q og leucocyclicin Q og består av kun 2 aminosyrer (46,48,49).

Det er mangel på kunnskap om hvordan N- og C-terminus til disse peptidene danner en sirkulær struktur. Både N- og C-terminus til sirkulære bakteriociner består hovedsakelig av hydrofobe aminosyrer, og punktet for bindingen av endene befinner seg i en heliksstruktur på peptidet, se Figur 1.3.2 (21,23). Substitusjonsanalyser viser at sykliseringen er avhengig av hydrofobe aminosyrer (61). Aminosyren leucin i posisjon 1 i enterocin NKR-5-3B kan byttes ut med andre hydrofobe aminosyrer (som fremmer heliksdannelse) og fortsatt gi modent bakteriocin, men kan ikke byttes ut med andre hydrofile aminosyrer (61). Det gjenstår fortsatt å finne ut mer om enzymene som katalyserer modningen av de sirkulære bakteriocinene. Det er vist at disse enzymene kodes av gener i bakteriocinclusteret og trolig er det ikke et enkelt protein, men flere proteiner som er involvert i sykliseringen og transporten av sirkulære bakteriociner (21,23).



Figur 1.3.2 NMR-struktur av bakteriocinene enterocin AS-48, carnocyclin A og enterocin NKR-5-3B. NMR-strukturer er hentet fra Protein Data Bank for bakteriocinene enterocin AS-48 (PDB 1E68), carnocyclin A (PDB 2KJF) og enterocin NKR-5-3B (PDB 2MP8) hvor hydrofobe aminosyrer er farget rødt og hydrofile aminosyrer er farget blått. Pilene markerer sykliseringspunktet mellom N- og C- terminus.

1.3.3 Virkemåte

Den antimikrobielle virkemåten til sirkulære bakteriociner er via en interaksjon med cellemembranen som resulterer i forstyrret membranpermeabilitet og påfølgende lekkasje av ioner og celledød (21). Det har lenge vært påstått at sirkulære bakteriociners aktivitet ikke

avhenger av en spesifikk reseptor på målbakteriens cellemembran, blant annet grunnet deres brede spekter av aktivitet og kjemiske egenskaper (21). Sirkulære bakteriociner er positivt ladet (ved pH 7) og det antas derfor at de kan interagere med cellemembranen til bakterier (som er negativt ladet) uten å være avhengig av et reseptormolekyl. Enterocin AS-48, carnocyclin A og gassericin A har stor affinitet for overflaten til bakterier (62–64). Enterocin AS-48 (AS-48) har vist evnen til å interagere med membranvesikler fra både Gram-positive og Gram-negative bakterier. AS-48 danner ikke-selektive porer i plasmamembranen som ioner og stoffer med lav molekylvekt lekker ut fra (62). Carnocyclin A danner selektive anionkanaler som er avhengige av ladning, mens gassericin A danner porer som kalsiumioner lekker ut fra (63,64). I motsetning til det som er antatt med andre sirkulære bakteriociner så viser *L. lactis* IL1403 med mutasjoner i gener kodende for en membranbundet maltose ABC-transporter (mulig reseptor), redusert sensitivitet mot garvicin ML (65). Til tross for nevnte funn er den spesifikke virkemåten til de fleste sirkulære bakteriociner fortsatt ukjent.

1.4 *Listeria monocytogenes*

Listeria-slekten består av Gram-positive og fakultative aerobe bakteriearter, og inneholder blant annet *Listeria monocytogenes* (66). *L. monocytogenes* er en viktig matbåren patogen som kan gi sykdommen listeriose hos både dyr og mennesker, og det er rapportert mange utbrudd av sykdommen hvor næringsmidler har vært smittekilden (66). En årsak til smitte fra matvarer skyldes blant annet at *L. monocytogenes* kan vokse på temperaturer mellom -2 °C og 45 °C, med en optimumstemperatur på 30-37 °C (66). Dette betyr at *L. monocytogenes* kan vokse ved kjøleskapstemperatur som oftest er mellom 1-4 °C, og i tillegg kan bakterien også overleve i nedkjølte produkter over lengre tid. Videre har bakterien evne til å vokse ved pH mellom 4.3-9.6 og ved saltkonsentrasjoner opp til 20 % (67,68).

1.4.1 Biofilm

Biofilm er et samfunn av bakterier som er godt forankret til en overflate, og består av bakterieceller som vokser i en egenprodusert matriks (69). Matriksen kalles også ekstracellulær polymerisk substans (EPS) og består av proteiner, polysakkarider og ekstracellulært DNA (67,70). Det er en fordel for bakterier å kunne produsere og vokse i biofilm, da cellene blir mer beskyttet mot miljøet rundt (69). Dette gjør at bakteriene som lever i biofilmen også er mer tolerante mot antimikrobielle stoffer da det er høy celletetthet, flere resistente mutanter,

akkumulering av antibiotikanedbrytende enzymer, og persistente celler (71). Biofilm er en stor utfordring i mat- og helseindustrien da det er en potensiell smittekilde som er vanskelig å bli kvitt.

L. monocytogenes kan danne biofilm på overflater som benyttes i matproduksjon og emballasje, som plastikk og rustfritt stål (68). Biofilmdannelsen hos *L. monocytogenes* avhenger av flere faktorer som bakteriestamme, temperatur, vekstmedium, inkuberingstid og overflatemateriale (67). Det er vist at biofilm fra *L. monocytogenes* tolererer vanlige vaske- og desinfeksjonsprosedyrer som brukes i matindustrien, og det kreves høyere konsentrasjoner av vaske- og desinfeksjonsmidler samt lengre behandlingstid enn produsentene oppgir for å utrydde biofilmen (70,72). Andre studier har vist at bakteriociner har god aktivitet mot biofilm fra *L. monocytogenes*, og bakteriociner kan derfor være et effektivt og trygt alternativ for å utrydde biofilm i mat- og helseindustrien (73).

1.4.2 Forekomst og utbrudd

L. monocytogenes er som nevnt en robust bakterie som overlever under stressende forhold, og bakterien finnes de fleste steder i naturen. Blant annet er *L. monocytogenes* isolert fra jord, vann, kloakk, fôr, planter, dyr og mennesker (68). I tillegg er bakterien isolert fra mange ulike matvarer som røkt fisk, grønnsaker, upasteuriserte meieriprodukt, og andre spiseklare produkter som ikke krever oppvarming eller tilberedning (68). Ifølge EUs kriterier for matsikkerhet kan spiseklare produkter som ikke støtter vekst av *L. monocytogenes* inneholde ≤ 100 CFU/g ved produksjon, og for spiseklare produkter som støtter vekst kan produktet ikke overstige 100 CFU/g i løpet av holdbarhetstiden (66).

Det har vært flere utbrudd av listeriose både i Norge og i utlandet som har resultert i sykehusinnleggelser og dødsfall. Ifølge Folkehelseinstituttet (FHI) var det hittil største registrerte utbruddet i Norge i 2007, hvor 21 personer ble diagnostisert med sykdommen og 5 av disse døde. Utbruddet skyldtes mykost som blant annet hadde blitt solgt til sykehus, og forårsaket at 19 personer ved Oslo universitetssykehus ble smittet (74). FHI melder om at det siste norske utbruddet av listeriose var i 2022 hvor fire personer ble smittet og innlagt på sykehus, og smitten kom trolig fra røkt laks (74).

1.4.3 Sykdom og behandling av listeriose

Listeriose er en sjelden, men alvorlig sykdom, og ifølge WHO er dødsraten på hele 20-30 % blant risikogruppene (75). Gruppene som er mest utsatt for sykdommen er gravide kvinner, nyfødte, eldre, og personer med nedsatt immunforsvar, men friske mennesker kan også bli syke. For risikogruppene kan listeriose være svært alvorlig og føre til hjernehinnebetennelse og sepsis, mens friske individer hovedsakelig rammes av en mildere form av sykdommen som gir febril gastroenteritt (68). Dersom gravide kvinner smittes av *L. monocytogenes* kan dette føre til spontanabort, dødfødsel eller alvorlig sykdom hos det nyfødte barnet (68).

Listeriose behandles med antibiotika, som regel penicillin eller ampicillin, men andre antibiotika benyttes også i kombinasjon med disse eller alene (68). Det er isolert antibiotikaresistente og multiresistente stammer av *L. monocytogenes* fra miljøet, matvarer og kliniske pasientprøver, og i flere tilfeller er disse resistente mot antibiotika som i dag brukes til å behandle sykdommen (68,76). På grunn av de alvorlige konsekvensene *L. monocytogenes* kan gi ved smitte er det ønskelig å forhindre at bakterien havner i næringsmiddelindustrien og potensielt smitter forbrukere. Tidligere studier har vist at nisin, særlig i kombinasjon med andre tilsetninger eller antimikrobielle stoffer, reduserer vekst av *L. monocytogenes* som er tilsatt i rå- eller røkt laks (77,78). Det er av interesse å undersøke flere mulige preventive behandlinger av matvarer som er særlig utsatte smittebærere av *L. monocytogenes*, hvor behandling med bakteriociner er av stor relevans.

1.5 Mål med oppgaven

Målet med denne oppgaven var å identifisere, isolere og karakterisere et ukjent antimikrobielt stoff produsert av *Bacillus velezensis* B2002, en stamme isolert fra fermentert pasjonsfrukt. Denne stammen var vist å produsere et stoff med ekstremt god aktivitet mot *Listeria innocua*. Siden stoffet var ukjent, ble oppgaven delt inn i følgende delmål:

- Identifikasjon og isolering av stoffet ved bruk av helgenomsekvensering, rensing og massespektrometri
- Videre karakterisering av stoffets egenskaper med hensyn på immunitet, inhiberingsspekter, stabilitet, virkemåte, og med et spesielt fokus på aktivitet mot *Listeria*

Dette arbeidet har som mål om å bidra til økt forståelse av bakteriociner og deres potensial som konserveringsmiddel og alternativ eller supplement til dagens antibiotika.

2 Material og metode

2.1 Bakteriestammer

Den bakteriocinproduserende stammen *Bacillus velezensis* B2002 ble oppdaget og isolert som del av et laboratoriekurs i molekylærbiologi ved NMBU (BIO211, 2022). Stammen ble isolert fra en prøve med fermentert pasjonsfrukt (fermentert utendørs i 14 dager; 5-20 °C) som ble undersøkt for bakteriocin-produserende stammer som kunne hemme *Listeria innocua*. En koloni med stor og tydelig inhiberingssone ble plukket, rendyrket og kultivert i BHI (Brain Heart Infusion; Oxoid).

Både *B. velezensis* B2002 og alle andre stammer som ble brukt i denne masteroppgaven ble lagret ved -80 °C i vekstmedium tilsatt 15 % glyserol. En oversikt over stammer brukt i arbeidet er vist i Tabell 2.1.1

Tabell 2.1.1 Stammer benyttet i arbeidet med eventuell karakteristik og seleksjon^R.

Stamme	Karakteristikk	Referanse ^a
<i>Bacillus velezensis</i> B2002		LMG
<i>Escherichia coli</i> GeneHogs®		Invitrogen
<i>Lactococcus lactis</i> IL1403		LMG
<i>L. lactis</i> B204	pNZ8037, Klo ^R	LMG
<i>L. lactis</i> B200	pNZ9530, Ery ^R	LMG
<i>L. lactis</i> pNZ	pNZ9530, pNZ8037, Klo ^R , Ery ^R	Dette studiet
<i>L. lactis</i> acnDEI	pNZ9530, pNZ8037- <i>acnDEI</i> , Klo ^R , Ery ^R	Dette studiet
<i>L. lactis</i> acnDE	pNZ9530, pNZ8037- <i>acnDE</i> , Klo ^R , Ery ^R	Dette studiet
<i>Listeria innocua</i> LMG 2785		LMG
<i>L. monocytogenes</i> EGDe	pNZ44-pHluorin2, Klo ^R	(79)
<i>L. monocytogenes</i> Xen32	Bioluminscerende (<i>lux</i>)	PerkinElmer

Klo; kloramfenikol, Ery; erytromysin

^aLaboratoriet for Mikrobiell Genteknologi (LMG), Norges miljø- og biovitenskapelige universitet, Norge

Alle *Lactococcus* ble kultivert i GM17 (M17 supplert med 0.4 % glukose; Oxoid) ved 30 °C. *Bacillus* og *Listeria* ble kultivert i BHI ved 37 °C, henholdsvis med og uten risting. *E. coli* ble kultivert i LB (Luria-Bertani; Oxoid) ved 37 °C og risting.

2.2 Helgenomsekvensering og analyse

Genomisk DNA ble isolert fra overnattekultur av *B. velezensis* B2002 ved bruk av GenElute™ Bacterial Genomic DNA kit (Sigma-Aldrich) i henhold til protokoll fra produsenten. Isolert DNA ble lagret på -20 °C inntil bruk.

For å finne potensielle genkluster tilhørende bakteriociner ble genomisk DNA fra *B. velezensis* B2002 helgenomsekvensert (Novogene). Data fra helgenomsekvenseringen ble behandlet som beskrevet av Ovchinnikov et al. (2022) (80). Potensielle bakteriocinkluster ble funnet ved bruk av databasene antiSMASH og BAGEL4.

2.3 Optimalisering av bakteriocinproduksjon fra *B. velezensis* B2002

For å finne optimal bakteriocinproduksjon fra *B. velezensis* B2002 ble ulike vekstforhold undersøkt. Fra overnattekultur av *B. velezensis* B2002 ble 1 µl overført til 50 ml BHI-medium som ble inkubert på 37 °C med risting (180 rpm). Påfølgende dag ble cellene høstet, vasket én gang i 25 ml kald steril 0.9 % NaCl og resuspendert til en OD_{600nm} ~ 1 (sentrifugering ved 10,000 g, 4 °C, 15 min). Cellesuspensjonen ble deretter fortynnet 100-ganger i 16 ulike Erlenmeyerkolber med MRS- (deMan Rogosa Sharpe; Oxoid), BHI-, GM17-, og LB medium til 250 ml i fire kolber per medium. En flaske av hvert medium ble inkubert ved fire ulike forhold: 37 °C med og uten risting, og 30 °C med og uten risting. Prøver ble tatt ut etter 6, 12, 18, 24 og 48 timer, og celler ble fjernet med sentrifugering (maks g, 5 min) og varmebehandling av supernatant ved 95 °C i 5 min. Antimikrobiell aktivitet ble analysert med en seriefortynningsteknikk og uttrykt i Bakteriocin enheter (BU; Bacteriocin Units) som beskrevet under (80).

2.3.1 Bestemmelse av bakteriocinaktivitet

En seriefortynning av hver prøve ble forberedt i BHI i 96-brønns plater, deretter tilsatt 50-ganger fortynnet overnattekultur av *L. innocua* LMGT 2785 til et volum på 200 µl. Vekst ble målt som OD₆₀₀ med SPECTROstar Nano (BMG LABTECH) etter 5 timer på 37 °C. En bakteriocinenhet (BU) ble definert som den mengden antimikrobielt stoff som hemmet indikatorstammen *L. innocua* LMGT 2785 med 50 % eller mer sammenlignet med en positiv kontroll uten noe hemmende tilsatt. Brønnsen med høyest fortynningsgrad som fortsatt hemmet

vekst med 50 % eller mer ble derfor definert til å inneholde 1 BU (bakteriocin-enhet) eller 5 BU/ml. Mengden bakteriocinaktivitet (BU/ml) i original løsning er da 5 BU/ml multiplisert med total fortynningsgrad i brønnen.

2.4 Rensing av bakteriocin

Rensing av bakteriocin fra *B. velezensis* B2002 ble utført ved bruk av revers-fase kromatografi (RPC) av supernatant fra overnattkultur av bakterien. Kulturrør med 10 ml BHI-medium ble inokulert med en enkeltkoloni av *B. velezensis* B2002 som ble inkubert i 24 timer ved 37 °C med risting. Deretter ble 5 ml av kulturen overført til en Erlenmeyerkolbe med 0.5 L BHI som ble inkubert ved 37 °C og risting i 24 timer. Celler ble fjernet ved sentrifugering (10,000 g, 4 °C, 30 min) og supernatant ble benyttet direkte til RPC.

RPC ble utført med en Resource RPC kolonne (Cytiva; 1 ml) tilkoblet et ÄKTA Purifier system (Amersham Pharmacia Biotech). Kolonnen ble først ekvilibrert med 50 kolonne-volumer (CV) 0.1 % trifluoreddiksyre (TFA), og deretter ble 100 ml av prøven (supernatanten fra *B. velezensis* B2002) applisert på kolonnen ved 3-5 ml/min. Prøven ble så eluert fra kolonnen med en lineær gradient fra 0-100 % 2-propanol tilsatt 0.1 % TFA over 30 fraksjoner med 1 ml per fraksjon.

Antimikrobiell aktivitet i fraksjonene ble funnet ved en spot-on-lawn metode. En 50-ganger fortynnet overnattkultur av *L. innocua* LMG 2785 ble støpt inn i BHI soft-agar (0.8 % agarose) på skål. Deretter ble 3 µl av hver fraksjon applisert på agaren. Etter tørking ble skålen inkubert over natt ved 37 °C og eventuelle hemmingssoner ble observert. Aktiviteten til fraksjoner som gav hemmingsone ble så kvantifisert ved bruk av seriefortynning i 96-brønnsplate som beskrevet i 2.3.1, med unntak av at *L. lactis* IL1403 ble brukt som indikator og vekst ble målt etter 5 timer på 30 °C i GM17.

2.4.1 MALDI-TOF MS av RPC fraksjoner

For å finne massen til det rensede bakteriocinet ble MALDI-TOF MS utført på alle RPC-fraksjonene. MALDI matrixløsningen og kalibreringspeptid ble tillaget som beskrevet av Ovchinnikov et al. (2022) (80). Fra hver RPC fraksjon ble 0.6 µl blandet med 0.6 µl matrixløsning og spottet på målplaten (Bruker MTP 384 ground steel target plate; Bruker Daltonics) ved å pipettere opp og ned 3-4 ganger. Tilsvarende volum kalibreringspeptid og

matrixløsning ble blandet og avsatt på platen. MALDI-TOF MS ble utført ved bruk av ultrafleXtreme MADLI-TOF/TOF (Bruker Daltonics).

2.5 Inhiberingsspekter amylocyclicin

Amylocyclicins inhiberingsspekter ble undersøkt for alle stammer i LMGs indikatorkolleksjon (se Vedlegg 1). Inhiberingsspekter ble funnet ved å benytte en spot-on-lawn metode som beskrevet i 2.4. De ulike indikatorstammene ble støpt inn i BHI-softagar på skåler. Deretter ble 5 µl av mest aktive RPC fraksjon med ulike konsentrasjoner; ufortynnet, 10 x fortennet og 100 x fortennet, applisert på skålene. Da RPC-fraksjonen med amylocyclicin inneholdt 2-propanol ble 5 µl negativ kontroll (50 % 2-propanol tilsatt 0.1 % TFA) også applisert på skålene. Skålene ble inkubert på 30 °C over natten, og eventuelle inhiberingssoner ble observert neste dag.

2.6 Kloning og karakterisering av immunitetsgener

Alle primere benyttet i dette i arbeidet er vist i Tabell 2.6.1.

Tabell 2.6.1 Primere benyttet i dette arbeidet.

Navn	Sekvens 5'-3'
pNZ8037_fwd	ATATTTTCGGCAATCTTCTCAATG
pNZ8037_rev	TCCATGTGCAGTACCCATG
pNZ8037_test_F	CGCGAGCATAATAAACGGC
pNZ8037_test_R	ACGCCTGTTTTAACGATTATGC
acn_DEI_fwd	CCATGGGTACTGCACATGGAAATCATATGGCGGAAAG
acn_DEI_rev	GAGAAGATTGCCGAAAATATTCTATTTTCAACGGCGAC
acn_DE_rev	GAGAAGATTGCCGAAAATATCTCATATGATTTCTGCC

2.6.1 Isolering av plasmid

Plasmidet pNZ8037 ble isolert fra overnatkultur av *L. lactis* B204 ved bruk av E.Z.N.A.® Plasmid DNA Mini Kit I (Omega Bio-Tek) i henhold til protokoll fra produsenten, med det unntak at løsning I ble tilsatt lysozym til 20 mg/ml og inkubert på 37 °C med risting (1400 rpm) i 30 minutter. Isolert plasmid ble lagret på -20 °C inntil bruk.

2.6.2 Polymerase chain reaction (PCR)

PCR ble benyttet til å amplifisere gensekvensene *acnDEI* og *acnDE* og til linearisering av plasmidet pNZ8037. For hver PCR ble Q5® High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs) benyttet, og 50 µl reaksjonsmikser ble satt opp i henhold til protokoll fra produsenten. Genomisk DNA fra *B. velezensis* B2002 ble benyttet som templat (40 ng) for *acnDEI* og *acnDE*, og isolert plasmid (300 ng) ble benyttet som templat for pNZ8037. Primerparene *acn_DEI_fwd* og *acn_DEI_rev*, *acn_DEI_fwd* og *acn_DE_rev*, og *pNZ8037_fwd* og *pNZ8037_rev* ble brukt for henholdsvis *acnDEI*, *acnDE* og pNZ8037 (se Tabell 2.6.1).

PCR av *acnDEI* og *acnDE* ble utført med følgende innstillinger; 98 °C i 30 sek, etterfulgt av 35 sykluser med 98 °C i 10 sek, 57 °C i 15 sek, 72 °C i 50 sek, og til slutt 72 °C i 5 min. PCR av pNZ8037 ble utført med følgende innstillinger: 98 °C i 30 sek, etterfulgt av 35 sykluser med 98 °C i 10 sek, 53 °C i 15 sek, 72 °C i 2 min x, og til slutt 72 °C i 5 min. PCR-produktene ble rensset ved bruk av NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Machery-Nagel), i henhold til protokoll fra produsenten. Konsentrasjon av PCR-produktene ble verifisert med NanoDrop 2000 Spectrophotometer (Thermo Fischer Scientific).

2.6.3 Gibson assembly® av *acnDE* og *acnDEI* inn i pNZ8037

For å klonere *acnDEI* og *acnDE* inn i pNZ8037 ble to separate Gibson Assembly® utført, henholdsvis for *acnDEI* og *acnDE*. Gibson Assembly ble utført ved bruk av GeneArt™ Gibson Assembly® HiFi Master Mix (Thermo Fischer Scientific), og reaksjonsmikser på 20 µl ble satt opp i henhold til protokoll fra produsenten. Reaksjonsmikser ble satt opp med 1:1 ratio vektor:innskudd, og inneholdt 0.08 picomol av pNZ8037 og *acnDE(I)* og 10 µl Gibson Assembly HiFi Master Mix. Reaksjonsmikserne ble inkubert på 50 °C i 15 minutter før de ble satt på is og benyttet videre til kjemisk transformasjon.

2.6.4 Kjemisk transformasjon av *E. coli* GeneHogs®

Kjemisk kompetente *E. coli* GeneHogs® celler ble transformert med reaksjonsmikserne fra Gibson Assembly for å ta opp pNZ8037-*acnDEI* og pNZ8037-*acnDE*. Kompetente celler ble tint på is før 3 µl kald gibsonmiks ble tilsatt. Deretter ble cellene varmesjokket på 42 °C i 30 sekunder, før de ble inkubert på is i 5 minutter. Cellene ble så tilsatt 450 µl romtemperert S.O.C. (Super Optimal broth with Catabolite repression; 20 g/L trypton, 0.5 g/L NaCl, 5 g/L

gjærekstrakt, 2.5 mM KCl, 10 mM MgSO₄, 10 mM MgCl₂, 20 mM glukose) og inkubert i 60 minutter ved 37 °C og risting. Transformasjonene (100 µl) ble spredd på LB-agarskåler med 12.5 µg/ml kloramfenikol som ble inkubert på 37 °C til synlige kolonier oppsto (1-2 dager).

For å bekrefte at *acn*-genene var vellykket klonet inn i pNZ8037 ble det utført koloni-PCR av transformantkoloniene. For koloni-PCR ble Q5® High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs) benyttet, og 25 µl reaksjonsmikser ble satt opp i PCR-strips henhold til protokoll fra produsenten. Primerene pNZ8037_test_F og pNZ8037_test_R ble benyttet i reaksjonen (Tabell 2.6.1). Transformantkoloniene ble benyttet som templat i PCR ved å avsette en koloni i reaksjonsmiksen og deretter i 5 ml LB tilsatt 12.5 µg/ml kloramfenikol. Kulturene ble inkubert ved 37 °C og risting over natten. Koloni-PCR ble utført ved følgende program: 94 °C i 2 min, etterfulgt av 35 sykluser med 98 °C i 10 sek, 64 °C i 15 sek, 72 °C i 55 sek, og til slutt 72 °C i 5 min.

2.6.5 Elektroporering av *L. lactis* B200

Fra overnattekkulturer av *E. coli* transformantene (fra 2.6.4) ble plasmidene pNZ8037-*acnDEI* og pNZ8037-*acnDE* isolert ved bruk av E.Z.N.A.® Plasmid DNA Mini Kit I (Omega Bio-Tek) i henhold til protokoll fra produsenten. Elektrokompente *L. lactis* B200 ble deretter transformert med plasmidene. Transformasjoner ble utført ved elektroporering som beskrevet av Holo og Nes (1989) med noen endringer (81). Det ble tilsatt 5 µl rensed plasmid til 40 µl elektrokompente *L. lactis* B200 celler holdt på is. Totalt volum ble deretter overført til en nedkjølt 2 mm elektroporeringskyvette. Kyvetten ble gitt en elektrisk puls på ved bruk av en Gene-Pulser (Bio-Rad Laboratories) satt på 2 kV og 25 µF, med motstand på 200 Ω (Pulse Controller; Bio-Rad Laboratories). Deretter ble 960 µl nedkjølt SGM17MC (GM17 med 0.5 M sukrose, 20 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂) tilsatt. Cellene ble inkubert på is i 5 minutter før de ble inkubert ved 30 °C i 2 timer. Cellene (100 µl) ble spredd på GM17-agarskåler med 5 µg/ml erytromycin og 5 µg/ml kloramfenikol. Skåler ble så inkubert på 30 °C til synlige kolonier oppsto (2-3 dager). Koloni-PCR ble utført som beskrevet i 2.6.4 med unntak av at koloniene ble kultivert i GM17 med 5 µg/ml erytromycin og 5 µg/ml kloramfenikol ved 30 °C.

2.6.6 Immunitet mot amylocyclicin for *L. lactis* acnDEI og *L. lactis* acnDE

For å undersøke om *L. lactis* acnDEI og *L. lactis* acnDE hadde endret sensitivitet mot amylocyclicin ble det benyttet en seriefortynningsteknikk beskrevet i 2.3.1, med noen endringer. I en 96-brønn mikrotiterplate ble amylocyclicin seriefortynnet i GM17 tilsatt 5 µg/ml erytromycin, 5 µg/ml kloramfenikol og 5 ng/ml nisin A. Fortynningene ble tilsatt 50-ganger fortynnet overnattkultur av enten *L. lactis* acnDEI, *L. lactis* acnDE eller *L. lactis* pNZ. Vekst ble målt som OD₆₀₀ etter 5 timer inkubering ved 30 °C.

2.7 Karakterisering av fysiokjemiske egenskaper og poredannelse

2.7.1 Proteasesensitivitet

Det ble undersøkt om amylocyclicin var proteasesensitiv ved bruk av proteinase K (80). Overnattkultur (100 µl) av *L. innocua* LMGT 2785 ble støpt inn i BHI soft-agar på skål. Supernatant fra overnattkultur av *B. velezensis* B2002 ble sterilfiltrert (0.2 µm) og varmebehandlet (95 °C, 5 min). Supernatanten (3 µl) ble så applisert på agarskålen. I tillegg ble 3 µl av den mest aktive RPC-fraksjonen (fra 2.4) applisert på skålen. Ved siden av dråpene ble 2 µl proteinase K (20 mg/ml) tilsatt, og skålen ble inkubert på 37 °C til inhiberingssoner ble observert.

2.7.2 Varmestabilitet

Supernatant fra *B. velezensis* B2002 ble fordelt i to rør (0.5 ml) hvor ett rør ble varmebehandlet (100 °C, 5 min). Sammenligning av antimikrobiell aktivitet fra varmet og ubehandlet prøve ble utført med en seriefortynningsteknikk beskrevet i 2.3.1 med *L. innocua* LMGT 2785 som indikator.

2.7.3 pH-stabilitet

Amylocyclicins antimikrobielle stabilitet ved pH endringer ble undersøkt ved å utsette bakteriocinet for ulike pH-verdier. Amylocyclicin (102 400 BU/ml) ble fordelt på tre rør (300 µl) som ble tørket på 50 °C i 5 timer ved bruk av SpeedVac SPD2010 (Thermo Fischer Scientific) for å fjerne rester av 2-propanol/TFA. Tørket bakteriocin ble så resuspendert i 100 µl buffer med pH 2, 7 eller 10 (Buffer solutions; VWR). I tillegg ble 3 rør med 100 µl nisin A

(1 mg/ml) tilsatt 100 µl med tilsvarende buffere. Rørene ble inkubert på 37 °C og prøver på 20 µl ble tatt etter 1, 5, og 10 timer. Antimikrobiell aktivitet fra prøvene ble undersøkt med en seriefortynningsteknikk beskrevet i 2.3.1 med *L. innocua* LMGT 2785 som indikator.

2.7.4 Analyse av poredannelse ved bruk av propidiumjodid

Amylocyclicin (102 400 BU/ml), micrococcin P1 (1 mg/ml) og nisin A (1 mg/ml) ble seriefortynnet i PBS (Phosphate Buffered Saline; 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₂) med 40 µM propidiumjodid i hver sin rad i en sort 96-brønn mikrotiterplate. Overnattekultur (50 ml) av *L. lactis* ble vasket med PBS og cellene ble resuspendert til OD₆₀₀ ~ 1. Deretter ble 100 µl celleduspensjon tilsatt alle brønner på mikrotiterplaten, og fluorescenseemisjon ved 630/40 nm (eksitering ved 535/20 nm) ble målt over 3 timer ved bruk av Hidex Sense plateleser (Hidex).

2.7.5 Analyse av poredannelse ved bruk av pHluorin biosensor

Poredannelse fra amylocyclicin ble også analysert ved bruk av biosensorbakterier som uttrykker det pH-sensitive proteinet pHluorin2. Analysen ble utført som beskrevet av Crauwels et al. (2018), med noen endringer (79). Overnattekultur (5 ml) av *L. monocytogenes*/pNZ-pHin2^{Lm} ble sentrifugert (4500 g, 10 min) og cellene ble vasket 2 ganger med henholdsvis 5 ml PBS og LMB (Listerial Minimal Buffer; 100 mM MOPS, 4.82 mM KH₂PO₄, 11.55 mM Na₂HPO₄, 1.7 mM MgSO₄, 0.6 mg/ml (NH₄)₂SO₄, 55 mM glukose) til OD₆₀₀ ~ 3. Til en sort 96-brønn mikrotiterplate ble amylocyclicin (12 800 BU/ml), micrococcin P1 og nisin A tilsatt. Bakteriocinene ble seriefortynnet i LMB, før 100 µl av LMB-celleduspensjonen ble tilsatt fortynningene. Platen ble inkubert i mørket i 30 minutter før fluorescenseemisjon ved 510/17 nm (eksitering ved 400/20 nm og 470/20 nm) ble målt med SynergyTM H4 plateleser (BioTek).

2.8 Effekt av amylocyclicin mot *L. monocytogenes* biofilm

2.8.1 Biofilmdannelse fra *L. monocytogenes*

Evnen til å danne biofilm ble estimert som beskrevet av Kranjec et al. (2020) (14). Det ble tillaget overnattekulturer av ti *L. monocytogenes* stammer fra indikatorkolleksjonen i Vedlegg 1. Biofilm ble dyrket i 96-brønn mikrotiterplater, hvor 10 µl overnattekultur ble inokulert i 90 µl både BHI og TSB-G (Tryptic Soy Broth med 1% glukose; Oxoid). I tillegg ble to kolonner

benyttet til negativ kontroll med kun 100 µl vekstmedium. Platene ble inkubert i 24 timer på 37 °C, før planktoniske celler ble fjernet ved å vaske med 100 µl 0.9 % NaCl. Deretter ble 150 µl 0.4 % krystallfiolett (Sigma-Aldrich) tilsatt alle brønner, etterfulgt av 15 minutter inkubering før overflødig krystallfiolett ble fjernet. Brønnene ble så vasket tre ganger med 200 µl 0.9 % NaCl for å fjerne ubundet fargestoff. Etter siste vask ble brønnene inkubert i 10 minutter med 100 µl etanol for å ekstrahere bundet krystallfiolett, og totalt innhold ble overført til en ny 96-brønn mikrotiterplate. Dette steget ble gjentatt to ganger. Relativ indikasjon på mengden biofilm ble målt som OD₆₀₀ ved bruk av SPECTROstar Nano plateleser.

2.8.2 Biofilm-orientert antimikrobiell test (BOAT)

BOAT analysen ble utført som beskrevet av Kranjec et al. (2020) (14). Biofilm fra *L. monocytogenes* LMG 3744 ble dyrket i 24 timer som beskrevet i 2.8.1, før biofilmen ble vasket 2 ganger med 0.9 % NaCl. Amylocyclicin (25 600 BU/ml) ble seriefortynnet i BHI i en 96-brønn mikrotiterplate, og fortynningene (150 µl) ble overført til platen med biofilm som ble inkubert i 24 timer ved 37 °C. Amylocyclicin ble så fjernet, og biofilmen ble vasket 3 ganger med 0.9 % NaCl. Videre ble det tilsatt 100 µl BHI med 0.025 % trifenyl-tetrazoliumklorid (TTC, Sigma-Aldrich) i alle brønner før platen ble inkubert i 1 time ved 37 °C. Det ble tatt bilder av platen for visualisering av fargeendring, hvor TTC ble omdannet til rød formazan dersom cellene i brønnen var metabolsk aktive. TTC ble deretter fjernet fra brønnene og det ble tilsatt 200 µl etanol:acetone (70:30) for å ekstrahere fargestoffet. Det ble deretter overført 100 µl fra brønnene til en ny 96-brønn mikrotiterplate, og mengde farge i brønnene ble målt ved OD₄₉₂ med en SPECTROstar Nano plateleser.

2.8.3 Bakteriell viabilitet etter BOAT

BOAT ble gjennomført som beskrevet i 2.8.2, fram til steget før TTC tilsettes. Cellene i brønnen med lavest konsentrasjon amylocyclicin som ikke dannet formazan ved BOAT, ble resuspendert i 100 µl BHI og seriefortynnet. Fortynningene ble spredd på BHI agarskåler, og inkubert i 24 timer ved 37 °C. Kolonidannende enheter (CFU) i biofilmen ble beregnet ved å telle synlige kolonier, som representerte levedyktigheten til celler i biofilmen etter behandling med amylocyclicin (BOAT).

2.8.4 Konfokal laserskanningsmikroskopi

Biofilm ble dyrket i 8-brønns dekkglass med lokk (Chambered Coverglass; Thermo Fischer Scientific), hvor det ble tilsatt 30 μ l overnattkultur av *L. monocytogenes* LMGT 3744 til 270 μ l BHI. Dekkglasset ble inkubert i 24 timer ved 37 °C, før biofilmene ble vasket to ganger med 0.9 % NaCl buffer. Det ble tillaget seriefortynninger av amylocyclicin og kontroll med tilsvarende konsentrasjoner benyttet i BOAT, og 300 μ l av seriefortynninger ble tilsatt biofilmene. Dekkglasset ble så inkubert på nytt i 24 timer ved 37 °C før biofilmene ble vasket tre ganger med 0.9 % NaCl. Biofilmene ble deretter farget med SYTO® 9 og propidiumjodid fra FilmTracer™ LIVE/DEAD® Biofilm Viability kit (Molecular Probes, Thermo Fischer Scientific) i henhold til protokoll fra produsenten. Fluorescensbilder (z-stack) ble tatt med et EC Plan-Neofluoar 100x/1.3 olje-objektiv på et LSM 700 konfokalmikroskop med tilhørende Zeiss Axio Observer Z1 invertert mikroskop (Zeiss, Tyskland). Argon laser (488 nm) ble brukt for å eksitere SYTO9 og propidiumjodid, og emisjon ble målt ved 300-600 nm (SYTO9) og 600-800 nm (propidiumjodid).

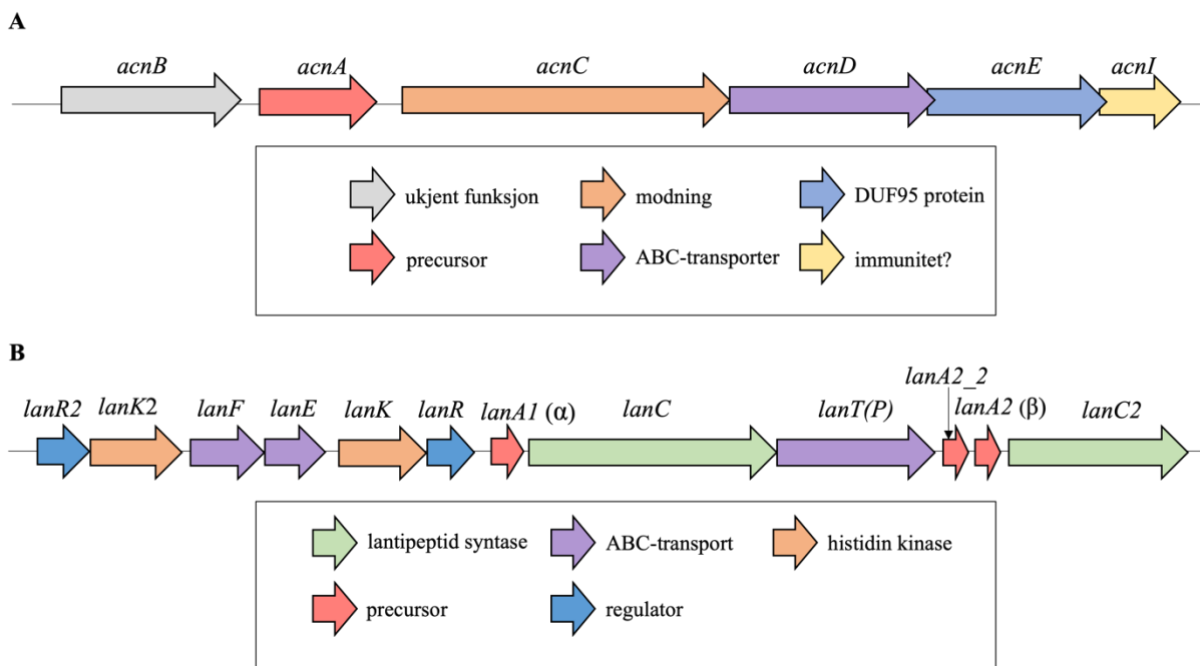
2.9 Effekt av amylocyclicin mot *L. monocytogenes* på røkt laks

Amylocyclicin (1 ml) tørket ved bruk av SpeedVac SPD2010 (Thermo Fischer Scientific) i 5 timer på 50 °C for å fjerne 2-propanol og TFA, og den tørkede pelleten ble resuspendert i 1ml 0.9 % NaCl. Fersk skivet røkt laks (Fiskeriet) ble kuttet i like store biter på 0.5-0.6 gram, og fiskebitene ble deretter utsatt for to ulike behandlinger. Ved behandling 1 ble 20 μ l fortynnet overnattkultur av *L. monocytogenes* Xen32 (4×10^7 CFU/ml) spredd på fiskens overflate med en steril cellespreder, og prøven ble inkubert i 15 minutter ved romtemperatur før 100 μ l av amylocyclicinløsningen (51 200 BU/ml) ble spredd på overflaten. Ved behandling 2 ble fiskebitene dyppet i amylocyclicinløsningen (51 200 BU/ml) og inkubert i 15 minutter ved romtemperatur. Deretter ble 20 μ l fortynnet overnattkultur av *L. monocytogenes* Xen32 (4×10^7 CFU/ml) spredd på fiskens overflate. For hver behandling ble det laget tre paralleller. Det ble i tillegg laget kontroller; positiv kontroll med kun 20 μ l *L. monocytogenes* Xen32 spredd på overflaten, og negativ kontroll uten hverken bakteriocin eller bakterie. Alle fiskebitene ble lagt i separate 35 mm petriskåler og inkubert ved 30 °C. Det ble tatt bilder av fiskebitene ved dag 0, 1, 2, 5 og 7 hvor bioluminescenssignal ble målt av IVIS Lumina II (Perkin Elmer) med 2 minutter eksponeringstid. Luminescenssignalet ble kvantifisert med programvaren Livin Image (Perkin Elmer) og ble uttrykt som fotoner/sekund/cm²/steradian.

3 Resultat

3.1 Helgenomsekvensering og analyse av *B. velezensis* B2002

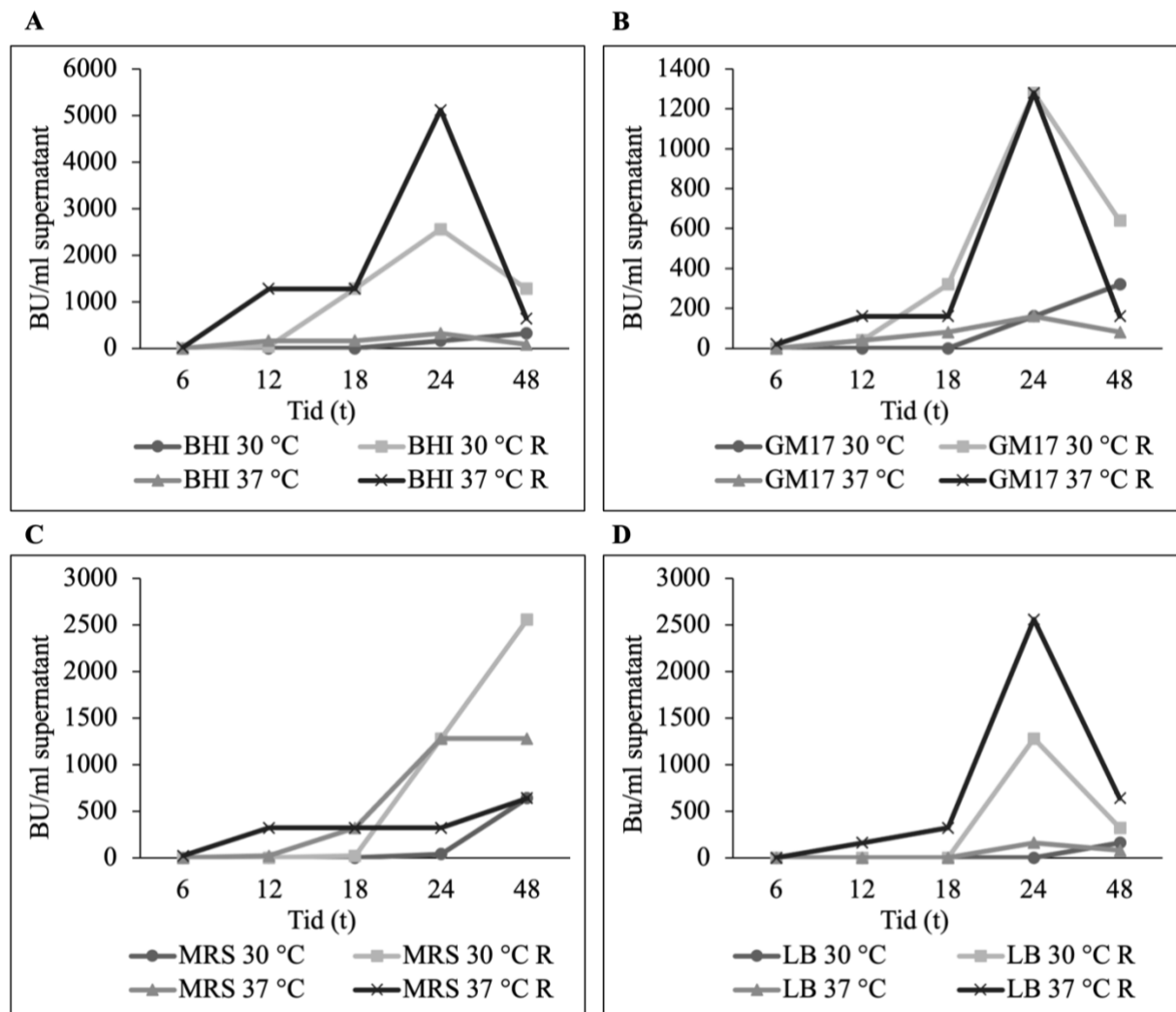
For å identifisere gener som kunne forklare hemmingssonen til *B. velezensis* B2002 mot *Listeria innocua* ble stammen helgenomsekvensert og genomet analysert med programvarene antiSMASH og BAGEL4 for å finne potensielle bakteriocinklustere. Genomet ble predikert til å inneholde to separate bakteriocinklustere, et som kodet for et ukjent lantipeptid og et som kodet for det sirkulære bakteriocinet amylocyclicin (Figur 3.1.1). I klusteret for det ukjente lantipeptidet ble to unike bakteriocingener predikert (*lanA1*, og *lanA2*), som indikerte at det kunne være et to-peptid lantibiotikum. Molekylmasser for lantipeptidene ble predikert i antiSMASH til å være mellom 3.4-3.5 kDa. Predikerte funksjoner for genene i det ukjente lantipeptidet ble funnet ved BLAST-søk av gensekvensene mot UniProt, mens gener i amylocyclicinclusteret ble sammenlignet med karakteriserte gener fra Scholz et al. (2014) (49).



Figur 3.1.1 Predikerte bakteriocinklustere i *B. velezensis* B2002 fra antiSMASH og BAGEL4. (A) viser genkluster tilhørende det sirkulære bakteriocinet amylocyclicin. Predikerte funksjoner fra genprodukt er funnet ved å sammenligne gener med karakterisert kluster (49). (B) viser genkluster tilhørende et ukjent lantipeptid med 3 predikerte precursorpeptid; *lanA1*, *lanA2* og *lanA2_2*, hvor det kun er én aminosyre forskjell mellom moden sekvens av *lanA2* og *lanA2_2* (precursor uten ledersekvens). Predikerte funksjoner fra genprodukt ble hentet fra BLAST-søk mot proteindatabasen UniProt.

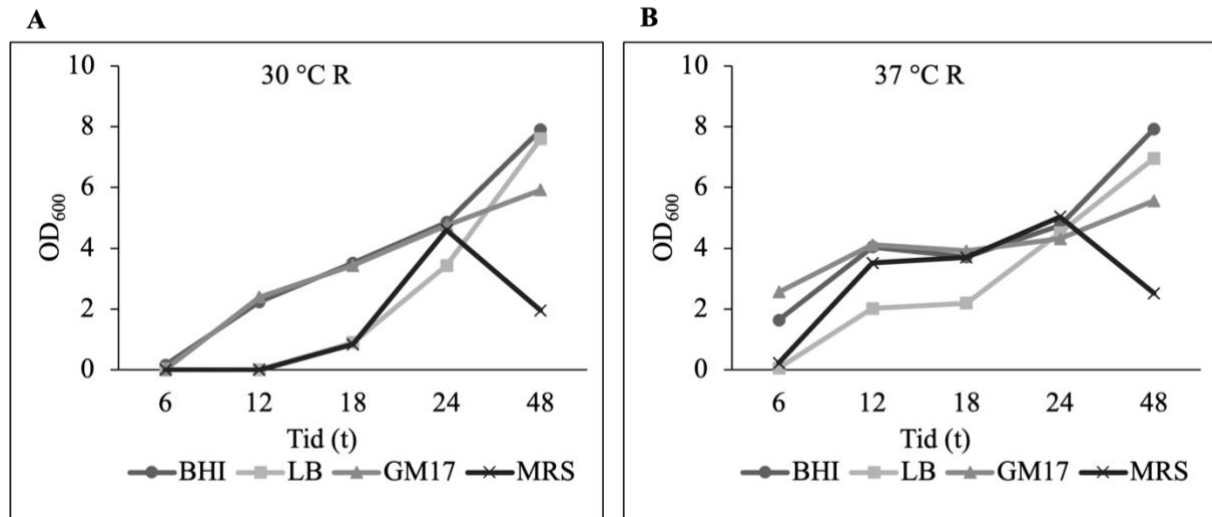
3.2 Optimalisering av bakteriocinproduksjon fra *B. velezensis* B2002

Før videre karakterisering, isolering og rensing av den antimikrobielle aktiviteten fra *B. velezensis* B2002, ble det testet ut ulike vekstforhold for å øke mengden av det antimikrobielle stoffet produsert av stammen. Stammen ble dyrket i fire ulike vekstmedier: BHI, GM17, MRS og LB ved temperatuene 30 °C og 37 °C med og uten risting. Supernatant fra vekstkulturene ble hentet etter 6, 12, 18, 24 og 48 timer inkubering og den antimikrobielle aktiviteten i supernatanten mot *L. innocua* LMG 2785 ble undersøkt (Figur 3.2.1). Den antimikrobielle aktiviteten var størst etter 24 timer vekst i BHI ved 37°C og risting, med en aktivitet på 5120 BU/ml i kulturen (supernatanten).



Figur 3.2.1 Antimikrobiell aktivitet (BU/ml) i supernatant fra *B. velezensis* B2002 ved ulike vekstforhold. A, B, C, D viser til antimikrobiell aktivitet i supernatant fra *B. velezensis* B2002 dyrket i henholdsvis BHI-, GM17-, MRS-, og LB-medium ved 30 °C og 37 °C med (R) og uten risting i 6, 12, 18, 24 og 48 timer.

Målinger av celledensitet (OD_{600}) med samme tidsintervall for kulturene med risting viste at veksten av *B. velezensis* B2002 var tilnærmet lik i alle medier etter 24 timer, selv om veksthastigheten varierer noe mellom mediene (Figur 3.2.2).



Figur 3.2.2 Vekstkurve *B. velezensis* B2002 i ulike vekstmedium med risting. (A) Vekst ved 30 °C og risting (R), og (B) 37 °C (R). Celledensitet ble målt ved OD_{600} etter 6, 12, 18, 24 og 48 timer.

De beste vekstforholdene for rensing og identifisering av det antimikrobielle stoffet produsert av stammen ble valgt til 24 timer vekst i BHI ved 37 °C og risting.

3.3 Rensing av antimikrobielt stoff fra *B. velezensis* B2002

Vanligvis starter protein- og bakteriocinrensing med ammoniumsulfatutfelling, etterfulgt av ionebytte- og revers-fase kromatografi (RPC) (38,80,82). Utfelling med ammoniumsulfat fra supernatanten til *B. velezensis* B2002 viste seg imidlertid ikke å være mulig da ingen pellet ble dannet etter sentrifugering (se Diskusjon 4.1). Dette gjorde rensingen utfordrende og det ble derfor gjennomført RPC direkte med 1 L supernatant. Alle RPC-fraksjonene ble testet for antimikrobiell aktivitet mot *L. innocua* LMGT 2785 ved spot-on-lawn (Figur 3.3.1).

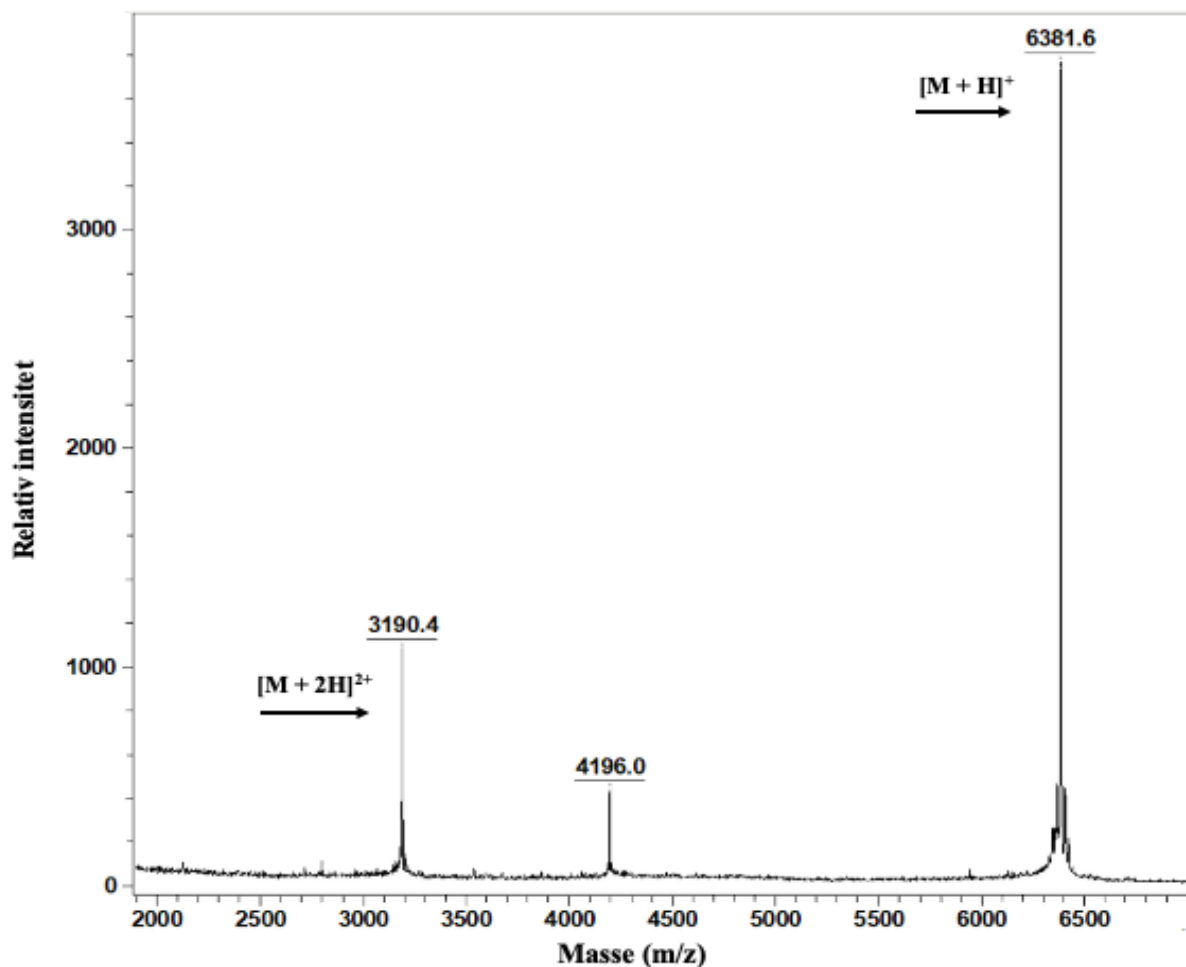


Figur 3.3.1 Inhiberingssoner til RPC-fraksjoner fra *B. velezensis* B2002 supernatant mot *L. innocua* LMG 2785.

RPC-fraksjon 8-23 ga tydelige inhiberingssoner mot *L. innocua* LMG 2785. Den antimikrobielle aktiviteten var høyest i fraksjon 10, som ga den største inhiberingssonen. Aktiviteten i fraksjon 10 ble også bestemt kvantitativt til 102 400 BU/ml.

3.4 Identifisering av amylocyclicin med MALDI-TOF MS

For å identifisere det antimikrobielle stoffet fra de aktive fraksjonene fra RPC-rensingen ble MALDI-TOF MS utført på alle aktive RPC-fraksjoner (fraksjon 8-23). Massespekter ga topper på 6381.6 m/z og 3190.4 m/z for alle fraksjoner med antimikrobiell aktivitet (ikke vist). Massespekter for fraksjonen med høyest aktivitet (fraksjon 10) er vist i Figur 3.4.1. Masse ble oppgitt som masse delt på ladning (m/z). For molekyl med enkeltladning ($z=1$) vil observert masse korrespondere med monoisotopisk masse (Da). Toppen på 6381.6 m/z samsvarte nøyaktig med det sirkulære bakteriocinet amylocyclicin som har en beregnet molekylmasse på 6381.6 kDa (49). Toppen på 3190.4 m/z viser høyst sannsynlig til den dobbelt ladde formen av samme molekyl ($z=2$), da 3190.4 m/z er nesten nøyaktig halvparten av 6381.6 m/z. En topp på 4196 m/z fra et ukjent molekyl var også tydelig. Predikerte molekylmasser fra det ukjente lantipeptidet (se 3.1) funnet i genomet til *B. velezensis* B2002 samsvarte ikke med noen av toppene i fra de aktive fraksjonene. Likevel tyder Figur 3.4.1. på at det er andre peptider er til stede i fraksjonene som potensielt kan påvirke den antimikrobielle aktiviteten.



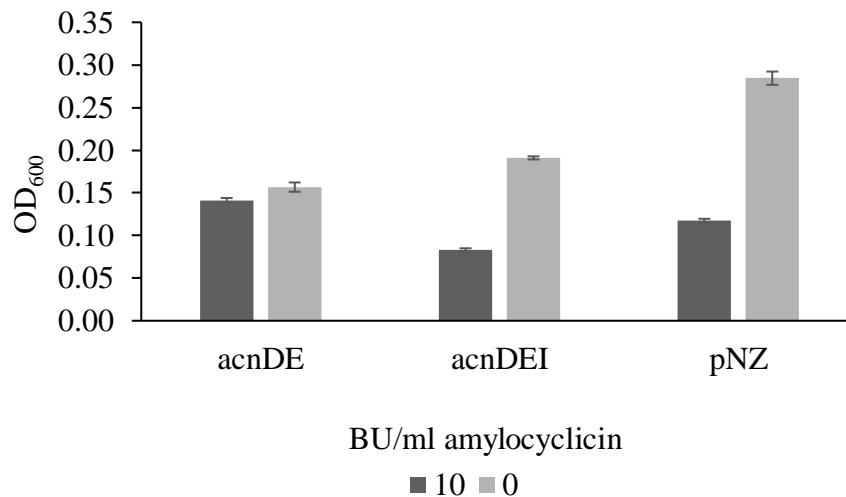
Figur 3.4.1 Massespekter av mest aktive RPC-fraksjon fra *B. velezensis* B2002. Toppen på 6381.6 m/z samsvarer med teoretisk masse til amylocyclicin og toppen på 3190.4 m/z er mest sannsynlig den dobbelt ladde formen av bakteriocinet ($z=2$). Toppen på 4196 m/z er et ukjent peptid.

RPC-fraksjon 10 ble benyttet direkte i videre tester og omtales heretter som amylocyclicin, som høyst sannsynlig er det antimikrobielle stoffet produsert av *B. velezensis* B2002.

3.5 Kloning og karakterisering av amylocyclicin-gener (immunitetsgener)

Siden amylocyclicin viste seg å være utfordrende å rense fra *B. velezensis* B2002 ble det forsøkt å klonere fullt bakteriocin-kompleks (4.2 kb) inn i *L. lactis* IL1403. Dette ville forenkle rensingen og garantere at den antimikrobielle aktiviteten kun var fra amylocyclicin, og ikke andre peptider. I tillegg er det en del som fortsatt er ukjent om immunitet og rollen til de ulike genene som er antatt å være involvert i immunitet til amylocyclicin (*acnCDEF*), og heterologt uttrykk av genklusteret vil gjøre det mulig å studere dette videre (49). Genklusteret ble derfor forsøkt klonet inn i plasmidvektoren pNZ8037, men det lyktes ikke å få transformanter med fullt genkluster. Imidlertid lyktes det å lage plasmidvektorer som uttrykker genene *acnDE* og

acnDEI, fra en nisin-induserbar promoter på plasmidet pNZ8037. For å undersøke rollen til disse genene i immunitet, ble plasmidet transformert inn i *L. lactis* B200, og det ble målt vekst av stammene *L. lactis* acnDE, acnDEI og pNZ (tomt plasmid; kontroll) med og uten tilsatt amylocyclicin (Figur 3.5.1).



Figur 3.5.1 Vekst av *L. lactis* acnDE, acnDEI og pNZ med og uten amylocyclicin. Nisin ble tilsatt til 5 ng/ml for induksjon av genuttrykk i alle stammene.

Vekst uten tilsatt amylocyclicin viste seg å være noe høyere for *L. lactis* acnDEI enn *L. lactis* acnDE, med OD-verdier på henholdsvis 0.191 og 0.157. Til sammenligning hadde kontrollen *L. lactis* pNZ en OD-verdi på 0.285 som viser at veksten av *L. lactis* B200 påvirkes av at *acn* genene uttrykkes. Med amylocyclicin tilsatt var veksten derimot betydelig dårligere for *L. lactis* acnDEI og pNZ sammenlignet med acnDE. Ved en amylocyclicinkonsentrasjon på 10 BU/ml ble veksten av *L. lactis* acnDEI hemmet med mer enn 50 % av veksten uten tilsatt amylocyclicin. Veksten av *L. lactis* acnDE var derimot tilnærmet upåvirket med tilsatt amylocyclicin.

3.6 Amylocyclicin har bredspektret aktivitet mot Gram-positive bakterier

Amylocyclicin har tidligere bare blitt testet mot et begrenset antall arter innen slektene *Paenibacillus*, *Bacillus*, *Micrococcus*, samt noen få Gram-negative arter (49). Amylocyclicin ble derfor testet mot et større panel av arter for å få ett større innblikk i inhiberingsspekteret. I panelet ble det inkludert flere arter som er mulige patogener for å undersøke amylocyclicin sitt potensiale til å bekjempe disse. En oversikt over alle stammer i panelet er vist i Vedlegg 1.

Aktivitet ble undersøkt ved å observere inhiberingssoner, og alle arter/stammer som ble hemmet av amylocyclicin er presentert i Tabell 3.6.1.

Tabell 3.6.1 Inhiberingsspekter til amylocyclicin. Grad av sensitivitet er presentert følgende; +++, inhiberingssone fra 100x fortynnet amylocyclicin; ++, inhiberingssone fra 10x fortynnet amylocyclicin; +, inhiberingssone fra ufortynnet amylocyclicin (se Vedlegg 2 for hvordan sensitivitet ble definert).

Indikatorstamme^a	Sensitivitet
Gram-positiv	
<i>Bacillus. cereus</i> (n = 3)	++
<i>Carnobacterium divergens</i> LMGT 2738	+
<i>Carnobacterium piscicola</i> LMGT 2332	++
<i>Enterococcus avium</i> LMGT 3465	+++
<i>Enterococcus faecalis</i> (n = 5)	+
<i>Enterococcus faecium</i> (n = 4)	+
<i>Lactobacillus curvatus</i> (n = 2)	+
<i>Lactobacillus plantarum</i> (n = 3)	++
<i>Lactobacillus sakei</i> (n = 2)	+++
<i>Lactococcus garvieae</i> LMGT 3390	+++
<i>Lactococcus lactis</i> (n=2)	++
<i>Leuconstoc gelidium</i> LMGT 2386	++
<i>Listeria innocua</i> (n = 2)	+++
<i>Listeria ivanovii</i> LMGT 2813	+++
<i>Listeria monocytogenes</i> (n = 17)	++ / +++ ^b
<i>Pediococcus acidilactici</i> LMGT 2002	+++
<i>Pediococcus pentosaceus</i> (n = 2)	++
<i>Staphylococcus aureus</i> (n = 5)	+
<i>Staphylococcus haemolyticus</i> LMGT 4133	++
<i>Streptococcus agalactiae</i> LMGT 3347	–
<i>Streptococcus dysgalactiae</i> LMGT 3899	++
<i>Streptococcus thermophilus</i> LMG 3555	+
<i>Streptococcus uberis</i> (n = 2)	+

^aStammer som ikke ble inhibert av amylocyclicin; *Streptococcus agalactiae* LMGT 3347, samt alle Gram-negative arter i panelet (se Vedlegg 1).

^b ++ for n = 5, +++ for n = 12

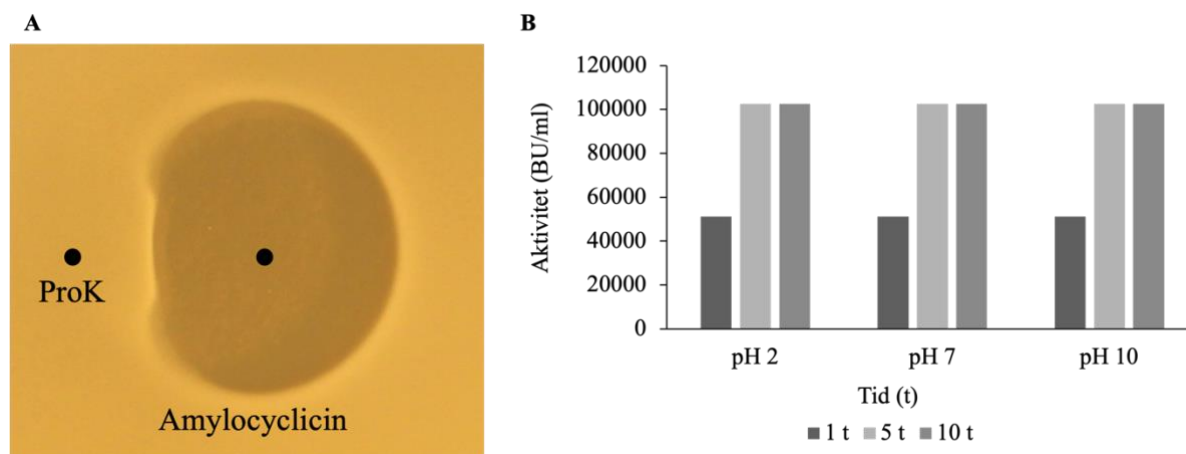
Amylocyclicin hadde antimikrobiell aktivitet mot alle Gram-positive stammer i panelet utenom *Streptococcus agalactiae* LMGT 3347. Blant de patogene hadde amylocyclicin aktivitet mot *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Listeria monocytogenes*, *Enterococcus faecalis* og *Enterococcus faecium*. Det var spesielt interessant å observere at amylocyclicin hadde svært god aktivitet mot *L. monocytogenes*, hvor over halvparten av stammene ble tydelig hemmet selv ved den laveste bakteriocinkonsentrasjonen (100-ganger fortynnet).

3.7 Fysiokjemiske egenskaper for amylocyclicin

Sirkulære bakteriociner er ofte svært stabile mot høye temperaturer, pH-forandringer og proteaser (23). Det er tidligere beskrevet at sirkulære bakteriociner kan være resistente mot proteaser på grunn av deres kompakte globulære struktur (23). Lav stabilitet mot proteaser er et problem for de fleste bakteriociner som gjør det utfordrende å bruke disse til for eksempel behandling av infeksjoner. God stabilitet er viktig for bruk og anvendelse av bakteriociner til hemming av patogener i ulike miljø, for eksempel i medisinsk eller industriell sammenheng. Det ble derfor undersøkt om amylocyclicin var protease-sensitiv (Figur 3.7.1). Det viste seg at amylocyclicin var sensitiv mot proteinase K, da amylocyclicin ikke hemmet indikator der proteinase K ble tilsatt.

Stabilitet ved ulike pH-forhold kan være viktig ved bruk av amylocyclicin sammen med andre stoffer, som for eksempel vaskemidler eller steriliserende løsninger. For å undersøke stabiliteten til amylocyclicin ved ulik pH ble RPC-renset amylocyclicin tørket og resuspendert i buffere med pH 2, 7 eller 10 (Figur 3.7.1). Etter 1 time inkubering hadde amylocyclicin en aktivitet på 51 200 BU/ml ved alle pH-nivå. Etter 5 og 10 timer inkubering hadde aktiviteten økt til 102 400 BU/ml, som tilsvarte aktiviteten til ubehandlet amylocyclicin. Nisin A som er et mye brukt bakteriocin i matindustrien ble også tatt med som en kontroll. Dette bakteriocinet er kjent å være ustabil ved høy pH på grunn av umettede aminosyrer som er reaktive ved høy pH (83). Som forventet ble aktiviteten til nisin tydelig redusert ved pH 10, men den ble også noe redusert ved lavere pH (se Vedlegg 3). Ved lav pH holdt aktiviteten seg derimot stabil over tid, mens aktiviteten ved pH 10 sank for hver måling.

Varmestabiliteten til peptidet ble også undersøkt, og det var heller ingen endring i antimikrobiell aktivitet fra *B. velezensis* B2002 supernatant etter koking på 100 °C i 5 minutter.

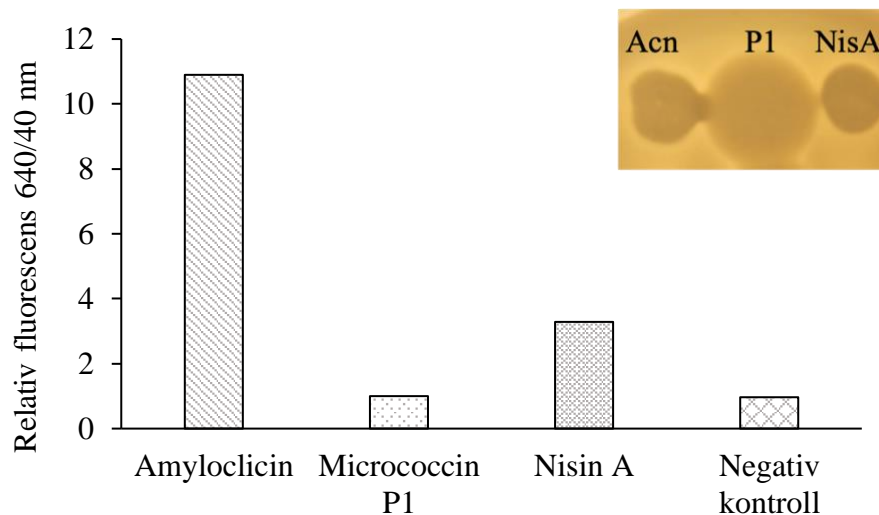


Figur 3.7.1 Proteinase- og pH-sensitivitet til amylocyclicin. (A) RPC-renset amylocyclicin og Proteinase K (ProK) applisert ved siden av hverandre. Dannelse av avgrenset hemmingssone («halvmåne») er karakteristisk for proteasesensitivitet. (B) RPC-renset amylocyclicin inkubert i buffere med pH 2, 7 og 10. Aktivitet ble målt som BU/ml etter 1, 5, og 10 timer inkubering i bufferne.

3.8 Amylocyclicin er et poredannende bakteriocin

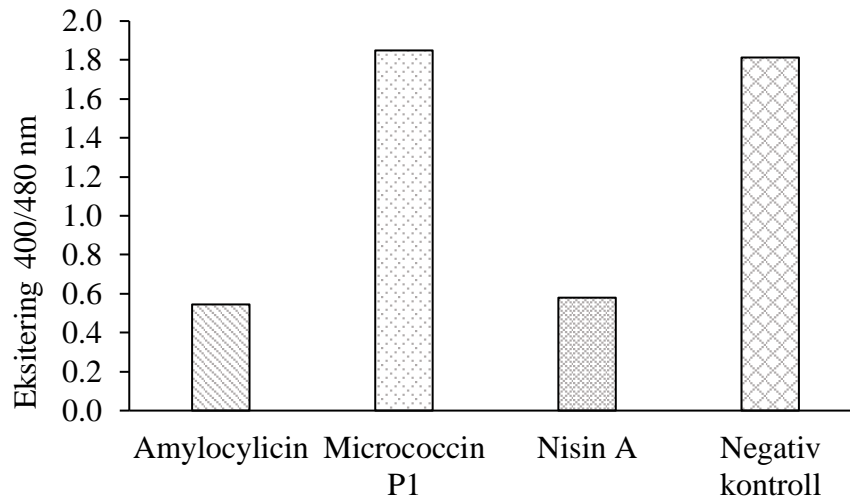
Amylocyclicins antimikrobielle virkemåte er ikke beskrevet, men flere andre sirkulære bakteriociner er antatt å danne porer i cellemembranen (23,62,63). En økt forståelse av virkemåten til bakteriociner kan hjelpe med å bedre anvende denne typen molekyler. For å undersøke om amylocyclicin danner porer i målbakteriens cellemembran ble det brukt to ulike analyser, propidiumjodid- og pHluorin-analyse (se Material og metode 2.7.4 og 2.7.5). Propidiumjodid-analysen ble utført med *L. lactis* IL1403 som indikator, som også er sensitiv mot amylocyclicin. pHluorin-analysen er etablert i *L. monocytogenes*.

Propidiumjodid-analysen er basert på en egenskap til propidiumjodid der binding til DNA fører til økt fluorescens. Dersom bakteriociner forstyrrer membranpermeabiliteten ved poredannelse vil propidiumjodid diffundere inn i cellen og binde DNA, som videre fører til økt emisjon av fluorescens (80). Både nisin A og micrococcin P1 er aktive mot *L. lactis* IL1403, men har ulik virkemåte. Nisin A er en kjent poredanner til forskjell fra micrococcin P1 som ikke danner porer, men inhiberer proteinsyntesen hos målbakterien (80). Propidiumjodid-analysen viste at amylocyclicin danner porer i cellemembranen da fluorescenssignalet hadde økt sammenlignet med micrococcin P1 og negativ kontroll (ingen tilsatt bakteriocin) (Figur 3.8.1).



Figur 3.8.1 Analyse av poredannelse fra amylocyclicin ved bruk av propidiumjodid. Amylocyclicin (2560 BU/ml), micrococcin P1 (25 µg/ml), nisin A (25 µg/ml) ble fortynnet i PBS med propidiumjodid og *L. lactis* IL1403. Figuren viser relativ fluorescens ved 640/40 nm etter 3 timer inkubasjon. Inhiberingssoner produsert av hvert bakteriocin (5 µl) mot *L. lactis* IL1403 er vist i øverst til høyre.

L. monocytogenes/pNZ-pHin2^{Lm} er en stamme som uttrykker det pH-sensitive fluorescerende proteinet pHluorin2, som har eksiteringstopper på 400 og 480 nm (84). Forholdet i intensitet mellom disse eksiteringstoppene avhenger av pH i miljøet proteinet befinner seg i. Dersom membranpermeabiliteten forstyrres ved poredannelse fra bakteriociner fører dette til at intracellulær pH synker til pH-nivået i miljøet/analysebufferen (80,84). Dette vil påvirke fluorescensintensiteten fra pHluorin2, og forholdet mellom eksiteringstoppene vil følgelig endre seg sammenlignet med en kontroll uten tilsatt poredannende bakteriocin/intakte celler. (80,84). Fluorescensmålinger av denne stammen etter eksponering for amylocyclicin viste en tydelig reduksjon i forholdet, som indikerer en reduksjon i intracellulær pH sammenlignet med negativ kontroll (ingen tilsatt bakteriocin) (Figur 3.8.2). Det samme viste celler eksponert for nisin A, men ikke micrococcin P1 og negativ kontroll.

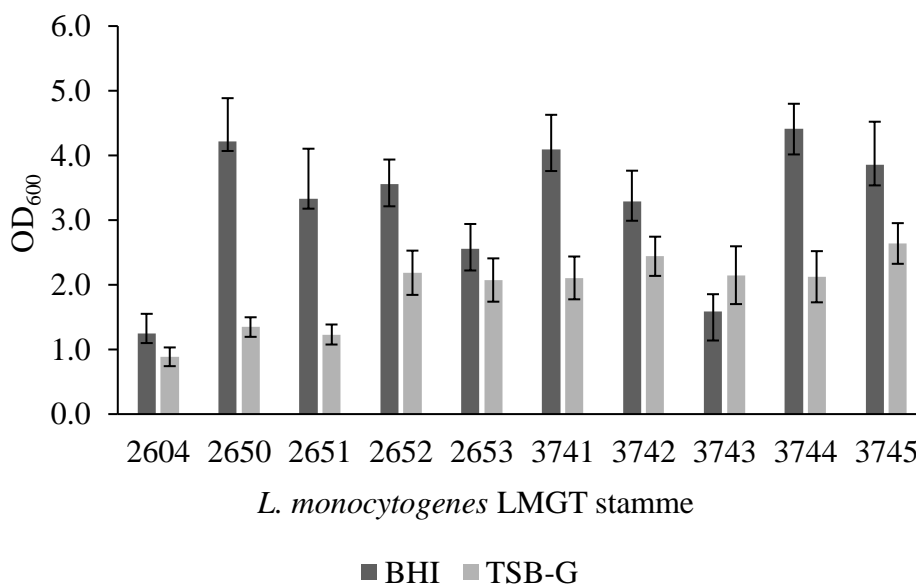


Figur 3.8.2 pHluorin analyse. Amylocyclicin (320 BU/ml), micrococcin P1 (25 µg/ml), nisin A (25 µg/ml) ble fortynnet i *Listeria* minimal buffer (LMB) og inkubert med *L. monocytogenes*/pNZ-pHin2^{Lm} i 30 minutter. Fluorescensemisjon ved 510/17 nm fra pHluorin2 ble målt fra eksitering ved 400/20 og 470/20 nm. Figuren viser forholdet mellom emisjonsverdien fra eksitering ved 400/20 nm og 470/20 nm.

3.9 Amylocyclicin forstyrrer *L. monocytogenes* biofilm

3.9.1 Biofilmdannelse fra utvalgte *L. monocytogenes* stammer

Biofilm dannet av potensielt patogene bakterier er et problem som kan være vanskelig å bekjempe. Siden amylocyclicin viste god aktivitet mot *L. monocytogenes*, en patogen med evne til å danne biofilm, ble det undersøkt om amylocyclicin også kunne forstyrre eller hemme biofilm fra bakterien. For å teste dette ble først evnen til å danne biofilm undersøkt for et utvalg av *L. monocytogenes* stammer isolert fra dyr og kontaminert mat. Forsøket viste biofilmdannelse hos alle stammene i begge vekstmedier som ble testet (BHI og TSB-G) (Figur 3.9.1).

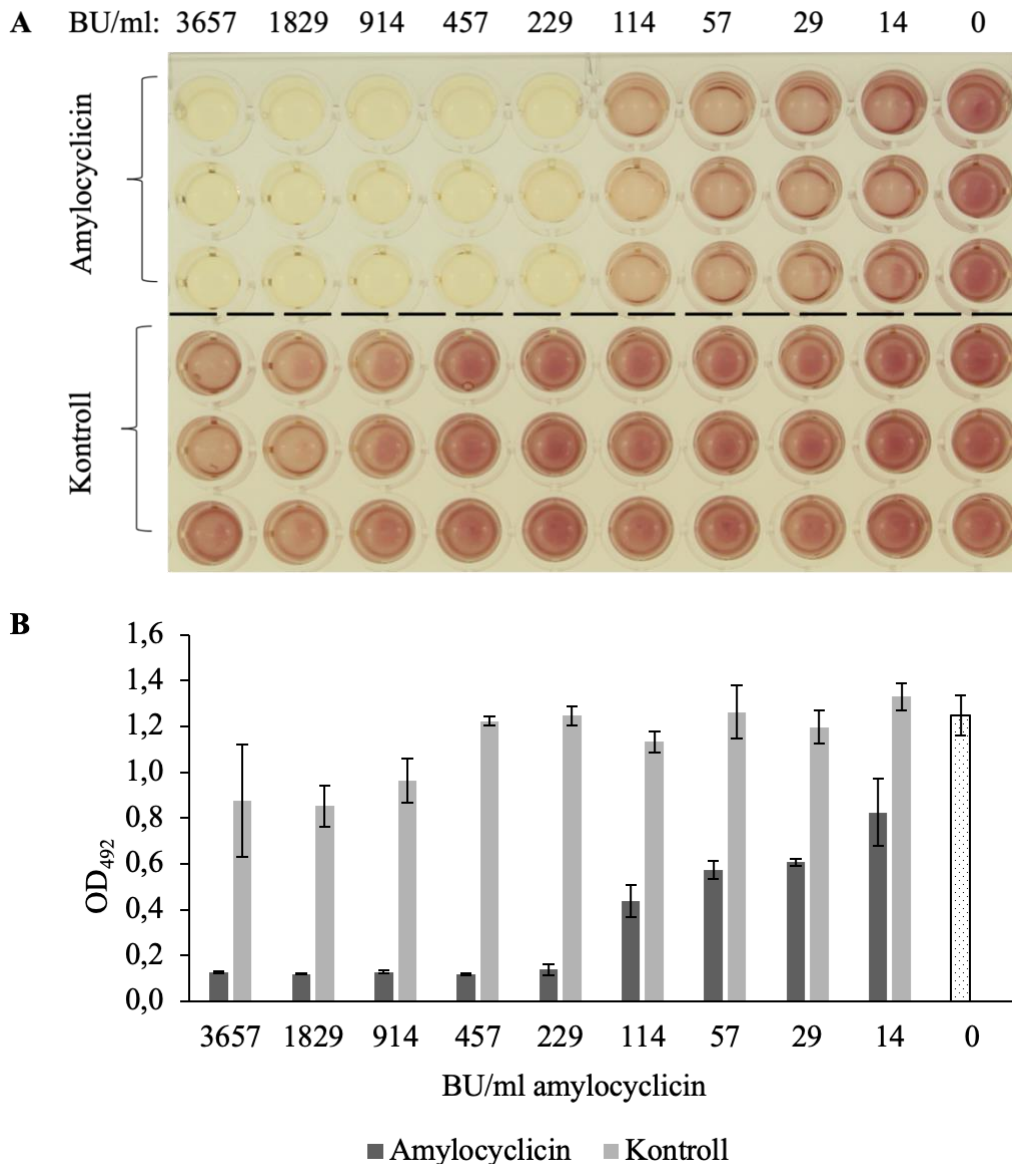


Figur 3.9.1 Utvalgte *L. monocytogenes* stammers evne til å danne biofilm. Biofilm ble dyrket i 24 timer i BHI eller TSB-G. Krystallfiolett ble tilsatt og målinger ved OD₆₀₀ målte mengden krystallfiolett bundet til biofilmen, og er et indirekte mål på stammens evne til å danne biofilm. Figuren viser gjennomsnittsverdier fra tre forsøk og tilhørende standardavvik.

Stammen *L. monocytogenes* LMGT 3744 i BHI viste best evne til å danne biofilm. Denne stammen ble isolert fra kontaminert rå kylling fra matindustrien (Liv Marit Rørvik, NVH, 1995)

3.9.2 Amylocyclicin mot biofilm fra *L. monocytogenes* LMGT 3744

Biofilm produsert av *L. monocytogenes* LMGT 3744 ble tilsatt ulike konsentrasjoner amylocyclicin eller løsemiddel som kontroll (brukt i eluert amylocyclicin; 50 % 2-propanol, 0.1 % TFA). Biofilmen ble inkubert 24 timer før trifenyl-tetrazolium klorid ble tilsatt (TTC). TTC fungerer som en indikator på levedyktighet, da metabolsk aktive celler vil ta opp TTC og omdanne det til rødt fargestoff (formazan) (85). Brønner med rød farge indikerer derfor metabolsk aktive celler i biofilmen, mens fargeløse brønner indikerer at bakteriocinet har drept eller hemmet cellene i biofilmen. Dette ble målt visuelt ved OD₄₉₂. Som vist i Figur 3.9.2 hemmet amylocyclicin cellene i biofilmen når konsentrasjonen var 229 BU/ml eller høyere. Biofilm tilsatt disse konsentrasjoner viste lite- til ingen tegn til metabolsk aktivitet.

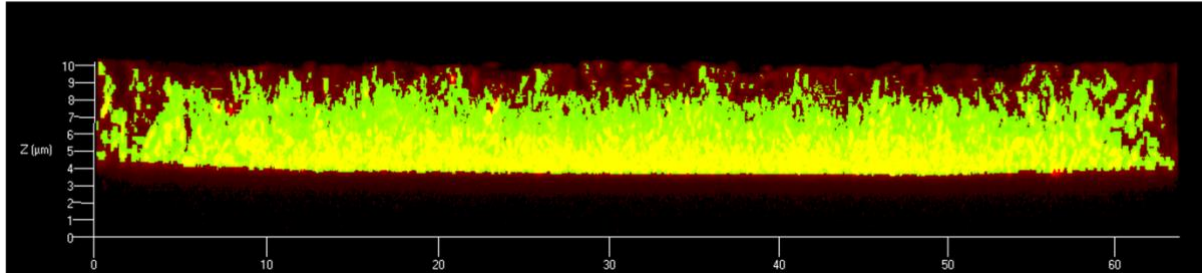


Figur 3.9.2 Analyse av amylocyclicins evne til å inhibere biofilm fra *L. monocytogenes* LMG 3744. Seriefortynninger av amylocyclicin og tilsvarende mengder kontroll (50 % 2-propanol, 0.1 % TFA) ble inkubert med biofilm fra *L. monocytogenes* LMG 3744 i 24 timer før TTC ble tilsatt. (A) Bilde fra analysen, hvor brønner med metabolsk aktivitet er farget røde, og brønner uten metabolsk aktivitet er fargeløse. (B) Gjennomsnittsverdier og standardavvik fra målinger ved OD₄₉₂.

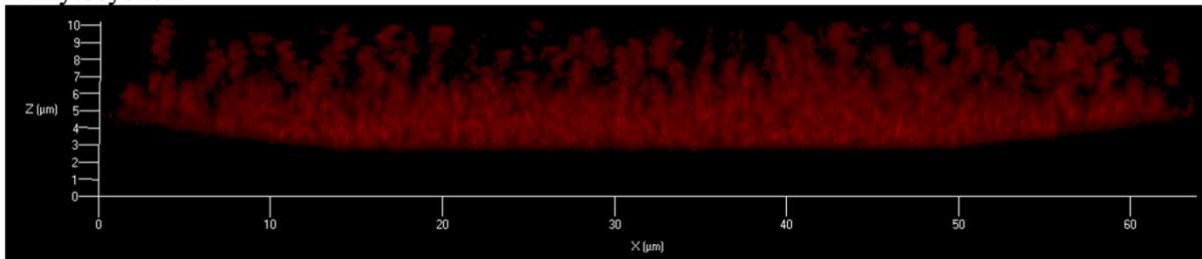
Studier har vist at bakterier i biofilm har evnen til å leve i «dvale» hvor de ikke gir utslag for metabolsk aktivitet, men fortsatt er levedyktige (86–88). For å undersøke dette ble behandlet biofilm resuspendert i vekstmedium, seriefortynnet og platet ut. Telling av kolonier (CFU) viste at biofilm utsatt for 229 BU/ml amylocyclicin ga Log₁₀ CFU på 5.2 (10^{5.2} CFU), selv om TTC ikke ga fargeendring ved behandling med denne konsentrasjonen (Figur 3.9.2). Til sammenligning ga kontrollen Log₁₀ CFU på 7.8, som viser at det var en tydelig reduksjon (400-ganger reduksjon) i levedyktige celler etter behandling med amylocyclicin.

For å undersøke levedyktigheten i biofilmen nøyere ble det utført en LIVE/DEAD farging av biofilm etterfulgt av konfokal mikroskopi (Figur 3.9.3). Biofilm utsatt for amylocyclicin og kontroll ble farget med SYTO9 og propidiumjodid som henholdsvis farger levende celler grønne og døde celler røde (14).

Kontroll



Amylocyclicin



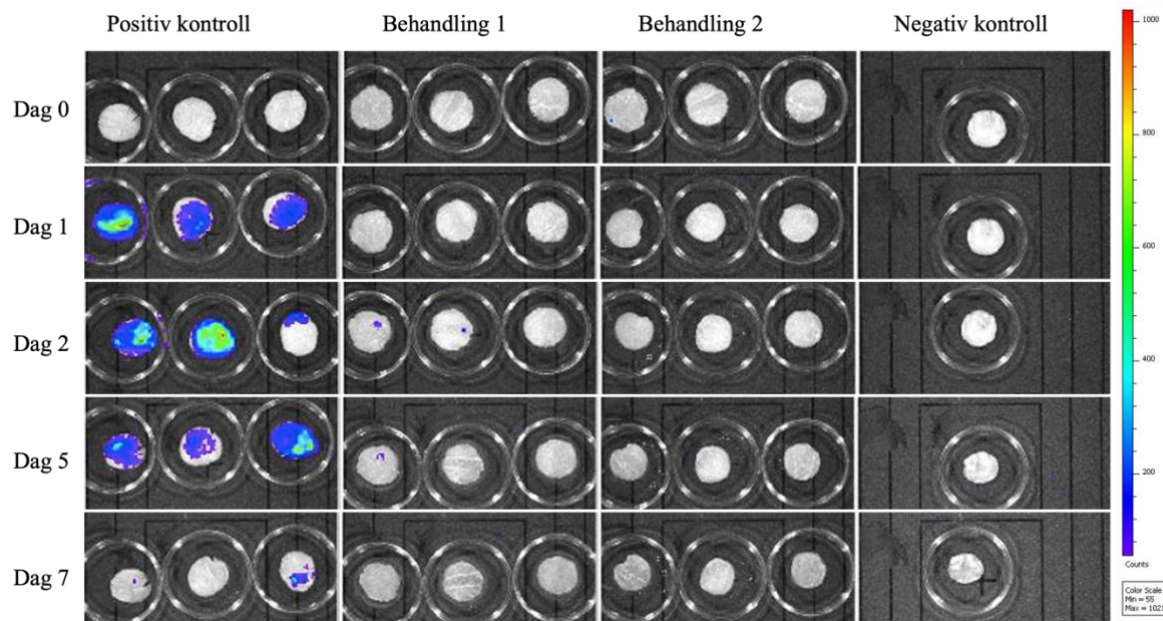
Figur 3.9.3 LIVE/DEAD farging av biofilm fra *L. monocytogenes* LMGT 3744 behandlet med amylocyclicin. Amylocyclicin (914 BU/ml) og tilsvarende mengde kontroll (50 % 2-propanol, 0.1 % TFA) ble inkubert med biofilm fra *L. monocytogenes* LMGT 3744 i 24 timer før LIVE/DEAD farging. Bilder ble tatt med emisjon på 300-600 nm (SYTO9) og 600-800 nm (propidiumjodid). Grønn og rød farge indikerer henholdsvis levende og døde celler i biofilmen.

Resultatet fra LIVE/DEAD fargingen viser igjen at amylocyclicin har en tydelig antimikrobiell effekt på biofilm fra *L. monocytogenes* LMGT 3744, da cellene i biofilmen er farget rødt. Sammenlignet med biofilmen behandlet med kontroll ser også celletettheten ut til å være redusert.

3.10 Amylocyclicin hemmer vekst av *L. monocytogenes* på røkt laks

Matvarer som konsumeres uten å bli varmebehandlet, som for eksempel røkt laks kan være en smittekilde av *L. monocytogenes*. Røkt laks er den trolige smittekilden bak det seneste *L. monocytogenes* utbruddet i Norge (74). Det ble derfor undersøkt om amylocyclicin kunne hemme bakterien på røkt laks. I forsøket ble 8×10^5 CFU *L. monocytogenes* Xen32 spredd på overflaten av biter med røkt laks. Denne stammen inneholder en modifisert kopi av *lux* operonet fra *Photobacterium luminescens*, som gjør at stammen kontinuerlig produserer lys når cellene er metabolsk aktive, vist i Vedlegg 4 (89). Laksebitene ble utsatt for to ulike behandlinger med

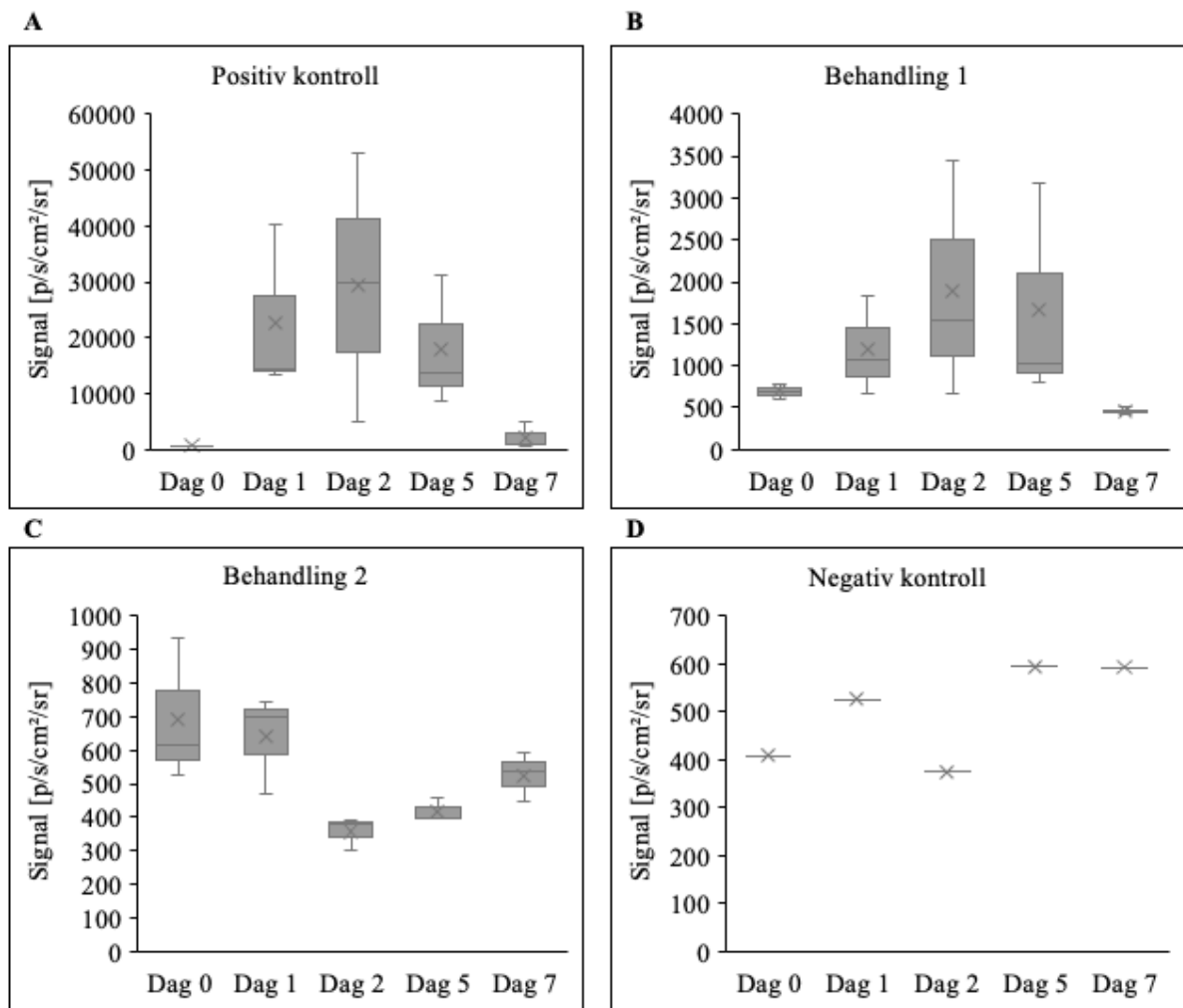
amylocyclicin. Ved behandling 1 ble amylocyclicin (51200 BU/ml) spredd på overflaten av den kontaminerte fisken. Ved behandling 2 ble fisken dyppet i amylocyclicin (51200 BU/ml) før *L. monocytogenes* Xen32 ble spredd på overflaten. Positiv kontroll bestod av fisk med kun *L. monocytogenes* Xen32 spredd på overflaten, og negativ kontroll bestod av ubehandlet fisk (ingen *L. monocytogenes* eller bakteriocin). Prøvene ble inkubert ved 30 °C og luminescenssignal ble målt ved dag 0, 1, 2, 5 og 7 (Figur 3.10.1).



Figur 3.10.1 Bioluminescenssignal produsert av *L. monocytogenes* Xen32 på røkt laks med og uten amylocyclicin. Bioluminescenssignal er målt i fotoner per sekund per kubikkcentimeter per steradian fra fire ulike prøver med paralleller. Fiskeprøvene er behandlet som beskrevet ovenfor, og signal ble målt ved dag 0, 1, 5, og 7.

Amylocyclicin viste seg å ha god aktivitet mot *L. monocytogenes* Xen32 på røkt laks, hvor behandling 2 var mest effektiv. Ved behandling 1 ble det observert noe lys ved dag 2 og dag 5, som tyder på at ikke all *L. monocytogenes* Xen32 var blitt hemmet/drept. Ved behandling 2 så det derimot ut til at stammen ikke klarte å vokse i løpet av forsøket.

Figur 3.10.1 gir en god indikasjon på effektiviteten fra behandlingene, men for å undersøke effekten nøyere ble også bioluminescenssignalene kvantifisert med programvaren Livin Image, se Figur 3.10.2.



Figur 3.10.2 Kvantifisering av bioluminescenssignal fra *L. monocytogenes* Xen32 på røkt laks med og uten amylocyclicin. Bioluminescenssignal er målt i fotoner per sekund per kvadratcentimeter per steradian [p/s/cm²/sr] med en eksponeringstid på 2 minutter. Fiskeprøvene er behandlet som beskrevet ovenfor, og signal ble målt ved dag 0, 1, 2, 5 og 7. Y-aksene er justert ut ifra intensiteten på signalene.

Kvantifiseringen viste i samsvar med bildene at signalene er tydelig redusert fra positiv kontroll, og at behandling 2 var mer effektiv en behandling 1. Fra behandling 2 ble det også målt noe bioluminescens, men stort sett er ikke dette signalet høyere enn for negativ kontroll som viser at det alltid vil måles noe lys selv om *L. monocytogenes* Xen32 ikke er til stede. Behandling 2 kan derfor sies å være svært effektiv mot *L. monocytogenes* Xen32 på røkt laks.

4 Diskusjon

I denne masteroppgaven ble det sirkulære bakteriocinet amylocyclicin identifisert fra *B. velezensis* B2002. Bakteriocinets fysiokjemiske egenskaper, inhiberingsspekter, immunitet, virkemåte, og aktivitet mot *L. monocytogenes* ble undersøkt. I denne delen av oppgaven vil metodene og resultatene fra disse undersøkelsene diskuteres.

4.1 Rensing av amylocyclicin

Det var utfordrende å rense amylocyclicin fra produsentstammen *B. velezensis* B2002. En vanlig og mye publisert renseteknikk for bakteriociner er ammoniumsulfat-utfelling fra supernatant, etterfulgt av ionebytte- og revers-fase kromatografi (RPC) (38,80,82). Dette var imidlertid ikke mulig ettersom utfelte proteiner/peptider ikke kunne skilles fra væsken. Da ammoniumsulfat ble tilsatt til supernatanten ble det observert utfelling av proteiner, men ingen pellet ble dannet ved sentrifugering. I stedet for forble partikler suspendert i supernatanten, og løsningen hadde høy viskositet som også gjorde det utfordrende å filtrere den. Dette tyder på at supernatanten hadde en lignende tetthet som de utfelte proteinene, tettheten til proteiner er ofte rapportert til å være 1.35-1.47 g/ml, noe som er høyere enn ammoniumsulfat-løsningen (1.16 g/ml). En mulig årsak til dette kan være at stammen produserer stoffer som øker tettheten og viskositeten på mediet. Det kan også være at stammen produserer lipopeptider og surfaktanter som påvirker tettheten og/eller oppdriften til partikler i væsken.

Det er tidligere vist at *B. velezensis* stammer kan produsere lipopeptider, inkludert lipopeptidet surfactin som er en biosurfaktant (overflateaktive stoffer) (90,91). Fra programvaren antiSMASH ble det detektert tre regioner i genomet til *B. velezensis* B2002 med likhet til kjente biosyntetiske genkluster tilhørende surfactin fra *B. velezensis* FZB42 (8-47% likhet). I følge NCBI Taxonomy har *B. velezensis* FZB42 tidligere blitt kalt *B. amyloliquefaciens* FZB42, som er produsentstammen hvor amylocyclicin først ble karakterisert fra (49). Dette viser at amylocyclicin-produserende stammer også kan produsere surfactin, og dette kan derfor også være tilfellet for *B. velezensis* B2002 til tross for at likheten til tidligere karakterisert surfactin genkluster var begrenset.

Da det ikke var mulig å felle ut proteiner produsert av *B. velezensis* B2002 ved hjelp av ammoniumsulfat, ble supernatant fra overnatkultur av stammen rensert ved RPC. Dette

resulterte i en bred elueringstopp med aktive fraksjoner over et større volum (antall fraksjoner). En konsekvens ble at bakteriocinet var mindre rent og inneholdt flere peptider enn kun amylocyclicin, som kunne sees i massespekteret fra MALDI-TOF MS i Figur 3.4.1.

Fra helgenomsekvenseringen av *B. velezensis* B2002 ble det funnet et potensielt bakteriocinkluster med gener kodende for lantipeptider med predikerte molekylmasser på 3.4-3.5 kDa. Det er viktig å nevne at massen av lantipeptider peptider kan være utfordrende å predikere på grunn av de posttranslasjonelle modifiseringene som påvirker vekten. Likevel representerer toppen på 4196 m/z i massespekteret i Figur 3.4.1 trolig ikke det ukjente lantipeptidet da det er relativt stor forskjell fra predikerte masser.

Massespekteret fra MALDI-TOF MS viste også en del topper med lav molekylvekt (< 2 kDa), og dette kan som nevnt kan tyde på at *B. velezensis* B2002 produserer en del lipopeptider. Det er mulig at lipopeptidene påvirker den antimikrobielle aktiviteten til amylocyclicin da tidligere studier har vist at lipopeptider fra *B. velezensis* har god aktivitet mot både Gram-positive og Gram-negativ arter (90,91). I studiet som først karakteriserte amylocyclicin ble det laget en mutert amylocyclicin-produsent som ikke produserte andre antimikrobielle forbindelser, inkludert lipopeptider, og dette er noe som potensielt kunne blitt gjort også i dette studiet (49).

På grunn av problemene knyttet til renheten av amylocyclicin ble amylocyclicin-klusteret på 4.2 kb forsøkt klonet inn i *L. lactis* IL1403 som ikke produserer antimikrobielle stoffer. Ved å uttrykke og produsere amylocyclicin i denne stammen kunne aktiviteten til bakteriocinet blitt verifisert. Bakteriocinklusteret ble forsøkt klonet inn i ulike plasmid og ulike kompetente stammer uten vellykket resultat. Årsaken til dette var trolig størrelsen på innskuddet som skulle inn i plasmidet. Dette kunne vært løst med å dele opp innskuddet/klusteret i flere fragmenter med overlappende ender, men ble ikke forsøkt grunnet mangel på tid. Det ble derfor ikke bekreftet at den antimikrobielle aktiviteten fra *B. velezensis* B2002 alene skyldtes amylocyclicin, men det ble antatt at amylocyclicin var hovedårsaken til den observerte aktiviteten da ingen andre karakteriserte eller predikerte antimikrobielle peptider ble verifisert.

4.2 Karakterisering av immunitetsgener

Genklusteret for amylocyclicin har tidligere blitt karakterisert i studiet gjort av Scholz et al. (2014), hvor AcnC, AcnD og AcnE ble predikert til å bidra til selvimmunitet mot bakteriocinet

(49). Dette ble oppdaget ved å designe mutanter av hver av disse genene og teste deres sensitivitet mot amylocyclicin (49). Scholz et al. (2014) lyktes ikke med å lage delesjonsmutanter av ABC-transporteren AcnDE, som indikerer at disse er essensielle for biosyntesen og muligens selv-immunitet (49).

I dette forsøket hadde *L. lactis* stammen som uttrykte *acnDE* som forventet en økt immunitet mot amylocyclicin, sammenlignet med stammen med tomt plasmid (Figur 3.5.1). *L. lactis acnDE* var ikke imidlertid ikke fullstendig immun mot amylocyclicin. Dette skyldes nok mangel på AcnC som tidligere er vist å bidra til immunitet, i tillegg på manglede uttrykk av ett immunitetsprotein.

En tidligere studie har vist at AcnF, et hydrofobt peptid på 73 aminosyrer som først ble predikert som immunitetsprotein, ikke hadde en viktig rolle for selvimmuniteten mot amylocyclicin (49). I denne oppgaven ble en 15 aminosyrer lengre sekvens av *acnF*, kalt *acnI* (89 aminosyrer), predikert som et mulig immunitetsprotein grunnet den relativt lille størrelsen og hydrofobisiteten. Årsaken til at en lengre sekvens ble benyttet var fordi leserammen til *acnI* inneholdt to mulige startkodon, hvor det første lå 15 aminosyrer oppstrøms for det andre, og for å sikre at riktig leseramme ble dekket i gensekvensen ble disse 15 aminosyrene inkludert for *acnI*. I tillegg hadde AcnF allerede vist å ikke bidra til immunitet, men dette var ikke undersøkt for AcnI.

L. lactis acnDEI viste seg å være mer sensitiv mot amylocyclicin enn *L. lactis acnDE*, noe som tyder på at det predikerte immunitetsproteinet AcnI ikke er viktig for immuniteten, og samsvarer med funn fra Scholz et al. (2014) (49). Dette var likevel et overraskende funn da det var forventet at *L. lactis acnDEI* i det minste skulle være like immun mot amylocyclicin som *L. lactis acnDE*. Resultatet tyder på at gnuttrykket av *acnI* i *L. lactis acnDEI* på en eller annen måte forstyrret immunitetseffekten av AcnDE. Det er vanskelig å si noe om hvorfor dette skjer, men det er mulig at de 15 ekstra aminosyrene som ble inkludert for *acnI* påvirker immunitetsfunksjonen til klusteret og at disse ikke inkluderes ved naturlig uttrykk av bakteriocinklusteret.

Samlet sett tyder dette på at tidligere predikerte immunitetsproteinet AcnF, og AcnI fra dette forsøket, ikke bidrar til økt immunitet mot amylocyclicin, og det gjenstår derfor å finne ut om det er andre gener i klusteret som koder for et spesifikt immunprotein. Det er antatt at sirkulære

bakteriocinens immunitetsprotein ikke er nok i seg selv for fullstendig immunitet, men at det kreves bidrag fra flere genprodukter i bakteriocinklusteret (23). Dette er også trolig tilfellet for amylocyclicin, hvor AcnDE bidrar til immunitet selv om de ikke er dedikerte immunitetsprotein, men de gir ikke full immunitet mot amylocyclicin.

4.3 Stabilitet amylocyclicin

Amylocyclicin viste seg å være stabil mot både varme og pH forandringer. Hverken høy (pH 10) eller lav (pH 2) påvirket effekten av amylocyclicin over tid (Figur 3.7.1). Likevel ble det observert en liten nedgang i aktivitet ved første måling (1 time inkubering i pH-bufferne). Årsaken til at pH kan påvirke aktiviteten noe kan komme av at peptidets ladning endres, som kan være avgjørende for bakteriocinets virkemåte og interaksjon med cellemembranen hos målbakterien. Endringer i pH kan også føre til at bakteriocinets struktur endres, men siden amylocyclicin gjenopptok aktiviteten ved senere målinger har eventuelle endringer i struktur trolig ikke vært varige.

Sammenlignet med nisin A, som er et mye brukt konserveringsmiddel, hadde amylocyclicin generelt sett bedre pH-stabilitet. Amylocyclicin mistet heller ikke aktivitet etter å bli utsatt høy varme og tørking. Denne stabiliteten er viktig dersom bakteriocinet skal benyttes i klinisk eller industrielt, da det hindrer tap av aktivitet dersom bakteriocinet utsettes for forhold med høy temperatur, tørking, eller pH-forandringer gjennom eventuell produksjon og lagring. I tillegg sikrer stabiliteten at bakteriocinet ikke mister sin aktivitet dersom det benyttes klinisk til å behandle infeksjoner, da det er ulike pH-nivå i ulike deler av kroppen.

Ett uventet resultat var at bakteriocinet var sensitivt mot proteinase K (Figur 3.7.1). Sirkulære bakteriociner er ofte resistente mot proteaser på grunn av deres struktur, og tidligere studier har vist at amylocyclicin er resistent mot trypsin (23,49). Proteasesensitiviteten ble observert ved at den antimikrobielle aktiviteten til amylocyclicin (mest aktive RPC-fraksjon) ble hemmet i nærvær av proteinase K. Dersom noe av aktiviteten fra amylocyclicinløsningen stammet fra andre antimikrobielle peptider kan dette være årsaken til inhiberingen fra proteinase K. Dette kunne blitt undersøkt ved å se om amylocyclicin faktisk ble spaltet av proteinase K ved å undersøke massespekter av proteasebehandlet amylocyclicin. Proteasesensitivitet kan være en utfordring ved praktisk anvendelse av bakteriocinet da det reduserer stabiliteten og bakteriocinet kan bli brutt ned før det når målbakterien. På den andre siden gjør medfører

sensitiviteten at proteaser kan benyttes for å kontrollere aktiviteten av bakteriocinet dersom det er nødvendig.

4.4 Aktivitet mot patogener

Amylocyclicin viste seg å ha et bredt inhiberingsspekter mot Gram-positive arter, inkludert patogener som *S. aureus* og *L. monocytogenes*. Aktiviteten observert mot *S. aureus* skiller seg fra tidligere studie av Scholz et al. (2014), hvor aktivitet fra amylocyclicin ikke ble observert for denne arten (49). Dette kan bety at aktiviteten mot *S. aureus* er stammespesifikk, eller at det ikke ble brukt tilstrekkelig konsentrasjon amylocyclicin til å inhibere *S. aureus* stammen. En annen årsak til denne forskjellen kan komme av at Scholz et al. (2014) benyttet en amylocyclicin-produsent med fjernet produksjon av lipopeptider, polyketider og bacilysiner (49). Både lipopeptider, polyketider og bacilysiner er dokumentert å ha antimikrobiell aktivitet, og dersom slike peptider var til stede i amylocyclicinløsningen (RPC-fraksjon) kan det være årsaken til den observerte aktiviteten mot *S. aureus* (90–93).

Amylocyclicin hadde også aktivitet mot de patogene *Enterococcus* stammene *E. faecalis* og *E. faecium*, men i likhet med *S. aureus* var denne aktiviteten lav da kun uforynnet amylocyclicin inhiberte stammene. Til sammenligning var amylocyclicin aktiv mot 17 ulike *L. monocytogenes* stammer, hvor 12 av disse ble inhibert av 100-ganger fortynt amylocyclicin. Flere av *L. monocytogenes* stammene brukt i forsøket er isolert fra matvarer, noe som viser at bakteriocinet har et potensial som konserveringsmiddel for å hindre vekst av *L. monocytogenes* i matvarer utsatt for vekst av bakterien.

4.5 Aktivitet mot *Listeria monocytogenes*

4.5.1 Amylocyclicinbehandling av biofilm fra *L. monocytogenes*

Biofilm fra *L. monocytogenes* LMGT 3744 ble utsatt for amylocyclicin, noe som viste seg å være effektivt for å ødelegge biofilmen. Antall levende celler i biofilmen ble tydelig redusert, og 3D-bilder av biofilmen viste også at celletettheten var redusert etter behandlingen med amylocyclicin (Figur 3.9.3). Biofilm er som nevnt tidligere ett problem i både mat- og helseindustrien, og dette forsøket viser potensialet bakteriocinet kan ha i utryddelsen av biofilm. I dette forsøket ble biofilmene kun dyrket i glass- og plastikkbrønner. Det er derfor interessant

å videre undersøke om bakteriocinet fungerer mot biofilm dyrket på flere typer overflater, som implantater som brukes i helseindustrien, og typiske overflater i matproduksjon som rustfritt stål og ulike typer emballasje.

CFU-tellinger fra biofilmen etter amylocyclicinbehandling viste at det fortsatt var levedyktige celler til stede i biofilmen, selv om det ikke så slik ut etter TTC-fargingen hvor brønnene med tilstrekkelig konsentrasjon amylocyclicin var fargeløse (ikke metabolsk aktive), vist i Figur 3.9.2. Dette viser at behandlingen ikke klarer å drepe alle cellene i biofilmen. En trolig årsak kan være at celler i biofilmen har gått i «dvale» og ikke er metabolsk aktive, noe som heller ikke vil gi rødfarge ved tilsetning av TTC. Celler som er i denne tilstanden er ofte mer tolerante mot antimikrobielle stoffer, noe som også observeres i dette forsøket (88). For å fullstendig utslette biofilmen fra *L. monocytogenes* kan det være nødvendig å kombinere amylocyclicin med andre behandlinger som dreper celler i denne tilstanden.

4.5.2 Amylocyclicinbehandling av *L. monocytogenes* på røkt laks

Røkt laks er et spiseklart produkt (krever ingen oppvarming eller tilberedning), og var trolig kilden bak det seneste listeriose utbruddet i Norge (74). En polsk studie fra 2016 undersøkte tilstedeværelsen av *L. monocytogenes* fra 152 prøver med røkt laks, hvor det viste seg at 18.4% var positive for bakterien (94). Flere av disse isolatene viste seg også å være resistente og multiresistente mot antimikrobielle forbindelser (94). Studien understreker risikoen for *L. monocytogenes* kontaminering av røkt laks, og en måte å minske risikoen for vekst av bakterien på røkt laks, og eventuelt andre spiseklare produkter, er å behandle disse med bakteriociner. Dette forsøket viste at å dyppe røkt laks i amylocyclicinløsning (tørket amylocyclicin resuspendert i saltvann) effektivt hemmer vekst av *L. monocytogenes*, også over tid (Figur 3.10.1 og Figur 3.10.2). En slik type behandling vil dermed kunne bidra til å hindre smitte av bakterien, i tillegg til å forlenge holdbarheten på produktet.

I dette forsøket ble fisken lagret på 30 °C for å fremskynde veksten av *L. monocytogenes* grunnet begrenset tid til rådighet, og ikke på 1-4 °C slik røkt laks normalt lagres. Det er derfor vanskelig å si hvor mange dager forlenget holdbarhet med tanke på vekst av *L. monocytogenes* denne behandlingen gir, men ved 30 °C hindret amylocyclicin vekst av bakterien i minst syv dager (forsøkets lengde). Dette tilsvarer betydelig lengre tid ved 4 °C, da *L. monocytogenes* vokser mye saktere ved 4 °C versus optimumstemperatur (30-37 °C) (66).

Ifølge EUs retningslinjer for spiseklare produkter som støtter vekst av *L. monocytogenes*, skal ikke mengden *L. monocytogenes* overskride 100 CFU/g i løpet av holdbarhetstiden (66). I dette forsøket ble det ikke utført CFU-beregninger av mengde *L. monocytogenes* Xen32 som var til stede på fiskebitene ved forsøkets slutt. CFU burde blitt beregnet for å finne ut om all *L. monocytogenes* faktisk var blitt drept av amylocyclicinbehandlingene, da nåværende resultat kun bekrefter at cellene ikke produserer lys og dermed ikke er metabolsk aktive. Dette kunne blitt gjort ved å homogenisere fisken og spre den på agarskåler, hvor eventuell vekst av *L. monocytogenes* Xen32 ville blitt detektert ved måling av bioluminescens slik som i Vedlegg 4.

Den positive kontrollen med kun *L. monocytogenes* Xen32 viste en tydelig nedgang i bioluminescens fra dag 5 til dag 7. Dette tyder på at vekstforholdene var såpass redusert at *L. monocytogenes* Xen32 ikke lenger klarte å vokse ved dag 7. Da dette var tilfellet for positiv kontroll er det naturlig å tro at det i vert fall ikke befant seg levende *L. monocytogenes* celler ved dette tidspunktet på de behandlede prøvene. Det kan likevel ikke utelukkes at cellene hadde dannet biofilm og befant seg i «dvale» slik som beskrevet i 4.4.1, eller at veksten kunne blomstret opp igjen slik den gjorde for en av de positive kontrollene mellom dag 2 og 5 (Figur 3.10.1).

Ved en gjentakelse av et slikt forsøk burde det bli forsøkt å inkubere fisken på 4 °C for å direkte kunne måle forlengelse i holdbarhet med tanke på vekst av *L. monocytogenes*. I tillegg bør forsøket inkludere flere paralleller slik at CFU kan beregnes underveis i forsøket, og verifisere om bakteriocinet faktisk dreper *L. monocytogenes*. Det bør også undersøkes om amylocyclicin, eller andre bakteriociner, har denne effekten på *L. monocytogenes* i andre spiseklare produkter som fremmer vekst av bakterien. I tillegg må det vurderes hvordan en bakteriocinbehandling av matvarer kan foregå i praksis, det ikke nødvendigvis er gjennomførbart å dyppe all fisk i en amylocyclicinløsning under produksjon. Det er viktig å velge en behandling som både er effektiv mot *L. monocytogenes*, men som også er kostnads- og tidseffektiv.

4.6 Amylocyclicin er en poredanner med ukjent virkemåte

Den antimikrobielle virkemåten til sirkulære bakteriociner er antatt å avhenge av en interaksjon mellom bakteriocinet og målbakteriens cellemembran, eller en reseptor på overflaten av cellemembranen, som fører til ødeleggelse av membranpermeabiliteten og lekkasje av intracellulære stoffer (21,23). I dette studiet ble det bekreftet at dette også var tilfellet for

amylocyclicin, da propidiumjodid- og pHluorin-analysen viste at bakteriocinet forårsaket poredannelse hos både *L. monocytogenes* og *L. lactis* (Figur 3.8.1 og Figur 3.8.2).

Amylocyclicins virkemåte har delvis blitt undersøkt i studie av Zhang et al. (2022), hvor to sirkulære bakteriociner produsert av *Bacillus cogulans*, predikert til å være circularin A og amylocyclicin, forårsaket lekkasje av intracellulære forbindelser hos målbakterien (95). I studien til Zhang et al. (2022) ble imidlertid ikke de to bakteriocinene separert fra hverandre, og det kan derfor ikke konkluderes om poredannelsen skyldtes kun ett av bakteriocinene eller begge (95). I dette studiet ble det ikke predikert andre sirkulære bakteriociner fra *B. velezensis* B2002, men som nevnt tidligere kan deler av aktiviteten skyldes eventuelle lipopeptider som også har evnen til å danne porer hos målbakteriens cellemembran (96). Likevel er det rimelig å konkludere med at amylocyclicin er et poredannende bakteriocin basert på tidligere antagelser av sirkulære bakteriociners virkemåte og resultat fra dette forsøket.

Til tross for at det ble observert at amylocyclicin danner porer hos målbakterien ble det ikke undersøkt hvordan dette faktisk skjer og om det er en spesifikk reseptor involvert. Sirkulære bakteriociner har vært antatt å kunne interagere med cellemembranen til målbakterien direkte, uten å binde til ett reseptormolekyl (23). Med tanke på amylocyclicins brede hemmingsspekter kan dette også være tilfellet for dette bakteriocinet, da aktiviteten ikke avhenger strukturer som er artsspesifikke (for Gram-positive).

En måte å identifisere reseptormolekyler på er å se etter og screene resistente mutantkolonier som oppstår i inhiberingssonene til bakteriociner. For bakteriociner som er avhengige av en interaksjon med et spesifikt protein (reseptor) vil spontane mutanter med endret struktur eller uttrykk av dette proteinet kunne vokse selv med bakteriocinet til stede (97). I slike tilfeller kan bakteriocinet selv selektere for slike mutanter. I spot-on-lawn forsøkene knyttet til inhiberingsspekter ble det ikke observert resistente mutantkolonier i inhiberingssonene til amylocyclicin for noen av stammene i panelet. Dette utelukker ikke muligheten for reseptorbinding som en del av amylocyclicins virkemåte, men gir en indikasjon på at en eventuell reseptor ikke er en direkte DNA-kodet struktur hos målbakterien. Det gjenstår fortsatt å finne eksakte virkemåte for amylocyclicin, noe som er viktig dersom bakteriocinet skal kunne vurderes til praktisk bruk.

5 Konklusjon og videre arbeid

Målet for denne oppgaven var å identifisere, isolere, og karakterisere et antimikrobielt stoff produsert av *B. velezensis* B2002. Fra helgenomsekvensering av stammen ble to potensielle bakteriociner predikert, og ved hjelp av rensing og massespektrometri ble det konkludert med at stammen produserte det sirkulære bakteriocinet amylocyclicin. Amylocyclicin ble ikke fullstendig isolert, og massespekteret viste at stammen også produserer en del andre små peptider, trolig lipopeptider, som kan ha påvirket aktiviteten til amylocyclicin på en ukjent måte. Amylocyclicin ble videre karakterisert og viste seg å være svært stabil mot pH og varmemeforandringer, men var noe overraskende proteasesensitiv. Det ble også identifisert at amylocyclicin danner porer hos målbakterier som en del av sin antimikrobielle virkemåte. Amylocyclicin hadde antimikrobiell aktivitet mot Gram-positive bakterier, men ikke Gram-negative, noe som var som forventet. Bakteriocinet viste spesielt god aktivitet mot *L. monocytogenes* og biofilm produsert fra bakterien. I tillegg viste behandling med amylocyclicin av røkt laks kontaminert med *L. monocytogenes* seg å være svært effektiv.

Fremtidig arbeid vil innebære å finne en bedre renseprosess av amylocyclicin fra *B. velezensis* B2002, slik at den antimikrobielle aktiviteten fra bakteriocinet kan bekreftes. Dette kan gjøres ved hjelp av kloning av bakteriocinklusteret, som forsøkt i denne oppgaven, eller ved å mutere produsentstammen til å ikke produsere andre potensielt antimikrobielle peptider. Dersom bakteriocinet skal kunne anvendes i industrien kan genmodifisering av produsenten være en utfordring, og derfor bør også godkjente og mer effektive rensemetoder undersøkes.

På grunn av amylocyclicins høye stabilitet og aktivitet mot patogener har bakteriocinet et brukspotensial som konserveringsmiddel eller som ett alternativ til antibiotika. Videre arbeid bør derfor også inkludere å teste effekten av amylocyclicin sammen med andre bakteriociner eller antibiotikum, for å undersøke om dette øker effektiviteten og reduserer forekomsten av resistens fra eksisterende antibiotikum. Dette vil kunne bidra til å redusere antibiotikabruk, noe som er helt essensielt for å løse den globale utfordringen knyttet til antibiotikaresistens. For at dette skal kunne skje kreves det generelt mer forskning på bakteriociner, inkludert amylocyclicin, spesielt med tanke på deres virkemåte og effekt *in vivo*.

6 Referanser

1. Hutchings MI, Truman AW, Wilkinson B. Antibiotics: past, present and future. *Curr Opin Microbiol*. 2019 Oct;51:72–80.
2. Kapoor G, Saigal S, Elongavan A. Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians. *J Anaesthesiol Clin Pharmacol*. 2017;33(3):300.
3. Vollmer W, Blanot D, de Pedro MA. Peptidoglycan structure and architecture. *FEMS Microbiol Rev*. 2008 Mar;32(2):149–67.
4. Murray CJ, Ikuta KS, Sharara F, Swetschinski L, Robles Aguilar G, Gray A, et al. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *The Lancet*. 2022 Feb;399(10325):629–55.
5. Reygaert WC. An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. *AIMS Microbiol*. 2018;4(3):482–501.
6. World health organization. Antimicrobial resistance [Internet]. 2021 [cited 2022 Oct 22]. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>
7. Cotter PD, Hill C, Ross RP. Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nat Rev Microbiol*. 2005 Oct;3(10):777–88.
8. Zimina M, Babich O, Prosekov A, Sukhikh S, Ivanova S, Shevchenko M, et al. Overview of global trends in classification, methods of preparation and application of bacteriocins. *Antibiotics*. 2020 Sep 1;9(9):1–21.
9. Acedo JZ, Chiorean S, Vederas JC, van Belkum MJ. The expanding structural variety among bacteriocins from Gram-positive bacteria. Vol. 42, *FEMS Microbiology Reviews*. Oxford University Press; 2018. p. 805–28.
10. Cotter PD, Ross RP, Hill C. Bacteriocins-a viable alternative to antibiotics? Vol. 11, *Nature Reviews Microbiology*. 2013. p. 95–105.
11. Alvarez-Sieiro P, Montalbán-López M, Mu D, Kuipers OP. Bacteriocins of lactic acid bacteria: extending the family. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2016 Apr 10;100(7):2939–51.
12. Antoshina D V., Balandin S V., Ovchinnikova T V. Structural Features, Mechanisms of Action, and Prospects for Practical Application of Class II Bacteriocins. *Biochemistry (Moscow)*. 2022 Nov 17;87(11):1387–403.
13. Ovchinnikov K V., Kranjec C, Thorstensen T, Carlsen H, Diep DB. Successful Development of Bacteriocins into Therapeutic Formulation for Treatment of MRSA

- Skin Infection in a Murine Model. *Antimicrob Agents Chemother.* 2020 Nov 17;64(12).
14. Kranjec C, Ovchinnikov K V., Grønseth T, Ebineshan K, Srikantam A, Diep DB. A bacteriocin-based antimicrobial formulation to effectively disrupt the cell viability of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) biofilms. *NPJ Biofilms Microbiomes.* 2020 Dec 2;6(1):58.
 15. Kobayashi Y, Ichioka M, Hirose T, Nagai K, Matsumoto A, Matsui H, et al. Bottromycin derivatives: Efficient chemical modifications of the ester moiety and evaluation of anti-MRSA and anti-VRE activities. *Bioorg Med Chem Lett.* 2010 Oct 15;20(20):6116–20.
 16. Arnusch CJ, Bonvin AMJJ, Verel AM, Jansen WTM, Liskamp RMJ, de Kruijff B, et al. The Vancomycin–Nisin(1–12) Hybrid Restores Activity against Vancomycin Resistant Enterococci. *Biochemistry.* 2008 Dec 2;47(48):12661–3.
 17. Klaenhammer TR. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Rev.* 1993 Sep;12(1–3):39–85.
 18. Arnison PG, Bibb MJ, Bierbaum G, Bowers AA, Bugni TS, Bulaj G, et al. Ribosomally synthesized and post-translationally modified peptide natural products: overview and recommendations for a universal nomenclature. *Nat Prod Rep.* 2013;30(1):108–60.
 19. Knerr PJ, van der Donk WA. Discovery, Biosynthesis, and Engineering of Lantipeptides. *Annu Rev Biochem.* 2012 Jul 7;81(1):479–505.
 20. Shin JM, Gwak JW, Kamarajan P, Fenno JC, Rickard AH, Kapila YL. Biomedical applications of nisin. *J Appl Microbiol.* 2016 Jun 12;120(6):1449–65.
 21. Perez RH, Zendo T, Sonomoto K. Circular and leaderless bacteriocins: Biosynthesis, mode of action, applications, and prospects. Vol. 9, *Frontiers in Microbiology.* Frontiers Media S.A.; 2018.
 22. Towle KM, Vederas JC. Structural features of many circular and leaderless bacteriocins are similar to those in saposins and saposin-like peptides. *Medchemcomm.* 2017;8(2):276–85.
 23. Gabrielsen C, Brede DA, Nes IF, Diep DB. Circular Bacteriocins: Biosynthesis and Mode of Action. *Appl Environ Microbiol.* 2014 Nov 15;80(22):6854–62.
 24. Choudhary P, Rao A. SELECT-GLYCOCIN: a recombinant microbial system for expression and high-throughput screening of glycocins. *Glycoconj J.* 2021 Apr 18;38(2):233–50.

25. Stepper J, Shastri S, Loo TS, Preston JC, Novak P, Man P, et al. Cysteine S - glycosylation, a new post-translational modification found in glycopeptide bacteriocins. *FEBS Lett.* 2011 Feb 18;585(4):645–50.
26. Paik SH, Chakicherla A, Hansen JN. Identification and Characterization of the Structural and Transporter Genes for, and the Chemical and Biological Properties of, Sublancin 168, a Novel Lantibiotic Produced by *Bacillus subtilis* 168. *Journal of Biological Chemistry.* 1998 Sep;273(36):23134–42.
27. Hegemann JD, Zimmermann M, Xie X, Marahiel MA. Lasso Peptides: An Intriguing Class of Bacterial Natural Products. *Acc Chem Res.* 2015 Jul 21;48(7):1909–19.
28. Cui Y, Zhang C, Wang Y, Shi J, Zhang L, Ding Z, et al. Class IIa Bacteriocins: Diversity and New Developments. *Int J Mol Sci.* 2012 Dec 6;13(12):16668–707.
29. Nissen-Meyer J, Oppegård C, Rogne P, Haugen HS, Kristiansen PE. Structure and Mode-of-Action of the Two-Peptide (Class-IIb) Bacteriocins. *Probiotics Antimicrob Proteins.* 2010 Mar 3;2(1):52–60.
30. Hanchi H, Hammami R, Fernandez B, Kourda R, Ben Hamida J, Fliss I. Simultaneous Production of Formylated and Nonformylated Enterocins L50A and L50B as well as 61A, a New Glycosylated Durancin, by *Enterococcus durans* 61A, a Strain Isolated from Artisanal Fermented Milk in Tunisia. *J Agric Food Chem.* 2016 May 11;64(18):3584–90.
31. Acedo JZ, van Belkum MJ, Lohans CT, Towle KM, Miskolzie M, Vederas JC. Nuclear Magnetic Resonance Solution Structures of Lacticin Q and Aureocin A53 Reveal a Structural Motif Conserved among Leaderless Bacteriocins with Broad-Spectrum Activity. *Biochemistry.* 2016 Jan 15;55(4):733–42.
32. Swe PM, Cook GM, Tagg JR, Jack RW. Mode of action of dysgalactin: a large heat-labile bacteriocin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 2009 Feb 17;63(4):679–86.
33. Parks WM, Bottrill AR, Pierrat OA, Durrant MC, Maxwell A. The action of the bacterial toxin, microcin B17, on DNA gyrase. *Biochimie.* 2007 Apr;89(4):500–7.
34. Delgado MA, Rintoul MR, Farías RN, Salomón RA. *Escherichia coli* RNA Polymerase Is the Target of the Cyclopeptide Antibiotic Microcin J25. *J Bacteriol.* 2001 Aug 1;183(15):4543–50.
35. Breukink E, de Kruijff B. Lipid II as a target for antibiotics. Vol. 5, *Nature Reviews Drug Discovery.* 2006. p. 321–3.

36. Martínez B, Böttiger T, Schneider T, Rodríguez A, Sahl HG, Wiedemann I. Specific Interaction of the Unmodified Bacteriocin Lactococcin 972 with the Cell Wall Precursor Lipid II. *Appl Environ Microbiol.* 2008 Aug;74(15):4666–70.
37. Diep DB, Skaugen M, Salehian Z, Holo H, Nes IF. Common mechanisms of target cell recognition and immunity for class II bacteriocins. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2007 Feb 13;104(7):2384–9.
38. Oftedal TF, Ovchinnikov K V., Hestad KA, Goldbeck O, Porcellato D, Narvhus J, et al. Ubericin K, a New Pore-Forming Bacteriocin Targeting mannose-PTS. *Microbiol Spectr.* 2021 Oct 31;9(2).
39. Wu C, Biswas S, Garcia De Gonzalo C V., van der Donk WA. Investigations into the Mechanism of Action of Sublancin. *ACS Infect Dis.* 2019 Mar 8;5(3):454–9.
40. Yoneyama F, Imura Y, Ohno K, Zendo T, Nakayama J, Matsuzaki K, et al. Peptide-Lipid Huge Toroidal Pore, a New Antimicrobial Mechanism Mediated by a Lactococcal Bacteriocin, Lacticin Q. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009 Aug 1;53(8):3211–7.
41. Bhattacharjee R, Nandi A, Sinha A, Kumar H, Mitra D, Mojumdar A, et al. Phage-tail-like bacteriocins as a biomedical platform to counter anti-microbial resistant pathogens. *Biomedicine & Pharmacotherapy.* 2022 Nov;155:113720.
42. Samyn B, Martinez-Bueno M, Devreese B, Maqueda M, Gálvez A, Valdivia E, et al. The cyclic structure of the enterococcal peptide antibiotic AS-48. *FEBS Lett.* 1994 Sep 19;352(1):87–90.
43. Kemperman R, Kuipers A, Karsens H, Nauta A, Kuipers O, Kok J. Identification and Characterization of Two Novel Clostridial Bacteriocins, Circularin A and Closticin 574. *Appl Environ Microbiol.* 2003 Mar;69(3):1589–97.
44. Wirawan RE, Swanson KM, Kleffmann T, Jack RW, Tagg JR. Uberolysin: a novel cyclic bacteriocin produced by *Streptococcus uberis*. *Microbiology (N Y).* 2007 May 1;153(5):1619–30.
45. Martin-Visscher LA, van Belkum MJ, Garneau-Tsodikova S, Whittal RM, Zheng J, McMullen LM, et al. Isolation and Characterization of Carnocyclin A, a Novel Circular Bacteriocin Produced by *Carnobacterium maltaromaticum* UAL307. *Appl Environ Microbiol.* 2008 Aug;74(15):4756–63.
46. Sawa N, Zendo T, Kiyofuji J, Fujita K, Himeno K, Nakayama J, et al. Identification and Characterization of Lactocyclicin Q, a Novel Cyclic Bacteriocin Produced by *Lactococcus* sp. Strain QU 12. *Appl Environ Microbiol.* 2009 Mar 15;75(6):1552–8.

47. Borrero J, Brede DA, Skaugen M, Diep DB, Herranz C, Nes IF, et al. Characterization of Garvicin ML, a Novel Circular Bacteriocin Produced by *Lactococcus garvieae* DCC43, Isolated from Mallard Ducks (*Anas platyrhynchos*). *Appl Environ Microbiol.* 2011 Jan;77(1):369–73.
48. Masuda Y, Ono H, Kitagawa H, Ito H, Mu F, Sawa N, et al. Identification and Characterization of Leucocyclicin Q, a Novel Cyclic Bacteriocin Produced by *Leuconostoc mesenteroides* TK41401. *Appl Environ Microbiol.* 2011 Nov 15;77(22):8164–70.
49. Scholz R, Vater J, Budiharjo A, Wang Z, He Y, Dietel K, et al. Amylocyclicin, a novel circular bacteriocin produced by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *J Bacteriol.* 2014;196(10):1842–52.
50. Potter A, Ceotto H, Coelho MLV, Guimarães AJ, Bastos M do C de F. The gene cluster of aureocyclicin 4185: the first cyclic bacteriocin of *Staphylococcus aureus*. *Microbiology (N Y).* 2014 May 1;160(5):917–28.
51. Himeno K, Rosengren KJ, Inoue T, Perez RH, Colgrave ML, Lee HS, et al. Identification, Characterization, and Three-Dimensional Structure of the Novel Circular Bacteriocin, Enterocin NKR-5-3B, from *Enterococcus faecium*. *Biochemistry.* 2015 Aug 11;54(31):4863–76.
52. van Heel AJ, Montalban-Lopez M, Oliveau Q, Kuipers OP. Genome-guided identification of novel head-to-tail cyclized antimicrobial peptides, exemplified by the discovery of pumilarin. *Microb Genom.* 2017 Oct 1;3(10).
53. Xin B, Liu H, Zheng J, Xie C, Gao Y, Dai D, et al. *In Silico* Analysis Highlights the Diversity and Novelty of Circular Bacteriocins in Sequenced Microbial Genomes. *mSystems.* 2020 Jun 30;5(3).
54. Xin B, Xu H, Liu H, Liu S, Wang J, Xue J, et al. Identification and characterization of a novel circular bacteriocin, bacicyclicin XIN-1, from *Bacillus* sp. Xin1. *Food Control.* 2021 Mar;121:107696.
55. Kawai Y, Saito T, Kitazawa H, Itoh T. Gassericin A; an Uncommon Cyclic Bacteriocin Produced by *Lactobacillus gasseri* LA39 Linked at N - and C -Terminal Ends. *Biosci Biotechnol Biochem.* 1998 Jan 22;62(12):2438–40.
56. Kalmokoff ML, Cyr TD, Hefford MA, Whitford MF, Teather RM. Butyriovibriocin AR10, a new cyclic bacteriocin produced by the ruminal anaerobe *Butyriovibrio fibrisolvens* AR10: characterization of the gene and peptide. *Can J Microbiol.* 2003 Dec 1;49(12):763–73.

57. Acedo JZ, van Belkum MJ, Lohans CT, McKay RT, Miskolzie M, Vederas JC. Solution Structure of Acidocin B, a Circular Bacteriocin Produced by *Lactobacillus acidophilus* M46. *Appl Environ Microbiol.* 2015 Apr 15;81(8):2910–8.
58. Borrero J, Kelly E, O'Connor PM, Kelleher P, Scully C, Cotter PD, et al. Plantaricyclin A, a Novel Circular Bacteriocin Produced by *Lactobacillus plantarum* NI326: Purification, Characterization, and Heterologous Production. *Appl Environ Microbiol.* 2018 Jan;84(1).
59. Golneshin A, Gor MC, Williamson N, Vezina B, Van TTH, May BK, et al. Discovery and characterisation of circular bacteriocin plantacyclin B21AG from *Lactiplantibacillus plantarum* B21. *Heliyon.* 2020 Aug;6(8):e04715.
60. Gabrielsen C, Brede DA, Salehian Z, Nes IF, Diep DB. Functional Genetic Analysis of the GarML Gene Cluster in *Lactococcus garvieae* DCC43 Gives New Insights into Circular Bacteriocin Biosynthesis. *J Bacteriol.* 2014 Mar 1;196(5):911–9.
61. Perez RH, Sugino H, Ishibashi N, Zendo T, Wilaipun P, Leelawatcharamas V, et al. Mutations near the cleavage site of enterocin NKR-5-3B prepeptide reveal new insights into its biosynthesis. *Microbiology (N Y).* 2017 Apr 1;163(4):431–41.
62. Gálvez A, Maqueda M, Martínez-Bueno M, Valdivia E. Permeation of bacterial cells, permeation of cytoplasmic and artificial membrane vesicles, and channel formation on lipid bilayers by peptide antibiotic AS-48. *J Bacteriol.* 1991 Jan;173(2):886–92.
63. Gong X, Martin-Visscher LA, Nahirney D, Vederas JC, Duszyk M. The circular bacteriocin, carnocyclin A, forms anion-selective channels in lipid bilayers. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes.* 2009 Sep;1788(9):1797–803.
64. Kawai Y, Ishii Y, Arakawa K, Uemura K, Saitoh B, Nishimura J, et al. Structural and Functional Differences in Two Cyclic Bacteriocins with the Same Sequences Produced by *Lactobacilli*. *Appl Environ Microbiol.* 2004 May;70(5):2906–11.
65. Gabrielsen C, Brede DA, Hernández PE, Nes IF, Diep DB. The Maltose ABC Transporter in *Lactococcus lactis* Facilitates High-Level Sensitivity to the Circular Bacteriocin Garvicin ML. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012 Jun;56(6):2908–15.
66. Bergis H, Bonanno L, Asséré A, Lombard B, Polet M, Andersen JK. EURL Lm TECHNICAL GUIDANCE DOCUMENT on challenge tests and durability studies for assessing shelf-life of ready-to-eat foods related to *Listeria monocytogenes* In collaboration with a working group of representatives of National Reference Laboratories (NRLs) for *Listeria monocytogenes* and a Competent Authority (CA) [Internet]. 2021. Available from: <http://eurl-listeria.anses.fr>

67. Osek J, Lachtara B, Wieczorek K. *Listeria monocytogenes* – How This Pathogen Survives in Food-Production Environments? *Front Microbiol.* 2022 Apr 26;13.
68. Olaimat AN, Al-Holy MA, Shahbaz HM, Al-Nabulsi AA, Abu Ghoush MH, Osaili TM, et al. Emergence of Antibiotic Resistance in *Listeria monocytogenes* Isolated from Food Products: A Comprehensive Review. *Compr Rev Food Sci Food Saf.* 2018 Sep;17(5):1277–92.
69. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. *Clin Microbiol Rev.* 2002 Apr;15(2):167–93.
70. Fagerlund A, Møretrø T, Heir E, Briandet R, Langsrud S. Cleaning and Disinfection of Biofilms Composed of *Listeria monocytogenes* and Background Microbiota from Meat Processing Surfaces. *Appl Environ Microbiol.* 2017 Sep 1;83(17).
71. Dincer S, Masume Uslu F, Delik A. Antibiotic Resistance in Biofilm. In: Dincer S, Özdenefe MS, Arkut A, editors. *Bacterial Biofilms.* IntechOpen; 2020.
72. Fagerlund A, Heir E, Møretrø T, Langsrud S. *Listeria Monocytogenes* Biofilm Removal Using Different Commercial Cleaning Agents. *Molecules.* 2020 Feb 12;25(4):792.
73. Qiao Z, Zhang L, Wang X, Liu B, Shan Y, Yi Y, et al. Antibiofilm Effects of Bacteriocin BMP32r on *Listeria monocytogenes*. *Probiotics Antimicrob Proteins.* 2022 Dec 28;14(6):1067–76.
74. Folkehelseinstituttet. Utbrudd av listeriose i Norge [Internet]. 2023 Mar [cited 2023 Mar 21]. Available from: <https://www.fhi.no/sv/utbrudd/oversikt-over-storre-utbrudd/utbrudd-av-listeriose-i-norge/>
75. World Health Organization. Listeriosis [Internet]. 2018 Feb [cited 2023 Mar 20]. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/listeriosis>
76. Kusunur AB, Vaiyapuri M, Rao Badireddy M. Emergence of Antimicrobial Resistance in Seafood-Borne *Listeria monocytogenes*: An Overview. In: *Handbook on Antimicrobial Resistance.* Singapore: Springer Nature Singapore; 2023. p. 1–16.
77. Heir E, Solberg LE, Carlehög M, Moen B, Jensen MR, Holck AL. Improved control of *Listeria monocytogenes* during storage of raw salmon by treatment with the fermentate Verdad N6 and nisin. *Int J Food Microbiol.* 2021 Jan 2;336:108895.
78. Soni KA, Shen Q, Nannapaneni R. Reduction of *Listeria monocytogenes* in cold-smoked salmon by bacteriophage P100, nisin and lauric arginate, singly or in combinations. *Int J Food Sci Technol.* 2014 Aug;49(8):1918–24.

79. Crauwels P, Schäfer L, Weixler D, Bar NS, Diep DB, Riedel CU, et al. Intracellular pHluorin as Sensor for Easy Assessment of Bacteriocin-Induced Membrane-Damage in *Listeria monocytogenes*. *Front Microbiol.* 2018 Dec 11;9.
80. Ovchinnikov K V., Oftedal TF, Reich SJ, Bar NS, Holo H, Skaugen M, et al. Genome-assisted Identification, Purification, and Characterization of Bacteriocins. *Bio Protoc.* 2022 Jul 20;12(14).
81. Holo H, Nes IF. High-Frequency Transformation, by Electroporation, of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* Grown with Glycine in Osmotically Stabilized Media. *Appl Environ Microbiol.* 1989 Dec;55(12):3119–23.
82. Rosenbergová Z, Oftedal TF, Ovchinnikov K V., Thiyagarajah T, Rebroš M, Diep DB. Identification of a Novel Two-Peptide Lantibiotic from *Vagococcus fluvialis*. *Microbiol Spectr.* 2022 Aug 31;10(4).
83. Rollema HS, Kuipers OP, Both P, de Vos WM, Siezen RJ. Improvement of solubility and stability of the antimicrobial peptide nisin by protein engineering. *Appl Environ Microbiol.* 1995 Aug;61(8):2873–8.
84. Reich SJ, Stohr J, Goldbeck O, Fendrich B, Crauwels P, Riedel CU. Improved fluorescent *Listeria* spp. biosensors for analysis of antimicrobials by flow cytometry. *Microbiologyopen.* 2022 Aug 30;11(4).
85. Moussa SH, Tayel AA, Al-Hassan AA, Farouk A. Tetrazolium/Formazan Test as an Efficient Method to Determine Fungal Chitosan Antimicrobial Activity. *J Mycol.* 2013 Jun 3;2013:1–7.
86. Shapiro JA, Nguyen VL, Chamberlain NR. Evidence for persisters in *Staphylococcus epidermidis* RP62a planktonic cultures and biofilms. *J Med Microbiol.* 2011 Jul 1;60(7):950–60.
87. Williamson KS, Richards LA, Perez-Osorio AC, Pitts B, McInnerney K, Stewart PS, et al. Heterogeneity in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms Includes Expression of Ribosome Hibernation Factors in the Antibiotic-Tolerant Subpopulation and Hypoxia-Induced Stress Response in the Metabolically Active Population. *J Bacteriol.* 2012 Apr 15;194(8):2062–73.
88. Wood TK, Knabel SJ, Kwan BW. Bacterial Persister Cell Formation and Dormancy. *Appl Environ Microbiol.* 2013 Dec;79(23):7116–21.
89. Hardy J, Francis KP, DeBoer M, Chu P, Gibbs K, Contag CH. Extracellular Replication of *Listeria monocytogenes* in the Murine Gall Bladder. *Science* (1979). 2004 Feb 6;303(5659):851–3.

90. Yu F, Shen Y, Qin Y, Pang Y, Fan H, Peng J, et al. Isolation and purification of antibacterial lipopeptides from *Bacillus velezensis* YA215 isolated from sea mangroves. *Front Nutr.* 2022 Nov 24;9.
91. Barale SS, Ghane SG, Sonawane KD. Purification and characterization of antibacterial surfactin isoforms produced by *Bacillus velezensis* SK. *AMB Express.* 2022 Dec 27;12(1).
92. Staunton J, Weissman KJ. Polyketide biosynthesis: a millennium review. *Nat Prod Rep.* 2001 Jun 4;18(4):380–416.
93. Özcengiz G, Ögülür İ. Biochemistry, genetics and regulation of bacilysin biosynthesis and its significance more than an antibiotic. *N Biotechnol.* 2015 Dec;32(6):612–9.
94. Wieczorek K, Osek J. Prevalence, genetic diversity and antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* isolated from fresh and smoked fish in Poland. *Food Microbiol.* 2017 Jun;64:164–71.
95. Zhang J, Gu S, Zhang T, Wu Y, Ma J, Zhao L, et al. Characterization and antibacterial modes of action of bacteriocins from *Bacillus coagulans* CGMCC 9951 against *Listeria monocytogenes*. *LWT.* 2022 Apr 15;160.
96. Inès M, Dhouha G. Lipopeptide surfactants: Production, recovery and pore forming capacity. *Peptides (NY).* 2015 Sep;71:100–12.
97. Ovchinnikov K V., Kristiansen PE, Straume D, Jensen MS, Aleksandrak-Piekarczyk T, Nes IF, et al. The Leaderless Bacteriocin Enterocin K1 Is Highly Potent against *Enterococcus faecium*: A Study on Structure, Target Spectrum and Receptor. *Front Microbiol.* 2017 May 3;8.

7 Vedlegg

Vedlegg 1

Tabell 7.1 Inhiberingsspekter til amylocyclicin (fullstendig tabell). Grad av sensitivitet; +++, inhiberingssone fra 100x fortynnet amylocyclicin; ++, inhiberingssone fra 10x fortynnet amylocyclicin; +, inhiberingssone fra uforynnet amylocyclicin; – ingen inhiberingssone.

Stamme	Sensitivitet
Gram-positiv	
<i>Bacillus cereus</i> LMGT 2805	++
<i>B. cereus</i> LMGT 2711	++
<i>B. cereus</i> LMGT 2731	++
<i>Carnobacterium divergens</i> LMGT 2738	+
<i>C. piscicola</i> LMGT 2332	++
<i>Enterococcus avium</i> LMGT 3465	+++
<i>E. faecalis</i> LMGT 2333	+
<i>E. faecalis</i> LMGT 3088	+
<i>E. faecalis</i> LMGT 3330	+
<i>E. faecalis</i> LMGT 3331	+
<i>E. faecalis</i> LMGT 3332	+
<i>E. faecium</i> LMGT 2763	+
<i>E. faecium</i> LMGT 2772	++
<i>E. faecium</i> LMGT 2783	+
<i>E. faecium</i> LMGT 2876	+
<i>Lactobacillus curvatus</i> LMGT 2353	+
<i>L. curvatus</i> LMGT 2355	+
<i>L. plantarum</i> LMGT 2003	++
<i>L. plantarum</i> LMGT 2352	++
<i>L. plantarum</i> LMGT 3125	++
<i>L. sakei</i> LMGT 2361	+++
<i>L. sakei</i> LMGT 2380	+++
<i>Lactococcus garvieae</i> LMGT 3390	+++
<i>L. lactis</i> LMGT 2081	++
<i>L. lactis</i> IL1403	+++
<i>Leuconstoc gelidium</i> LMGT 2386	++
<i>Listeria innocua</i> LMGT 2710	+++
<i>L. innocua</i> LMGT 2785	+++
<i>L. ivanovii</i> LMGT 2813	+++
<i>L. monocytogens</i> LMGT 2604	++
<i>L. monocytogens</i> LMGT 2651	+++
<i>L. monocytogens</i> LMGT 2652	+++
<i>L. monocytogens</i> LMGT 2653	+++
<i>L. monocytogens</i> LMGT 3733	+++
<i>L. monocytogens</i> LMGT 3734	+++
<i>L. monocytogens</i> LMGT 3735	+++
<i>L. monocytogens</i> LMGT 3736	+++
<i>L. monocytogens</i> LMGT 3737	++
<i>L. monocytogens</i> LMGT 3738	+++
<i>L. monocytogens</i> LMGT 3739	+++

<i>L. monocytogenes</i> LMGT 3740	++
<i>L. monocytogenes</i> LMGT 3741	+++
<i>L. monocytogenes</i> LMGT 3742	++
<i>L. monocytogenes</i> LMGT 3743	+++
<i>L. monocytogenes</i> LMGT 3744	+++
<i>L. monocytogenes</i> LMGT 3745	++
<i>Pediococcus acidilactici</i> LMGT 2002	+++
<i>P. pentosaceus</i> LMGT 2001	++
<i>P. pentosaceus</i> LMGT 2366	++
<i>Staphylococcus aureus</i> LMGT 3023	+
<i>S. aureus</i> LMGT 3262	+
<i>S. aureus</i> LMGT 3263	+
<i>S. aureus</i> LMGT 3264	+
<i>S. aureus</i> LMGT 3265	+
<i>S. haemolyticus</i> LMGT 4133	++
<i>Streptococcus agalactiae</i> LMGT 3347	-
<i>S. dysgalactiae</i> LMGT 3899	++
<i>S. thermophilus</i> LMG 3555	+
<i>S. uberis</i> LMGT 3912	+
Gram-negativ	
<i>Actinobacter soli</i> B1392	-
<i>A. calcoaceticus</i> B1396	-
<i>Escherichia coli</i> LMGT 3591	-
<i>Salmonella tryphimurum</i> B1377	-
<i>S. enteritidis</i> B1378	-
<i>Serratia sp.</i> B933	-
<i>Serratia sp.</i> B934	-

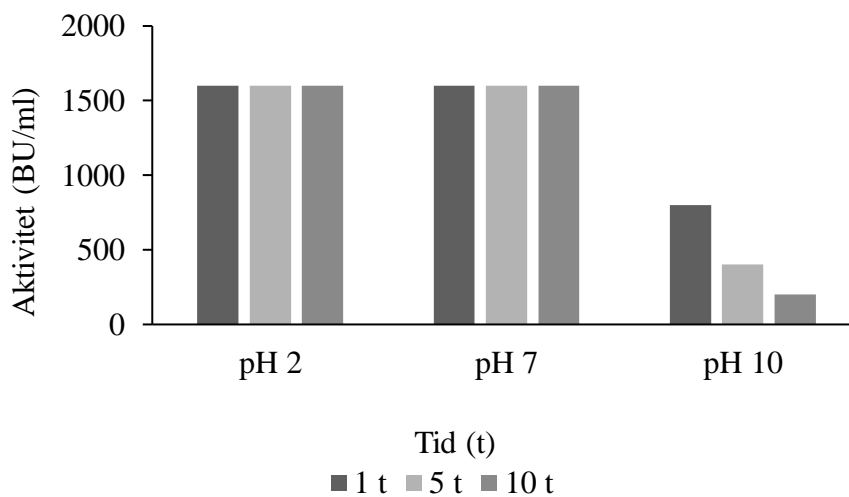
Alle stammer tilhører LMGs indikatorkolleksjon og ble kultivert i BHI ved 30 °C.

Vedlegg 2



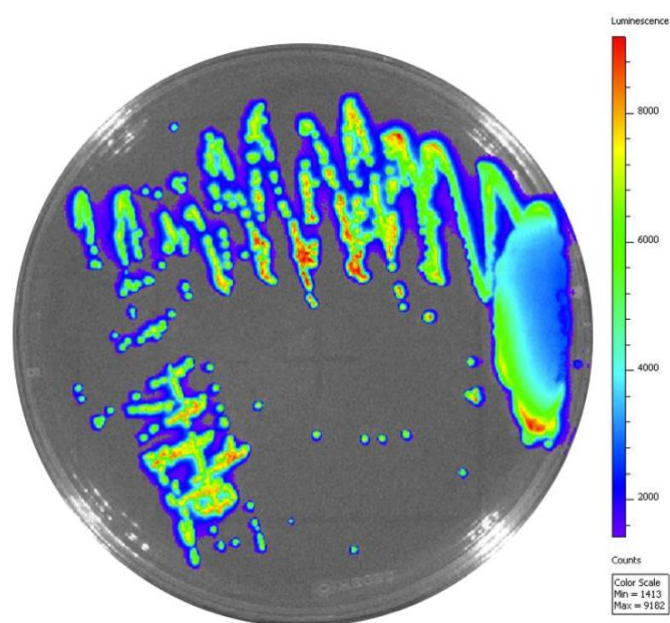
Figur 7.1 Inhiberingssoner fra ulike konsentrasjoner amylocyclin (Acn) og nisin A (NisA) mot *L. monocytogenes* LMGT 3735. Figuren viser eksempel på en stamme definert med +++ sensitivitet mot amylocyclin og ++ sensitivitet mot nisin A, ref. Vedlegg 1 og Tabell 3.6.1. Kontroll (K) er 50 % 2-propanol, 0.1 % TFA.

Vedlegg 3



Figur 7.2 pH-stabilitet til nisin A. Nisin A inkubert i buffere med pH 2, 7 og 10. Antimikrobiell aktivitet ble målt som BU/ml (mot *L. innocua* LMGT 2785) etter 1, 5, og 10 timer inkubering i bufferne. Ubehandlet nisin A hadde en aktivitet på 6400 BU/ml.

Vedlegg 4



Figur 7.3 Bioluminescens fra *L. monocytogenes* Xen32 spredd på agarskål. Luminescens ble målt ved IVIS Lumina II (Perkin Elmer), med 2 minutter eksponeringstid.



Norges miljø- og biovitenskapelige universitet
Noregs miljø- og biovitenskapelige universitet
Norwegian University of Life Sciences

Postboks 5003
NO-1432 Ås
Norway