

UNIVERSITETET FOR MILJØ- OG BIOVITENSKAP



## Forord

Denne avhandlingen ble skrevet i forbindelse med fullføringen av min mastergrad i bioteknologi, studieåret 2011/2012. Alt arbeidet med denne avhandlingen ble utført på Laboratorium for Mikrobiell Genteknologi og næringsmiddelmikrobiologi, et laboratorium tilknyttet Institutt for Kjemi, Bioteknologi og Matvitenskap på Universitet for Miljø og Biovitenskap i Ås.

Jeg vil takke hovedveileder Helge Holo og medveileder Hilde Marit Østlie for uvurderlig veiledning, godt samarbeid, hjelp og støtte gjennom hele prosjektperioden. I tillegg vil jeg takke Tine Bang, Laboratorieleder på TINE Meieriet Tresfjord for hennes bidrag med problemstilling og prøvemateriale.

Andre som fortjener en stor takk, er avdelingsingeniør Zhian Salehian og senioringeniør Linda Godager for deres daglige bidrag, og ingeniør May-Britt Selvåg Hovet for autoklaving, vasking og forberedelse av utstyr og reagenser på laben.

På LMG har jeg blitt tatt godt imot av alle ansatte. Dette har vært et hyggelig og inkluderende arbeidsmiljø, med mange hjelpsomme mennesker.

Til slutt vil jeg takke familien min for all tålmodighet og støtte gjennom hele utdannelsen min.

Ås, mai 2012

Johanna Marie Lundesgaard Eidahl

# Innhold

Forord.....	I
Sammendrag .....	IV
Abstract.....	V
Forkortelser .....	VI
1. Introduksjon .....	1
1.1 Melkesyrebakterier .....	1
1.1.1 Klassifisering av LAB.....	1
1.1.2 Bruk av melkesyrebakterier i næringsmiddelsindustrien .....	2
1.1.3 Bakteriociner og anvendelse av disse.....	2
1.1.4 Klassifisering av bakteriociner.....	3
1.1.5 Genetikk og sirkulære bakteriociner .....	5
1.1.6 <i>Leuconostoc</i> og bakteriociner produsert av denne slekten .....	7
1.1.7 <i>Leuconostoc gasicomitatum</i> og Leucocin H .....	8
1.2 Sekvenseringsstrategier .....	9
1.2.1 Roche 454 Genome Sequencer .....	10
1.2.2 Illumina Genome Analyser.....	10
1.2.3 Sanger sekvensering .....	11
1.3 Ost – et meieriprodukt laget ved hjelp av melkesyrebakterier .....	12
1.4 Kittmodnet ost .....	13
1.4.1 Hva er kittmoden ost? .....	13
1.4.2 Faktorer som påvirker modningen av kittmodnet ost.....	13
1.4.3 Mikroorganismer i kittlaget .....	15
1.5 Forurensning i produksjonsanlegg i meierier .....	16
1.5 Hensikt og problemstilling .....	16
2. Materiale .....	18
3. Metode .....	22
3.1 Sekvensering av contig på 570 bp .....	22
3.2 Kloning av det Leucocin H-kodende genet .....	22
3.3 Sekvensering – å finne overlappende sekvenser og lage contiger .....	26
Sekvensering ved restriksjonskutting og liggering i vektor .....	26
Invers PCR med megaprimer på restriksjonskuttet og selv-ligert DNA.....	28
3.4 Kloning av nyopplaget sekvens rundt det Leucocin H-kodende genet .....	32

3.5 Egenskaper ved Leucocin H, og bacteriocinets evne til å hemme vekst av Enterobacteriaceae på Ridderost .....	34
Undersøkelse av produksjon av bakteriocin ved ulike pH.....	34
Bakteriocinassay med softagar .....	35
Hemming av de Gram negative artene <i>Escherichia coli</i> , <i>Morganella morganii</i> og <i>Proteus mirabilis</i> , i buljong.....	36
4. Resultater .....	39
4.1 Sekvensering av contig på 570 bp .....	39
4.2 Kloning av det Leucocin H-kodende genet .....	40
3.3 Sekvensering – å finne overlappende sekvenser og lage contig.....	43
Sekvensering ved restriksjonskutting og ligering i vektor .....	43
Invers PCR med megaprimer på restriksjonskuttet og selv-ligert DNA.....	44
3.3 Kloning og transformering av nyoppdaget sekvens rundt det Leucocin H-kodende genet .....	51
3.4 Egenskaper ved Leucocin H, og bacteriocinets evne til å hemme vekst av Enterobacteriaceae på Ridderost .....	55
Mikrotiterassay for testing av bakteriocinaktivitet.....	55
Bakteriocinassay med softagar .....	56
Hemming av de Gram negative artene <i>Escherichia coli</i> , <i>Morganella morganii</i> og <i>Proteus mirabilis</i> .....	61
Effekten av ulike <i>Leuconostoc</i> på Enterobacteriaceae med Ridderost som vekstmedium .....	62
4. Diskusjon og konklusjon .....	66
4.1 Sekvensering.....	66
Sekvensering av 570 bp lang contiger .....	66
Sekvensering ved bruk av vektor .....	66
Invers PCR med megaprimer på restriksjonskuttet og selv-ligert DNA.....	67
4.2 Kloning av det Leucocin H-kodende genet .....	71
4.3 Kloning av nyoppdaget sekvens rundt det H-kodende genet.....	72
4.4 Egenskaper ved Leucocin H .....	74
Bakteriocinproduksjon ved ulike pH .....	74
Bakteriocinassay med softagar .....	74
Hemming av de gram negative artene <i>Escherichia coli</i> , <i>Morganella morganii</i> og <i>Proteus mirabilis</i> .....	76
LMGT 3601 <i>Leuconostoc gasicomitatum</i> sin effekt på Enterobacteriaceae med Ridderost som vekstmedium. ....	76
5. Referanser .....	78

## Sammendrag

*Leuconostoc gasicomitatum* er én av flere bakteriocinproduserende melkesyrebakterier. Hos denne arten har man oppdaget produksjon av det sirkulære bakteriocinet leucocin H. Dette bakteriocinet har tidligere vist aktivitet mot flere blant annet *Listeria monocytogenes*, *Clostridium perfringens* og *Bacillus cereus*.

Genomsekvensering av *Leuconostoc gasicomitatum* LMG 3601 har av ukjente årsaker vært svært utfordrende. Kombinasjon av Roche- og Illumina-sekvensering gav lav dekningsgrad, noe som gjorde det umulig å lage sammenhengende contiger. Ved prosjektets begynnelse hadde man en contig på 570 basepar. Denne inneholdt det strukturelle genet for bakteriocinet leucocin H. I løpet av dette prosjektet har man, ved hjelp av invers PCR med bruk av megaprimer, klart å finne hittil ukjent genomsekvens, og oppnådd større dekningsgrad for sekvensdata. Dette gjorde det mulig å utvide det 570 bp lange contigen til 4,5 kilobaser. Ved sekvenssøk og blastøk, fant man åpne leserammer for andre gener som er nødvendig for bakteriocinproduksjon.

Det ble gjort forsøk på å klonere de 570 bp i en annen bakteriestamme, som også hadde evnen til å produsere sirkulære bakteriociner. Denne stammen, *Lactococcus garviaeae*, overlevde ikke ved kloning av disse 570 bp. Trolig førte produksjon av Leucocin H til at de klonede cellene av *Lactococcus garviaeae* døde. Grunnen til dette kan være mangel på immunitet som følge av at man ikke har hele genklyngen for leucocin H. Ved kloning av de 4,5 kb overlevde *Lactococcus garviaeae*, noe som tydet på at genet for immunitet er en del av den identifiserte sekvensen. Mikrotiterassay viste at de transformerte cellene gav nedsatt produksjon av bakteriocin, sammenlignet med vildtypen.

Egenskapene til leucocin H ble testet ved ulike bakteriocinassay, og man så hemming av *Lactobacillus sakei* og *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*. Optimal pH for bakteriocinproduksjon lå på 7,0 i 25°C. Ved testing av bakteriocinets effekt mot de Gram negative artene *Escherichia coli*, *Morganella morganii* og *Proteus mirabilis*, kunne man se en hemming der hvor forholdene lå best til rette for vekst av *Leuconostoc*.

På grunnlag av den observerte hemmingen av de Gram negative artene, ønsket man å teste om leucocin H kunne ha en hemmende effekt på uønsket oppvekst av arter av familien Enterobacteriaceae på Ridderost. Man kunne ikke se noen sterk effekt av bakteriocinet. Denne delen av prosjektet ble gjennomført i samarbeid med TINEs meierier i Tresfjord.

## Abstract

*Leuconostoc gasicomitatum* is one of several bacteriocin producing lactic acid bacteria. In this species one has discovered production of the circular bacteriocin leucocin H. This bacteriocin has shown activity against several species; among these are *Listeria monocytogenes*, *Clostridium perfringens* and *Bacillus cereus*.

A full genome sequencing of the strain *Leuconostoc gasicomitatum* LMG 3601 has, for unknown reasons, been a huge challenge. Combination of Roche- and Illumina-sequencing gave a very low coverage, which made it impossible to create a contig. At the beginning of this project, a contig of 570 base pairs was known. This segment of base pairs contained the structural gene for the bacteriocin leucocin H. During this project, one has, by the use of an inverse PCR with a megaprimer, on restriction cut and self-ligated DNA, managed to identify unknown sequence, and attained a better coverage for the sequence data. This made it possible to expand the segment of 570 bp to a larger contig of 4,5 kilo bases. By searching in several databases, and doing some blasting, one found open reading frames that showed some similarity to other genes encoding proteins necessary for bacteriocin production in other bacteria.

One attempted to clone the 570 bp into another bacterial strain, which also had the ability to produce circular bacteriocins. This strain, a strain of *Lactococcus garviaeae*, did not survive after having received the 570 bp into its genome. This was probably due to the production of leucocin H, which without the production of a dedicated immunity protein. By cloning all the 4,5 kb into the genome of *Lactococcus garviaeae*, the transformants survived, which leads to the allegation that the 4,5 kb encodes the immunity protein. A bacteriocin assay showed that the transformed cells had a significantly lower production of bacteriocin, compared to the wild type.

The properties of leucocin H was characterized by several bacteriocin assays. It was shown activity against strains of *Lactobacillus sakei* and *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*. The optimal pH for bacteriocin production was 7,0 in 25°C. By testing the effects of the bacteriocin against the Gram negative species *Escherichia coli*, *Morganella morganii* and *Proteus mirabilis*, one could see some inhibition of the growth. However, there was observed only when the environment favored growth of *Leuconostoc gasicomitatum*.

Because of the observations regarding inhibition of growth of Gram negative species, one wished to investigate the effects of leucocin H on unwanted growth of species of Enterobacteriaceae on the surface-ripened cheese, Ridderost. No strong effect was observed. This part of the project was done in collaboration with the TINE dairies in Tresfjord.

## Forkortelser

DNA	Deoxyribonucleic acid/ deoksyribonykleinsyre
ssDNA	Single stranded DNA / enkelttrådet DNA
dsDNA	Duoble stranded DNA/ dobbeltrådet DNA
bp	Basepar
kb	Kilobaser (1kb=1000bp)
aa	Amino acids/ aminosyrer
LAB	Lactic Acid Bacteria/ melkesyrebakterier
PCR	Polymerase Chain Reaction/ polymerase kjedereaksjon
RT	Romtemperatur
ON	Over natt
LB	Luria-Bertani
LA	Luria-Bertani agar
MRS	de Man, Rogosa og Sharpe
BHI	Brain Heart Infusion
GM17	M17 tilsatt glukose
VRBGA	Violet Red Bile Glucose Agar
cfu	Colony forming units/ kolonidannende enheter

# 1. Introduksjon

## 1.1 Melkesyrebakterier

Melkesyrebakterier (Lactic Acid Bacteria, LAB) er en heterogen gruppe av bakterier som har evnen til å fermentere ulike karbohydrater og produsere laktat som hovedprodukt. Bakteriene i denne gruppen er taxonomisk ordnet i samme phylum og klasse. Fellestrekk er at de er Gram positive, aerobe, ikke-sporulerende, katalase-negative, syre-tolerante kokker eller staver med lavt GC-innhold i sitt DNA (Axelsson 2004).

### 1.1.1 Klassifisering av LAB

De slektene som defineres som melkesyrebakterier, er *Aerococcus*, *Lactobacillus*, *Carnobacterium*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Tetragenococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus* og *Vagococcus* (Axelsson 2004). Alle disse er ulike forgreninger fra samme orden; *Lactobacillales*, i *Firmicutes*-phylum. Tidligere har *Bifidobacterium* blitt regnet som en melkesyrebakterie på grunn av sin sentrale funksjon i fordøyelsesystemet og probiotiske egenskaper, men i dag regnes den ikke som en melkesyrebakterie, på grunn av manglende typiske egenskaper for LAB og fylogenetiske slektskap, og sin unike form for sukkerfermentering (Axelsson 2004).

Basert på biokjemiske egenskaper kan melkesyrebakterier deles inn i henholdsvis homo- og heterofermentative bakterier. Homofermentative melkesyrebakterier fermenterer glukose og produserer kun laktat, mens de heterofermentative vil i tillegg til laktat produsere CO<sub>2</sub> og etanol/acetat (Gottschalk 1988; Kandler 1983; Klaenhammer et al. 2005). På grunn av melkesyrebakterienes evne til å metabolisere karbohydrater, samt manglende anabolske egenskaper, stiller denne gruppen bakterier sterke krav til sitt naturlige habitat med hensyn til tilstedeværelse av komplekse ernæringskomponenter (Gottschalk 1988). Disse kravene møtes i melkesyrebakterienes naturlige habitat: melk, kjøtt, grønnsaker, korn og planter (Gottschalk 1988; Klaenhammer et al. 2005). Melkesyrebakterier kan også finnes i slimhinner hos pattedyr (Axelsson 2004).

Egenskaper som brukes til å skille mellom enkelte arter, er evnen til vekst ved bestemte forhold i miljøet. Blant annet kan ulike temperaturer, saltkonsentrasjoner og pH bidra til å skille mellom arter. I tabell 1 kan man se de ulike egenskapene som karakteriserer de forskjellige slektene av melkesyrebakterier. Fenotypiske og biokjemisk karakterisering kan bidra til en foreløpig antydning av art, men kun analyser på nukleinsyrenivå (eksempelvis 16S-analyser) vil kunne gi en sikker konklusjon med hensyn til artbestemmelse (Axelsson 2004).



Tabell 1: Egenskaper hos de ulike slektene av melkesyrebakterier (Axelsson 2004).

		Vekst ved					
		Temperatur		pH		Konsentrasjon av NaCl	
LAB slekter	Glukosefermentering	10°C	45°C	4,4	9,6	6,5 %	18 %
<i>Carnobacterium</i>	Homofermentativ	+	-	Ubestemt	-	Ubestemt	-
<i>Lactobacillus</i>	Homo- og heterofermentativ	±	±	±	-	±	-
<i>Aerococcus</i>	Homofermentativ	+	-	-	+	+	-
<i>Lactococcus</i>	Homofermentativ	+	-	±	-	-	-
<i>Vagococcus</i>	Homofermentativ	+	-	±	-	-	-
<i>Pediococcus</i>	Homofermentativ	±	±	+	-	±	-
<i>Streptococcus</i>	Homofermentativ	-	±	-	-	-	-
<i>Tetragenococcus</i>	Homofermentativ	+	-	-	+	+	+
<i>Leuconostoc</i>	Heterofermentativ	+	-	±	-	±	-
<i>Weissella</i>	Heterofermentativ	+	-	±	-	±	-
<i>Enterococcus</i>	Homofermentativ	+	+	+	+	+	-
<i>Oenococcus</i>	Heterofermentativ	+	-	±	-	±	-

### 1.1.2 Bruk av melkesyrebakterier i næringsmiddelsindustrien

Melkesyrebakterier er mye brukt i næringsmiddelsindustrien av flere grunner. De vokser raskt og fermenterer karbohydrater, slik at laktat produseres og pH reduseres. pH kan gå så lavt som til 4,0, som er lavt nok til å hemme vekst av andre mikroorganismer som matforringende og patogene bakterier. Dette gir næringsmidlene økt holdbarhet. Vekst av melkesyrebakterier og produksjon av laktat er en selvbegrensende prosess. Selv om de fleste melkesyrebakterier kan leve i relativt sure forhold, vil til slutt pH bli redusert til det punktet der heller ikke melkesyrebakteriene kan formere seg i samme stor grad. Da vil vekst og fermentering avta.

### 1.1.3 Bakteriociner og anvendelse av disse

I tillegg til den hemmende effekten av pH, organiske syrer, hydrogenperoksid og diacetyl (Piard & Desmazeaud 1991; Stiles 1994), produserer mange stammer av melkesyrebakterier et spekter av ulike *bakteriociner* (Klaenhammer 1988). Bakteriociner er ribosomalt syntetiserte proteiner og peptider som virker antimikrobielt mot bakterier som, i de fleste tilfeller, er nært beslektet med produsentbakterien. De kan også ha et bredere spekter; man har observert aktivitet av stammer som er fjernt beslektet med produsentbakterien (Jack et al. 1995; Klaenhammer 1988). Man tror hensikten er forsvar mot infeksjoner av inntrengere, samt at produksjon av bakteriociner bidrar til å

gjøre produsentene konkurransedyktige i sin økologiske nisje (Garneau et al. 2002; van Belkum et al. 2011).

I næringsmiddelindustrien benyttes bakteriers evne til bakteriocinproduksjon til flere formål. Mange melkesyrebakterier produserer bakteriociner som er av stor interesse for næringsmiddelsindustrien (Holo et al. 2001). Bruk av bakteriociner som konserveringsmiddel kan bidra til å redusere tilsetning av kjemiske konserveringsmidler, samt redusere bruk av varmebehandling. Dette kan resultere i mer naturlig bevaring av næringsmidler (Galvez et al. 2007).

Flere bakteriociner viser aktivitet mot matforringende og patogene bakterier som kan utvikle seg i næringsmidler. De vanligste eksemplene på slike bakterier er *Bacillus*, *Clostridium*, *Staphylococcus* og *Listeria* (Martin-Visscher et al. 2008). Fordi de fleste melkesyrebakterier er GRAS-bakterier (Generally Regarded As Safe), og produserer ikke-toksiske forbindelser (Holo et al. 2001), er det et stort potensial for å bruke nettopp melkesyrebakterier til å hindre uønsket bakterievekst i mat og produksjonsanlegg for næringsmidler (Galvez et al. 2007). Bakteriociner produsert av melkesyrebakterier er hovedsakelig små, varmestabile peptider (Jack et al. 1995). Bakteriociner kan tilsettes næringsmidler som *ex situ* produserte konsentrat eller som kulturer av bakteriocinproduserende stammer *in situ* (Galvez et al. 2007).

Nisin er per dags dato det eneste bakteriocinet godkjent for bruk i næringsmiddelsindustrien (Galvez et al. 2007; Garneau et al. 2002). Dette bakteriocinet blir produsert av enkelte stammer av *Lactococcus lactis* (Liu & Hansen 1990), og er i dag kommersielt tilgjengelig som konserveringsmiddel E234 (Galvez et al. 2007). Nisin har aktivitet mot et bredt spekter av Gram positive bakterier (Abee et al. 1995). Sporer er spesielt sensitive, og nisin er mye brukt for å hindre vekst fra sporer i varmebehandlede produkter. Nisin er relativt stabilt ved høy temperatur og ved lav pH. Dette gjør det svært brukervennlig i industriell matproduksjon (Ross et al. 1999).

#### **1.1.4 Klassifisering av bakteriociner**

Bakteriociner fra Gram positive bakterier kan generelt grupperes i to familier: Klasse I "lantibiotics" og klasse II "non-lantibiotics" (Klaenhammer 1988). Begge disse gruppene inneholder varmestabile bakteriociner, men klasse I lantibiotics består av små peptider som blir modifisert posttranslasjonelt. Disse inneholder vanligvis aminosyren lanthionin eller  $\beta$ -metyllanthionin. Nisin er et velstudert eksempel på klasse I-bakteriocin (Holo et al. 2001). Klasse II non-lantibiotics, derimot, inneholder ingen posttranslasjonelle modifikasjoner utover det at et lederpeptid blir kløyyet (Martin-Visscher et al. 2008).

I begge klassene finner man enkeltpeptid-bakteriociner. I det siste har man likevel sett et økende antall topeptid-bakteriociner (Garneau et al. 2002), der de to peptidkjedene har en synergistisk aktivitet (Garneau et al. 2002; Holo et al. 2001).

Klasse I "lantibiotic" topeptid-bakteriociner har varierende størrelser, sekvenser og strukturer. Disse inneholder modifikasjoner av cystein-, serin- og threoninresiduer, som er nødvendig for dannelsen av lantioninbruer. De ribosomalt syntetiserte prepeptidene blir enzymatisk modifisert før lederpeptidene fjernes og det aktive setet blir tilgjengelig (Garneau et al. 2002). Den omfattende modifiseringen slike bakteriociner gjennomgår, gjør denne klassen peptider vanskelig å sekvensere ved metoder som Edman degradering (Garneau et al. 2002). Eksempler på lantibiotic topeptid-bakteriociner er cytolysin (Booth et al. 1996), plantaricin W (Holo et al. 2001) og staphylococcin C55 (Navaratna et al. 1998).

Klasse II non-lantibiotic topeptid-bakteriociner kan også ha varierende sekvenser og strukturer, men felles for alle er at de syntetiseres som prepeptider, prosesseres under eksportering, og med unntak av dannelsen av disulfidbruer, ikke gjennomgår noen post-translasjonell modifikasjon. Det ferdige bakteriocinet er kationisk, amfifilt og inneholder svært få eller ingen cysteinresiduer (Garneau et al. 2002).

I tillegg til de to klassene lantibiotics og non-lantibiotics, har det de siste årene blitt oppdaget en potensielt ny gruppe bakteriociner; *sirkulære* bakteriociner. Disse blir sirkulære ved hjelp av en amidbinding mellom N-terminalen og C-terminalen til peptidets hovedkjede. Dette gjør dem motstandsdyktige mot mange proteaser og stabile over et større spekter av temperatur (van Belkum et al. 2011). De sirkulære bakteriocinene som til nå har blitt identifisert, består av 35-70 aminosyrer (aa) og inneholder ingen disulfidbruer. De produseres med en utvidet N-terminal og et lederpeptid på 2-35 aa (van Belkum et al. 2011), som hindrer bakteriocinet i å være biologisk aktivt mens det enda er inne i cellen, og utgjør et gjenkjennelsesignal for transportsystemet (Nes et al. 1996). Alle sirkulære bakteriociner som har blitt identifisert, har en Gram positiv produsent (van Belkum et al. 2011).

De sirkulære bakteriocinene deles inn i to grupper basert på grad av sekvenslikhet og biokjemiske karakteristika. Gruppe 1 er kationiske og har et høyt isoelektrisk punkt ( $pI \approx 10$ ). Bakteriocinene i gruppe 2 har sekvenshomologi seg imellom og et lavere isoelektrisk punkt ( $pI \approx 5$ ) (van Belkum et al. 2011).

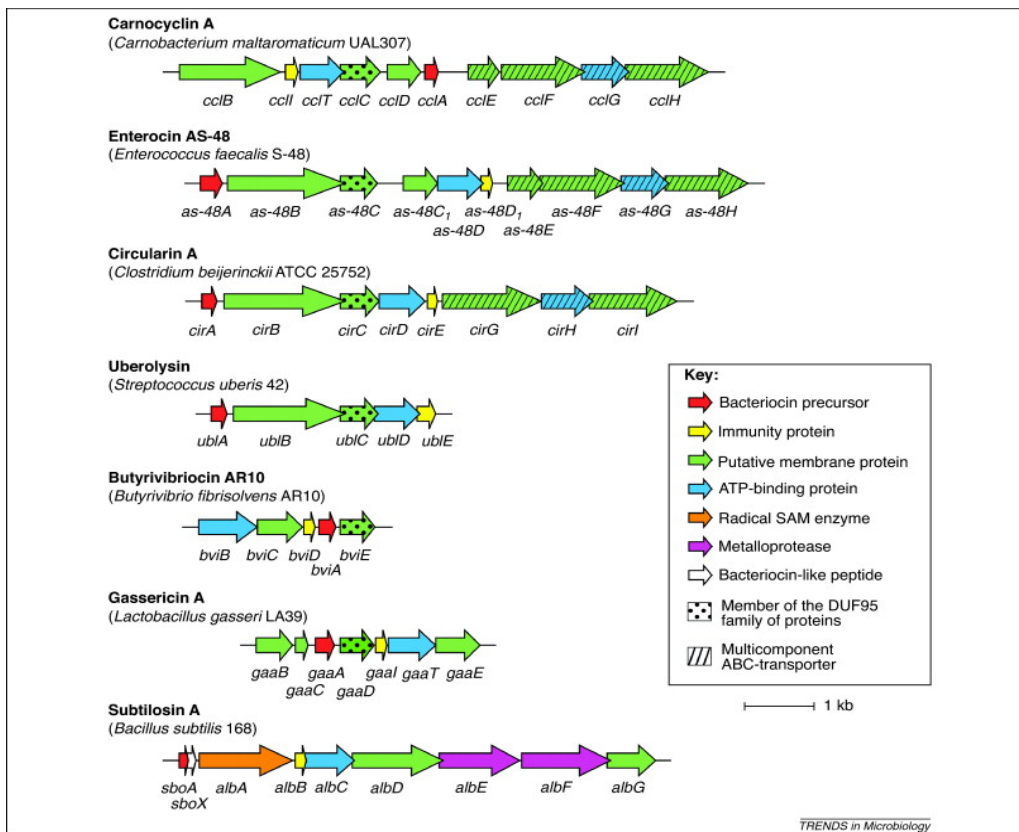
### 1.1.5 Genetikk og sirkulære bakteriociner

De genetiske determinantene for sirkulære bakteriociner er lokalisert på kromosom eller plasmid, og inneholder klynger av gener, der de fleste har blitt identifisert ved sekvenshomologi blant proteinene (van Belkum et al. 2011). I alle bakteriocinprodusenters genom er det minst fire ulike gener som er helt avgjørende for produksjon, modifisering og sekresjon av bakteriocinet; (1) et strukturelt gen som koder for prepeptidet for bakteriocinet, (2) et immunitetsgen, (3) et gen for en ABC-transporter (ABC: ATP-binding cassette) og (4) et gen for "accessory"-proteiner nødvendig for sekresjon av bakteriocinet (Garneau et al. 2002).

Bakteriocinproduserende bakterier har immunitetsproteiner som beskytter dem fra å bli drept av sine egne forbindelser. Immunitetsproteiner uttrykkes uten transport og prosessering (Nes et al. 1996). De er relativt små (50-150 aa) og det er ikke observert noen vesentlig likhet mellom ulike bakteriosinprodusenters immunitetsproteiner (Nes et al. 1996). Immunitetsproteinene til sirkulære bakteriociner har en høy pI, og kan ha flere transmembrane domener. Dette indikerer at de er assosiert med plasmamembranen (van Belkum et al. 2011).

Et immunitetsgen alene er ikke nok til å utgjøre full immunitet for produsenten. I flere tilfeller har man sett at produksjon av membranproteiner og ATP-bindende proteiner har økt immuniteten til produsenten (van Belkum et al. 2011). ABC-transportere er proteinkomplekser som bruker energi fra ATP-hydrolyse til transport av ulike forbindelser over membranen (Davidson & Chen 2004; Davidson et al. 2008).

Figur 1 viser en skjematisk fremstilling av genklyngene til ulike sirkulære bakteriociner. Når man sammenligner de genetiske egenskapene hos de ulike sirkulære bakteriocinene, ser man at de har mange fellestrekk. Dette indikerer en lignende biogenese av disse, med unntak av genklyngen for subtilocin A, som er atypisk.



**Figur 1: Skjematisk fremstilling av genklyngene i sirkulære bakteriociner. Navnet på genklyngenes tilhørende bakteriocin, er uthevet. Egenskapene de ulike genene koder for, er fargekodet med oversikt i rammen til høyre. Figuren er hentet fra van Belkum et al. (2011).**

Sirkulære bakteriociner produseres, som tidligere nevnt, med en forlengelse av aminosyrer, et lederpeptid på den N-terminale enden av prekursorteiniet. Dette varierer i lengde og sekvens, man har ikke observert noen vesentlig sekvenshomologi mellom artenes lederpeptid. Man tror imidlertid at enkelte aminosyrer i lederpeptidet er essensielle for at dette skal kunne spaltes av. Dette har man blant annet sett i enterocin AS-48 (produsert av *Enterococcus faecalis* S-48), der utbytting av den siste aminosyren i lederpeptidet, His-1, førte til at produksjon av enterocin AS-48 opphørte. Man tror enzymene som kløyver av lederpeptidet og danner amidbindingen mellom N-terminalen og C-terminalen er helt avhengig av enkelte aminosyrer i lederpeptidet for å kunne gjenkjenne setene for disse reaksjonene. Ingen av disse enzymene har til nå blitt identifisert (van Belkum et al, 2011).

Syklisering av prekursorteinene er en delvis ukjent prosess. Det hersker usikkerhet rundt aktivering av karboksylgruppen (C-terminalen). Syklotider (sirkulære peptider produsert av enkelte plantefamilier) har visse fellestrekk med sirkulære bakteriociner, men produseres med en utvidelse både på N-terminalen og på C-terminalen. Sykliseringen av syklotidene er en mer eller mindre kjent prosess, der en asparaginyll endoproteinase angriper karbonylgruppen på en konservert asparagin

eller arginin-residue på den forlengede C-terminalen. Dermed dannes et stabilt acyl-enzym intermediat. Et tripeptid-motiv på N-terminalen vil da gå inn i enzymets aktive sete, og aminogruppen til N-terminalen angriper thiolesteren i intermedietet. Dermed får man et syklisk peptid. Fordi prekursorproteiner av sirkulære bakteriociner ikke har noen utvidet C-terminal, er det ukjent hvordan karboksylgruppen på denne enden aktiveres (van Belkum et al., 2011).

Den eneste mekanismen man til nå har observert hos sirkulære bakteriociner, er at de fungerer ved å permeabilisere membranen til mottakercellen, slik at ioner strømmer ut og membranpotensialet forsvinner (van Belkum et al. 2011). Bakteriociner fra Gram positive bakterier er generelt aktive kun mot andre Gram positive bakterier, fordi yttermembranen til Gram negative celler er en større barriere for de aktuelle bakteriocinene (van Belkum et al. 2011). Man har imidlertid sett unntak fra denne trenden da det er vist at enterocin AS-48, lactocyclin Q og subtilisin A i høye konsentrasjoner kan ha aktivitet mot enkelte Gram negative celler (Sawa et al. 2009; van Belkum et al. 2011). Man har også sett at carnocyclin A kan virke aktivt mot Gram negative celler dersom disse først har blitt forbehandlet med EDTA (Martin-Visscher et al. 2011). Derfor har man tidligere påstått at carnocyclin A ikke krever noen membranreseptorer slik som de fleste andre bakteriociner, men danner anionselektive ionekanaler i lipidlaget til cellen. Man mente denne kanaldannelsen var spenningsavhengig, og man trodde også at bakteriocinet bandt til cellen ved elektrostatiske interaksjoner mellom de positive ladningene til proteinet og de negative ladningene i membranen. Dette innebar at aktiviteten til carnocyclin A krevde et negativt membranpotensiale (van Belkum et al. 2011). I dag hersker det imidlertid tvil rundt påstanden om carnocyclin A sin uavhengighet av membranreseptorer. Hos bakteriociner har man generelt observert et svært spesifikt inhiberingsspekter (Gabrielsen et al. 2012). Dette innebærer at bakteriocinet kan skille mellom arter, og dette understøtter teorien om at bakteriociner krever membranreseptorer hos artene som inngår i inhiberingsspekteret (Gabrielsen et al. 2012).

### **1.1.6 *Leuconostoc* og bakteriociner produsert av denne slekten**

*Leuconostoc* er en viktig slekt av melkesyrebakteriene. Artene i denne slekten er Gram-positive kokker, ikke-sporulerende, fakultativt anaerob med lavt GC-innhold i DNA, og vokser ved 20-30 °C. (Thunell 1995). Bakterien er heterofermentativ, det vil si at den i tillegg til å produsere laktat, også genererer CO<sub>2</sub> og etanol/acetat (Axelsson 2004).

*Leuconostoc* ble for første gang isolert i 1878, da en sukkerfabrikk fikk problemer med store slimdannelse i anlegget. Flere arter av *Leuconostoc* er i stand til å produsere dextran fra sukrose (Cogan & Jordan 1994; Thunell 1995).

*Leuconostoc* sitt naturlige habitat er på overflaten av planter og i vegetabiliske produkter, og er mye benyttet ved fermentering av oliven, agurk og sauerkraut. De vanligste artene er *Leuconostoc mesenteroides* og *Leuconostoc lactis* (Beresford et al. 2001). *Leuconostoc mesenteroides* deles inn i underartene *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenterioides*, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* og *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* (Cogan & Jordan 1994). Denne familien omfatter arter som generelt ansees som ikke-patogene. Likevel finnes tilfeller av bakteriemi forårsaket av ulike arter av *Leuconostoc* (Handwerger et al. 1990)

*Leuconostoc* brukes blant annet i fermenterte meieriprodukter, der den, som følge av et synergistisk forhold til lactococci, bidrar til utvikling av diacetyl som er viktige for smak og aroma (Cogan & Jordan 1994; Thunell 1995; Vedamuthu 1994; Yang et al. 2010). I melk vokser *Leuconostoc* relativt sakte, og er lite viktig for laktosefermentering. Likevel, på grunn av evnen til å produsere aromakomponenter, er *Leuconostoc* ofte en viktig komponent i DL-starterkulturer benyttet i ulike meieriprodukter som kulturmilk, rømme og ostetyper som blant annet Gauda, Ridderost og Jarlsberg (Cogan & Jordan 1994). I forbindelse med osteproduksjon har mange arter av *Leuconostoc* en tilleggsfunksjon i form av sitratmetabolisme og en påfølgende produksjon av CO<sub>2</sub>. Produksjon av CO<sub>2</sub> fra sitrat påvirker ostens hulldannelse i tillegg til CO<sub>2</sub> produsert fra heterofermentativ omsetning av karbohydrat, noe som er ønsket i flere typer ost (Thunell 1995).

Flere stammer av *Leuconostoc* produserer bakteriociner. Disse bakteriocinene har et relativt bredt inhiberingsspekter, som i de fleste tilfeller blant annet har anti-*Listeria* aktivitet (Stiles 1994).

### **1.1.7 *Leuconostoc gasicomitatum* og Leucocin H**

Laboratorium for Mikrobiell Genteknologi (LMG) ble det oppdaget bakteriocinproduksjon hos en uidentifisert stamme. Dette bakteriocinet viste aktivitet mot blant annet *Listeria monocytogenes*, og de to sporedannerne *Bacillus cereus* og *Clostridium perfringens* når disse befant seg i vegetativ tilstand. Det ble også registrert hemming av enkelte arter av nærmere beslektede bakterier som *Lactobacillus*, *Carnobacterium*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Enterococcus* og *Staphylococcus* (Blom et al. 1999). Ved artsbestemmelse ved hjelp av vekstforsøk, kvalitative tester og 16S sekvensering, viste denne arten seg å være en stamme av *Leuconostoc gasicomitatum* (Blom et al. 1999). *Leuconostoc gasicomitatum* er en art som vanligvis er forbundet med forringelse av kjøtt pakket i modifisert atmosfære (Bjorkroth et al. 2000; Susiluoto et al. 2003; Vihavainen & Bjorkroth 2009). Dette gjelder bare enkelte stammer.

Det nyoppdagede bakteriocinet fikk navnet "leucocin H". Ved revers fase-kromatografi ble det funnet to fraksjoner med hemmende aktivitet. Ved å blande disse to fraksjonene ble den hemmende

aktiviteten større enn summen hemming av de to fraksjonene. På grunnlag av disse observasjonene antok Blom et al. (1999) at leucocin H var et to-peptid bacteriocin.

Forsøk på N-terminal sekvensanalyse av bacteriocinet var mislykket, men ved kløyving med BNPS-skatole (2-(2-nitrofenylsulfenyl)-3-metylindol), ble det avdekket en kort aminosyresekvens for hver av de to peptidene. Disse viste ingen homologi med andre peptider eller proteiner. Dette tydet på at leucocin H var et nytt bacteriocin som på dette tidspunktet ikke passet inn i noen annen klasse (Blom et al. 1999).

For å oppnå mer informasjon om bacteriocinet, var det ønskelig gjøre en full genomsekvensering av *Leuconostoc gasicomitatum*. Ved genomsekvensering viste det seg at deler av genomet av ukjente grunner var spesielt vanskelig å sekvensere. Sekvenseringen ble utført ved en kombinasjon av Illumina Genome Analyser og Roche 454 Genome Sequencer i Tyskland i 2010, men resulterte i sekvenser av varierende lengder med svært lav dekningsgrad. Roche sekvensering gav kortere sekvensfragmenter enn normalt, og til tider var det ingen dekning i det aktuelle området. Illumina-sekvensene var for korte til å kunne overlappes med hverandre. Totalt resulterte dette i en for lav dekningsgrad til å kunne lage contiger, det vil si å kombinere fragmentene av sekvens til én sammenhengende genomsekvens.

Etter å ha revers transkribert den kjente delen av proteinsekvens for de to peptidene  $\alpha$  og  $\beta$  i leucocin H, ble det funnet en DNA-sekvens fragmentene fra Illumina og Roche-sekvensering, som kunne kode for det ene peptidet leucocin H $\beta$ . Det tilsvarende genet for leucocin H $\alpha$  ble aldri funnet. Påstanden om at leucocin H var et to-peptid bacteriocin viste seg i ettertid å være villedende. Blastsøk med DNA-sekvensen som trolig kodet leucocin H $\beta$  ga grunnlag for å tro at bacteriocinet var sirkulært (H. Holo, personlig meddelelse). Det ble blant annet funnet likheter med det sirkulære bacteriocinet carnocyclin A, produsert av *Carnobacterium maltaromaticum* UAL307. Figur 2 viser en sammenstilling av proteinsekvensene for disse to bacteriocinene.

Leucocin H:	MF-ELVAHLGTSYVVAERIANLLMTGMSVGAIVGMVSGIGSWA-GVFLNMAKYMFKSQSKRVVIGF
Carnocyclin A:	MLYELVAY-GIAQGTAEKVVSLINAGLTVGSIISILGGVTVGLSGVFTAV KAATAKQGIKKAIQL
	*   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *

Figur 2: Sammenstilling av aminosyresekvensene til henholdsvis leucocin H og carnocyclin A. Den understrekede sekvensen er den aminosyresekvensen funnet av Blom et al. (1999) for det man da mente var  $\beta$ -peptidet.

## 1.2 Sekvenseringsstrategier

To strategier som vanligvis blir benyttet ved full genomsekvensering er beskrevet nedenfor. Begge disse metodene er såkalte "shotgun-sequencing by synthesis"-metoder, der DNA fragmenteres, og baserekkefølgen leses samtidig som nye DNA-tråder syntetiseres i termale syklere. Man oppnår korte



DNA-sekvenser. Siden sekvensene er overlappende, kan man i ettertid plassere dem i forhold til hverandre og oppnå lange, sammenhengende sekvenser.

### 1.2.1 Roche 454 Genome Sequencer

Denne metoden omfatter EmulsionPCR med fragmentert genomisk DNA bundet til små kuler via adaptersekvenser (Zhou et al. 2010). Denne amplifiseringsreaksjonen resulterer i flere identiske DNA-fragmenter bundet til samme kule. Kulene overføres deretter til en picotiterplate, der hver kule fordeles i hver sin brønn. I denne brønnen skjer en pyrosekvensering, der bioluminescens avgis for hvert nukleotid som settes inn i den voksende sekvensen. Dette signalet er et resultat av en biokjemisk kaskadereaksjon der enzymene ATP sulfurylase og luciferase har avgjørende roller (Ronaghi et al. 1998; Zhou et al. 2010). Emisjonssignal ved riktig innkorporert nukleotid gir informasjon om identiteten til den komplementære basen i templatet (Zhou et al. 2010).

Fordeler ved denne sekvenseringsmetoden er hastigheten og evnen til å sekvensere lengre strekk av DNA. Man kan oppnå sekvenser på opp til 500 bp (Zhou et al. 2010) og systemet er svært raskt og effektivt (Ronaghi et al. 1998). En ulempe ved Roche-metoden er unøyaktigheten som kan oppstå i regioner med lengre homopolymerer av nukleotider (Ronaghi et al. 1998; Zhou et al. 2010). Dette er problematisk grunnet en nonlinear signalrespons etter innkorporering av flere enn tre identiske nukleotider (Ronaghi et al. 1998; Zhou et al. 2010). Software algoritmer skal imidlertid kunne korrigere for dette (Ronaghi et al. 1998).

### 1.2.2 Illumina Genome Analyser

Genomsekvensering ved bruk av Illumina Genome Analyser innebærer BridgePCR-amplifisering av ulike fragmenter av enkelttrådet DNA (ssDNA) i en flowcelle. Som en del av prøveforberedelsen blir genomisk DNA brutt ned i fragmenter, og adaptor-oligonukleotider liggeres til hver ende av fragmentene. Fragmentene med en lengde på 200-300 bp blir rensset og amplifisert med primere som kan hybridisere til oligonukleotider festet til bunnen av en flowcelle. Etter hybridisering blir fragmentene kopiert gjennom en kort PCR, og dobbeltrådet DNA (dsDNA) som dannes i denne reaksjonen blir kovalent bundet til bunnen av flowcellen, og fungerer som templat for en BridgePCR. Dermed dannes tette grupper av identiske DNA-fragmenter i flowcellen. Deretter degraderes reversDNA-trådene i dsDNA, og sekvenseringsprimere hybridiserer til ssDNA (Zhou et al. 2010).

Selve sekvenseringen skjer ved at ett og ett fluoroformerket nukleotid binder til 3'OH på den voksende nukleotidtråden som startes av sekvenseringsprimeren. Hvert nukleotid fungerer som en reversibel terminator av tråden og avgir fluorescens ved binding. Dette signalets bølgelengde gir

informasjon om basen som settes inn i den voksende sekvensen og det emitterte blir registrert av en detektor. Deretter gjøres 3'OH tilgjengelig for at et nytt nukleotid skal binde seg. Denne sekvenseringsprosessen består av et visst antall sykluser. Illuminasekvensering resulterer derfor i et stort antall DNA-sekvenser med en lengde på det samme antall baser som antall sykluser. En potensiell svakhet ved denne metoden er at den er avhengig av at alle DNA-trådene i en gruppe av identisk DNA forlenges samtidig med samme type nukleotid. Dette gjør at det detekteres kun ett signal fra hver gruppe. Eventuelle forsinkelser i løpet av de ulike reaksjonene kan føre til problemer ved deteksjon av signal (Zhou et al. 2010).

Denne metoden er nøyaktig og billigere enn Roche-metoden. Man får relativt mye sekvensdata til en lav pris. Ulempen med Illumina-sekvensering er at den gir genomsekvensen i kun korte sekvenser. Dette kan resultere i en lavere dekningsgrad, det vil si lite overlapp mellom de korte sekvensene, noe som gjør det vanskeligere å plassere sekvensene i riktig rekkefølge i for å oppnå den totale genomsekvensen. Å lage contiger krever høy coverage. Derfor kombineres denne vanligvis med Roche 454 Genome Sequencer-metode, som gir lengre sekvenser. Dette øker dekningsgraden betraktelig, samtidig som det også blir lettere å plassere sekvenser som er repetert flere steder i genomet.

### 1.2.3 Sanger sekvensering

Ved sekvensering av interne DNA-prøver på LMG brukes Sanger sekvenseringsmetode, eller "dideoxymetoden". Dette er en sekvenseringsmetode som baserer seg på DNA-kjede terminerende egenskapene til dideoxyribonukleotider, det vil si deoxyribonukleotider som mangler en hydroksylgruppe på 3'enden til ribosemolekylet. Dermed er ikke mulig å opprette en fosfodiesterbinding fra denne til et nytt nukleotid (Sanger et al. 1977).

Til Sanger sekvenseringsreaksjon trengs et DNA-templat med primere som omslutter regionen i templatet som skal sekvenseres, en DNA-polymerase, deoxyribonukleotider og fluorescens- eller radioaktivt merkede dideoxyribonukleotider. I løpet av en PCR vil polymerasen inkorporere deoxyribonukleotider inntil et dideoxyribonukleotid terminerer reaksjonen (Sanger et al. 1977). Dette resulterer i mange fragmenter av ulik lengde, merket med en spesifikk fluorescerende eller radioaktiv komponent, som signaliserer hvilke av de fire basene adenin, tymin, cytosin eller guanin, som er satt inn som reaksjonsterminerende nukleotid (Zhou et al. 2010).

DNA-fragmentene separeres på størrelse ved kapillær polyakrylamidgelelektroforese (PAGE), og fluorescens detekteres ved utgangen av kapillæret. De minste fragmentene når detektoren først, og

på grunnlag av signalet som detekteres og rekkefølgen det detekteres i, kan DNA-sekvensen bestemmes.

En fordel med Sanger-metoden, er at den gir lange sekvensfragmenter, med stor grad av nøyaktighet. Det som kan være en ulempe med Sanger-prinsippet er at den krever primere, det vil si at man må kjenne til noe av sekvensen for å kunne bestemme mer. Hvis man skal gjøre shotgun sekvensering ved bruk av Sanger-metoden, må man klonere fragmenter av genomisk DNA inn i vektorer, og deretter sekvensere ved bruk av primere som er spesifikke for vektoren. Dette er en omstendelig, tidkrevende og relativt dyr metode, som har blitt lite brukt etter at nyere metoder, som Roche og Illumina-sekvensering, er blitt tilgjengelig.

### 1.3 Ost – et meieriprodukt laget ved hjelp av melkesyrebakterier

Ost er et meieriprodukt laget av melk, løpe og melkesyrebakterier. Produksjon av ost består av flere trinn som ysting etterfulgt modning. Ysting innebærer bruk av starter-melkesyrebakterier og løpe, en proteinase som også kalles chymosin. Melk tilsettes løpe en bestemt tid etter tilsats eller ved en bestemt pH, noe som medfører koagulering av melken. Koagulering betyr at melkeproteinene kasein danner et nettverk som omslutter fettmolekylene i melken. Denne koaguleringen skjer raskere og kraftigere på grunn av tilsats av starter-melkesyrebakterier (se neste avsnitt). Videre i ysteprosessen blir mysen skilt ut, og den faste massen som gjenstår formes, presses og saltes (Brennan et al. 2004).

Mikrofloraen i ost kan deles inn i to grupper: Starter melkesyrebakterier og sekundær flora. Starter melkesyrebakterier er melkesyrebakterier som tilsettes i melken *før* løpetilsats. Disse er viktige både i produksjon og modning, og bidrar blant annet til syring av melken (som forsterker koaguleringen), men også til andre faktorer som er karakteristiske for hver enkelt ostetype, som smak og huldannelse (Beresford et al. 2001). Derfor er starterkulturene som benyttes, unike i form av blandingsforhold og sammensetning av bakterier.

Sekundær flora deles inn i "non starter LAB" (NSLAB), andre bakterier (eksempelvis *Brevibacterium* og propionsyrebakterier), mugg og gjær. Disse (med unntak av NSLAB) tilsettes i osten avhengig av hva slags ost som skal produseres. Disse bakteriene bidrar ikke til selve ystingsprosessen, men har mye å si for ostens modning (Beresford et al. 2001).

"Non-starter" melkesyrebakterier (NSLAB) tilsette under ystingsprosessen. Dette er mesofile laktobaciller og pediokokker som vokser dårlig i melk, men etableres etter hvert, i høye celledtall ( $10^6$ - $10^8$  cfu/g). Dette skjer i løpet av ostens modning. Av alle mesofile artene av *Lactobacillus* er *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus* og

*Lactobacillus curvatus* de artene som oftest har blitt identifisert (Beresford et al. 2001). Av *Pediococcus* er artene *Pediococcus acidilactici* og *Pediococcus pentosaceus* de som forekommer hyppigst ved isolering og identifisering i ost (Beresford et al. 2001).

## 1.4 Kittmodnet ost

Denne avhandlingen fokuserer spesielt på Ridderost, en bakterielt overflatemodnet ost som produseres av TINEs meierier i Tresfjord i Vestnes kommune i Møre og Romsdal.

### 1.4.1 Hva er kittmoden ost?

Bakterielt overflatemodnede ostetyper karakteriseres ved vekst av spesielle mikroorganismer på overflaten. Disse utvikler et kittlag av gjær eller bakterier, avhengig av hvilke organismer som er involvert. Dette kalles *kittmoden ost*. Den mikrobielle floraen på overflaten, og den biokjemiske aktiviteten denne har, er i stor grad med på å bestemme smaken på osten. Mikroorganismene på overflaten sørger for en produksjon av svovelforbindelser ved nedbrytning av blant annet aminosyren methionin, og interaksjoner som oppstår mellom disse sulfurforbindelsene bidrar til ostens smak (Brennan et al. 2004).

På overflaten til kittmodnede oster finnes hovedsakelig salttolerante gjær tidlig i modningsperioden. pH øker som følge av gjærens deaminering av aminosyrer, og man får etter hvert en dominans av Gram positive bakterier, spesielt coryneformede bakterier og ikke-patogene *Staphylococcus ssp.* Veksten av disse kan være relativt kraftig, ofte høyere enn  $10^9/\text{cm}^2$  (Brennan et al. 2004).

### 1.4.2 Faktorer som påvirker modningen av kittmodnet ost.

#### *Under produksjon*

Etter at osten har blitt lakesaltet, påføres den en kommersiell kultur som inneholder ulike kombinasjoner av bakterien *Brevibacterium linens*, gjæren *Debaryomyces hansenii* og/eller muggarten *Geotrichum candidum*. I noen tilfeller benytter man i stedet kulturer som tidligere har blitt brukt på eldre oster, for å sikre vekst av *alle* mikroorganismer nødvendige for kittmodning av osten. En ulempe ved en slik metode er at uønskede bakterier fra den eldre osten, eksempelvis forurensende og kvalitetsødeleggende bakterier og potensielt patogene mikroorganismer, også blir overført til de nye ostene (Brennan et al. 2004).

Osten modnes ved høy relativ fuktighet, og en temperatur på 10-15 °C i 14-35 dager. På tidlige stadier av modningen blir osten vasket med saltlake. I enkelte tilfeller påføres også kittkulturen en ekstra gang for å sikre tilstrekkelig utvikling av kittlag (Brennan et al. 2004).

### *Miljøfaktorer*

Mange ytre faktorer er avgjørende for en god kittmodning. Blant annet er riktig relativ fuktighet viktig for å hindre uttørking av osten. Modningstemperaturen skal være i det sjiktet der mikroorganismene på ostens overflate trives best, mens modningstiden skal være lang nok for tilstrekkelig vekst og utvikling av kittlag. Osten må også snus regelmessig for å oppnå en jevn eksponering for O<sub>2</sub> og en riktig fasong (Brennan et al. 2004).

For kittmodnet ost vil vaskingen av osten forstyrrer mikrohabitatet kittlaget utgjør, og gjær blir dermed utkonkurrert av de andre mikroorganismene tilstede på grunn av den sene vekstraten gjær har. Økning i pH stimulerer også vekst av Gram positive corynedannede bakterier. Man får dermed et bakterielt kittlag. Dette vil være tilstrekkelig utviklet etter 2 til 3 uker og osten overføres da til et rom med lavere temperatur for ytterligere modning (Brennan et al. 2004).

### *Fysiske og kjemiske karakteristika*

Mikrofloraen i kittlaget påvirkes av pH, salt og fuktighet. Variabler som igjen påvirker dette er:

- Ulik forbehandling av melka (pasteurisering eller råmelk)
- Type starterkultur benyttet
- Grad av ettervarming, pressing og salting av ostemassen
- Hyppigheten av saltvasking under modningsperioden
- Modningstemperatur
- Relativ fuktighet under modningsperioden
- Modningstid

Fersk oster bør ha en pH på 5,1-5,2 etter at starterkulturen har omsatt laktose til melkesyre og har surgjort ostemassen. Ved denne pH vil gjær utvikle seg, i motsetning til salttolerante bakterier, som krever en pH på minst 5,6 (Brennan et al. 2004). I tillegg vil lav vannaktivitet, lav temperatur og mye salt gjøre osten til et godt vekstmedium for gjær. Gjæren vil imidlertid deaminere aminosyrer tilstede i osten, og føre til økt produksjon av NH<sub>3</sub> på overflaten av osten. Dette medfører en økning i pH, noe som tilrettelegger for vekst av de salttolerante bakteriene (Staphylococcer, micrococcer og coryneformede bakterier) (Brennan et al. 2004).

Salt fra overflaten av osten vil diffundere innover mot ostens kjerne og danne en saltgradient innover i osten. Dette saltet, samt luftfuktigheten, vil påvirke vannaktiviteten ( $a_w$ ). Vannaktiviteten i kittmodnet ost varierer som regel fra 0,95 hos de harde ostene, med vanninnhold <40 % til 0,98 hos de mykere ostene med opp til 56 % vanninnhold (Brennan et al. 2004).

### 1.4.3 Mikroorganismer i kittlaget

#### *Gjær*

Gjærartene *Debaryomyces hansenii* og *Geotrichum candidum* er de to artene som er funnet oftest i kittlaget. *Geotrichum candidum* har karakteristikkene til både gjær og mugg. Det har imidlertid blitt observert en mye høyere proteolytisk og lipolytisk aktivitet hos stammene isolert fra ost. På grunnlag av dette har man delt inn i to *Geotrichum candidum* biotyper; én type som vokser raskt med sterk proteolytisk aktivitet, og én type som vokser saktere, med liten proteolytisk aktivitet.

Gjærvekst på kittmodnet ost i begynnelsen av modning er viktig av to grunner. Gjær øker pH, og produserer forbindelser som stimulerer vekst av kittbakterier. Gjærcellene metaboliserer laktat, som tidligere har blitt produsert av starterkulturen, til CO<sub>2</sub> og H<sub>2</sub>O, og deaminerer aminosyrene slik at pH øker ytterligere til over 6,5. Dette resulterer i en pH-gradient, der pH inni osten er lavere enn på ostens overflate. Ved denne pH trives kittmodningsbakteriene. Økt pH på ostens overflate bidrar i tillegg positivt for enzymene som er viktige for ostens modning. Disse enzymene har pH-optimum på ca 7,0 (Gripon 1997). Gjær på ostens overflate er også viktig fordi den produserer forbindelser som er nødvendige for vekst av *B. linens* (Purco et al. 1951a).

I tillegg bidrar gjær til modningsprosessen med sine proteolytiske og lipolytiske enzymer, samtidig som den hindrer uttørking av osten og bidrar til utvikling av smak ved produksjon av flyktige, organiske syrer og karbonylforbindelser (Brennan et al. 2004).

#### *Coryneformede bakterier*

Valdés-Stauber et al. (1997) gjorde en studie av coryneformede bakterier på ost, der de ønsket å identifisere den mikrobielle sammensetningen på overflaten av kittmodnet ost fra ulike meierier i Tyskland. De isolerte og identifiserte blant annet *Brevibacterium linens* og *Corynebacterium ammoniagenes*. Disse dominerte på alle undersøkte oster, samtidig som de påviste et varierende antall ulike *Corynebacterium ssp.* og *Arthbacter ssp.*

Flere ekstracellulære enzymer har blitt påvist hos *Brevibacterium linens*, blant annet tallrike proteinaser (Ratray & Fox 1999). Man har også påvist intracellulære proteolytiske enzymer, men

denne aktiviteten er relativt lav i forhold til den ekstracellulære aktiviteten (Ratray & Fox 1999). Hos stammene med proteolytisk aktivitet, har man også sett en lipolytisk aktivitet, som også bidrar til smaksutvikling i osten i tillegg til den ordinære modningen (Brennan et al. 2004).

### ***Staphylococcus og micrococcus***

Man har funnet store mengder av ulike arter *Staphylococcus* og *Micrococcus* på kittmodnet ost (Brennan et al. 2004). Av disse slektene er *Staphylococcus* den viktigste og mest dominante. De første dagene i ostemodningen er *Staphylococcus* mest dominerende av alle bakteriene, inntil corynoformede bakterier erstatter store deler av bestanden på ostens overflate. De fleste artene av *Staphylococcus* og *Micrococcus* som finnes i kittlaget til bakterielt overflatemodnet ost, er svært tolerante for salt (halotolerante), og de kan tåle opp til 10 % (Brennan et al. 2004).

## **1.5 Forurensning i produksjonsanlegg i meierier**

Funn av Enterobacteriaceae på ost er vanligvis et tegn på dårlig hygiene under ysting og prosessering av melk. På mange oster kan man likevel finne relativt høye tall av enterokokker ( $10^7$ - $10^8$  cfu/g) i normalfloraen, og på grunnlag av dette er det forskere som mener at disse bakteriene kan ha en mulig positiv rolle i modningen av osten (Brennan et al. 2004). Flere stammer av enterokokker produserer bakteriociner som virker antibakterielt mot patogene mikroorganismer som *Listeria monocytogenes*, patogene stammer av *Clostridium* og *Staphylococcus aureus*. Disse stammene kan være en ønskelig del av mikrofloraen i enkelte meierianlegg (Giraffa 1995).

## **1.5 Hensikt og problemstilling**

***Sekvensering – å finne overlappende sekvenser og dermed kunne sette sammen flere av sekvensfragmentene fra tidligere genomsekvensering.***

Innen høsten 2011 var genet som trolig kodet for Leucocin H det eneste som var funnet av genklyngen for bakteriocinet. Dette genet var lokalisert i en sekvens på cirka 520 bp, hvorav 192 bp kodet for det antibakterielle peptidet; det strukturelle genet for Leucocin H. Den resterende sekvensen var ubestemt. For å kunne finne mer av genklyngen for Leucocin H, var det ønskelig å finne mer av den omliggende genomsekvensen. Dette ville gjøre det mulig å finne overlapp, og dermed sette sammen flere av sekvensfragmentene fra Roche- og Illumina sekvensering.

### ***Kloning og transformering – kan andre bakteriestammer, som produserer andre sirkulære bakteriociner, produsere Leucocin H?***

Det var ønskelig å bekrefte at peptidet kodet av den identifiserte gensekvensen kodet for leucocin H betahar bakteriocinaktivitet. Derfor ønsket vi å klonе genet inn i en melkesyrebakterie. Dersom bakteriocin ble produsert, ville der være dødelig for produsenten. Vi antar at immunitetsproteinet kodes av et nærliggende gen. Derfor klonet vi også et fragment med flere gener, for å se om bakteriocin ble produsert.

Siden leucocin H antas å være sirkulært ønsket man å klonе genet for Leucocin H inn i genomet til *Lactococcus garvieae* LMG 3390. Denne stammen produserer allerede det sirkulære bakteriocinet Garvicin ML (van Belkum et al. 2011). Dersom dette var vellykket, kunne man bestemme denne stammens evne til produksjon av bakteriocinet.

Dersom sekvenseringen førte fram, og større deler av genklyngen rundt Leucocin H ble funnet, ville man også forsøke å klonе dette i LMG 3390, og undersøke eventuelle forskjeller i bakteriens vekst, metabolisme og effekt på miljøet.

### ***Egenskaper ved Leucocin H og bakteriocinets evne til å hemme vekst av Enterobacteriaceae på Ridderost***

Ridderost er en kittmodnet ost produsert i TINEs meierier i Tresfjord. I meieriet har man funnet bakterier av familien *Enterobacteriaceae* på ridderost, og i viskelaken som benyttes under modning av osten.

Myndighetene har satt grenser for antallet cfu/g (colony forming units/gram) av *Enterobacteriaceae* og coliforme bakterier tillatt på ost. Av fem prøveuttak kan to ha et antall på inntil  $10^3$  cfu/g. De resterende tre prøveuttakene må ha færre enn  $10^2$  cfu/g (Comission Regulation (EC) No 2073 2005). Selv om TINE klarer å holde disse kravene, ønsker man å redusere/eliminere forekomsten av slike bakterier på ost.

Vi ønsker å teste Leucocin H sin effekt på antall *Enterobacteriaceae* i viskelake, med Ridderost som vekstmedium.



## 2. Materiale

Tabell 2: Bakteriestammer med LMG-nummer, veksttemperaturer, vekstmedium benyttet i dette prosjektet, og eventuelle kommentarer om bakteriocinproduksjon, innhold av vektorer, osv.

Navn	LMGT-nummer	Veksttemperatur (°C)
<i>Enterococcus faecalis</i>	2708	30
<i>Escherichia coli</i>		37
	2700	
• DH5α®pMG36e	2702	
• DH5α®pBluescript	3268	
• DH5α®pAT28	3279	
<i>Pseudomonas fluorescense</i>	3020	30
<i>Staphylococcus aureus</i>	3022	30
<i>Listeria innocua</i>	2710	30
<i>Lactococcus lactis cremoris</i>	2245	30
<i>Bacillus cereus</i>	2711	30
<i>Leuconostoc gasicomitatum</i>	2601	25
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i> A1	3752	25
<i>Lactobacillus sakei</i>	2313	30
<i>Lactococcus garvieae</i>	3390	30
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> IL 1403	2903	30

Tabell 3: Utstyr og instrumenter

Type	Modell	Leverandør
Støpekar		
Elektroforesekar	Hoefer® HE33	Pharmacia Biotech
Geldoc	Benchtop UV	UVP
Autoklav	SC 500	Matachana
Sentrifuge	5804 R	Eppendorf
Sentrifuge	Biofuge Fresco	Heraeus
Avtrekk		Kebo Healthcare Systems
Gassbrenner	Flameboy	Integra Biosciences
Inkubator, 25°		Aqua®Lytick
Elektroporeringsapparat	Pulse Controller	BioRad
Inkubator, 30°C		Termaks
Ismaskin	KF85	Porkka
Elektroporeringsapparat	GenePulser™	BioRad
Fryser	-20°C Fryser	Bosch
Fryser	-80°C Fryser	Heto Ultra Freeze

Thermocycler	MyCycler™ og S 1000™	BioRad
Thermocycler	PTC-100™	MJ Research, Inc.
Mikrotiter Plateleser	Multiscan Ascent	Labsystems
Mikrobølgeovn		Samsung
Nanodrop Spektrofotometer	ND-1000	NanoDrop®
pH-meter	MP 220	Mettler Toledo
Kjøleskep	Grand Cooler	Bosch
Vortexmikser	G-560E	Scientific Industries
Vannbad, 55°C	TW20	Julabo
Vannbad, 25, 30 og 37°C	U3	Julabo
Pipetter 0,5-10 µL, 2-20 µL, 20-200 µL og 100-1000 µL		Eppendorf
Pipette, 1-5 ml		Finntip
Mikrotiter Plateleser	Spectrostar Nano	LMG Labtech
Spektrofotometer	Colorimeter 252	CIBA Corning
Dialysefilter	0,025µm VSWP	Millipore

Tabell 4: Kits

Kit	Leverandør
ABI PRISM® BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems
E.Z.N.A. Plasmid Mini kit I	Omega Bio-tek
E.Z.N.A Cycle Pure kit	Omeg Bio-tek
Nucleospin® Extract II	Macherey-Nagel
Zero Blunt® TOPO® PCR Cloning Kit	Invitrogen

Tabell 5: Kjemikalier

Navn	Leverandør
di-Natriumhydrogenfosfat-Dihydrat (Na <sub>2</sub> HOP <sub>4</sub> *2H <sub>2</sub> O)	Merck
Natriumdihydrogenfosfat-Monohydrat (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> *H <sub>2</sub> O)	Merck
Natriumklorid (NaCl)	Merck
Ammoniumsulfat	Aristar®
Bacto Agar	Saveeb Werner AB
Bovine Serum Albumin	New England Biolabs
dNTPs	TaKaRa
Erythromycin	Sigma®
Kanamycin	Sigma®
Spectinomycin	Sigma®
Ampicillin	Sigma®
Ethanol	Kemetyl
Etidiumbromid	Sigma®

Glyserol	Sigma®
Glysin	Merck
Glukose	Merck
M17 Broth	Oxoid
M17 agar	Oxoid
MRS (deMann, Rogosa, Sharpe) Broth	Oxoid
VRBGA (Violet Red Bile Glucose Agar)	Oxoid
BHI (Brain Heart Infusion)	Oxoid
Trypton	Oxoid
Gjærekstrakt	Oxoid
Sucrose	Merck
Natriumsitrat (C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> Na <sub>3</sub> O <sub>7</sub> )	Merck

Tabell 6: Buffere

Navn	Innhold
<b>GYT (Glycerol Yeast Extract)</b>	10% (v/v) glyserol, 0,125% (w/v) gjærekstrakt, 0,25% (v/v) trypton.
<b>Loading Buffer</b>	40 % (v/v) sukrose, 2 mM EDTA, og noen korn bromthymolblått
<b>TAE (Tris Acetic EDTA)</b>	40 mM Tris-base, 1µM EDTA pH 8,0 og 1,1 % (v/v) eddiksyre
<b>TE (Tris-EDTA) (0,1x)</b>	1 mM Tris-HCl po 8,0 og 100 µM EDTA pH 8,0

Tabell 7: Enzymer.

Enzym	Buffer	Leverandør
<b>DyNAzyme</b>	10x Optimized DyNAzyme™ Buffer	Finnzyme
<b>Phusion® High-Fidelity DNA polymerase</b>	P5x Phusion Buffer HF	Finnzyme
<b>T4 DNA Ligase</b>	T4 DNA Ligasebuffer	New England Biolabs
<b>Lysozym</b>		Sigma
<b>RsaI</b>	Buffer 4	New England Biolabs
<b>HindIII</b>	Buffer 2	New England Biolabs
<b>EcoRI</b>	EcoRI-buffer	New England Biolabs
<b>EcoRV</b>	Buffer 3	New England Biolabs
<b>HincII</b>	Buffer 3	New England Biolabs
<b>BamHI</b>	Buffer 3	New England Biolabs
<b>PstI</b>	Buffer 3	New England Biolabs

Tabell 8: Standarder

Navn	Leverandør
1 kb Ladder	New England Biolabs, Inc.
1 kb Ladder	Invitrogen

Tabell 9: Primere.

Navn	Sekvens (5'→3')	T <sub>m</sub> (°C)	Merknad
3601up1	CCAACATAATTTCAATTATAGTCG	58	
3601d1	ATAGTGCTAGCCGTGTATAGT	55	
36013	ACGGAACCCTAGAGTTTTGATA	60	
36014	<i>TGCAgagc</i> TCCAGATTATTTTGAATATATCGTCTC	61	Har et restriksjonssete for SacI på 5'enden.
36015	<i>ttgaaatggcaatcg</i> ttTCCAGATTATTTTGAATATATCGTCTC		Har en hale som overlapper med visse deler av pMG36e, til bruk i SOE-PCR
36016	ACATCTATATCAACCCGCTAC	58	
36017	GCAATCTACTATACACGGCT	57	
36018	TGCCAAGATCCGATACCAG	67	
36019	TGGGTACATCGTATGTAGTGG	60	
36020	CAAAACAACATTGAGAAATTGTGACAT	66	
36021	CTCAATGTTGTTTTGTTGGCCAT	67	
36022	GTGCTCTTGCTGAACCAT	63	
36023	<i>ttgaaatggcaatcg</i> tttCCTGTTGACATTGATTCCTA	60	Har en hale som overlapper med visse deler av pMG36e, til bruk i SOE-PCR
36024	ACACCGTGAGGAATAATATGCA	63	
36025	CAACATTGGGTATGATGTCGCT	66	
36026	ATCGTTCCAAATGCTCCACA	67	
Pmg4	ATGGGTCGATCGAATTCGGTC	69	
Pmg8	AGTTGCGGATGTACTTCAGA	60	
Pmg12	GAAACGATTGCCATTCA	60	
M13 rev (-46)	GAGCGGATAACAATTTACACAGG	67	
M13 rev (-26)	CAGGAAACAGCTATGAC	51	
M13 fwd (-46)	GCCAGGGTTTTCCAGTCACGA	73	
M13 fwd (-20)	GTA AACGACGGCCAGT	59	
1F	GTGTTTGATCTTGGCTCAC	59	Primer til amplifisering av 16S-sekvenser
4R	ACGGGCGGTGTGTRC	63	Primer til amplifisering av 16S-sekvenser

## 3. Metode

### 3.1 Sekvensering av contig på 570 bp

Før dette masterprosjektet startet, hadde man en contig på 570 bp. Denne ble laget ved å kombinere flere Illumina og Roche sekvensfragmenter ved hjelp av overlapp mellom disse. Det var imidlertid mulighet for at koblingen av disse sekvensfragmentene var feil eller inneholdt sekvenseringsfeil. For å undersøke contigen var korrekt sammensatt, ble det gjort en Polymerase Kjedereaksjon (PCR). Polymerase Chain Reaction (PCR), eller polymerase kjedereaksjon, en metode bestående av termale sykluser der definerte fragmenter av DNA blir amplifisert in vitro (Mullis et al. 1986). Under amplifisering denatureres DNA-molekylet til ssDNA, som fungerer som templat for syntese av nytt DNA ved hjelp av en termostabil DNA polymerase. Termiske sykluser regulerer reaksjonen (Mullis et al. 1986).

Genomisk DNA ble ekstrahert fra en kultur av *Leuconostoc gasicomitatum* LMGT 3601. Dette ble brukt som templat for en PCR som skulle bekrefte at contigen på 570 bp, i realiteten var én sammenhengende sekvens. Til denne PCR-reaksjonene brukte man primerne 36013 og 36014 (tabell 9). Ved bruk av disse to primerne skulle man, hvis contigen var korrekt, få et fragment på cirka 570 bp.

Fragmentet som resulterte av PCR-reaksjonen ble rensert med E.Z.N.A. Cycle Pure Kit, før det ble presipitert med natriumacetat og etanol, og sekvensert med Sanger sekvenseringsmetode. Ved hjelp av NEB cutter V2.0 fant man potensielle åpne leserammer i sekvensen som resulterte av denne sekvenseringen. Med disse ble gjort blastsøk i NCBI.

### 3.2 Kloning av det Leucocin H-kodende genet

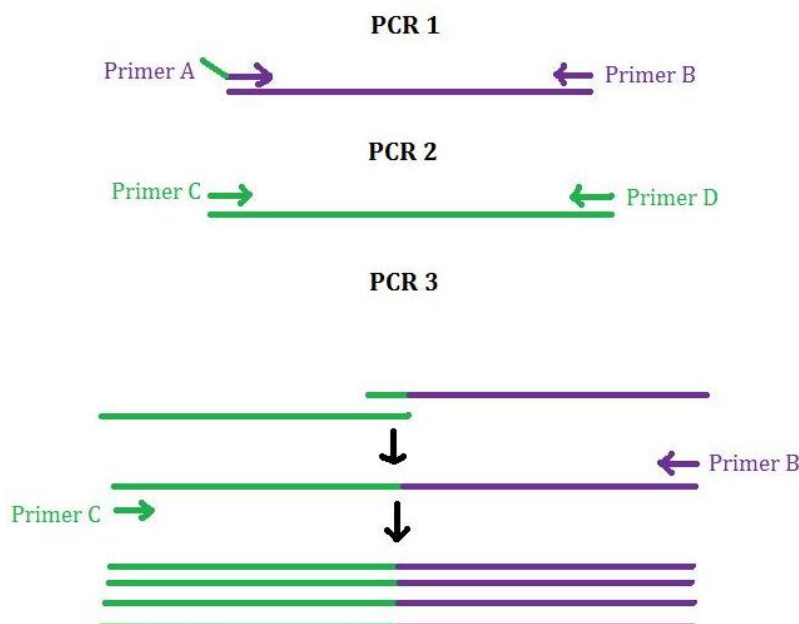
Man ønsket å klonere og transformere sekvenssegmentet på 520 bp, som trolig inneholdt det strukturelle genet for Leucocin H. Målcellene var *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* IL1403 LMGT 2903; en ikke-bakteriocinproduserende stamme, og *Lactococcus garvieae* LMGT 3390, som produserer det sirkulære bakteriocinet garvicin ML (Gabrielsen et al. 2012; van Belkum et al. 2011).

Den leucocin H-produserende stammen *Leuconostoc gasicomitatum* LMGT 3601, ble dyrket i MRS til  $OD_{\lambda=600}$  0,4. DNA ble ekstrahert ved bruk av E.Z.N.A. Plasmid Mini Kit I D6943-02, levert av OMEGA bio-tek.

*Escherichia coli* LMG 2702 med vektoren pMG36e ble dyrket i Luria-Bertani-medium (LB) ved 37°C med 10µg/ml Erythromycin. DNA ble ekstrahert ved bruk av E.Z.N.A. Plasmid Mini Kit I levert av OMEGA bio-tek. PMG36e er en vektor som inneholder blant annet den sterke, konstitutive promotoren p32. Denne vektoren inneholder et gen for erythromycinresistens (Vandeguchte et al. 1989). Ved kloning og transformering med denne vektoren er Erythromycin derfor et aktuelt antibiotikum for seleksjon av transformanter.

Til rekombinering av p32 i pMG36e med genet for Leucocin H, benyttet man seg av "Gene Splicing by Overlap Extension PCR" (SOE-PCR). "Splicing by Overlap Extension" (SOE) er en metode som gjør det mulig å rekombinere DNA-segmenter uten bruk av restriksjonsenzymer og ligase. Denne metoden omfatter minimum tre PCR-reaksjoner. De to første PCR-reaksjonene innebar amplifisering av de to DNA-sekvensene man ønsker spleiset sammen. Den ene primeren som benyttes ved PCR 1 (amplifisering av DNA-segment 1) er forlenget med en sekvens som er komplementær til 3'-enden av produktet av PCR 2 (amplifisering av DNA-segment 2) (Horton 1995). Figur 3 illustrerer dette prinsippet.

Ved PCR 3 benyttes de to komplementære endene til PCR-produkt 1 og PCR-produkt 2 som primere, samtidig som resten av PCR-produktene fungerer som templat. Dermed vil man amplifisert et sammenhengende PCR-produkt bestående av de to DNA-segmentene (Horton 1995).



**Figur 3: Splicing by Overlap Extension PCR.** Primer A har en "hale" med den komplementære sekvensen til PCR-produktet fragmentet skal kombineres med. Dette gjør at de to PCR-produkt 1 og 2 vil hybridisere og prime hverandre ved PCR 3. Når dette har skjedd, trengs primere til å amplifisere produktet av spleisingen (her primer B og C).

Ved bruk av SOE-PCR ble genet for erythromycinresistens og promotoren p32 plassert rett oppstrøms for segmentet på 550 bp. I vårt tilfelle var primeren 36015 tilsvarende Primer A i figur 3, 36013 tilsvarte primer B. PCR 1 med disse to primerne og genomisk DNA fra LMGT 3601 som templat, resulterte i et PCR-produkt på ca 550 bp. I PCR 2 ble primerne pmg8 og pmg12 (tilsvarende henholdsvis primer C og D i figur 3), og templatet pMG36e, brukt til å danne et 1,5 kb stort produkt.

Deretter ble en SOE-PCR med de to tidligere PCR-produktene, samt primerene pmg8 og 36013 utført. For å undersøke at denne SOE-PCR var vellykket, ble det gjort en gelelektroforese, som gjorde det mulig å se størrelsesforskjellen mellom de ulike PCR-produktene.

SOE-blunt-end-PCR-produktet ble videre klonet inn i OneShot®Kompetente celler ved hjelp av Zero Blunt® TOPO® PCR Cloning Kit levert av Invitrogen. Dette er en rask og enkel måte for å klonere DNA inn i kjemokompetente *Escherichia coli*. TOPO®Kloning benytter enzymet Topoisomerase I, isolert fra viruset *Vaccinia*, som binder til dobbeltrådet DNA og kløyver fosfodiesterbindingene i DNA backbone etter sekvensen 5'-CCCTT-3'. Energien som dannes når en slik fosfodiesterbinding brytes, blir lagret ved at det dannes en ny, kovalent binding mellom 3' fosfat i den brutte DNA-tråden, og en tyrosin-residu i topoisomerase I. Når den brutte tråden skal bindes sammen igjen, blir denne fosfotyrosin-bindingen angrepet av 5'hydroksyl som i utgangspunktet resulterte fra brudd på tråden. Dermed reverseres topoisomerase I-reaksjonen. Vektoren, pCR®-Blunt II-TOPO®, har en slik topoisomerase I fra *Vaccinia*-viruset kovalent bundet til 3'enden til hver DNA-tråd (Invitrogen™ 2006).

Kloning og transformasjon inn i kjemokompetente *Escherichia coli* ble utført i henhold til prosedyre fra leverandøren. Cellene ble plattet ut på skåler med GM17 tilsatt 50µg/ml Kanamycin og 10 µg/ml Erythromycin, samt 40 µl X-gal.

Transformantene ble inkubert ved 37°C ON, og deretter slemmet opp i dH<sub>2</sub>O og varmebehandlet før en kontroll-PCR med samme primere som tidligere brukt i SOE-PCR (representert av henholdsvis primer C og B på figur 3) for å undersøke om konstruktet av pMG36e og genet for Leucocin H var til stede i transformantene.

Transformanter med insert ble videre dyrket i LB tilsatt 100 µg/ml Erythromycin og 50 µg/ml Kanamycin ON. Plasmid ble ekstrahert deretter ved bruk av E.Z.N.A. Plasmid Mini Kit I, levert av OMEGA bio-tek.

Det nødvendig å sette konstruktet inn i et høy-kopi plasmid, pat28. Denne vektoren er konstruert av DNA fra både Gram positive og Gram negative arter. Dette gjør det mulig å transformere konstruktet

inn i både Gram positive og Gram negative celler. Vektoren inneholdt resistensgener mot antibiotikumet Spectinomycin (Trieucot et al. 1990).

Ekstrahert pat28 og konstruktet av vektoren pCR<sup>®</sup>-Blunt II-TOPO<sup>®</sup>, p32 og det 650 bp fra 3601 ble begge kuttet med restriksjonsenzymet BamHI. Dette enzymet kutter i sekvensen 5'...G<sup>ˆ</sup>GATCC...3' (New England Biolabs Inc. 2011b). Deretter ble de to plasmidene ligert sammen ved bruk av T4 DNA ligase fra New England Bio-Labs.

Ligasen ble inaktivert ved 70 °C i 30 minutter for å øke forekomsten av transformanter ved elektroporering (Kobori & Nojima 1993). Ved elektroporering blir DNA og elektrokompetente celler utsatt for en elektrisk puls gjennom en kuvette. Den biologiske mekanismen for opptak av DNA ved denne metoden er ukjent (Dower et al. 1988). Man vet at spenningen som sendes gjennom løsningen likevel fører til at DNA tas inn i cellen i større grad enn ved kjemisk transformasjon (Dower et al. 1988). For å hindre overspenning er det viktig at løsningen i kuvetten har en tilstrekkelig lav konduktivitet. Derfor ble ligeringsmiksen dialysert i 90 minutter før elektroporering (Atrazhev & Elliott 1996).

Konstruktet bestående av vektoren pat28, promotoren p32, 520 bp med det strukturelle genet for Leucocin H, og deler av vektoren pCR<sup>®</sup>-Blunt II-TOPO<sup>®</sup>, ble transformert inn i One Shot<sup>®</sup> Electrocomp<sup>™</sup> *Escherichia coli* i henhold til protokoll av Tung og Chow (1995). Transformanter ble dyrket på GM17 med 50 µg/mL Kanamycin og 150 µg/mL Spectinomycin.

6 transformanter ble slemmet opp i hvert sitt eppendorfrør og varmebehandlet som forberedelse til en kontroll-PCR med Phusion<sup>®</sup> High-Fidelity DNA Polymerase. De samme primere som tidligere brukt i SOE-PCR (representert av henholdsvis primer C og B på figur 3) ble brukt for å undersøke at konstruktet av pMG36e og genet for Leucocin H var til stede i de nye transformantene. De riktige cellene ble dyrket i 37°C ON i LB med 50 µg/mL Kanamycin og 150 µg/mL Spectinomycin, og DNA ble ekstrahert ved hjelp av E.Z.N.A. Plasmid Mini Kit I, levert av OMEGA Bio-tek.

I henhold til metode utviklet av Holo og Nes (1989), ble det laget elektrokompetente celler av *Lactococcus lactis* IL1403 LMG 2903 og *Lactococcus garvieae* LMG 3390. Konstrukt av det strukturelle genet for Leucocin H, vektoren pCR<sup>®</sup>-Blunt II-TOPO<sup>®</sup>, p32 og pat28, ble transformert i disse cellene ved bruk av samme prosedyre som brukt av (Holo & Nes 1989). Denne prosedyren innebærer dyrking av celler i osmotisk stabilisert medium der det er tilsatt glysin, som inhiberer dannelsen av cellevegg. Dette gjør at cellene som dyrkes opp har svakere cellevegg, og kan ta opp DNA lettere (Holo & Nes 1989).



Transformasjon ved elektroporering ble utført etter prosedyre utviklet av Holo og Nes (1989). Ved transformering ble ekstrahert pat28 og pMG36e brukt som kontroller på de kompetente cellenes kvalitet og evne til å ta opp DNA.

Transformantene som vokste opp ble lysozymbehandlet i 10 min ved 37°C, og brukt som templat i en PCR med primerne 36013 og 36014, som begge skulle hybridisert til de 550 bp som ble transformert inn i de elektrokompetente IL1403 og 3390.

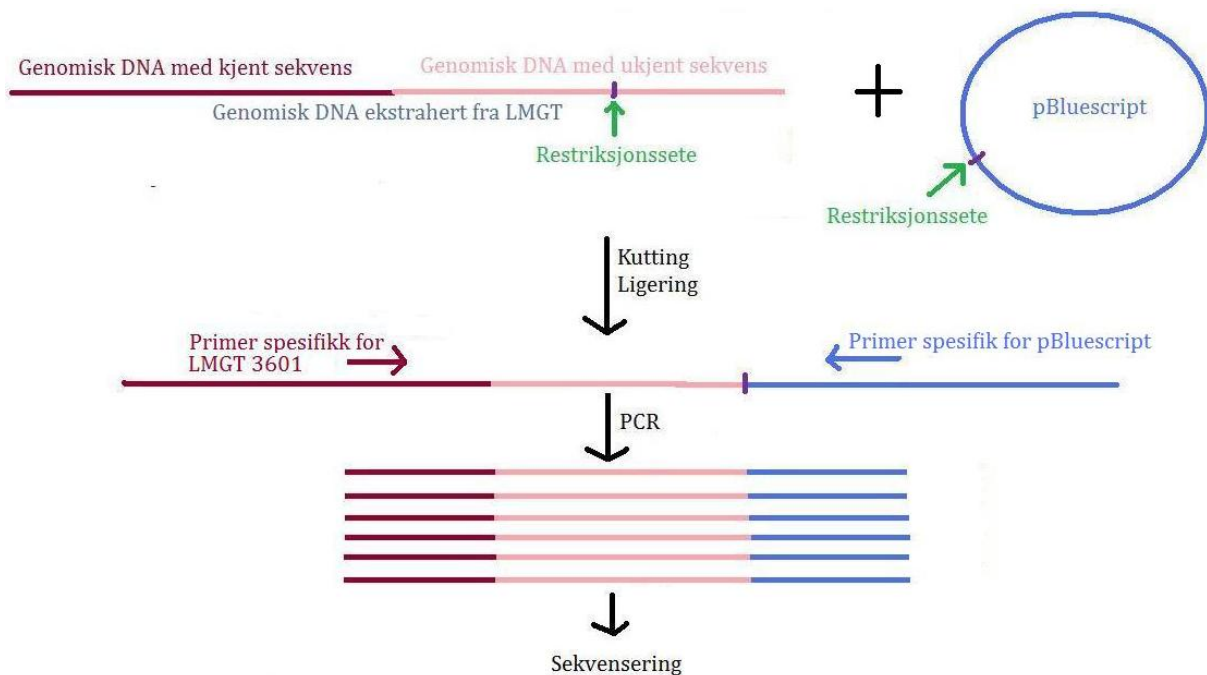
### **3.3 Sekvensering – å finne overlappende sekvenser og lage contiger**

I løpet av prosjektperioden har man gjort flere forsøk på ulike metoder for å avdekke ny, ukjent genomsekvens for LMGT 3601. De ulike metodene som ble forsøkt, blir gjennomgått i kronologisk rekkefølge følgende avsnittene.

#### **Sekvensering ved restriksjonskutting og ligering i vektor**

En mulig strategi for å oppnå ny, ukjent sekvens for LMGT 3601, var å kutte en viss mengde genomisk DNA fra LMGT 3601 og en viss mengde av en vektor, og ligere dette sammen. I dette forsøket benyttet man vektoren pBluescript. Det aktuelle restriksjonsenzymet ville kuttet et korresponderende restriksjonssete i de ukjente delene av genomisk DNA, og dersom dette lå tilstrekkelig nært den identifiserte sekvensen, ville dette ukjente DNA kunne bli innlemmet i et DNA-fragment som kunne fungere som templat for en PCR.

En PCR med to primere, en spesifikk for pBluescript, og en spesifikk for LMGT 3601, ble brukt for å oppnå produkter av ukjente størrelser. Ved gelelektroforese ville man da forventet bånd av bestemte lengder, avhengig av hvor i templatet disse primerne hybridiserte. Disse PCR-produktene håpet man ville inneholde deler av DNA som tidligere er sekvensert. Se illustrasjon i figur 4.



**Figur 4: Strategi for sekvensering av genomisk DNA ekstrahert fra LMG 3601, ved hjelp av restriksjonskutting og ligering av både genomisk DNA og pBluescript etterfulgt av PCR med primere spesifikke for kjente sekvenser i de to DNA-molekylene.**

Genomisk DNA ble ekstrahert fra 10 ml kultur av 3601 i dyrket ON i MRS ved 25°C. *Escherichia coli* DH5α LMG 3268 med pBluescript SK+, ble dyrket ON ved 37°C i LB med 150 µg/mL Ampicillin. pBluescript SK+ er en kommersiell vektor levert av den tidligere eksisterende leverandøren Stratagene, som er nå en del av Agilent Technologies. Genomisk DNA ble ekstrahert med Plasmid Mini Kit I, levert av Omega bio-tek.

DNA og plasmid ble restriksjonskuttet i fire forskjellige prøver, med henholdsvis fire av restriksjonsenzymene i tabell 7; RsaI, HindIII, EcoRI og EcoRV. Restriksjonskutting foregikk i et reaksjonsvolum på 20 µL. Hver restriksjonsreaksjon ble inkubert i 2 timer ved temperaturer etter anbefaling fra leverandøren (New England Biolabs Inc. 2011b), før reaksjonen ble stoppet ved varmebehandling i 20 min ved 80°C.

Presipitering av DNA ved bruk av natriumacetat og etanol ble utført i henhold til prosedyre av Moore (1999), etterfulgt av ligeringen med T4 DNA ligase og tilhørende buffer (New England Biolabs Inc. 2011a). Ligeringen foregikk i 16°C ON i 20 µL reaksjonsvolum, og stoppet ved frysing (-20°C).

pBluescript kuttet med EcoRV ble ligert med genomisk DNA kuttet med RsaI og EcoRV, henholdsvis, ettersom kutting med begge disse restriksjonsenzymene gir "blunt ends". Genomisk DNA kuttet med

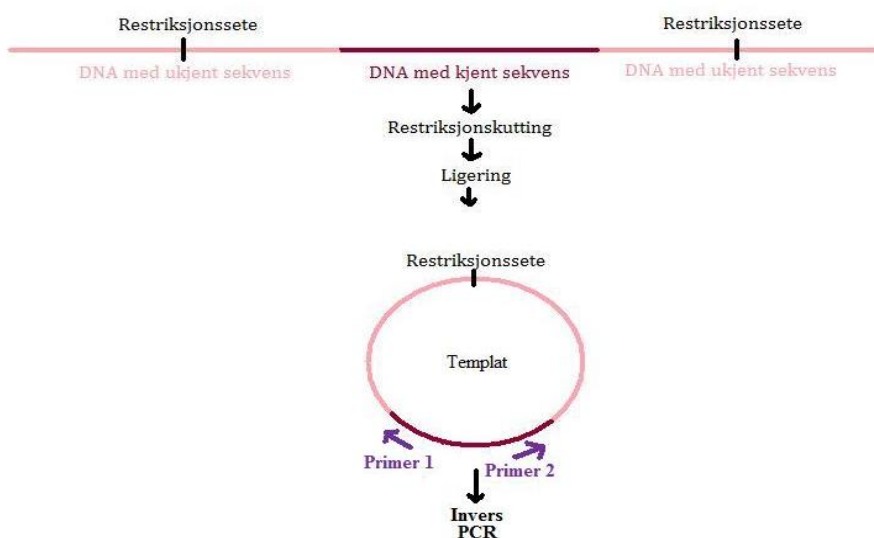
HindIII og EcoRI, ble ligert til pBluescript kuttet med samme enzym, siden kutting med disse restriksjonsenzymene resulterte i "sticky ends" (New England Biolabs Inc. 2011b).

Ulike M13-primere kombinert med en av de to primerne 3601up1 eller 3601d1 (tabell 9) ble brukt i en PCR. Til denne ble DyNAzyme™II DNA Polymerase brukt, i et reaksjonsvolum på 50 µL komponert i henhold til prosedyre fra leverandør (Finnzyme 2011a) Phusion® High-Fidelity DNA polymerase fra Finnzymes ble også brukt i enkelte PCR-forsøkt. I tillegg testet man ulike annealingstemperaturer fra 50-60 °C. Elongeringstid for reaksjonen var 3 minutter. DyNAzyme II DNA polymerase kan transkribere cirka 1000bp/min (Finnzyme 2011a), mens Phusion® High-Fidelity DNA polymerase har en høyere transkripsjonsrate (cirka 3000 bp/min) og en mer nøyaktig proofreadingsmekanisme (Finnzyme 2011b).

PCR-produktene ble applisert på en 1 % agarosegel for gelelektroforese med 1 kb ladder fra New England Biolabs, Inc. Grunnet store problemer med denne metoden, gikk man bort fra disse forsøkene, og valgte en ny strategi, for oppnåelse av mer genomisk DNA-sekvens. Denne inkluderte Invers PCR og megaprimer på restriksjonskuttet og selv-ligert DNA.

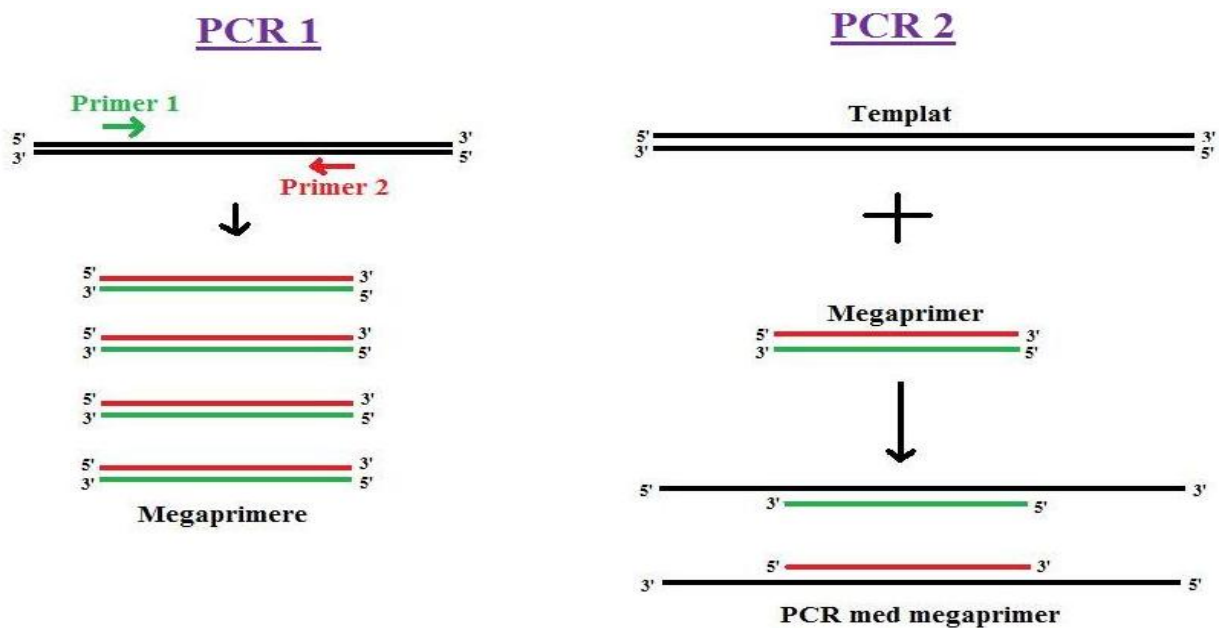
### Invers PCR med megaprimer på restriksjonskuttet og selv-ligert DNA

Det ble gjort et nytt forsøk på å oppnå ny, ukjent sekvens for LMG1 3601. Dette forsøket innebar restriksjonskutting, med enzymene RsaI, HindIII, EcoRI, EcoRV og HincII, og ligering av genomisk DNA, etterfulgt av en invers PCR. Restriksjonsseter ute i den ukjente sekvensen, ville kunne gi et sirkulært produkt som kunne bruke som templat i en Invers PCR (Ochman et al. 1988). Se illustrasjon av invers PCR i figur 5.



Figur 5: Invers PCR er en mye brukt metode for å oppnå ukjent sekvens av DNA.

For denne invers PCR ble primerene 3601up1 og 3601d1 benyttet. På grunn av negativt resultat, forsøkte man å kombinere denne metoden med bruk av en *megaprimer*. PCR med megaprimer er en metode som innebærer to PCR-reaksjoner. Ved første PCR amlifiserer man et strekk av DNA på et hundretalls baser. Dette PCR-produktet renses, før det brukes som en *megaprimer* i den neste PCR-reaksjonen (Ke & Madison 1997). Dette er illustrert i figur 6. Megaprimer-metoden er mye brukt metode, blant annet for å sette inn mutasjoner i DNA, som en del av setespesifikk mutagenese (Barik 1995; Sarkar & Sommer 1990).



Figur 6: Megaprimer PCR.

Grunnen til at valgte å bruke en megaprimer, er at denne hybridiserer til templatet ved en så høy temperatur at man utelukker alle problemer som kan oppstå ved uspesifikk hybridisering av primere, og vanskeligheter i forbindelse med smeltepunkt forskjeller blant primere. Ved PCR med megaprimer brukes et PCR-program som ikke inkluderer noe eget hybridiseringstrinn med temperatur tilpasset primerne, men i stedet går rett fra denaturering av templatet til hybridisering og elongering ved 72°C (Tyagi et al. 2004). Dersom smeltepunktet til primerne brukt i PCR 1 er lavt nok, er det ikke nødvendig å rense dette PCR-produktet før det brukes som megaprimer, en endring av PCR-programmet (man øker hybridiseringstemperaturen tilstrekkelig) er alt som er nødvendig (Tyagi et al. 2004).

I dette forsøket brukes en megaprimer som en del av en invers PCR. Megaprimeren ble syntetisert en PCR ved hjelp av primerne 36016 og 36017 (tabell 9), med genomisk DNA fra LMGT 3601 som templat. Primerne var spesifikke for kjente deler av genomisk DNA fra LMGT 3601. Megaprimeren ble brukt som primer i en påfølgende invers PCR.

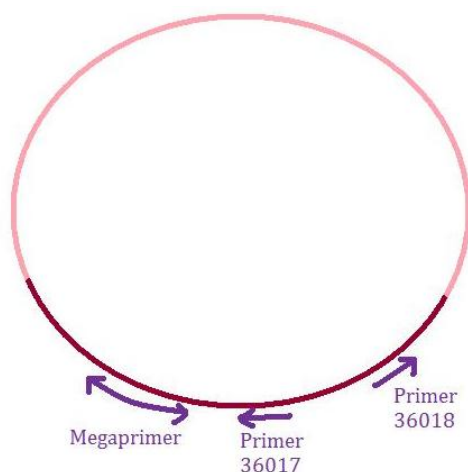
Som templat for denne inverse PCR-reaksjonen, brukte man genomisk DNA fra LMGT 3601 som var restriksjonskuttet med henholdsvis HincII, RsaI, HindIII, EcoRI og EcoRV. Dette hadde selvligert ved bruk av T4 DNA ligase og tilhørende buffer fra New England Biolabs, Inc.

Til syntese av megaprimer og invers PCR med megaprimer, ble Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase brukt. I henhold til prosedyre fra leverandør (New England Bio Labs® Inc.), foregikk amplifiseringsreaksjonen i et reaksjonsvolum på 50 µL. PCR-programmet for invers PCR med megaprimer er beskrevet i tabell 11.

Tabell 9: Program for invers PCR med megaprimer.

Trinn	Temperatur (°C)	Tid	
1	98	30 sek	Innledende denaturering
2	98	10 sek	Denaturering av templat
3	72	4 min	Hybridisering av megaprimer og elongering
4	<b>35 sykluser av trinn 2-3</b>		
5	4	∞	

Produktet ble renset ved bruk av E.Z.N.A. Cycle Pure Kit fra Omega Bio-tek, og brukt som templat i en ny PCR med primerne 36018 og 36019 (tabell 9), som dekket området der megaprimeren hybridiserte, se figur 7.



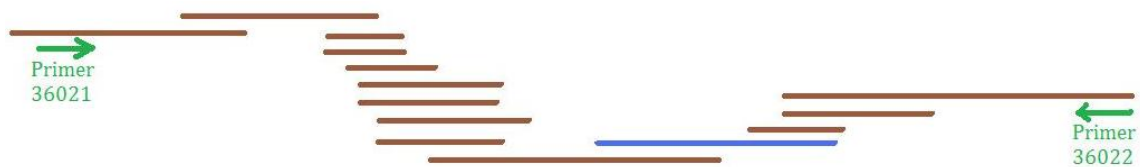
Figur 7: Etter invers PCR med megaprimer, ble det gjort en nested-PCR med primere som ville elongeres over fragmentet der megaprimeren hybridiserte. Disse ville derfor fange opp eventuelle produkter fra denne megaprimer PCR.

Denne PCR-reaksjonen resulterte i antydninger til et PCR-produkt, som ble gjort tydeligere ved å gjøre nested-PCR, men med en elongeringstid som var mer tilpasset størrelsen på dette produktet.

Dermed fjernet man forstyrrende produkter sannsynligvis oppstod på grunn av uspesifikk primerbinding.

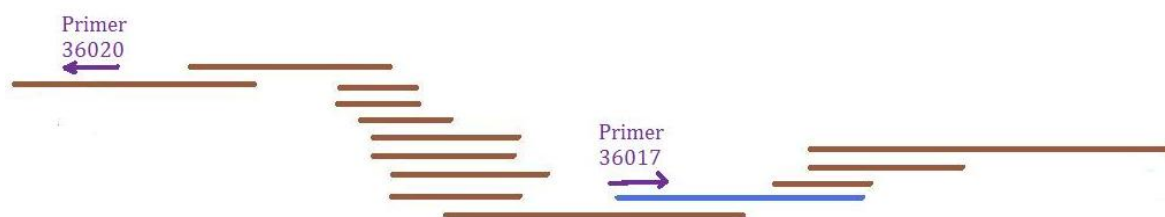
PCR-produktet av nested-PCR ble skåret ut av gel ved hjelp av skalpell, og ekstrahert med DNA ekstraksjonskittet NucleoSpin® Extract II fra Macherey-Nagel. Det ekstraherte produktet ble presipitert med etanol og natriumacetat før sekvensering med Sanger-metoden.

Sekvensene som resulterte av denne sekvenseringen gjorde at man ble bedre i stand til å bearbeide sekvensdata fra Illumina- og Roche-sekvensering, og finne overlapp mellom disse. Denne bearbeidelsen resulterte i en lengre contig (se resultater). Ved å gjøre en vanlig PCR, med genomisk DNA som templat, kunne man undersøke at denne nye sekvensen var korrekt sammenkoblet. Bearbeiding av slik sekvensdata, og kontroll av contig med PCR, er illustrert i figur 8.



**Figur 8: Fremgangsmåten for bearbeiding av sekvensdata. Den blå linjen illustrerer ny sekvens. De brune linjene illustrerer sekvens funnet ved Illumina- og Roche-sekvens. Ved en PCR ble det undersøkt om sekvensene/fragmentene som ble koblet sammen virkelig hadde en sammenheng.**

Det forlengede fragmentet av identifisert, genomisk DNA-sekvens ble bruk til å designe nye primere. Disse ble brukt i en ny, invers PCR for å kunne finne mer ukjent sekvens, se figur 9. Til denne PCR-reaksjonen brukte man det samme templatet som sist; produktet av en invers megaprimer-PCR med HincII-restriksjonskuttet, selvligert genomisk DNA.



**Figur 9: Ny PCR med nye primere; 36020 og 36017.**

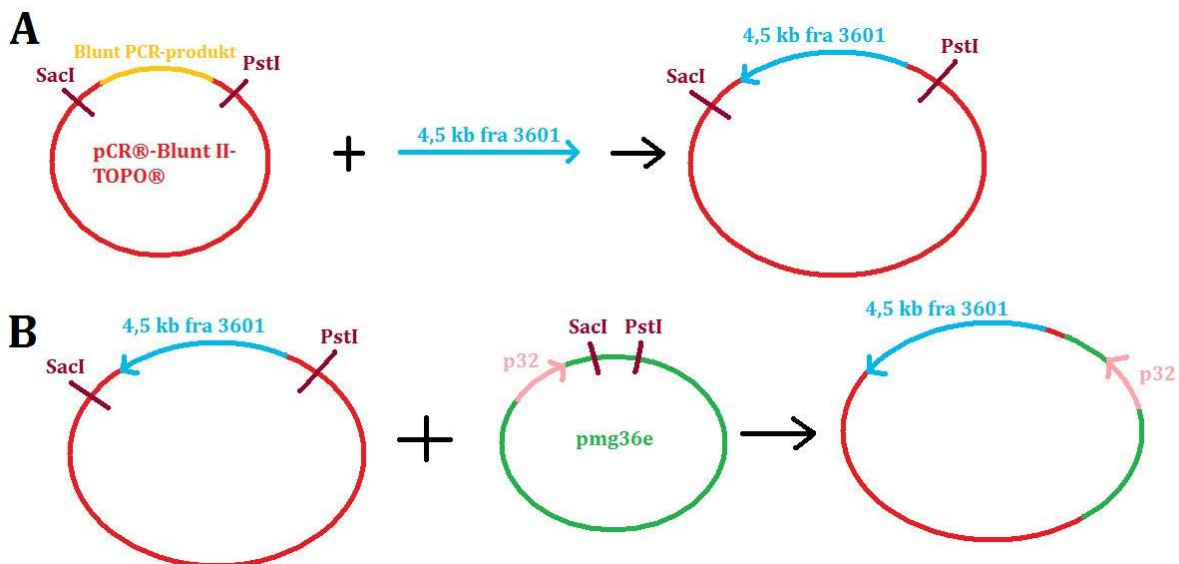
Dette resulterte i et nytt PCR-produkt som ble sekvensert med Sanger sekvenseringsmetode, og bearbeidet på samme måte som tidligere. Dette resulterte i et sammenhengende segment av genomisk DNA med kjent sekvens, som videre klonet og transformert i LMG 3390; *Lactococcus garviaeae*.

### 3.4 Kloning av nyoppdaget sekvens rundt det Leucocin H-kodende gen

Etter å ha identifisert mer av genomsekvensen på hver side av det leucocin H-kodende gen, hadde man et segment på cirka 4,5 kb. Man ønsket å klonere større deler av dette segmentet inn i stammen IL1403 og LMGT 3390. Man forsøkte først å fusjonere den nye sekvensen i LMGT 3601 med promotoren p32 ved SOE-PCR. Store problemer med SOE-PCR og den nye sekvensen resulterte i at man måtte velge en annen metode.

Sekvensen amplifisert med PCR ble ligert inn i vektoren pCR®-Blunt II-TOPO®, som videre ble transformert inn i elektrokompetente *Escherichia coli* i henhold til protokoll av Tung og Chow (1995). Transformantene ble dyrket ved 37°C ON på LA med 50 µg/mL Kanamycin. DNA ble ekstrahert ved hjelp av E.Z.N.A. Plasmid Mini Kit I. Både innsertet og vektoren hadde et BamHI-sete i sekvensen. Disse sitter slik at man ved hjelp av restriksjonskutting med enzymet BamHI, kunne finne ut hvilken retning innsertet fra LMGT 3601 hadde i vektoren. Størrelsen på restriksjonsfragmentene kunne bestemmes ved gelelektroforese, og avslørte retningen til innsertet.

Ut ifra innsertets retning ble det valgt et restriksjonssete der promotoren p32 kunne settes inn. Se figur 10.

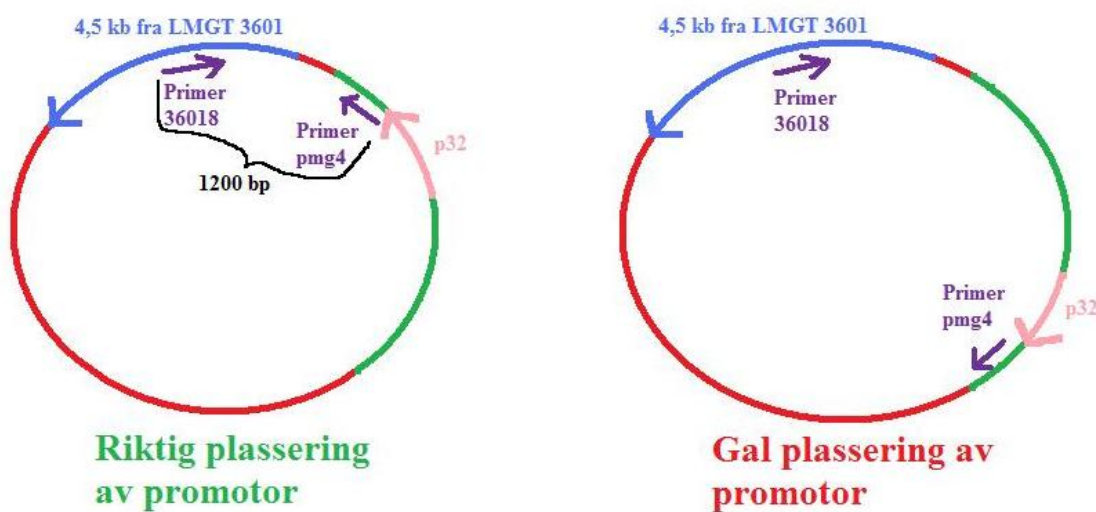


Figur 10: (A) Retningen til innsertet var avgjørende for hvilke restriksjonsenzym som ble valgt ved kutting. Det viste seg at restriksjonssetet for PstI ble sittende oppstrøms for innsertet av 4,5 kb fra genomet til LMGT 3601. Derfor ble PstI valgt. På denne måten ble promotoren plassert oppstrøms for den nyoppdagede sekvensen (4,5 kb). (B) Ved kutting og ligering ble promotoren plassert oppstrøms for innsertet av 4,5 kb fra genomet til LMGT 3601.

Ekstrahert vektor med innsertet av 4,5 kb fra LMGT 3601 ble restriksjonskuttet med PstI. pMG36e, som hadde et tilsvarende restriksjonssete sittende nedstrøms for promotoren p32, ble kuttet med

samme enzym, og de to kuttede plasmidene ble ligert til hverandre ved hjelp av T4 DNA Ligase og tilhørende ligasebuffer. Deretter ble klonen bestående av pCR®-Blunt II-TOPO®, 4,5 kb av genomisk DNA fra LMGT 3601 og pMG36e transformert i elektrokompetente *Escherichia coli*, og platet ut på GM17 med 100 µg/mL Erythromycin og 50 µg/mL Kanamycin. Denne tilsetningen av antibiotika selekterte bort celler uten klon. Cellene ble dyrket i 37°C ON.

Ved PCR med primerne 36018 og den pMG36e-spesifikke primeren pmg4 fikk man undersøkt at p32 var plassert oppstrøms for insertet. Dette er illustrert i figur 11. Dersom promotoren p32 var plassert oppstrøms for insertet av 4,5 kb, skulle denne PCR-reaksjonen resultere i et produkt på 1200 bp.



Figur 11: Dersom man fikk et PCR-produkt på 1200 bp, visst man at promotoren satt oppstrøms for insertet av 4,5 kb av genomisk DNA fra LMGT 3601.

Etter å ha valgt ut vektoren der promotoren p32 satt oppstrøms for 4,5 kb insertet, ble konstruktet transformert inn i IL 1403 og LMGT 3390. Denne gangen bestod konstruktet blant annet av *hele* pMG36e, som ble ligert inn i vektoren pCR®-Blunt II-TOPO®, noe som gjorde det mulig å transformere DNA fra Gram negative celler inn i Gram positive (Vandeguchte et al. 1989). Elektroporering ble utført i henhold til prosedyre utviklet av Holo og Nes (1989), og transformantene ble dyrket i 48 timer ved 30°C på GM17 med 10 µg/mL Erythromycin.

Etter oppvekst på agarplate, ble transformantene av henholdsvis IL1403 og LMGT 3390 plukket og dyrket i GM17 tilsatt 10 µg/mL Erythromycin. For å bevise at transformasjonen av konstruktet var vellykket ble noe av 100 µL av hver kultur lysozym- og varmebehandlet, og brukt som templat i en PCR med primer spesifikke for insertet av genomisk DNA fra LMGT 3601. Den samme PCR ble forsøkt etter å ha ekstrahert DNA fra oppdyrkede transformanter, og klonet dette inn i elektrokompetente *Escherichia coli*.



Transformanter som ble dyrket opp, ble testet i et mikrotiterassay for påvisning av mulig bakteriocinproduksjon. Det var kun transformantene av LMGT 3390 som ble testet. Disse ble testet mot vildtypen av LMGT 3390.

Før mikrotiterassayet ble satt opp, ble bakteriocin i presipitert med ammoniumsulfat. 1 mL av hver supernatant ble tilsatt 0,4 g ammoniumsulfat. Etter å ha blandet dette godt, ble prøvene sentrifugert i 10 min ved 13.000 rpm, og supernatanten ble aspirert ut. Den resterende pelletten av bakteriocin ble løst i 100 µL MRS, og varmebehandlet for å drepe eventuelle resterende bakterieceller.

Supernatantene ble brukt til at mikrotiter- bakteriocinassay. 50 µL MRS ble tilsatt brønn 2A-12H i et mikrotiterbrett. 100 µL supernatant av de ulike transformantene, samt vildtypen av LMGT 3390 ble applisert i henholdsvis hver sin brønn i rekke 1. Steril MRS ble brukt som negativ kontroll.

Det ble laget en fortynningsrekke av alle prøvene ved å overføre 50 µL fra én brønn til den neste. De resterende 50 µL fra brønn 12 ble kastet. Indikatorbakterien LMGT 2313 *Lactobacillus sakei*, tidligere dyrket i MRS i 30°C ON, ble fortynnet 1:100. Deretter ble 50 µL av denne fortynningen tilsatt i alle brønnene i mikrotiterbrettet. LMGT 2313 er en svært syretolerant stamme, noe som gjør den godt egnet som indikatorbakterie i ulike bakteriocinassay (Blom et al. 1999). Etter 12 timers inkubering i 30°C, ble absorbansen i hver brønn målt ved hjelp av en Spectrostar Nano plateleser.

### **3.5 Egenskaper ved Leucocin H, og bakteriocinets evne til å hemme vekst av Enterobacteriaceae på Ridderost**

Enkelte av de følgende forsøkene innebærer bruk av *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* A1 LMGT 3752. Denne stammen er isolert fra en starterkultur for produksjon av ost (Kleppen et al. 2012). Tidligere har man ikke blitt observert noen bakteriocinaktivitet fra denne stammen (Kleppen et al. 2012), derfor brukes den til sammenligning med Leucocin H-produserende LMGT 3601.

#### **Undersøkelse av produksjon av bakteriocin ved ulike pH**

For å måle bakteriocinaktiviteten ved ulike pH, ble det gjennomført et mikrotiterassay med MRS tilsatt ulike mengder natriumdihydrogenfosfat ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) og dinatriumhydrogenfosfat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ). De ulike sammensetningene av disse skulle bufre mediet slik at syren produsert av melkesyrebakterien ikke skulle senke pH.

MRS ble tilsatt ulike mengder av fosfatbuffer. Før inokulering ble pH i de ulike kombinasjonene av MRS og fosfatbuffer målt med et pH-meter. LMG 3601 ble inokulert i samtlige medier, og dyrket ON i

ved 25°C.  $OD_{\lambda=600}$  i kulturene ble målt etter 18, 24, 30 og 42 timer. Deretter ble kulturene brukt videre i et mikrotiterassay for kvantifisering av bakteriocinaktivitet ved de ulike pH.

Man ønsket å måle bakteriocinaktiviteten i MRS bufret til ulike pH. I følge Blom et al. (1999) er en bakteriocinenhet (1 BU) mengden bakteriocin som kreves for å hemme indikatorbakterien 50 %. Ved å sammenligne målingene med de bakteriocin negative brønnene, kunne man lett se hvilke fortytning av bakteriocin som inneholdt mer enn 1 BU.

50 µL MRS ble tilsatt brønn 2A-12H i et mikrotiterbrett. 1 mL av de ulike kulturene som hadde vokst ON, 24, 30, og 42 timer i medier tilsatt forskjellige volum av fosfatbuffer, ble spunnet ned og 100 µL supernatant ble overført til henholdsvis hver sin brønn 1A-1H. Steril MRS uten tilsatt fosfatbuffer ble brukt som negativ kontroll.

Det ble laget en fortytningsrekke av alle prøvene ved å overføre 50 µL fra én brønn til den neste. De resterende 50 µL fra brønn 12 ble kastet. Indikatorbakterien LMGT 2313 *Lactobacillus sakei*, tidligere dyrket i MRS i 30°C ON, ble fortynnet 1:1000. Deretter ble 50 µL av denne fortytningen tilsatt i alle brønnene i mikrotiterbrettet. Etter 24 timer inkubering ved 30°C ble brettet lest av i en Multiscan Ascent plateleser, levert av MTX Lab Systems, Inc. (Virginia, USA).

Man ønsket også å sammenligne bakteriocinaktiviteten i prøvene etter 2 døgn og etter 3 døgn. Derfor ble supernatantene av bakteriocin etter 2 døgns inkubering frosset ned, og brukt sammen med supernatantene av bakteriocin etter 3 døgns inkubering. Mikrotiterassay ble gjennomført på samme måte. Prøven med 5 ml MRS tilsatt 1 ml 0,5 M  $Na_2HPO_4$  ble ekskludert fra forsøket. Etter 24 timer inkubering ved 30°C ble brettet lest av i en Multiscan Ascent plateleser, levert av MTX Lab Systems, Inc. (Virginia, USA).

### **Bakteriocinassay med softagar**

For å undersøke Leucocin H sitt hemmingsspekter, ble LMGT 3601 testet mot ulike stammer av bakterier i et bakteriocinassay med softagar. 1 µL LMGT 3601 ble applisert midt på agarplater av bufret MRS og ble dyrket ON ved 25°C. Indikatorbakteriene er listet i tabell 12.

Tabell 10: Indikatorbakterier med LMG-nummer, medium og temperatur benyttet ved dyrkning.

Stammer	Art	Vekst-medium	Temperatur (°C)
2708	<i>Enterococcus faecalis</i>	LB	30
2700	<i>Escherichia coli</i>	LB	37
3020	<i>Pseudomonas fluorescense</i>	BHI	30
3022	<i>Staphylococcus aureus</i>	BHI	30
2710	<i>Listeria innocua</i>	BHI	30
2245	<i>Lactococcus lactis cremoris</i>	GM17	30
2711	<i>Bacillus cereus</i>	BHI	30
	<i>Leuconostoc gasicomitatum</i> 617	MRS	25
3752	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i> A1	MRS	25
2313	<i>Lactobacillus sakei</i>	MRS	30
3390	<i>Lactococcus garvieae</i>	GM17	30
1403	<i>Lactococcus lactis</i> IL 1403	GM17	30

Indikatorbakteriene ble dyrket til  $OD_{\lambda=600} \sim 1,0$ , før de ble fortynnet 1:50 i 5 mL softagar (stammene dyrket i BHI ble fortynnet 1:2) og overført på platene der 3601 hadde forhåndsinkubert i 24 timer ved 25°C. LMGT 3601 ble også testet mot utvalgte indikatorstammer *uten* at forhåndsinkubering.

Etter påføring av indikatorstammer i softagar, ble skålene inkubert i 24 timer. Forsøket ble utført ved ulike temperaturer; 17°C, 25°C og 30°C. Etter endt inkubasjonstid, ble hemmingssonene målt, evaluert og sammenlignet.

### Hemming av de Gram negative artene *Escherichia coli*, *Morganella morganii* og *Proteus mirabilis*, i buljong

Hemmingen av *Escherichia coli* ble undersøkt i et assay der ulike fortynninger av LMGT 3601 i LB og bufret MRS ble tilsatt cirka  $10^2$  cfu/ml LMGT 2700 *Escherichia coli*. Forsøket ble utført ved ulike temperaturer og ved ulike inkubasjonstider; 17°C i 7 dager, 25°C i 7 dager, og 37°C i 24 timer. Etter vekst, ble 100 µL fra hvert rør platet ut på LA-skåler og inkubert ved 37°C i 24 timer før bestemmelse av antall cfu/ml av *Escherichia coli*. Når dette var nødvendig, ble kulturene fortynnet før utplating i paralleller. Bufret MRS tilsatt kun *Escherichia coli* ble brukt for å kontrollere vekst av denne i MRS.

Dette assayet ble også gjennomført med *Morganella sp.* og *Proteus sp.* som indikatorbakterier. Disse artene ble isolert fra viskelake brukt i osteproduksjon. Viskelaken var tilsendt fra TINEs meierier i Tresfjord. Artsbestemmelse ble gjort ved hjelp av 16S-analyse.

Assayet ble utført på samme måte som med *Escherichia coli*, men i stedet for utplating på LB og inkubasjon ved 37°C, ble 100 µL av kulturene støpt inn i Violet Red Bile Glucose Agar (VRBGA) og inkubert 48 timer ved 30°C. *Proteus* og *Morganella* er arter i Enterobacteriaceae-familien. VRBGA er et vekstmedium selektivt for Enterobacteriaceae og Enterococcus (Oxoid Ltd. 2011).

### ***Effekten av Leucocin H på Enterobacteriaceae med Ridderost som vekstmedium***

For å artsbestemme Entrobacteriaceae funnet i viskelake fra TINE, ble fortyninger av prøver av viskelake, tilsendt fra TINEs meierier i Tresfjord, støpt inn i VRBGA, og dyrket i 30°C i 48 timer. Deretter ble ulike kolonier plukket, dyrket, og DNA fra de oppdyrkede cellene ble ekstrahert. PCR ble utført ved hjelp av de spesifikke 16S-primerene 1F og 4R (se tabell 9), og PCR-produktet ble sekvensert ved hjelp av Sanger sekvensering. 16S-sekvensen som resulterte av dette ble brukt i et blastsøk i NCBI-databasene.

Ved å gjenskape kittmodningsprosessen som Ridderost gjennomgår i meieriet, og tilsette LMGT 3601 i viskelake, kunne man undersøke virkningen dette hadde på antall Enterobacteriaceae. Ferdig modnet Ridderost, viskelake, Linens W og OFR9, som ble benyttet i dette forsøket var tilsendt fra TINEs meieri i Tresfjord, der Ridderosten produseres.

Prosedyren for forsøket er beskrevet nedenfor.

#### Dag 1

- Ved hjelp av en ostesøker ble det stanset ut prøver fra ytterkant mot midten av Ridderost. Disse ble delt i biter på 1 g og fordelt; én i hver sin petriskål.
- Hver ostebit ble påført 10 µL kittkultur på den øvre overflaten.
- Petriskålene ble satt i en lukket boks sammen med et fuktig papirhåndkle. Boksen med ostebiter ble inkubert ved 17°C.

#### Dag 2

- Én ostebit ble tatt ut og kalt 0-prøve. Denne ble løst i 5 ml sterilt natriumsitrat (2 %, pH 7,5), og fortynt i 0,9 % NaCl. 100 µL av fortyningene ble støpt inn i VRBGA i paralleller, og inkubert ved 30°C ved 48 timer.
- Tre og tre ostebiter ble påført 10 µL av følgende suspensjoner, henholdsvis:
  - Celler av 100 µL LMGT 3601 (*Leuconistoc gasicomitatum*) dyrket opp til  $OD_{\lambda=600} > 1,0$  i bufret MRS, løst i 1 mL viskelake.

- Celler av 100 µL LMGT 3752 (*Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* A1) dyrket opp til  $OD_{\lambda=600} > 1,0$  i MRS, løst i 1 mL viskelake.
- Tre ostebiter påført 10 µL viskelake uten tilsatt *Leuconostoc*.
- En prøve av viskelaken ble fortynnet i 0,9 % NaCl, og 100 µL fortynning ble støpt inn i 10 mL VRBGA og inkubert i 48 timer ved 30°C.

#### Dag 5

- Prosedyre fra dag 2 ble gjentatt.

#### Dag 8

- Ostebitene ble løst i 5 mL natriumsitrat og fortynnet i 0,9 % NaCl. 100 µL av hver fortynning ble støpt inn i 10 mL VRBGA, og inkubert ved 30 °C i 48 timer.

Kittkulturen som ble benyttet dag 1, var en sammensatt kultur bestående av den kommersielle kulturen OFR9 Liq 100D og Linens W. Blandingsforholdet av OFR9 og dH<sub>2</sub>O var 1:10, og denne blandingen ble tilsatt 20mg Linens W. per 50 ml løsning. OFR9 og Linens W er begge kommersielle kulturer merket Choozit™ Cheese Cultures, produsert av Danisco. OFR9 består av bakteriene *Brevibacterium casei* og *Brevibacterium linens*, og gjærartene *Debaryomyces hansenii*, *Candida utilis* og *Geotrichum candidum*. Linens W er frysetørret *Brevibacterium linens* (Danisco 2007).

Natriumsitrat ble brukt for å løse opp ostebitene. Dette inneholder forbindelser som bidrar til å løse opp kalsium i osten (Pastorino et al. 2003), slik at bakterieceller løsner, og kan løse seg i løsningen.

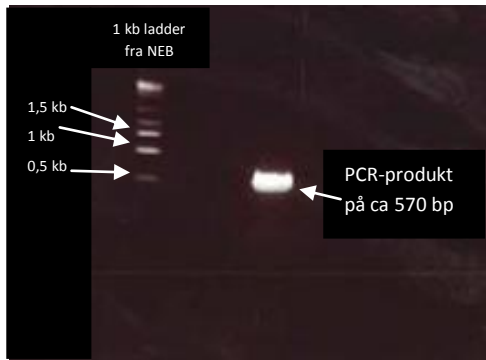
Prøvene av viskelaken som ble brukt dag 2 og dag 5, var tidligere brukt viskelake tilsendt fra TINES meierier i Tresfjord. Disse prøvene ble til en hver tid oppbevart i 4°C, og måtte brukes umiddelbart etter mottakelse, på grunn av en relativt rask reduksjon av innhold av *Enterobacteriaceae*. Det ble gjort 4 forsøksserier, der den samme viskelaken ble benyttet både dag 2 og dag 5.

Ved endt inkuberingstid ble cfu/g bestemt ved telling av kolonier på skåler med mellom 10 og 300 cfu.

## 4. Resultater

### 4.1 Sekvensering av contig på 570 bp

Figur 12 viser resultatet av PCR med primerne 36013 og 36014. Dette var cirka 570 bp stort.



**Figur 12:** PCR-produkt bestående av cirka 570 bp. Primere benyttet for denne PCR-reaksjonen, var 36013 og 36014. Til venstre vises en 1 kb størrelsesmarkør fra New England Biolabs Inc.

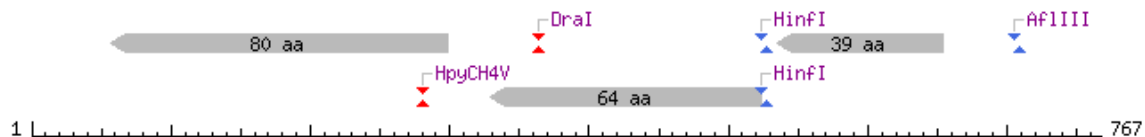
Dette PCR-produktet viste at 570 bp av contigen på 756 bp var sammenhengende. Sekvensering av dette PCR-produktet resulterte i en 520 bp lang sekvens som gav mulighet til å korrigere eventuelle feil gjort under Roche-sekvensering. Forward-sekvensen er vist i figur 13.

```
AAGATAAGGAGAATCAATGTTTGA CTTAGTAGCACACTTGGGTACATCCNCGTAGTGGCNGAAANAATTG
CTAACTTATT AATGACAGGANCCTGTAGGAGCTGTCATTGGGATGGTTTCTGGTATCGGATCTTGGGCAAGG
AGTTTTTCTAAATATGGCAAAATATATGTTTAAATCACAAGTAAGCGAGTTGTTATTGGCTTCTAAAAAGTCA
AAAAATAGGTTAATGATAAAAAATAATCATACTGAATTATGCAGAAAATTCTAAAATAATCAATAAAATTTAAG
GACTTTTTCGGTCTAGAGTTTCTATTCCCAAAAAGCATATACTTTATTTATGGGGAACATTAATTCAATTA
TAGTATTTTTTAAATCGGTTCAATAGTGTCTCACTGGCTCCCGCGCAATCTACTATACACGGCTAGCACTATTAT
TGTGTTTCTAATAAATGATATTTATGAAGTAGCGGGTGATATGATGTTAAGTGATAATATCATTTTATATCAAAC
```

**Figur 13:** Sekvens oppnådd ved sekvensering av 570 bp langt fragment.

Flere steder i sekvensen var det homopolymerer av nukleotider som Roche-sekvenseringen ikke hadde fanget opp. Sangersekvensering, og dobbeltsjekk med Illuminasekvensene, gjorde det mulig å rette opp feilene som hadde oppstått under Roche sekvensering.

Ved blastsøk med denne sekvensen i NEB cutter V2.0, fant man 5 åpne leserammer, tre av disse gav en aminosyresekvens lengre enn 30 aa. Disse er illustrert i figur 14.



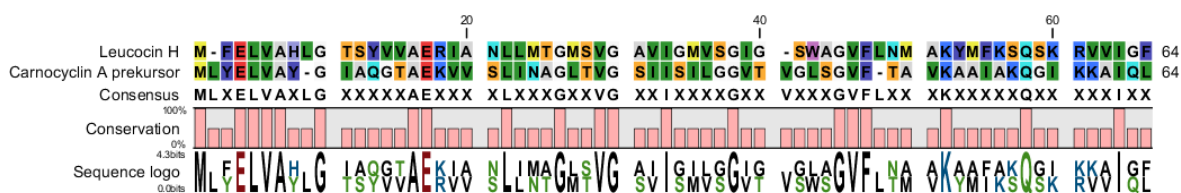
Figur 14: 3 av de 5 åpne leserammene funnet i sekvensen av de 520 basene identifisert.

Blastsøk med disse leserammene i NCBI gav resultatene listet i tabell 13.

Tabell 11: Resultat av blastsøk med åpne leserammer funnet i 520 bp lang sekvens.

Antall aminosyrer	Resultat av blastsøk	E-verdi
<b>80</b>	Søk gav flere relevante treff <ul style="list-style-type: none"> <li>- Hypotetisk protein [Lysinibacillus sphaericus C3-41]</li> <li>- ABC transporter, permease/ATP-bindende protein [Oribacterium sp. oral taxon 078 str. F0262]</li> </ul>	0,72 2,3
<b>64</b>	Søk gav flere relevante treff: <ul style="list-style-type: none"> <li>- Hypotetisk protein bcere0017_57380 [<i>Bacillus cereus</i> Rock1-3]</li> <li>- Hypotetisk protein KNP414_07105 [<i>Paenibacillus mucilaginosus</i> KNP414]</li> <li>- Hypotetisk protein Plarl_14454 [<i>Paenibacillus larvae</i> subsp. <i>larvae</i> BRL-230010]</li> <li>- Hypotetisk protein AC3_A0725 [<i>Clostridium perfringens</i> E str. JGS1987]</li> <li>- RecName: Full=Carnocyclin-A; Flags: Precursor</li> </ul>	9x10 <sup>-06</sup> 8x10 <sup>-05</sup> 0,15 0,28 0,37
<b>39</b>	Ingen signifikant likhet funnet	

Flere av disse søkeresultatene gir svært høye E-verdier, blant annet treffet "Carnocyclin A prekursor". Sammenstilling ved hjelp av CLC Sequence Viewer, fikk man resultatet vist nedenfor:



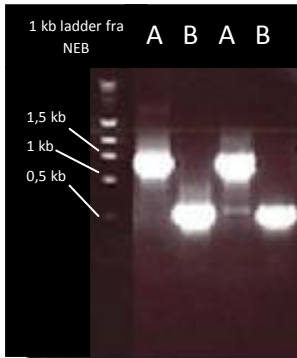
Figur 15: Sammenstilling av prekursorproteinet for Carnocyclin A og Leucocin H.

På tross av noen høye E-verdier, er resultatene interessante for sammenlikning og diskusjon av senere resultater. Ved bruk av et av vedktøyene i "Expsay Bioinformatics Resource Portal", "TMpred", ble det predikert transmembrane regioner i leserammen på 80 aa.

## 4.2 Kloning av det Leucocin H-kodende genet

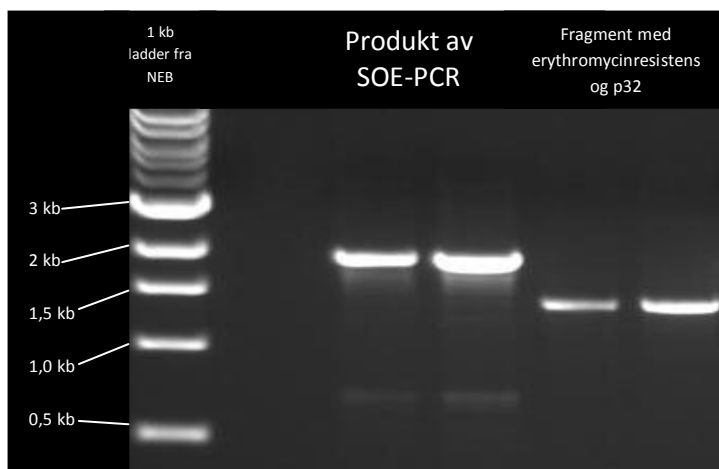
Figur 16 viser resultatet av de to PCR-reaksjonene med henholdsvis primersettet 36015+36013 og genomisk DNA fra LMGT 3601 som templat, og primersettet pmg8+pmg12 med mPG36e som

templat. Disse to produktene hadde overlappende områder, og skulle brukes videre som templat i en SOE-PCR.



**Figur 16:** Figuren viser de to produktene av SOE-PCR. (A) PCR-produkt av primerne pmg8 og pmg12, ca 1500 bp stort. (B) PCR-produkt av primerne 36013 og 36015, ca 500 bp stort.

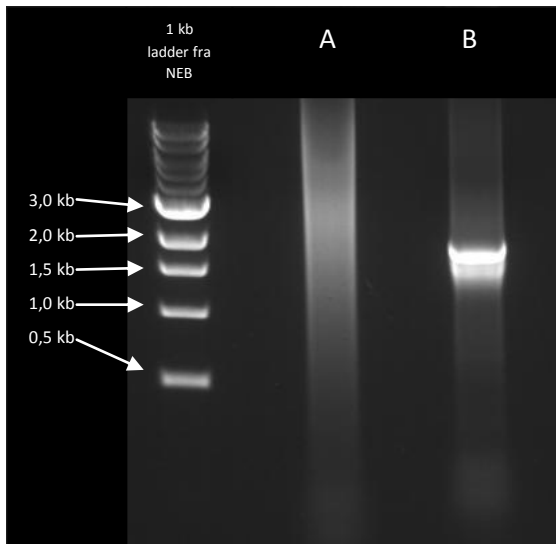
Figur 17 viser elektroforesebildet av produktet fra SOE-PCR, det vil si rekombineringen av genet for erythromycinresistens og promotoren p32 og segmentet av DNA fra LMGT 3601. Etter rekombinasjon forventet man et produkt på cirka 2000 bp. Til sammenligning er der 1,5 kb store PCR-produktet av primersettet pmg8+pmg12 applisert ved siden av. Dette er det samme produktet som ble spleiset med 550 kb av DNA fra LMGT 3601, for å danne SOE-PCR-produktet.



**Figur 17:** Produkt fra SOE-PCR. Venstre: 1 kb ladder fra New England Biolabs, Inc. De to midtre brønnene inneholder produktet av SOE-PCR, det vil si pMF36e-fragment som inneholder genet for erythromycinresistens og promotoren p32, rekombinert med fragment av genomisk DNA fra LMGT 3601. Til sammenligning inneholder de to brønnene til høyre kun fragmentet med genet for erythromycinresistens promotoren p32.

Figur 17 bekreftet at SOE-PCR har fungert, man hadde et produkt på cirka 2 kb. Dette produktet av klonet og transformert inn i *Escherichia coli*, og resultatet ble et flere transformanter på LA med Erythromycin og Kanamycin. PCR med primerne pmg8 og 36013 med de varmebehandlede koloniene som templat, gav et PCR-produktene i figur 18.

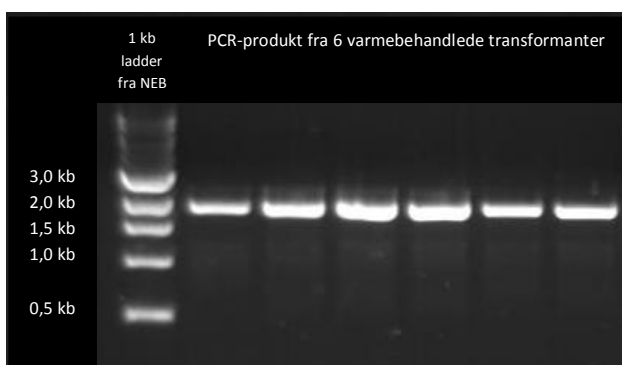




**Figur 18:** PCR av varmebehandlede transformanter dyrket opp på LA med Erythromycin og Kanamycin. Man forventet et produkt på ca 2000 bp. A) og B) tilsvarer PCR-produkter der varmebehandlede transformanter ble bruk som templat, og primerne pmg8 og 36013 ble benyttet. Disse PCR-produktene bekreftet at transformeringen av SOE-PCR-produktet i *Escherichia coli* var vellykket for koloni B. Til venstre: 1 kb ladder fra New England Biolabs.

Koloni B (vist i figur 18) ble dyrket i LB tilsatt 100 µg/mL Erythromycin og 50 µg/ml Kanamycin, før plasmid ble ekstrahert og fusjonert med vektoren pAT28 ved hjelp av restriksjonskutting av både pAT28 og konstruktet med BamHI, etterfulgt av ligering. Ligeringen ble dialysert, før den ble transformert ved elektroporering inn i elektrokompetente *Escherichia coli*. Disse ble dyrket på LA tilsatt 150 µg/mL Spectinomycin og 100 µg/ml Erythromycin.

Koloniene som vokste opp ble varmebehandlet og brukt som templat til en PCR med primerne pmg8 og 36013. Hensikten med denne PCR-reaksjonen var å beviser at transformasjon av konstrukt inn i *Escherichia coli* var vellykket. Primerene skulle, hvis transformasjon var vellykket, gi et produkt på 2 kb. Figur 19 viser at samtlige kolonier testet gav et PCR-produkt på 2 kb.



**Figur 19:** PCR-produkt av 6 varmebehandlede transformanter av *Escherichia coli*. PCR ble utført med primerne pmg8 og 36013. Venstre: 1 kb ladder fra New England Biolabs.

Konstruktet, som nå bestod av 550 kb av genomisk DNA fra LMGT 3601 (dette inneholdt det strukturelle genet for Leucocin H), genet for erythromycinresistens og promotoren p32, deler av vektoren TOPO og pAT28 (som også inkluderte genet for resistens mot Spectinomycin), ble ekstrahert fra *Escherichia coli*, og transformert i elektrokompetente IL1403 og LMGT 3390. For å undersøke cellenes evne til å ta opp DNA ved elektroporering, ble pAT28 og pMG36e brukt som kontroller. Dette ville også avsløre eventuelle restriksjonsmekanismer hos noen av artene. Transformantene ble dyrket på GM17-agar og selektert på antibiotika; spectinomycin og erythromycin. Resultatet er vist i tabell 14.

Tabell 12: Resultater fra transformering ved elektroporering av konstrukt inn i elektrokompetente IL1403 og LMGT 3390.

Elektrokompetente celler	Materiale transformert	Transformanter på GM17 tilsatt antibiotika
<b><i>Lactococcus lactis</i> IL1403</b>	Konstrukt av vektoren TOPO, p32, gen for Leucocin H og pAT28.	> 20 kolonier
	pAT28	> 50 kolonier
	pMG36e	> 50 kolonier
<b><i>Lactococcus garviaeae</i> LMGT 3390</b>	Konstrukt av vektoren TOPO, p32, strukturelt gen for Leucocin H og pAT28.	4 døgns inkubering gav 3 svært små kolonier
	pAT28	> 50 kolonier
	pMG36e	> 50 kolonier

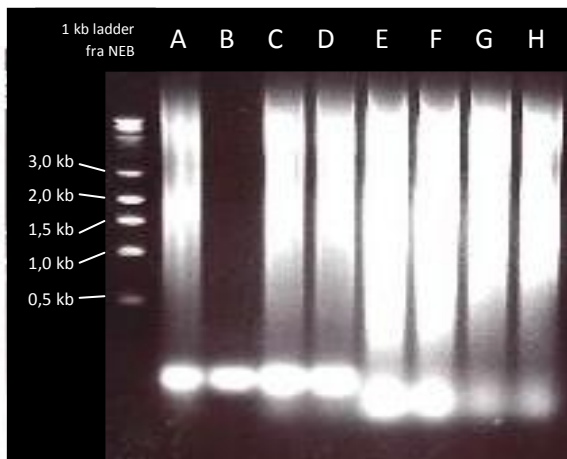
Transformantene som vokste opp ble lysozymbehandlet i 10 min ved 37°C, og brukt som templat i en PCR med primerne 36013 og 36014, som begge skulle hybridisert til de 550 bp som ble transformert inn i de elektrokompetente IL1403 og LMGT 3390. Produktetene av denne PCR-reaksjonen viste kun produkter i IL1403. Ingen av de tre LMGT 3390 som ble dyrket opp inneholdt DNA fra LMGT 3061.

### 3.3 Sekvensering – å finne overlappende sekvenser og lage contig

#### Sekvensering ved restriksjonskutting og ligering i vektor

Kloning av fragmenter av genomisk DNA fra LMGT 3601 inn i vektoren pBluescript ble gjort ved kutting av begge DNA-prøvene med henholdsvis RsaI, HindIII, EcoRI og EcoRV, etterfulgt av ligering. Disse liggeringene ble brukt som templat for en PCR med primere spesifikke for henholdsvis pBluescript og en kjent sekvens av genomisk DNA fra LMGT 3601. Flere forsøk med ulike mengder templat, ulike annealingstemperaturer og ulike primere for både pBluescript og LMGT 3601 ble gjennomført. To ulike DNA polymeraser ble også forsøkt. Samtlige forsøk resulterte alle i produkter

som vist i figur 20. Denne figuren viser et elektroforesebilde av PCR-produktet av de ulike restriksjonskuttete og ligerte prøvene.



**Figur 20:** Elektroforese med 1 % agarosegel og 1 kb ladder fra New England Biolabs, Inc. A og E) Genomisk DNA kuttet med *RsaI*, og ligert med pBluescript kuttet med *EcoRV*. B og F) Genomisk DNA kuttet med *HindIII*, og ligert til pBluescript kuttet med samme enzym. C og G) Genomisk DNA kuttet med *EcoRI*, og ligert til pBluescript kuttet med samme enzym. D og H) Genomisk DNA kuttet med *EcoRV*, og ligert til pBluescript kuttet med samme enzym. Primersett brukt i dette tilfellet: A-D: 3601up1 og M13fd(-46), E-H: 3601d1 og M13fd(-46).

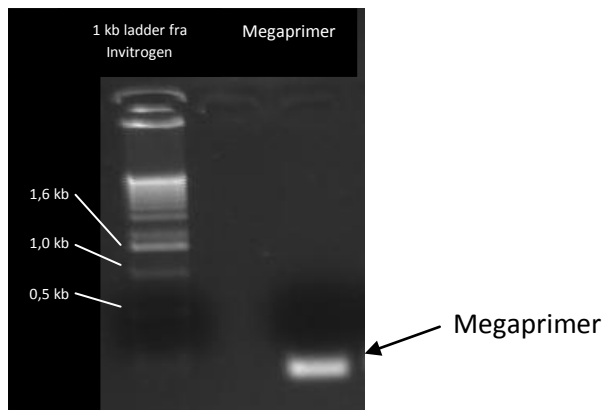
Figur 20 representerer kun et eksempel på elektroforesebildene av PCR-produktene. Alle forsøk gjort med denne metoden hadde svært lignende resultater. Uspesifikke PCR-produkter uten noen definerte bånd gjorde det umulig å fortsette med sekvensering. Derfor valgte vi å forsøke en annen metode, som innebar blant annet invers PCR på restriksjonskuttet og selv-ligert genomisk DNA fra LMGT 3601.

### **Invers PCR med megaprimer på restriksjonskuttet og selv-ligert DNA**

Som forberedelse til invers PCR, ble genomisk DNA fra LMGT 3601 restriksjonskuttet med henholdsvis *RsaI*, *HincIII*, *EcoRI*, *EcoRV* og *HincII*. Deretter ble prøvene ligert, og det ble gjort en invers PCR med primerne 3601up1 og 3601d1.

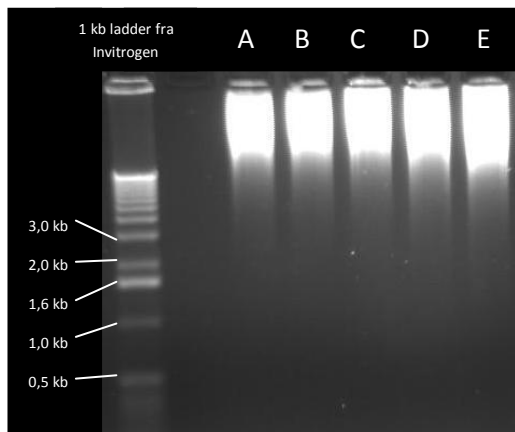
Ved elektroforese med PCR-produktet viste det seg at invers PCR var fullstendig mislykket, det ble ikke laget noe PCR-produkt. Man valgte derfor å forsøke å bruke en megaprimer kombinert med invers PCR.

Kombinasjon av invers PCR og PCR med megaprimer har, etter vår kjennskap, aldri blitt forsøkt tidligere. For å syntetisere denne primeren ble det gjort en PCR med primerne 36016 og 36017. Produktet av denne PCR-reaksjonen er vist i figur 21.



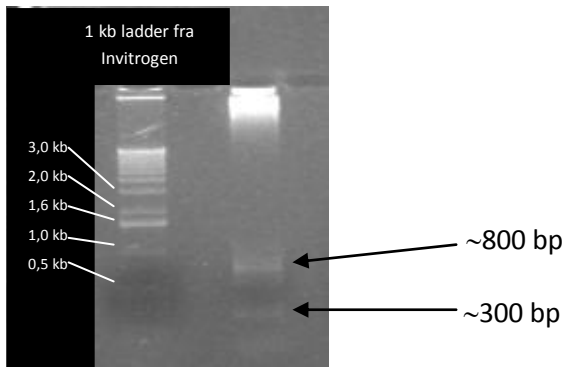
**Figur 21:** Syntese av megaprimer ble gjort ved PCR med genomisk DNA fra LMGT 3601 som templat og primerne 36016 og 36017.

Megaprimeren ble renset og brukt til å prime en invers PCR med restriksjonskuttet, selv-ligert DNA som templat. Dette DNA var kuttet med henholdsvis RsaI, HindIII, EcoRI, EcoRV og HincII før ligering. Produktet av denne invers PCR-reaksjonen ble applisert på en gel, se figur 22.



**Figur 22:** Produkt av invers PCR med megaprimer 36016/36017. Venstre: 1 kb ladder fra Invitrogen. Brønn A-E inneholder produktene tidligere kuttet med henholdsvis HincII, RsaI, HindIII, EcoRI og EcoRV. Til venstre: 1 kb ladder fra Invitrogen Pilen peker ut et mulig bånd i gelen.

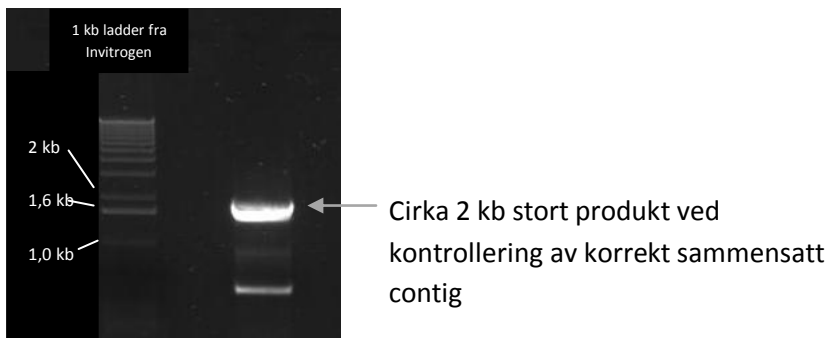
Invers PCR med megaprimer på HincII-ligering (figur 22, brønn A), gav antydning til PCR-produkt (dette er ikke tydelig på figur 22). Dette produktet ble brukt videre i en nested PCR med primerene 36017 og 36018. Ved å redusere elongeringstemperaturen til en lengde som var mer tilpasset størrelsen på dette produktet, fikk man et tydeligere produkt. Dette er vist i figur 23. Produktet ble skåret ut og ekstrahert fra gelen, før produktet ble sekvensert med Sanger sekvenseringsmetode.



**Figur 23: Produkt fra PCR med primere 36017 og 36018, med rensset PCR-produkt av genomisk DNA kuttet med HincII.**

**Venstre: 1 kb ladder fra Invitrogen.**

Pilene i figur 23 viser båndene som ble skåret ut og sekvensert. Sekvenseringen resulterte i mer hittil ukjent genomisk sekvens, som bidro til sammensetning av flere sekvensfragmenter fra Roche- og Illumina-sekvensering. Kontroll på contig som ble laget ved hjelp av nyfunnet sekvens ble gjort med en PCR med primerne 36021 og 36022 (tabell 8). Resultatet av denne kontrollen skulle bli et cirka 2000 bp stort produkt. Dette produktet er vist i figur 24.



**Figur 24: Kontroll på sammensetning av contig. Venstre: 1 kb ladder fra Invitrogen.**

Sekvensering av det utkårede båndet i figur 24 resulterte i sekvensene i figur 25.

### Forward sekvens:

```
AACTGTATTATTTGTTAATGTCACATCAACATGTTTTCTAATATATACCTACGACTATCCTTGAAATTA  
TGTGGTAACATATCAGTGTATACTTTTCTTTTATCTAACAAAGAAAGCATAACACATAAGTATTTA  
AAATTCAAAATCGTAATCGTAATAATGCAATATCCAGATATTTTGAATATATCGTCTCAAGATA  
AAGGAGAAATCAAAATGTTTGAATAGTAGCACACTTGGGTACATCGTATGTAGTGGCAGAAAAGAAATGC  
TAACITATTAATGACAGGAATGCTGTAGGAGCTGTCAITGGGATGGTTCTGGTATCGGATCTTGGG  
CAGGAGTTTTCTAATAATGGCAAAATATATGTTTAAATCAAAAGTAGCGAGTTGTTATTGGCTTC  
TAAAAAGTCAAAAATAGGTTAATGATAAAAAAATAATCATACTGAATATGCAGAAAATCTAAAAAT  
AATCAATAAATTTAAGGACTTTTTGGTCTAGAGTTTTCTATCCAAAAAAGCATATACTTTATTTT  
TATGGGAACAAITTAATCAATTAATAGTATTTTTTAAATCGGTTCAATAGTGTCTCACTGGCTCCCG  
CGCAATCTACTATACACGGCTAGCACTATTATTGTGTTCTAATAAATGATATTTATGAAGTAGCGGG  
TGATATGATGTAAATGATAATATCATTATATCAAAACTTAGGGTCCATTTAAAAATCTATTTT  
TGNATAANTACTTAAAGAGTA
```

### Revers sekvens

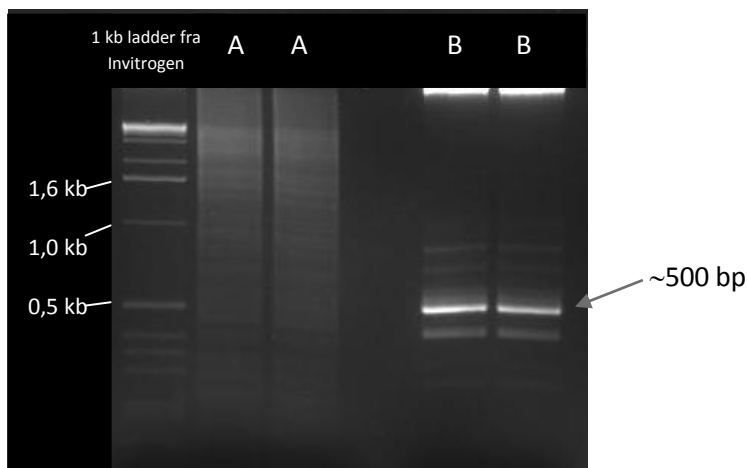
```
CGAGACTAGAGCTTATGATTCAATAAAGTTAAATTAATTTGGAAATTATATTTTTNCNTATTATA  
TTGGGAACCAACATTAAACACAATGATTAATTTTTCTATTCCCATCTAACACTCAACCTCTGTCTA  
ACATATAATGCTACTTTATAAAAATAAAAATGTGAATATAAATATGTTTGCTCACGTAACCACGCC  
GGTACGAAAATAATATTTGATATTAATAAACAAATATAAACTAACATAATACACCAATACAAAAAT  
TTATAAATAAATATCGCTTTTAAAGTTTTCTAGCTTGGCATAGGACAATAACAAGACTGCCAATCAAA  
TTCATAGAATTAAGGCTTAAAAACATTAAAAAGTTTAAATTTGTGAAAAAACACTAAATATAATGCA  
AAAAAAACAGTTGATAGTAATGTAGTGACTATATAAATAACGAGGGTTTTTTTTTAATAACAACTTA  
GTTAATCCGTTTTTATAAACAGTAATATGTTGTTTATCCACTTTAGGACCATAAACATTACT  
AATACCTAGCAGTATACTGCTAGTACTTGATAGTAATAACAGACCATATCCCCAAGTATAGACATT  
TGTAATCATATATTTAGGTATTTTTTGGCTCAATGT
```

Figur 25: Sekvensene som resulterte av sekvensering av bånd på cirka 2 kb. Dette båndet var en følge av PCR med primere som hybridiserte til en ny contiger laget ved en tidligere sekvensering.

Sekvensene i figur 25 ble sammenstilt med contigsekvensen, og man rettet sekvenfeil i Roche-sekvensene med Illumina-sekvenser som kontroll.

Ved hjelp av resultatet av sekvenseringen ble nye primere syntetisert og en ny invers PCR ble gjort med det samme invers-megaprimere produktet som ble bruk ved nested-PCR. Her ble primerne 36020 og 36017 brukt. I tillegg forsøkte man disse primerne på kun HincII-kuttet, selv-ligert DNA.

Produktene av disse PCR-reaksjonene er vist i figur 26.



Figur 26: PCR-produkt av invers PCR med templatene (A) genomisk DNA kuttet med HincII og ligert, og (B) invers PCR-produkt av genomisk DNA kuttet med HincII og ligert. I brønnen til venstre er 1 kb ladder fra Invitrogen. Pilen peker ut båndet som ble skåret ut av gelen og sekvensert.

Sekvensering med Sanger-metoden avslørte ytterligere ukjent genomisk DNA-sekvens, se figur 27.

**Forward sekvens:**

```
ATATGTGTTCTATAATGATATTTATGAAGTAGCGGGTGGANNGGAGGTAANGGGCTCTNNCCNTTTANAACAAAACCC  
NGGGTCCCTTTNAAANCCNTTTTTGGATNAANACCTNAAGNANNATTCCANTANGANANTCCTTTANGGGAANTGG  
CCTAATTACCCTANTGGGTTTTGGGGATACCGGGTTAANNGGANANCCNTNACCCNCCGGGGAAAAAGGCCNTNA  
TTTTCCNAAAATCCGGANTNAACNAAACNGTCCTTTGGAANCCGGCCNGGAANTANGTCCNGGAGCCTANTTNCNTNC  
NCCNAGNCCCCGGAAATNAAAAANCNNGGNAANTNNANNACCGGNGGGGNAATAANNCCCCNNCNTCCCCCTTTT  
GGNNGNCCCCTTANCCNNGGTTTNN
```

**Revers sekvens:**

```
ATATTTTATAATAATTCCTAATTTAATTTGTTGAGAAAAACTTTGAGGAAAAGATTNTTCACTAAANNANANGATTAGGT  
GCCTACAAAAATGGAGAATGCGGAGGTAATAATGCCACAACCTGTTATGAATTTACATGATTTATTAATTCAGGGAACCTTA  
GAATGNACGTTAATCNGCTACCTGAACTANNATNATGNCCGANATCAAANNACGNTTGTANTACAGAAATTTCNAAAA  
ATNATGNCTTTTNTCCACAGNAGGTTNATGATNTTCTATAAAACNCAGTNATCCCAAACCCAANGNGGTAATAANNACA  
ANNTCCCTANAAGAANTCTACTANTANAATACTTCTTTAAGTNNTTATGCAAAAANTAGTNTTTTNGGTGGANCCGTNNGT  
TTTGANATGN
```

**Figur 27:** Sekvens oppnådd ved Sanger-sekvensering av utskåret PCR-produkt på cirka 500 bp.

Denne sekvensen gjorde det mulig å lage en større contiger av den man hadde. Ved kombinerings av sekvensfragmenter med overlapp, oppnådde man til slutt et sammenhengende segment på 4540 bp, som blant annet inneholdt det strukturelle genet for Leucocin H.

Denne er vist i figur 28.

```

ATGTACAAAATTTTAAACATTTGTATATACATCTGTCAATAACAAAATAAGATAATATCACTAAACTATTAGTTA
GTGATATTTATTTACTATAATGCTACAATGTTATTATAAAATTAATTAATGATTTTTATTAGGAA GTATTATATA
TCCAACTTTTATTTGTAAAATATGCGCAT AAGTCAAT AATCGGACTAT TTCTTATCTAGGGCTGAATTAATTAGG
TTACTTTCATTTTTGCATTATCATATGGATGCCCAACTTTGATAATAGAGTGTGTTAAGTTGTGACGATTTAACA
AATTTTCACTTTCAAAGTCAAAA CTAGTGAATTTGATCCCTAAA GCGGTGTGTAATAA GTCCGATTTTATGAG
TTGATGGCGCTCGTTGTACAAGGCAACAATCGATGATTTAAATTCAGGTGTGTATTTTCTGTGGCATAATAA
AAAACCTCTATATTTAATTACTCGGAT TCTA CCTAGAAAATAAGGTGTCCGGATTTTAA GTATACGCGTCGTA
GATTAAA AAAATTAAGAGAAACCTTTATGATAAGCATTTATTAA CGATCTCATTAGCTTAT AACTGAACCTTTGT
CAAATATTTTATGSTATTTCTGACTCTCATAAAAATAAAAAATCGCTCTCTTGTGTAAACAAACATGATAAG
ATAATACCTCTTTACATTTTATTTAATTGATTAAACATAAGGAGTCAACCTGTTGACATTGATTTCTACATCAATT
TTCTGTAAATAAAA OCTACA TTGGATTTCAGTTAGCTAA TTA CTATGACAA TAGTAACTACAAGGACACTTAT
TACTGTAAATTTTATGCAACAACATGATCGGTTCTATTTATTTTGGTATAAGTAGACATTCGATGGAACCTCA
TGAAA GGTGGAATATGAACA GTTTCAATATCA TTGCTAATAAGGGTCTCTCCACCA TAACAACCGGAAA GATCAC
TTCTCTGATATATTAAATGAAA GATAAAAAGGAAAT ACTGAATGATAAGCACTTTAAATAGACGTAA TACA G
CTAACCTTACTTTTTGCTAACAA TTTATTTGACTGGTTTTATGTTAAACA GCTGACCCCGGAGATA GTTCATTC
TAAGTTCCCTGAATTAATAATCATGTAATTTCAATAACAGTTGTGCGGATTATTACCTCCGCATTCTCCATTTTT
GTAGGCACCTTAATCACTGTTTTAGTGATATATCTTTCTCCTCAAAGTTTTTCTGAACAAATTAATTAGGAATTA
TTTATAATAATTAATTAATGTCACAATTTCTCAATGTTGTTTTGTTGGCCATTA GTCAACTGTATTTATTTGTTTAT
GTCCATCAACA TGTTTTCTAATATA TACCTACGACTATAATTGAAA TTAGTTGGTAACTATTCAGTGTATACTT
TCTTTTATCTAACAAAGAAA GCATACACATAAGTATTTAAATTCAAAATCGTAATCGTAATAATTGCAATAT
TCCAGATTA TTTGAAATATCGTCTCAAAGATAAAGGAGAAATCAAATGTTTGAATTAGTAGCACCTTGGGTA
CATCGTATGTAGTGGCAGAAA GAATTGCTAACTTATTAATGACAGGAATGTCTGTAGGAGCTGTCAATTGGGAT
GGTTCTGGTATCGGATCTGGGCAGGAGTTTTCTAATATGGCAAAA TATATGTTAATCACAAAGTAAGC
GAGTTGTTATTGGCTCTAAAAGTCAAAA ATAGTTAATGATAAAA AAAATAATCATACTGAATTATGCA GAAA
ATTTCTAAATAAATCAATAATTAAGGACTTTT CGGCTAGAGTTTTCTATTCCAAAAAGCATATACCTATTTTATGG
GAACTAATTCAAATTAATA GATTTTTTAAATCGTTCAATAGTGTCTCACTGGCTCCGCGCAATCTACTATAC
ACGGCTAGCACTATTTATGTTTCTAATAAATGATATTTATGAA GTAGCGGGTGATATGATGTTAAGTGATAA
TATCATTTTTATATCAAAA CTCTAGGGTTCCATTTAAATCTATTTTGTATAAATCTTAAAGAAGTATTCTATTAG
TATATTTCTTTAGGGATATTGCTTATTTACCTTATTGGTTTTTTGGGATTA CTGTGTTTATAGGAATATCATTAA
CCTACTGTGGAATAAAGTCAATTTTTTTTCGAAAATTCTGTATTAACA AAAACGTTCTTTTGATATCGGTCATGA
TATTAGTTCAAGGTAGCTTATTACTTAA TAAATTGGGATCTATTTTCAAATAAAAATTTTTTATTAACAATTTATG
GTTAGTAACCCTGTTAATAGGATCATTAGTTATCATATATCTTTTAACTTATTATCTACGGCATGATAAACATATT
TCTTTCTGCTACTCTATATGATGCTAAAAAATGTAGACATAATGAATATTATTAAATGACATT CACGTGGATAA
TAACGAAA AAATCTTTTTA CAAAAAAGAAAT AAAA AATATGATTGCCAATAAAAAGTCAGGTGCTTATTGAAATAT
GTTTACCTTATTTTTGTTCAACTTTCTATTCAGTTCTTTATCTTTTCTACATTGACGCAAAAAATACCTAATAATATG
ATTTACAAATGTCTATACTTGGGATATGGTCTGTTATTA CTATCAAGTACTAGCAGTATACTGCTAGGTATTAGT
AATGTTTATGGTCTAAAGTGGATAACAACAACATATTACTGTTTAAATAAAAACGGAAATAAAAAGTTGTTATT
AAAAAAAACCTCGTTATTTATATAGTCACTACATTTACTATCAA CTGTTTTTTTGCATTATATTTAGTGTTTTTTC
ACAAATTAACCTTTTAAATGTTTTAAGCCTTAATTCTATGAAATTTGATTGGCAGTCTTGTATTGTCCTATGCCA
AGCTAGAAAACCTTAAAAGCGATA TTTATAAAA TTTTGTATTGGTGTATATGTTAGTTTATATTGTTTATTA
ATATCAAAATATTTTTCGTACCGGCGTGGTTACGTGAGGCAACATATTTATATTCACATTTTATTTTATAAA
GTAGCATTATATGTTAGACAGAGGTTGAGTGTAGATGGGAATAGAAAATTAATCAATTGTGTTAATGTTGG
TAAGCAATA TAATAATAAAAAATAAATTTCCAATA TTAATTTAACTTTATTGAATCAT AAGCTCTATGTTCTCGT G
GGACCAAATGGTTACAGGCAA GAGCACATTAATGAA GATAATACTGGTATTATTGATCCTACAA TTGGAAACG
TAATTGTTAGTGATTCAGT AACAGTTAGTTATGATACCGATGACATAAAAATATATGAATACTTACTGGACAA

```

Figur 28: Sekvensen vist er en contig oppnådd ved kombinerings av flere Roche- og Illuminasekvenser ved hjelp av overlappende segmenter. Flere av disse overlappende regionene ble funnet ved hjelp av Sanger sekvensering av PCR-produkter som resulterte av nested PCR der et tidligere produkt av en invers PCR med megaprimer, fungerte som templat.

Det ble gjort et blastsøk med disse 4,54 kb i NEB cutter V2.0. Dette resulterte i 28 åpne leserammer.

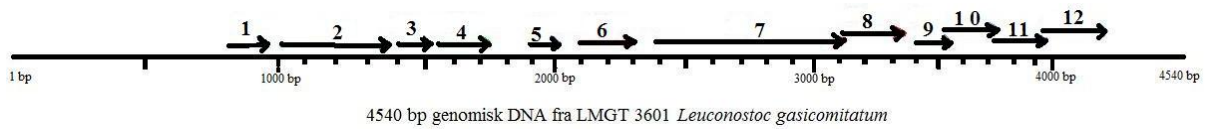
Disse er vist i figur 29. Tabell 15 viser resultatet av blastsøk av de ulike proteinsekvensene leserammene bestod av.



Tabell 135: Blastsøk med aminosyresekvensen leserammene gav. Leserammer på revers streng eller kortere enn 30 aa er ikke inkludert.

Åpen leseramme	Antall aminosyrer	Posisjon i 4,54 kb	Resultat av blastsøk	E-verdi
1	53	797-958	Ingen signifikante likheter funnet	
2	118	1018-1374	Søk gav flere relevante treff: <ul style="list-style-type: none"> <li>- ABC transporters, permease protein [<i>Lactobacillus farciminis</i> KCTC 3681]</li> <li>- integral membrane component of efflux system [<i>Campylobacter lari</i> RM2100]</li> <li>- ABC transporters permease, [<i>Mycoplasma genitalium</i> G37]</li> </ul>	9,3 0,47 5,3
3	39	1420-1539	Ingen signifikante likheter funnet	
4	64	1551-1745	Søk gav flere relevante treff: <ul style="list-style-type: none"> <li>- Hypotetisk protein bcere0017_57380 [<i>Bacillus cereus</i> Rock1-3]</li> <li>- Hypotetisk protein KNP414_07105 [<i>Paenibacillus mucilaginosus</i> KNP414]</li> <li>- Hypotetisk protein Plarl_14454 [<i>Paenibacillus larvae</i> subsp. <i>larvae</i> BRL-230010]</li> <li>- Hypotetisk protein AC3_A0725 [<i>Clostridium perfringens</i> E str. JGS1987]</li> <li>- RecName: Full=Carnocyclin-A; Flags: Precursor</li> </ul>	$9 \times 10^{-06}$ $8 \times 10^{-05}$ 0,15 0,28 0,37
5	59	1897-2076	Ingen signifikante likheter funnet	
6	67	2104-2307	ABC transporters ATP binding protein/ permease MsbA [ <i>Campylobacter lari</i> RM2100]	0,044
7	245	2391-3128	Søk ga flere relevante treff: <ul style="list-style-type: none"> <li>- ABC transporters, permease/ATP-binding protein [<i>Oribacterium</i> sp. oral taxon 108 str. F0425]</li> <li>- sugar ABC superfamily ATP binding cassette transporters, membrane protein [<i>Oribacterium sinus</i> F0268]</li> </ul>	0,008 0,009
8	81	3119-3364	Lantibiotic ABC Superfamily ATP binding cassette transporters ABC protein [ <i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC10782]	$4 \times 10^{-7}$
9	54	3405-3569	Beta-hexosaminidase [ <i>Borrelia turicatae</i> 91E135]	6,1
10	79	3526-3765	Oxidoreduktase, kort kjede dehydrogenase/reduktase familien [ <i>Enterobacter cancerogenus</i> ATCC 35316]	2,4
11	71	3758-3973	Ingen signifikante likheter funnet	
12	92	3967-4245	Søk gav flere relevante treff: <ul style="list-style-type: none"> <li>- protein of unknown function DUF95, transmembrane [<i>Clostridium perfringens</i>]</li> <li>- Integral membrane protein DUF95 [<i>Bacillus</i> sp. 5B6]</li> </ul>	0,29 0,56

Figur 29 viser en illustrasjon av leserammene funnet i de 4,54 kb funnet ved sekvensering.



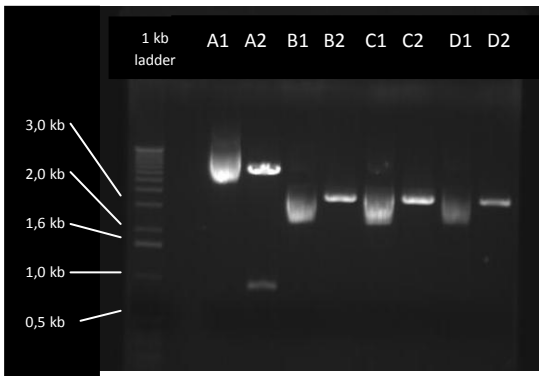
**Figur 29:** Åpne leserammer identifisert i 4,54 kb stor contigen som inneholder genet for Leucocin H. Figuren inkluderer ikke leserammer kortere enn 30 aa eller leserammer på revers DNA-streng. Leserammene er nummerert på samme måte som i tabell 15.

Ved bruk av et av verktøyene i "ExPASy Bioinformatics Resource Portal", "TMpred", kunne man predikere transmembrane regioner i leserammene i tabell 15. Det viste seg at leseramme 1, 2 og 12 kunne inneholde ett eller to transmembrane domener. Teoretisk pl for leseramme 1 ble kalkulert til å være 10,7.

### 3.3 Kloning og transformering av nyoppdaget sekvens rundt det Leucocin H-kodende genet

Etter sekvenseringsarbeidet stod man igjen med 4,5 kb med sekvens som omga det strukturelle genet for Leucocin H. Det var store muligheter for at dette fragmentet av genomisk DNA kodet for større deler av genklyngen tilhørende Leucocin H. Ved å klonere dette større sekvensfragmentet i *Lactococcus garviaeae* LMG 3390, kunne man finne ut om de 4,5 kb blant annet kodet for et immunitetsgen. Dersom stammen overlevde denne transformeringen, kunne man også se effekten av bakterieaktiviteten sammenlignet med vildtypen av samme stamme.

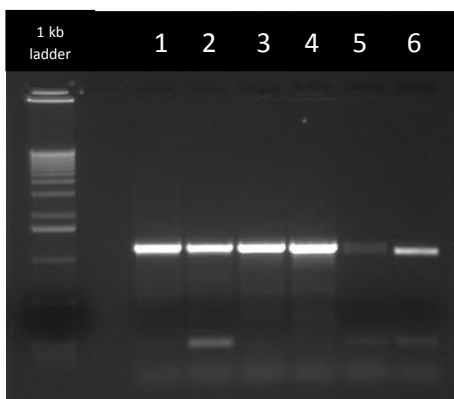
Man forsøkte i utgangspunktet å fusjonere den nye sekvensen i LMG 3601 med promotoren p32 ved en SOE-PCR, slik som tidligere. Store problemer med SOE-PCR og den nye sekvensen resulterte i at man måtte velge en annen metode. Man valgte å klonere fragmentet inn i vektoren TOPO, og transformert inn i *Escherichia coli*. Denne transformeringen resulterte i flere transformanter som ble dyrket opp på LA med 50 µg/mL. Fordi det var et BamHI-sete i både insertet og i vektoren, kunne retningen til insertet sjekkes ved restriksjonskutting med BamHI. Figur 30 viser restriksjonsfragmentene som resulterte fra denne kuttingen.



**Figur 30:** DNA, henholdsvis ukuttet og kuttet med BamHI, fra elektrokompetente *Escherichia coli*. DNA består av vektoren TOPO fusjonert med de 4,5 kb som omgir det strukturelle genet for Leuocin H. Venstre: 1 kb ladder fra Invitrogen. (A.1) Ukuttet DNA fra transformant A. (A.2) BamHI-kuttet DNA fra transformant A. (B.1) Ukuttet DNA fra transformant B. (B.2) BamHI-kuttet DNA fra transformant B. (C.1) Ukuttet DNA fra transformant C. (C.2) BamHI-kuttet DNA fra transformant C. (D.1) Ukuttet DNA fra transformant D. (D.2) BamHI-kuttet DNA fra transformant D.

Av figur 30 ser man at kun én av de plukkede *Escherichia coli*-transformantene, transformant A, har insertet av 4,5 kb fra LMGT 3601 i vektoren. De andre vektorene er "tomme". Dette kan man se av størrelsen på både kuttet og ukuttet DNA. Kuttet DNA fra transformant A resulterte i to restriksjonsfragmenter; ett på cirka 1000 bp, og et på cirka 7 kb. For å få klonet promotoren p32 oppstrøms for dette 4,5 kb lange fragmentet, måtte man derfor kutte i det restriksjonssetet som satt oppstrøms for dette fragmentet; restriksjonssetet for PstI. For illustrasjon av dette, se figur 10.

PMG36e med promotoren p32 ble ligert inn oppstrøms for insertet og klonet i elektrokompetente *Escherichia coli*. Disse ble dyrket på LA tilsatt 100 µg/ml Erythromycin og 50 µg/mL Kanamycin. Da transformantene hadde vokst opp, ble det kontrollert at ligeringen var vellykket med en PCR med primerne 36018 og pmg4 (se figur 11). Resultatet av denne er vist i figur 31.

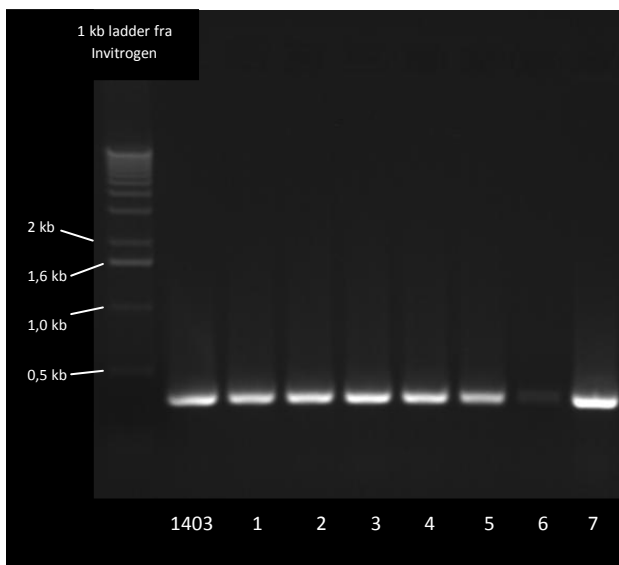


**Figur 31:** Resultat av kontroll retningen til pMG36e i vektoren. Figuren viser flere prøver med produkt på cirka 1200 bp. Venstre: 1 kb ladder fra Invitrogen. Hver brønn representerer PCR-produktet der én varmebehandlet transformant (1-6) ble brukt som templat.

Samtlige av PCR-produktene var 1,2 kb store. Dette viser at p32 står slik at denne promotoren skal kunne starte transkripsjon av leucocin H-genklyngen.

DNA ble ekstrahert fra disse transformantene, og transformert inn i elektrokompetente IL1403 og LMGT 3390, som ble dyrket på GM17-agar tilsatt 10 µg/mL Erythromycin. Denne transformasjonen resulterte i mange (cirka 100) transformanter av LMGT 3390, men kun én transformant av IL1403.

For å bevise at transformasjonen inn henholdsvis IL1403 og LMGT 3390 var vellykket, noe av 100 µL av hver kultur lysozymbehandlet, og brukt som templat i en PCR med primer spesifikke for insertet av genomisk DNA fra LMGT 3601. Til denne PCR-reaksjonen brukte man primerne 36018 og 36021. Dette skulle i teorien gi et PCR-produkt på 370 bp, men PCR-reaksjonen gav imidlertid ikke noe produkt. Derfor ble DNA ekstrahert fra transformantene IL1403 og LMGT 3390, og transformert inn i elektrokompetente *Escherichia coli*. Transformantene som vokste opp ble varmebehandlet, og PCR med de samme primerene ble forsøkt på dette templatet. Resultatet er vist i figur 32. Her ser man at alle transformantene inneholdt konstruktet.



**Figur 32:** PCR-produkt som resultat av varmebehandlede kolonier (én koloni av IL1403, koloni 1-7 er ulike kolonier av LMGT 3390). Primerne 36018 og 36021 ble brukt i denne PCR-reaksjonen, som skulle resultere i produkter på 370 bp.

Figur 32 beviste at de oppdyrkede transformantene av LMGT 3390 og IL1403 inneholdt konstruktet med blant annet 4,5 kb med genet for leucocin H.

Transformantene av LMGT 3390 ble brukt videre i et mikrotiterassay for sammenligning med vildtypen LMGT 3390, som produserer garvicin ML. Resultatet av dette er avbildet i figur 33.



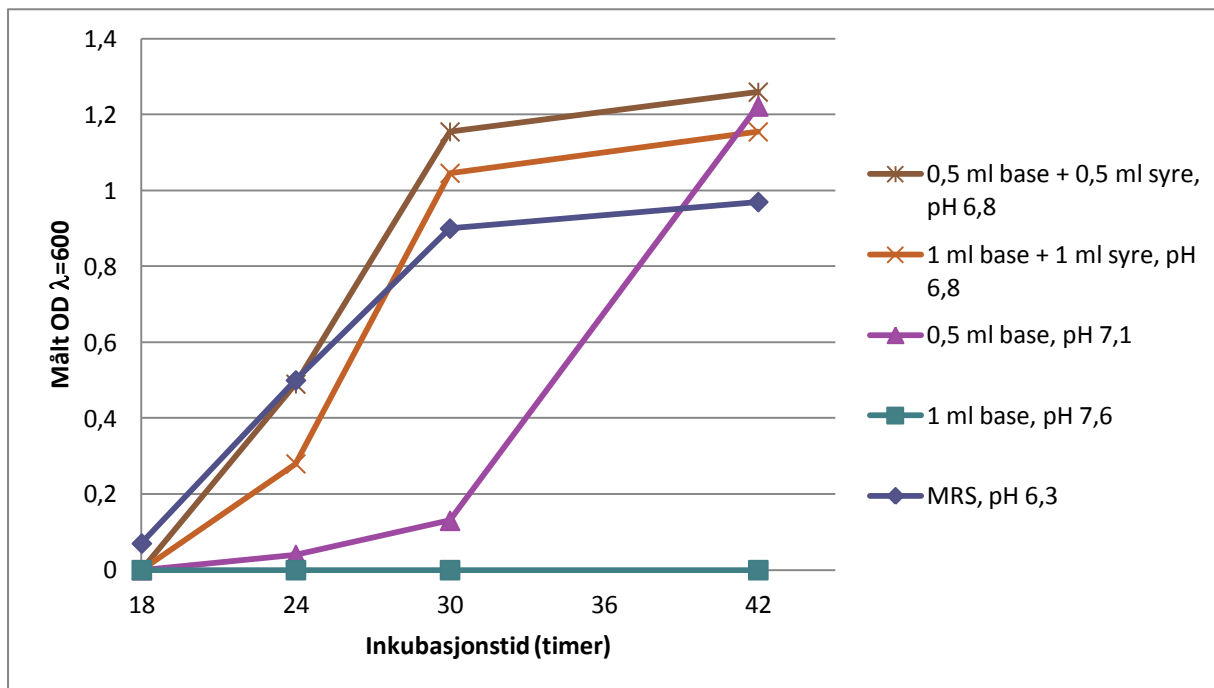
**Figur 33:** Resultat av mikrotiterassay der bakteriocinproduksjon hos transformanter av 3390 ble sammenlignet med vildtypen av LMGT 3390. Indikatorbakterien for dette assayet, var *Lactobacillus sakei* LMG 2313.

Av figur 33 ser man at det er en relativt stor forskjell på transformantenes evne til å hemme indikatorbakterien, sammenlignet med vildtypen av LMGT 3390. For vildtypen ser man relativt sterk hemming helt til brønnen der bakteriocin er fortynnet 1:512.

### 3.4 Egenskaper ved Leucocin H, og bacteriocinets evne til å hemme vekst av Enterobacteriaceae på Ridderost

#### Mikrotiterassay for testing av bacteriocinaktivitet

Resultater fra måling av  $OD_{\lambda=600}$  under vekst av LMGT 3601 i MRS tilsatt ulike mengder av sure og basiske løsninger av natriumfosfat, er vist i figur 34. Inkubasjonstemperaturen var 25°C.



Figur 34: Forsøk med ulike konsentrasjoner av 0,5 M dinatriumhydrogenfosfat og 0,5 M natriumdihydrogenfosfat i MRS. På X-aksen vises antall timer inkubasjonstid i 25 °C.

Bacteriocinaktiviteten ble videre testet i et mikrotiterassay med LMGT 2313 som indikator.

Mikrotiterassayet gav resultatet i tabell 17.

Tabell 14: Resultat av mikrotiterassay der LMGT 3601 hadde blitt dyrket ON i 5 mL MRS tilsatt ulike volum av henholdsvis sur og basiske løsninger av natriumfosfat. pH i mediet ble målt før inokulering av LMGT 3601.

LMGT 3601 dyrket i		pH	Fortynning med ≥ 50 % hemming	Bacteriocineneheter/mL (BU/mL)
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (0,5M)	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (0,5M)			
0,5 ml	0,5 ml	6,77	64	320
1,0 ml	1,0 ml	6,8	128	640
0,5 ml	0	7,1	128	640
1,0 ml	0	7,6	Ingen hemming	0
Ingen tilsetning		6,3	4	20

Resultatene i tabell 17 viser at tilsetning av både 0,5 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> og 0,5 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> gav økt bakteriocinproduksjon. Dette økte pH til ~7, noe som sannsynligvis påvirket produksjonen av bakteriocin.

Tabell 18 viser resultatene fra mikrotiterassay der LMGT 3601 ble inkubert i henholdsvis 2 og 3 døgn, til sammenligning.

Tabell 158: Resultat av mikrotiterassay der bakteriocinholdige supernatanter fra kulturer dyrket i henholdsvis 2 og 3 døgn, ble testet mot indikatorbakterien *Lactobacillus sakei* LMGT 2313.

LMGT 3601 dyrket i		Fortynning med ≥ 50 % hemming		Bakteriocinenheter/mL (BU/mL)	
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (0,5 M)	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (0,5 M)	2 døgn	3 døgn	2 døgn	3 døgn
0,5 ml	0,5 ml	1:128	1:64	640	320
1,0 ml	1,0 ml	1:256	1:128	1280	640
0,5 ml	0	1:256	1:128	1280	640
Ingen tilsetning		1:8	1:8	40	40

Ut ifra resultatene i tabell 17 og 18, kan man si at bakteriocinaktiviteten er økte til et maksimum i løpet av det 2. døgnet av inkubasjonstiden, før aktiviteten avtok i løpet av det 3. døgnet.

Produksjonen av bakteriocin var høyest i kulturene bestående av 5 mL MRS tilsatt 1 ml av hver av natriumfosfat-løsningene Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> og NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. Tilsetning av 0,5 ml av kun basen, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, hadde samme effekt på bakteriocinproduksjon. Disse to ulike tilsetningene av forfatbuffer førte begge til en pH nær 7.

### Bakteriocinassay med softagar

I tabell 19 vises hemming av ulike indikatorstammer ved 24 timer inkubasjonstid i 17 °C, ved testing mot LMGT 3601 *uten* at denne fikk forhåndsinkubere.

Tabell 16: Hemmingssonenes karakteristikk og bredde ved hemming av både LMGT 3601 og A1 ved 24 timer inkubasjonstid i 17 °C. A1 ble ikke testet mot *Enterococcus fecalis* og *Escherichia coli*. Den lave veksttemperaturen gjorde at *Escherichia coli* og *Lactobacillus sakei* ikke vokste.

LMGT	Indikatorbakterie	Plater inkubert i 17 °C, uten forhåndsinkubering av produsentstamme			
		LMGT 3601 <i>Leuconostoc gasicomitatum</i> som produsentstamme		LMGT 3752 <i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i> A1 som produsentstamme	
		Radius sonebredde (mm)	Kantsone	Radius sonebredde (mm)	Kantsone
2708	<i>Enterococcus fecalis</i>	0,5	Diffus		
2700	<i>Escherichia coli</i>	Ingen vekst			
3020	<i>Pseudomonas</i>	2	Diffus	3	Diffus
2245	<i>Lactococcus lactis cremoris</i>	0,5	Skarp		
2711	<i>Bacillus cereus</i>	1	Diffus	1	Diffus
2313	<i>Lactobacillus sakei</i>	2	Skarp	0	
3390	<i>Lactococcus garvieae</i>	Ingen vekst		Ingen vekst	

Skarpe soner med markerte overganger ble sett det den Leucocin H-produserende LMGT 3601 ble brukt som produsentstamme. Dette er et tegn på bakteriocinproduksjon.

Tabell 20 viser resultatene fra forsøk med forhåndsinkubering av LMGT 3601, der produsentstammen, henholdsvis LMGT 3601 og A1, først hadde blitt dyrket ved 25°C ON. Etter at indikatorstammene hadde blitt påført inkubering ved 17°C ON.



Tabell 170: Hemmingsonenes karakteristik og bredde ved hemming av både LMGT 3601 og A1 LMGT 3752 etter 24 timers inkubasjon ved 17 °C, da produsentstammen på forhånd ble dyrket ON ved 25°C. Den lave veksttemperaturen gjorde at *Escherichia coli* ikke vokste.

LMGT	Indikator	Plater inkubert i 17 °C, etter forhåndsinkubering av produsentstammen			
		LMGT 3601 som produsentstamme		<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i> A1 som produsentstamme	
		Radius sonebredde (mm)	Kantsone	Radius sonebredde (mm)	Kantsone
2708	<i>Enterococcus faecalis</i>	2	Diffus	1	Diffus
2700	<i>Escherichia coli</i>	Ingen vekst		Ingen vekst	
3020	<i>Pseudomonas</i>	5-6	Diffus	5-7	Diffus
3022	<i>Staphylococcus</i>	Ingen vekst		Ingen vekst	
2710	<i>Listeria innocua</i>	2	Diffus	1	Diffus
2245	<i>Lactococcus lactis cremoris</i>	1	Skarp	1	Diffus
2711	<i>Bacillus cereus</i>	6	Diffus	4	Diffus
2313	<i>Lactobacillus sakei</i>	4	Skarp	2	Diffus
3390	<i>Lactococcus garvieae</i>	1	Diffus	Ingen hemming	
1403	<i>Lactococcus lactis</i>	1	Diffus	1	Diffus

Ved softagarassay i 25 °C uten forhåndsinkubering av LMGT 3601 var det ingen hemming av noen indikatorer testet.

Tabell 21 viser resultatene fra assay *med* forhåndsinkubering av LMGT 3601, det vil si at produsentstammene, henholdsvis LMGT 3601 og A1, ble forhåndsinkubert et døgn i 25 °C, etterfulgt av påføring av indikatorstammer og 24 timer inkubasjons i 25 °C.

Tabell 18: Hemmingsonenes karakteristikk og bredde ved hemming av både LMGT 3601 og A1 ved 24 timer inkubasjonstid i 17 °C, da hovedbakterien på forhånd ble dyrket i 24 timer i 25°C. A1 ble ikke testet mot *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Listeria innocua* og *Bacillus cereus*.

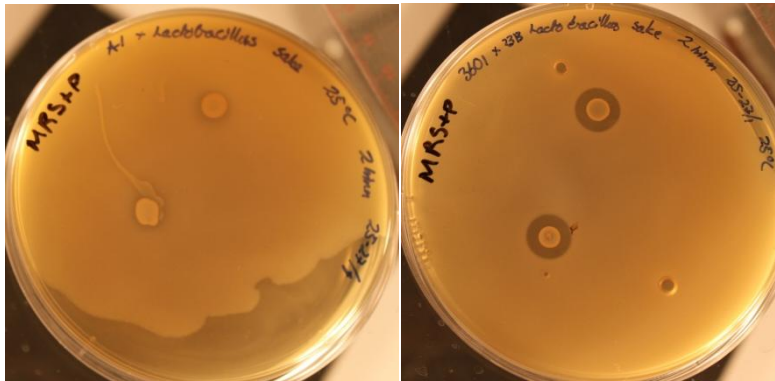
LMGT		Indikator				2 trinn, plater inkubert i 25 grader			
		LMGT3601 som produsentstamme		<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i> A1 som produsentstamme					
		Radius sonebredde (mm)	Kantsone	Radius sonebredde (mm)	Kantsone				
2708	<i>Enterococcus faecalis</i>	1	Diffus	1	Diffus				
2700	<i>Escherichia coli</i>	1	Diffus	2	Diffus				
3020	<i>Pseudomonas</i>	8	Diffus						
3022	<i>Staphylococcus</i>	Ingen hemming							
2710	<i>Listeria innocua</i>	1	Diffus						
2245	<i>Lactococcus lactis cremoris</i>	1	Skarp	Ingen hemming					
2711	<i>Bacillus cereus</i>	2	Diffus						
2313	<i>Lactobacillus sakei</i>	3	Skarp	1	Diffus				
3390	<i>Lactococcus garvieae</i>	Ingen hemming		1	Diffus				
1403	<i>Lactococcus lactis</i>	1	Diffus	1	Diffus				

Tabell 22 viser hemming av ulike indikatorstammer ved inkubasjon ON ved 30 °C, etter forhåndsinkubering av produsentstamme, LMGT 3601 ved 25°C ON.

Tabell 192: LMGT 3601 som produsentstamme, testet mot ulike indikatorer ved 30 °C. Produsentstammen hadde på forhånd inkubert ved 25 °C ON. A1 ble ikke testet i denne delen av forsøket.

LMGT	Indikator	Sonebredde (mm)	Kantsone
2708	<i>Enterococcus faecalis</i>	1	Diffus
2700	<i>Escherichia coli</i>	3	Diffus
3020	<i>Pseudomonas fluorescense</i>	8	Diffus
3022	<i>Staphylococcus aureus</i>	Ingen hemming	
2710	<i>Listeria innocua</i>	1	Skarp
2245	<i>Lactococcus lactis cremoris</i>	1	Skarp
2711	<i>Bacillus cereus</i>	1	Diffus
2313	<i>Lactobacillus sakei</i>	3	Skarp
3390	<i>Lactococcus garvieae</i>	1	Diffus
1403	<i>Lactococcus lactis</i>	1	Diffus

Som vist i tabell 19, 20, 21 og 22, er det tydelig hemming av *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, og *Lactobacillus sakei*. Dette ser man på de skarpe, avgrensede kantsonene. Figur 35 illustrerer dette.



Figur 35: Venstre: Hemmingskål med ikke bakteriocinproduserende LMGT 3752 *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* A1 som produsentstamme og LMGT 2313 *Lactobacillus sakei* som indikatorstamme. Høyre: Hemmingskål med Leucocin H-produserende LMGT 3601 *Leuconostoc gasicomitatum* som produsentstamme og LMGT 2313 *Lactobacillus sakei* som indikatorstamme. Ved begge forsøkene har produsentstammen inkubert i 25°C ON før indikatorstammen ble påført. Begge skålene ble så inkubert i 25 °C over natt. Man ser den tydelige klare, skarpe sonen hos LMGT 3601 som produserer bakteriocin. Denne sonen, som er karakteristisk for bakteriocinproduksjon, ser man ikke hos LMGT 3752 *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* A1, som ikke produserer bakteriocin.

I tilfeller som vist figur 35 er det lett å avgjøre om det er bakteriocinproduksjon som forårsaker hemmingssonen. I andre tilfeller kan det være vanskeligere (figur 36).



Figur 36: Venstre: Leucocin H-produserende *Leuconostoc gasicomitatum* LMGT 3601 som produsentstamme. Høyre: Ikke-bakteriocinproduserende *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* A1 LMGT 3752 som produsentstamme. Begge produsentstammene ble forhåndsinkubert i 25 °C ON før indikatorstammen *Pseudomonas fluorescens* LMGT 3020 ble påført. Begge skålene ble inkubert i 17 °C ON.

I figur 36 ser man noe diffuse overgangssoner for begge skålene. Dersom man kun hadde sett på skålen med Leucocin H-produserende LMGT 3601 som produsentstamme, ville det vært svært vanskelig å bestemme om det er bakteriocinproduksjon eller syreproduksjon som hemmet *Pseudomonas*. Fordi man har kontrollen, bestående av den ikke-bakteriocinproduserende LMGT 3752, kan man likevel fastslå at det hemmingen i skålene ikke er på grunn av bakteriocinproduksjon.

Hemmingssonene er like store og med samme karakteristika for den ikke-bakteriocinproduserende stammen.

### Hemming av de Gram negative artene *Escherichia coli*, *Morganella morganii* og *Proteus mirabilis*

På grunn av tidligere mistanker om at Leucocin H kunne hemme Gram negative arter, ønsket man å teste dette i kulturrør.

Tabell 24 viser gjennomsnittlig antall *Escherichia coli* i henholdsvis bufret MRS og LB etter ulike inkubasjonstider ved ulike temperaturer. Ikke alle skålene var mulig å telle. Samtlige LA-skåler som inngikk i forsøket var overvokst da de skulle telles. For å kunne finne eventuelle forskjeller mellom antall *Escherichia coli* i de ulike kulturene, ble mediene med anslagsvis  $10^8$  og  $10^5$  cfu/mL LMG 3601, fortynt ytterligere. Disse fortyntingene ble platet ut på LA, etterfulgt av inkubering i 37°C ON. Dermed kunne antall cfu/mL av *Escherichia coli* i kulturen beregnes. Feltene med angitt "Ikke beregnet", betyr at det ikke er gjort fortyntinger av kulturene og beregnet nøyaktige antall av *Escherichia coli*. I utgangspunktet ble alle rørene tilsatt cirka  $10^2$  cfu/ml av *Escherichia coli*.

Tabell 20: Vekst av *Escherichia coli* i henholdsvis LB og bufret MRS, i nærvær av ulike mengder av LMG 3601. Kulturene ble inkubert henholdsvis 1 uke ved 17°C, 1 døgn ved 25 °C og 1 døgn ved 37 °C. Tallene i tabellen representerer beregnet antall cfu/mL *Escherichia coli* etter inkubasjon og utplating på LA. De tomme feltene i tabellen representerer kulturer der antall av *Escherichia coli* ikke ble bestemt.

LMGT 3601 fortynnet til (cfu/ml)	7 dager inkubasjon i 17 °C		1 døgn inkubasjon i 25 °C	
	<i>Escherichia coli</i> i LB (cfu/ml)	<i>Escherichia coli</i> i bufret MRS (cfu/ml)	<i>Escherichia coli</i> i LB (cfu/ml)	<i>Escherichia coli</i> i bufret MRS (cfu/ml)
$10^8$	$1,2 \times 10^7$	10	$2 \times 10^6$	0
$10^7$	Ikke beregnet	30	Ikke beregnet	$3,5 \times 10^2$
$10^6$	Ikke beregnet	40	Ikke beregnet	$2,5 \times 10^3$
$10^5$	$3,3 \times 10^7$	30	$1,4 \times 10^7$	$1,2 \times 10^4$
$10^4$	Ikke beregnet	$1,8 \times 10^2$	Ikke beregnet	Ikke beregnet
$10^3$	$3,5 \times 10^7$	$1,1 \times 10^2$	Ikke beregnet	Ikke beregnet
$10^2$	Ikke beregnet	$6,2 \times 10^2$	Ikke beregnet	Ikke beregnet
$10^1$	Ikke beregnet	$7,8 \times 10^3$	Ikke beregnet	Ikke beregnet
Uten LMG 3601	$10^8$	$2,3 \times 10^7$	$10^8$	$10^7$

Tabell 25 viser gjennomsnittlig antall av *Morganella morganii* og *Proteus mirabilis* i henholdsvis bufret MRS og LB etter 1 ukes inkubasjon ved 17°C. Feltene med angitt "Ikke beregnet", betyr at det

ikke er gjort fortynninger av kulturene og beregnet nøyaktige antall av henholdsvis *Morganella morganii* og *Proteus mirabilis*.

Ved vekst i LB, var ingen av VRBGA-skålene mulig å telle, samtlige hadde >>>300 kolonier. For å kunne finne eventuelle forskjeller mellom antallet av henholdsvis *Morganella* og *Proteus* i de ulike kulturene, ble mediene med anslagsvis  $10^8$  og  $10^5$  LMGT 3601/mL fortynnet ytterligere, og disse fortynningene ble støpt inn i VRBGA, etterfulgt av inkubering i 30°C i 48 timer. Dermed kunne antall cfu/mL av *Morganella* og *Proteus* i de respektive kulturene beregnes. I utgangspunktet ble alle rørene tilsatt  $\sim 10^2$ /ml *Morganella* eller *Proteus*.

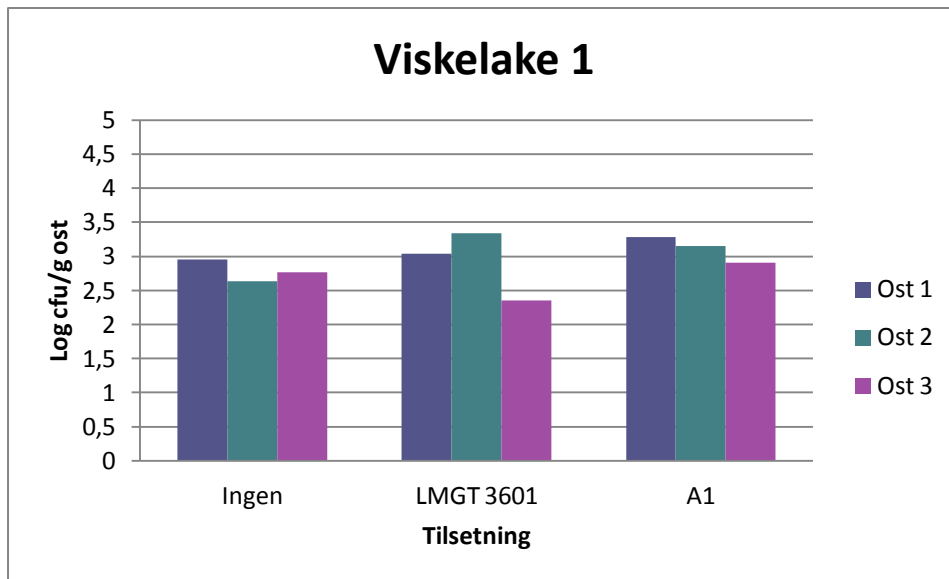
**Tabell 21: Vekst av henholdsvis *Morganella* og *Proteus* i LB og bufret MRS, i nærvær av ulike mengder av LMGT 3601. Kulturene ble inkubert 1 uke i 17°C. Tallene i tabellen representerer beregnet antall cfu/mL etter inkubasjon og innstøping i VRBGA. LB- kulturene måtte fortynnes ytterligere før utplating, man valgte ut kulturene som inneholdt  $10^8$ ,  $10^4$ ,  $10^1$  LMGT3601, i tillegg til den som ikke inneholdt LMGT3601.**

LMGT 3601 fortynnet til (cfu/ml)	Morganella		Proteus	
	Antall cfu/ml i LB	Antall cfu/ml i bufret MRS	Antall cfu/ml i LB	Antall cfu/ml i bufret MRS
$10^8$	$1,5 \times 10^7$	0	$1,6 \times 10^8$	0
$10^7$	Ikke beregnet	0	Ikke beregnet	0
$10^6$	Ikke beregnet	0	Ikke beregnet	0
$10^5$	Ikke beregnet	0	Ikke beregnet	0
$10^4$	$2,3 \times 10^7$	0	$10^8$	0
$10^3$	Ikke beregnet	$8,5 \times 10^2$	Ikke beregnet	0
$10^2$	Ikke beregnet	$1,5 \times 10^4$	Ikke beregnet	0
$10^1$	$5 \times 10^7$	Ikke tellbart	$2,3 \times 10^7$	0
<b>Uten LMGT 3601</b>	$10^8$	Ikke beregnet	$10^8$	Ikke beregnet

### Effekten av ulike *Leuconostoc* på *Enterobacteriaceae* med Ridderost som vekstmedium

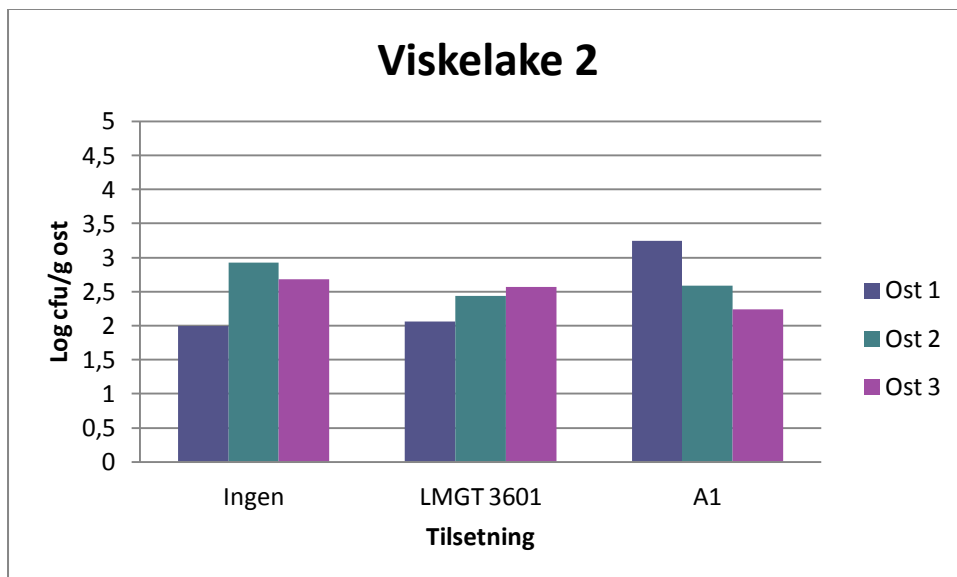
16S-analyse resulterte i artsbestemmelse av *Enterobacteriaceae* i viskelaken. Samtlige kolonier isolert fra viskelaken var stammer av *Morganella morganii* eller *Proteus mirabilis*.

Diagrammene nedenfor viser resultatene fra testing av hver enkelt viskelake. Hver enkelt viskelake inneholdt i utgangspunktet ulike antall cfu/ml av *Enterobacteriaceae*, og var derfor var de forskjellige viskelakene ikke mulig å sammenligne.



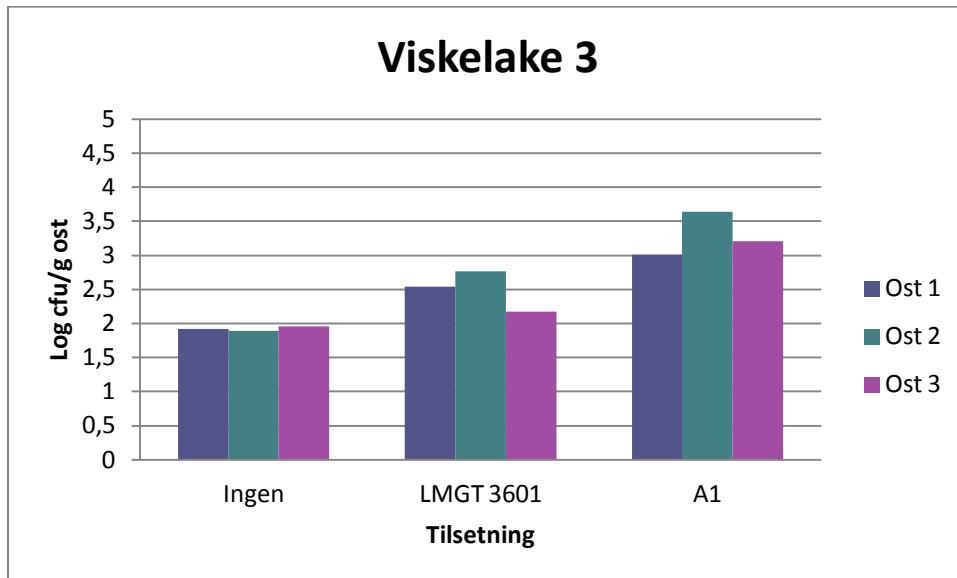
Figur 37: Diagrammet viser antall bakterier av familien *Enterobacteriaceae* (cfu/g) funnet på Ridderost etter 1 ukes modning. Ostbitene ble påført henholdsvis viskelake uten tilsetning, viskelake tilsatt bakteriocinproduserende LMGT3601 og viskelake tilsatt den ikke-bakteriocinproduserende stammen A1.

Etter hver visking ble prøver av viskelakt støpt inn i VRBGA, og antall cfu/ml ble beregnet. Ved visking med viskelake 1 ble det til sammen påført  $10^2$  cfu/g av *Enterobacteriaceae* i løpet av modningsprosessen. Fordi det ved innstøping av selve ostebitene ble talt opp til  $>10^3$  cfu/g, ser man at antall *Enterobacteriaceae* hadde steget i løpet av ostemodningen.



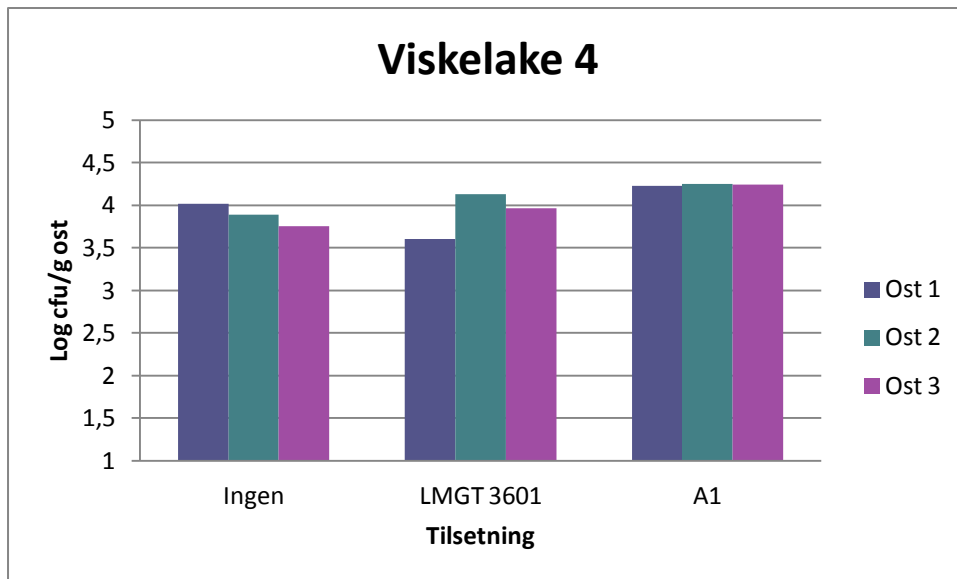
Figur 38: Diagrammet viser antall bakterier av familien *Enterobacteriaceae* (cfu/g) funnet på Ridderost etter 1 ukes modning. Ostbitene ble påført henholdsvis viskelake uten tilsetning, viskelake tilsatt bakteriocinproduserende LMGT3601 og viskelake tilsatt den ikke-bakteriocinproduserende stammen A1.

Etter hver visking ble prøver av viskelakt støpt inn i VRBGA, og antall cfu/ml ble beregnet. Ved visking med viskelake 2 ble det til sammen påført  $2,1 \times 10^3$  cfu/g av Enterobacteriaceae i løpet av modningsprosessen. Fordi det ved innstøpning av selve ostebitene ble talt opp til  $>10^3$  cfu/g, ser man at antall Enterobacteriaceae hadde steget i løpet av ostemodningen.



Figur 39: Diagrammet viser antall bakterier av familien *Enterobacteriaceae* (cfu/g) funnet på Ridderost etter 1 ukes modning. Ostbitene ble påført henholdsvis viskelake uten tilsetning, viskelake tilsatt bakteriocinproduserende LMGT3601 og viskelake tilsatt den ikke-bakteriocinproduserende stammen A1.

Etter hver visking ble prøver av viskelakt støpt inn i VRBGA, og antall cfu/ml ble beregnet. Ved visking med viskelake 3 ble det til sammen påført  $5 \times 10^1$  cfu/g av Enterobacteriaceae i løpet av modningsprosessen. Fordi det ved innstøpning av selve ostebitene ble talt opp til  $>10^3$  cfu/g, ser man at antall Enterobacteriaceae hadde steget i løpet av ostemodningen.



Figur 40: Diagrammet viser antall bakterier av familien *Enterobacteriaceae* (cfu/g) funnet på Ridderrost etter 1 ukes modning. Ostbitene ble påført henholdsvis viskelake uten tilsetning, viskelake tilsatt bakteriocinproduserende LMGT3601 og viskelake tilsatt den ikke-bakteriocinproduserende stammen A1.

Etter hver visking ble prøver av viskelake støpt inn i VRBGA, og antall cfu/ml ble beregnet. Ved visking med viskelake 4 ble det til sammen påført  $1,1 \times 10^3$  cfu/g av *Enterobacteriaceae* i løpet av modningsprosessen. Fordi det ved innstøping av selve ostebitene ble talt opp til  $>10^4$  cfu/g, ser man at antall *Enterobacteriaceae* hadde steget i løpet av ostemodningen.

Ved bruk av T-test med  $p=0,05$ , fant man at antall *Enterobacteriaceae* på ostebitene visket med viskelake med tilsetning, ikke var signifikant forskjellig fra ostebiten visket med viskelake uten tilsetning. Dette gjelder imidlertid ikke ostebitene som ble visket med viskelake 3. På disse ostebitene ble det beregnet at antall *Enterobacteriaceae* på ostebitene visket med viskelake tilsatt henholdsvis stammen A1 og LMGT 3601, var *signifikant høyere* enn kontrollosten, der det ikke var tilsatt *Leuconostoc*.

For ostene visket med viskelake 4, var antall *Enterobacteriaceae* i ostebitene visket med viskelake tilsatt stammen A1, *signifikant høyere* enn hos ostebitene visket med tilsetning av LMGT 3601 og visket uten tilsetning.



## 4. Diskusjon og konklusjon

### 4.1 Sekvensering

#### Sekvensering av 570 bp lang contiger

PCR med primere 36013 og 36014 resulterte i et produkt på cirka 570 bp. Dette bekreftet at kombineringen av sekvenser fra Illumina- og Roche-sekvensering var korrekt. Sanger-sekvensering gav nukleotidsekvensen til det 570 bp store PCR-produktet. Ved å sammenligne denne sekvensen med den sekvensen som ble oppnådd ved Roche-sekvensering, kunne man korrigere for eventuelle feil som kunne ha forekommet ved Roche sekvensering. Man vet at Roche-sekvensering kan resultere i feil i regioner med lengre homopolymerer av nukleotider. Etter korrigering kunne man fastslå at sekvensen var korrekt for i dette 570 bp lange området.

Ved søk med nukleotidsekvensen i NEBcutter V2.0. ble det funnet 3 åpne leserammer som var lengre enn 30 aa. Disse er illustrert i figur 13, og bestod av henholdsvis 80, 64 og 39 aa. Ved blastsøk i NCBI ble det funnet at leserammen på 80 aa viste en viss likhet med hypotetiske protein av andre bakterier, blant annet et ACB-transporterprotein. Ved bruk av prediksjonsprogrammer, kunne man finne to potensielle transmembrane domener. Resultatene av blastsøket gav imidlertid en relativt høy E-verdi, noe som vitner om en relativt høy usikkerhet rundt dette resultatet. Derimot viste leserammen som kodet for 64 aminosyrer en høy sekvenslikhet med to hypotetiske proteiner fra arter i Bacilliales-orden; *Bacillus cereus* og *Paenibacillus mucilaginosus*. Disse to søkeresultatene gav svært lave E-verdier. Flere resultater av blast med denne aminosyresekvensen, som ikke ga like lave E-verdier, var treffet "Carnocyclin A prekursor". Det var dette treffet som gjorde at man i utgangspunktet rettet oppmerksomheten mot sirkulære bakteriociner, og fremsatte påstanden om at Leucocin H var et sirkulært bakteriocin. Siden dette har man forsøkt finne mer genomisk sekvens rundt dette 64 aa lange proteinet.

#### Sekvensering ved bruk av vektor

Det først forsøket på å finne ny genomisk sekvens for LMGT 3601, var å restriksjonskutte genomisk DNA, og ligere dette inn i en vektor som var restriksjonskuttet på tilsvarende måte. En PCR burde da kunne fange opp restriksjonsfragmentene. Prinsippet for denne metoden var relativt enkelt, og man forventet distinkte PCR-produkter. Man hadde imidlertid ikke noen formening om hvor store disse produktene kunne være. Man var avhengig av at restriksjonssetene for de utvalgte enzymene satt tilstrekkelig nært de kjente delene av sekvensene.

Som figur 20 viser, resulterte PCR i alt annet enn bånd med distinkte størrelser. Elektroforesebildet viste enorme smørjer av PCR-produkter. Det var tydelig at PCR-reaksjonen hadde skjedd, produktene bestod av store mengder DNA, uten av det er mulig å peke ut noe bestemt produkt. Det kunne være flere grunner til dette. Én mulig årsak kan ha vært at restriksjonsfragmentene som resulterte fra kuttingen, under ligering ble ligert som påfølgende repetisjoner, og dette har resultert i flere like områder i sekvensen der primerne kunne hybridisere under PCR-reaksjonene. Likevel ville dette ført til PCR-produkter av distinkte størrelser.

Mistenkelig var det også at alle PCR-produktene var tilsynelatende så like. Alle produktene, med unntak av ett (se figur 13, brønn B) resulterte i én lang smear, på tross av at templatene for amplifiseringsreaksjonen var kuttet med ulike restriksjonsenzymmer før ligering. Dette burde i utgangspunktet resultere i restriksjonsfragmenter av ulike lengder. Påfølgende ligering og PCR skulle resultere i en viss variasjon blant produktene.

Man vurderte å forsøke noen andre restriksjonsenzymmer ved kutting. Som nevnt var det en forutsetning at restriksjonssetene for de aktuelle enzymene satt i kort nok avstand fra den kjente sekvensen. Man forsøkte aldri å kutte med noen andre enzymer, da man i stedet valgte å forsøke andre metoder for sekvensering. I det senere vet man at det satt restriksjonsseter tilstrekkelig nært de kjente områdene man tok utgangspunkt i ved priming av PCR-reaksjonen.

PCR på DNA ekstrahert fra LMGT 3601, har tidligere vist seg å være vanskelig. Som nevnt i introduksjonen, var genomsekvensering ved kombinasjon av Illumina og Roche-tekniker delvis mislykket. Enkelte områder var ikke dekket, og dette gjorde det umulig å lage lange contiger. Det var mistenkelig at alle reaksjoner som innebar syntese og amplifisering ved bruk av PCR resulterte i så mangelfulle resultater. På grunn av dette, ble det konkludert med at forsøk på sekvensering ved bruk av vektor var mislykket, og man valgte derfor å gå vekk fra denne metoden.

### **Invers PCR med megaprimer på restriksjonskuttet og selv-ligert DNA**

Som et nytt forsøk på å finne ny genomisk DNA-sekvens, prøvde man å gjøre en vanlig invers PCR på restriksjonskuttet, selv-ligert DNA. Invers PCR er en mye brukt metode for analysering av ukjente sekvenser med nærliggende kjente sekvenser (Ochman et al. 1988). Forsøk på invers PCR var mislykket. Man gikk aldri noe PCR-produkt.

Da invers PCR ikke førte frem, valgte man å forsøke med en megaprimer som en erstatning for de ordinære primerne. Bruk av megaprimer ville øke hybridiseringstemperaturen for PCR-reaksjonen til temperatur tilsvarende elongeringstemperaturen; 72°C. Dermed ville man også unngå problemer

med falsk priming. Bruk av megaprimerer ved sekvensering på denne måten har ikke tidligere blitt gjort, etter vår kunnskap. Megaprimerer brukes ofte i forbindelse med andre metoder, det er blant annet vanlig å bruke ved innsetting av mutanter som en del av setespesifikk mutagenese (Sarkar & Sommer 1990).

Antydningen til PCR-produkter er så svak at de knapt syntes på figur 18. Ved å redusere elongeringstiden ved nested PCR, og under denne reaksjonen bruke primere som hybridiserte nær området der megaprimeren hybridiserte, ble de kortere fragmentene mer dominerende, og lettere å se i en elektroforesegel. Disse PCR-produktene var av ulike størrelser, henholdsvis 800 bp og 300 bp, altså var de mindre enn PCR-produktet man skimtet på figur 18. Dette var noe uventet, men man valgte å se bort i fra dette da sekvenseringen førte fram. Resultatet beviste at invers PCR med megaprimer på kuttet og selvligert DNA, var en vellykket metode, og en potensiell fremgangsmåte for å oppnå ikke identifisert genomisk sekvens.

Sekvensering av de to båndene på henholdsvis cirka 800 bp og 300 bp, resulterte i noe ny genomisk DNA-sekvens, som bidro med overlapping mellom Illumina- og Roche-sekvenser. Dette gjorde det mulig å lage en lengre contig med sekvens som inneholdt det strukturelle genet for Leucocin H. Korrekt sammenkobling av sekvenseringsfragmenter ble bekreftet med en PCR (figur 20). Dette åpnet for en ny invers PCR på det samme PCR-produktet av selvligert, HincII-kuttet DNA. Denne andre invers PCR gjorde at man fant mer hittil ukjent genomisk sekvens som bidro til utvidelse av contigen. Dette resulterte i et 4540 bp langt fragment av genomisk DNA, som strakk seg på hver side av det strukturelle genet for Leucocin H.

Ingen av de sekvenserte produktene inneholdt noe restriksjonssete for HincII. Dette vitner om at den innledende restriksjonskuttingen med HincII resulterte i feilkutting, enzymet kuttet sannsynligvis på steder der det ikke var noe restriksjonssete. Denne feilkuttingen var imidlertid avgjørende for resultatet av invers PCR med megaprimer og nested invers PCR, og var trolig grunnen til at man oppnådde den hittil ukjente sekvensen.

I ettertid har man også vurdert muligheten om at det genomiske DNA som ble kuttet og ligert kan ha vært av dårlig kvalitet. Dersom DNA var fragmentert på forhånd *kan* dette ha resultert i sirkularisering ved tilsetning av ligase. Dette kan ha fungert som templat for PCR-reaksjonen.

Contigen som ble laget ved hjelp av de nye DNA-sekvensene bestod av en sammenhengende genomisk sekvens på 4540 bp. Denne kodet blant annet for det 64 aa store pre-proteinet Leucocin H. Sekvensene oppnådd ved sekvensering av PCR-produkt ble brukt til korrekturlesing av Roche-sekvenser, og Illuminasekvenser som kontroll. Man kunne imidlertid ikke si om denne

korrekturlesingen var tilstrekkelig for at sekvensen var korrekt. Man vet at Roche-sekvensering kan resultere i feil i regioner med lengre homopolymerer av nukleotider. Under sekvensbearbeidelse ble dette observert i flere posisjoner sekvensen. Illumina-sekvensering har en mye lavere feilrate enn Roche, men dette innebærer ikke nødvendigvis at det ikke gjøres feil. Med andre ord kan man ikke utelukke at feil under sekvensering kan ha skjedd, og at disse har blitt oversett er heller ikke umulig. Dersom slike feil oppstår i et kodende gen, vil det kunne føre til frameshift, det vil si endring forskyvning av leserammen og en følgende endring i aminosyrerekkefølge.

Søk med den 4,54 kb lange sekvensen i NEBcutter V2.0, avslørte 28 åpne leserammer, hvorav 10 av disse var kortere enn 30 aa. Tolv av disse 28 åpne leserammene hadde samme retning som den 64 aa lange sekvensen man mente kodet for Leucocin H. Disse 12 leserammene kunne være en potensiell genklynge som tilhørte leucocin H. Dette er illustrert i figur 29.

Blastsøk med de 12 forskjellige leserammene gav resultatene vist i tabell 15. Av figur 29 sett sammen med tabell 15 ser man fellestrekk med operoner som koder for andre sirkulære bakteriociner (van Belkum et al. 2011). Disse operonene koder blant annet for flere proteiner som inneholder mange membrankryssende domener. I de fleste genklyngene undersøkt har man funnet proteiner med homologi med en familie membranproteiner som alle inneholder et Domene med Ukjent Funksjon 95 (DUF95). Blastsøk med sekvensen på 4,5 kb resulterte i en leseramme på 92 aa (se tabell 15), som viste en likhet med DUF95-proteiner fra både *Clostridium perfringens* og *Bacillus* sp.

Flere leserammer viser likhet med proteiner som inngår produksjon og sekresjon av forbindelser. Flere av søkeresultatene viste en likhet med ABC-transporterproteiner. ABC-transportproteiner er membranproteiner som transporterer forbindelser over membranen ved bruk av energi fra ATP-hydrolyse (Hollenstein et al. 2007). ABC-transportproteiner er noe som finnes i de fleste bakterieceller, og katalyserer opptak av næring og sekresjon av toxiner og andre forbindelser (Davidson et al. 2008; Hollenstein et al. 2007). Disse proteinkompleksene er knyttet til bakteriecellens overlevelse og virulens. En leseramme på 81 aa lignet grad lantibiotika ABC superfamilien for ABC-proteiner. Denne familien av ATP-bindende proteiner er ofte involvert i blant annet lantibiotika-immunitet.

ABC-transporterproteiner er ett av flere fellestrekk for alle genklyngene for sirkulære bakteriociner (van Belkum et al. 2011). Alle sirkulære bakteriocin-genloci koder for ett eller flere løselige ATP-bindende proteiner, og små proteiner som er involvert i immunitet. Disse har som regel høy pI og ett eller flere membrankryssende domener, som gjør det mulig å anta at de er direkte forbundet med cellens membran (van Belkum et al. 2011). I genclusterene for AS-48, Circularin A og Carnocyclin A

har det også blitt observert gener som koder for proteiner som er homologe til multikomponent ABC-transportere (van Belkum et al. 2011). Man kan verken påstå eller utelukke at de nye leserammene funnet i LMGT 3601 sitt genom, er ABC-proteiner som er viktige i produksjonen og sekresjon av bakteriocinet Leucocin H. Et argument for at disse leserammene tilhører genklyngen for Leucocin H, er at disse genene ligger relativt nært det strukturelle genet. Man vet at ABC-transportere er viktige for bakteriocin sekresjon, og at genlocus for et bakteriocin med andre ord blant annet må kode et slikt protein.

Som nevnt i introduksjonen, må alle bakteriocinproduserende stammer også produsere et immunitetsprotein som beskytter produsenten mot sitt eget bakteriocin. Loci for immunitetsprotein har blitt identifisert hos produsentene av Carnocyclin A, Circularin A, Gassericin A og Enterocin AS-48 (henholdsvis *Carnobacterium maltaromaticum* UAL307, *Clostridium beijerinckii* ATCC 25752, *Lactocacillus gasseri* LA39 og *Enterococcus faecalis* S-38) (van Belkum et al. 2011). Immunproteiner er relativt små, med lav pI og ett til to membrankryssende domener (van Belkum et al. 2011)

I denne studien har man ikke sett noen likheter med identifiserte immunitetsproteiner fra andre bakteriocinprodusenter. Generelt har man sett liten homologi blant immunitetsproteiner (Nes et al. 1996). Derfor ville det være usannsynlig å finne nye immunitetsproteiner ved blastsøk. Likevel kan det være at en av de identifiserte leserammene i tabell 15 koder for et immunitetsprotein. Leseramme 1 i tabell 15 koder for et svært lite protein, på 53 aa, med et transmembrant domene og en teoretisk pI på cirka 10. Man kan ikke utelukke at dette genet koder for proteinet som gir cellen immunitet. De to andre leserammene med transmembrane domener koder for større proteiner med som ligner proteiner assosiert med ABC-transporterkompleks. Det er likevel ikke dermed sagt at disse ikke er viktige for immunitet. Flere studier viser at tilstedeværelsen av immunitetsprotein ikke nok for at bakteriocinprodusenten skal oppnå full immunitet. Ved studier av carnocyclin A har man funnet at minimumkravet for produksjon og immunitet hos produsenten, *Carnobacterium maltaromaticum*, var en kombinasjon av enkelte gener, som kodet for flere membranproteiner (blant annet proteiner av DUF95-familien), immunitetsprotein, et ATP-bindende protein samt det strukturelle genet for carnocyclin A (van Belkum et al. 2010). Tilsvarende funn har blitt gjort hos produsentene av circularin A (Kemperman et al. 2003), enterocin AS-48 (Martinez-Bueno et al. 1998) og gassericin A (Ito et al. 2009).

Ved blast av leserammer i den 4,5 kb lange contigen, fant man en påfallende stor likhet mellom leseramme 12 (tabell 13), som kodet for 92 aa, og hypotetiske proteiner fra arter av *Paenobacillus*. Dette hypotetiske proteinet var av DUF95-familien. Leseramme 1 i tabell 13, på 80 aa, viste også noe

likhet med hypotetiske proteiner av *Paenibacillus* og *Bacillus*. Man kan ikke se bort ifra at disse slektene også produserer sirkulære bakteriociner.

## 4.2 Kloning av det Leucocin H-kodende genet

Ved kloning av 520 bp med det strukturelle genet for Leucocin H i IL1403, fikk man vekst av transformanter ved alle forsøk. På grunn av tilsetning av erythromycin og spectinomycin i vekstmediet, var vekst av transformerte celler et bevis på at disse var resistente for disse antibiotika. Kontroll-PCR med primere spesifikke for den kjente delen av de 520 bp fra LMGT 3601, gjorde at man kunne konstantere at DNA fra LMGT 3601 befant seg inne i IL1403. IL1403 er en ikke-bakteriocinproduserende stamme av *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. Tidligere har man brukt denne stammen til svært vellykkede transformasjoner (Holo & Nes 1989). IL1403 er en mye studert stamme og det har aldri blitt observert noen bakteriocinproduksjon hos denne bakterien (Bolotin et al. 2001).

Vellykket koloning i IL1403, beviste at konstruktet lot seg klonere i Gram positive celler. Konstruktet bestod av pat28, deler av pMG36e med blant annet promotoren p32, genet for Leucocin H og TOPO-vektoren. Dette konstruktet var relativt stort, >7 kb.

LMGT 3390 er en stamme av *Lactococcus garviaeae*, som produserer det sirkulære bakteriocinet Garvicin ML (Borrero et al. 2011). Forsøk på transformasjon av konstrukt inn i elektrokompetente LMGT 3390 *Lactococcus garviaeae*, ga ingen vekst av kolonier på GM17 tilsatt antibiotika. Dette vekket mistanke om restriksjonsmodifikasjonssystemer (RM-systemer) i denne stammen. Slike systemer fungerer som en barriere for innsetting av nytt DNA, hovedsakelig som en beskyttelse mot virusinfeksjoner (Wilson 1991). For å undersøke om LMGT 3390 inneholdt slike mekanismer, ble det gjort kontroller med ekstrakt av pAT28 og pMG36e. Transformasjon av disse var vellykket, og resulterte i vekst av mer enn 50 transformanter. Disse kontrollene bekreftet samtidig at de kompetente cellene av LMGT 3390 var av tilstrekkelig god kvalitet, at de var i stand til å ta opp DNA ved elektroporering.

De samlede resultatene i tabell 13 indikerte at transformering av konstruktet med promotoren p32 og, det strukturelle genet for Leucocin H, burde gå. Det eneste forsøket som ikke resulterte i vekst av transformanter, var ved transformering av dette konstruktet i LMGT 3390; celler som i utgangspunktet var i stand til å produsere Garvicin ML (Borrero et al. 2011). Dette var grunnlag til å anta at det strukturelle genet for Leucocin H lot seg transformere i LMGT 3390, og at denne stammen da produserte Leucocin H. Fordi denne stammen i utgangspunktet har "maskineriet" til å produsere et Garvicin ML, antar man at stammen derfor kan produsere tilsvarende proteiner. LMGT 3390 er i følge resultater fra softagarassay (tabell 16 og 17) ikke sensitiv for Leucocin H, men det er mulig en

doseeffekt kan ha bidratt til død hos transformerte LMG 3390. Sirkulære bakteriociner kan utøve en effekt i svært lave konsentrasjoner, helt ned til nanomolare nivåer. Fordi promotoren som ble satt inn rett oppstrøms for bakteriocin prekursor-genet, p32, var en konstitutiv promotor, kan man anta at bakteriocinproduksjonen startet umiddelbart etter transformering. Rast akkumulering av bakteriocin inni cellen kan ha vært nok til å ta livet av cellene.

Hovedgrunnen til at transformanter av LMG 3390 aldri vokste opp på dyrkningsmediet, er antatt å være mangelen på immunitetsproteinet mot Leucocin H. Genet for immunitetsproteinet mot Leucocin H har enda ikke blitt identifisert, man har ingen grunn til å tro at dette var en del av de 520 bp transformert i dette forsøket.

På grunn av mangel på resten av operonet for Leucocin H, kunne man aldri forvente produksjon, sekresjon og immunitet i stor skala hos IL1403 (van Belkum et al. 2011). Hos et av de mest studerte sirkulære bakteriocinene, Enterocin AS-48, har man gjort observasjoner som tilsier at minimumskravet av gener for produksjon av dette bakteriocinet, er bakteriocin prekursor-genet, utvalgte membranproteiner, et ATP-bindende protein, og genet for immunitetsproteinet (Martinez-Bueno et al. 1998). Det samme har blitt observert hos Carnocyclin A (van Belkum et al. 2010), Gassericin A (Ito et al. 2009) og Circularin A (Kemperman et al. 2003).

### 4.3 Kloning av nyoppdaget sekvens rundt det H-kodende genet

Fordi det ikke lyktes å fusjonere p32 med 4,5 kb fra LMG 3601 ved bruk av SOE-PCR, ble det valgt en annen metode for å integrere p32 og 4,5 kb av DNA fra 3601 i en vektor. Man valgte først å klonere det 4,5 kb lange PCR-produktet inn i vektoren TOPO, og bestemme bestemme retningen på dette fragmentet ved hjelp av restriksjonskutting. Ut ifra insertets retning ble det valgt et nytt restriksjonssete oppstrøms for insertet; PstI, og både konstrukt og pMG36e ble kuttet med dette restriksjonssetet. Deretter ble dette ligert sammen, og retningen til pMG36e ble funnet ved restriksjonskutting med PCR. Konstruktet der promotoren i pMG36e, p32, satt oppstrøms for insertet av 4,5 kb, det vil si i riktig retning, ble transformert inn i elektrokompetente LMG 1403 og 3390, etter 3 døgn hadde disse transformerte laktokokkene vokst opp på skålene de var dyrket på. Fordi disse GM17-skålene var tilsatt antibiotika (10µg/mL erythromycin), var cellene uten transformert konstrukt selektert bort.

Kloning i IL1403 og LMG 3390 resulterte i vekst av begge *Lactococcus*-stammene, men vesentlig færre transformanter av IL1403. Dette betyr at konstruktet lot seg transformere. På grunn av størst interesse for LMG 3390, valgte man å ikke fokusere på dette lave antall transformanter man fikk av

IL1403. Ekstraksjon av konstrukt fra disse transformantene, og kloning av dette inn i *Escherichia coli*, bidro til å bekrefte at konstruktet befant seg i transformantene.

Faktumet at man denne gangen fikk av transformanter av LMGT 3390, man ikke hadde fått til å vokse ved kloning av kun strukturelt gen for Leucocin H, tyder på at insertet, som nå bestod av 4,5 kb, inneholdt gener som bidro til immunitet. Dette var ikke uventet, da man ved blast av denne sekvensen hadde oppdaget potensielle ATP-bindende proteiner, ABC-transportere, det strukturelle genet for bakteriocinet, samt mindre proteiner med mulige transmembrane domener og pl på cirka 10. Dersom leserammen på 53 aa (se tabell 15) virkelig kodet for et immunitetsprotein, slik indikert tidligere, kunne dette innebære at genene som utgjør et minimum for bakteriocinproduksjon og immunitet, er til stede i de nylig identifiserte 4,5 kb.

Det ble imidlertid utført et mikroiterassay der bakteriocinproduksjonen ble testet mot LMGT 2313 *Lactobacillus sakei*. Ved dette forsøket ble det vist at transformantene av LMG 3390 nesten ikke greide å hemme veksten av *Lactobacillus sakei* sammenlignet med vildtypen av LMGT 3390. Dette kan ha vært på grunn av den "ekstra belastningen" konstruktet utgjorde i de klonede cellene, som førte til en vesentlig lavere produksjonsrate. En annen mulighet er at både garvicin ML og leucocin H ble produsert i transformantene LMGT 3390, og dette bidro til en intern konkurranse om sekresjonsapparatet i cellen, accessory-proteiner, og andre forbindelser som er nødvendig for sirkularisering og produksjon av et fullstendig prosessert bakteriocin.

Grunnet mangel på tid ble ikke lignende mikrotiterassay ble utført for transformanten av IL1403. Det hadde vært interessant å finne ut om denne stammen ble i stand til å produsere leucocin H som følge av kloning. Dette vil bli en del av framtidige prosjekter.

På grunn av tidsbegrensninger, var det heller ikke mulig å gjøre flere tester med de oppdyrkede transformantene av LMGT 3390. Man ønsket videre å finne ut om klonede LMGT 3390 produserte leucocin H. Dette kunne gjøres ved å undersøke transformantenes evne til hemmingen av ulike stammer, og sammenligne denne med en klonet LMGT 3390 med en tilsvarende klon uten gener for leucocin H eller med LMGT 3390 vildtypen. Slik sammenligning kunne bidratt til å "artsbestemme" denne produksjonen ved å finne stammer som hemmes av leucocin H, men ikke garvicin ML. I mangel på egnede indikatorer som viste respons på de to bakteriocinene garvicin LM og leucocin H, ble det ikke utført noe slikt assay.

Dersom tiden hadde tillatt det, kunne man gjort massespektrometri av komponenter i supernatanten til transformantene LMGT 3390. Undersøkelser av denne kunne også vist om Leucocin H ble produsert.



## 4.4 Egenskaper ved Leucocin H

### Bakteriocinproduksjon ved ulike pH

Ved inokulering hadde MRS med tilsetning av kun 0,5 ml 0,5 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  en pH høyere enn 7. Veksten gikk tregere i starten på grunn av en høyere pH, som utgjorde et dårligere vekstgrunnlag for bakterien. Syreproduksjon i mediet økte etter hvert som antall bakterieceller i mediet økte, og dermed ble pH lavere. Dette var grunnen til at LMGT 3601 brukte nesten 12 timer ekstra på å nå samme OD i mediet tilsatt base. MRS tilsatt 1 ml 0,5 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  hadde ved inokulering en pH på cirka 7,6. Dette utgjorde et miljø som var for basisk for at LMGT 3601 kunne etablere vekst og produksjon, og samsvarer med funn rapportert av Blom et al. (1999).

Mikrotiterassayet viste bakteriocinproduksjonen i de ulike mediene etter vekst i medium med ulik pH. Dette assayet fortalte hvor mye bakteriocin som gjennom vekstforløpet hadde blitt produsert, og ved hvilke pH som var optimal for bakteriocinproduksjon. I dette forsøk observerte man en stor forskjell i mengden bakteriocin produsert ved ulik bufriing av vekstmediet. I mediet tilsatt 1 ml 0,5M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  og 1 ml 0,5 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  var pH tilnærmet 6,8 før inokulering med LMGT 3601. I mediet tilsatt kun 0,5 ml 0,5M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  var pH cirka 7,1 ved inokulering. Det viste seg at dette var de mest optimale tilsetningene for bakteriocinproduksjon, da det i disse supernatantene hadde et dobbelt så høyt antall bakteriocinenheter per mL sammenlignet de andre bufrede prøvene.

Ved pH nær 7 var altså bakteriocinproduksjonen tilsynelatende optimal. Dette var på tross av en tregere startfase for den ene prøven. Bakteriocinproduksjon i den ubufrede prøven, altså i MRS uten tilsetning, var svært lav sammenlignet med de bufrede prøvene.

Tabell 18 viser en halvering i bakteriocinaktivitet etter 3 dagers inkubering, sammenlignet med bakteriocinaktiviteten observert etter 2 dagers inkubering av den bakteriocinproduserende kulturen. Dette er trolig på grunn av at produksjonen avtar ettersom veksten stagnerer, og/eller at bakteriocinet blir svakt nedbrutt etter en viss tid.

### Bakteriocinassay med softagar

Ved 17°C, uten forhåndsinkubering av produsentstammen, ser man klare forskjeller mellom bakteriocinproduserende LMGT 3601 og *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* A1 LMGT 3751. Indikatorstammen LMGT 2313 *Lactibacillus sakei* er en svært syretolerant stamme. Det er tydelig av *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* A1 ikke har bakteriocinproduksjon, da LMGT 2313 viste absolutt ingen sensitivitet mot denne. Den Leucocin H-produserende stammen LMGT 3601, derimot, har tydelig aktivitet mot LMGT 2313, da det var tydelig oppklarte områder med

skarpe kantsoner rundt produsentstammen. Dette ser man også mot indikatorstammen LMGT 2245 *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, på tross av at denne stammens sensitivitet er lavere. Dette forsøket bekrefter også at LMGT 3601 har evne til å vokse og produsere bakteriocin ved 17°C, ved dyrking på bufret MRS-agar.

Noe overraskende kom den store hemmingen av LMGT 3020 *Pseudomonas fluorescens*. Dette er en Gram negativ bakterie (Peix et al. 2009). I følge van Belkum et al. (2011) er det sjeldent at bakteriociner produsert av Gram positive bakterier viser aktivitet mot Gram negative stammer. Den diffuse kantsonen rundt hver hemmingssone vitner imidlertid om at den er forårsaket av syreproduksjon fra produsentstammen, ikke bakteriocinproduksjon. Dette bekreftes også ved at den bakteriocin negativ *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* A1 forårsaker like store, og til tider større, diffuse hemmingssoner.

Ved forhåndsinkubering av produsentstammene, etterfulgt av påføring av indikatorbakterier, ser man en større grad av hemming av flere indikatorstammer. Disse har diffuse kantsoner, og blir i varierende grad også hemmet av *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* A1. Man kan imidlertid se en større hemming der bakteriocinproduserende LMGT 3601 er produsentstammen. Dette kan være på grunn av bakteriocinproduksjon, men at denne blir overskygget av syreproduksjon, som resulterer i mer diffuse kantsoner.

Tilsvarende tester ved 25°C og 30°C, der produsentstammen hadde forhåndsinkubert, viser mange av de samme resultatene, i tillegg til hemming av Gram negative *Enterococcus faecalis* og *Escherichia coli*. Sonene var imidlertid små, med diffuse kantsoner. Tilsvarende resultater for testing mot produsentstammen *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* A1, tydet på at det var syreproduksjon som forårsaket hemmingssoner.

Uten forhåndsinkubering, var det ingen hemming av noen indikatorer testet ved 25°C. Inkuberingstemperaturen brukt i dette forsøket lå nærmere optimaltemperaturen for dyrking av flere av indikatorstammene.

I disse undersøkelsene har man sett en hemming av en *Lactococcus* og en *Lactobacillus*. Blom et al. (1999) så et bredere hemmingsspekter enn det vi har sett Leucocin H. Blant annet så de en hemming av *Staphylococcus aureus*, noe som ikke ble observert under våre forsøk. Blom et al. (1999) så blant annet *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* og *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus*, i tillegg til flere andre melkesyrebakterier. I våre forsøk ble Leucocin H testet mot enkelte disse, og andre arter av disse slektene.

### **Hemming av de gram negative artene *Escherichia coli*, *Morganella morganii* og *Proteus mirabilis***

I bufret MRS ser man et *Escherichia coli* hemmes. Etersom LMGT 3601 blir mer og mer fortynnet, ser man et større antall *Escherichia coli*. Dersom man sammenligner med kontrollen, der det ikke var noe LMGT 3601 tilsatt, men  $10^7$  cfu/mL av *Escherichia coli*, ser man at det definitivt har vært en hemming. Denne hemmingen er sterkere ved 17°C enn ved 25 °C. Denne hemmingen kan være av ulike årsaker, men det er rimeligere å anta at en kombinasjon av lav temperatur og tilstedeværelse av bakteriocin har gjort miljøet lite gunstige for vekst av *Escherichia coli*, og dermed har denne veksten stoppet opp.

I utgangspunktet ble alle de ulike fortynningene av LMGT 3601 tilsatt  $10^2$  cfu/ml *Escherichia coli*. I bufret MRS med  $10^5$ - $10^8$  LMGT 3601/mL, inkubert i 17 °C, ser man at tallet på *Escherichia coli* redusert fra  $10^2$  cfu/mL til  $10^1$  cfu/mL i løpet av inkubasjonstiden. Dette tyder på at flere enn halvparten av *Escherichia coli*-cellene tilsatt kan ha dødd i dette tidsrommet. 17°C er ikke en optimal temperatur for denne bakterien, da denne har temperaturoptimum på 37°C, men kan vokse ved temperaturer på 7°C og 48°C (Watson 2007). I kombinasjon med nærvær av leucocin H, kan dette ha bidratt til å redusere overlevelsen av *Escherichia coli*.

Som vist i tabell 19, er tallet på *Escherichia coli* dyrket i LB ved 17°C of i 25 °C, tilnærmet uaffisert av antall LMG 3601 tilstedet i løsningen. LB er et medium der *Leuconostoc* vokser dårligere, men der *Escherichia coli* vil trives svært godt.

Resultatene fra tilsvarende tester med *Morganella morganii* og *Proteus mirabilis* som indikatorbakterier viser ingen vesentlig hemming ved 17 °C i LB-medium. Disse artene trives i LB-medium. I bufret MRS har disse artene sannsynligvis ikke overlevd i løpet av inkubasjonstiden på grunn av en kombinasjon av lav temperatur og nærvær av leucocin H.

I disse forsøkene ser man en "Hurdle-effekt", det vil si at en kombinasjon av to forhold, som alene ikke hemmer vekst av Enterobacteriaceae, vil i synergi kunne hemme vekst. En kan si at bakteriocinet får "litt hjelp" av den lave temperaturen.

### **LMGT 3601 *Leuconostoc gasicomitatum* sin effekt på *Enterobacteriaceae* med Ridderost som vekstmedium.**

Artene fra viskelaken som ble renstrøket og artsbestemt ved 16S-analyse, viste seg å være henholdsvis *Morganella morganii* og *Proteus mirabilis*. Dette var det samme som har blitt identifisert ved intern kvalitetskontroll i TINA-meieriene.

De fleste tallene i figur 37, 38, 39 og 40 er høyere enn grensene angitt i problemstillingen. Dette er grunnet andre forhold mellom areal og volum, enn de forholdene som er en realitet ved analyse i meieriene.

Tidligere forsøk har vist at Leucocin H viser aktivitet mot Enterobacteriaceae testet i kulturrør. Det var derfor av interesse å vite om Leucocin H kunne hemme arter av Enterobacteriaceae på Ridderost. Tidligere har man sett at LMGT 3601 kan vokse og produsere Leucocin H ved 17°C, som er modningstemperaturen for Ridderost.

Man så i at antall cfu/g av Enterobacteriaceae steg i løpet av modningstiden. Dette betyr at disse bakteriene kunne formere seg på Ridderost.

Man ønsket å finne ut av om tilsetning av den leucocin H-produserende stammen LMGT 3601 i viskelaken, kunne redusere antall bakterier av familien Enterobacteriaceae på osten. Som kontroll benyttet man viskelake uten tilsatt *Leuconostoc*, i tillegg til viskelake tilsatt den ikke-bakteriocinproduserende stammen *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* A1.

Ved hjelp av T-test med  $p=0,05$ , fant man signifikante forskjeller ved testing med enkelte viskelaker. Dette gjelder blant annet ostebitene som ble visket med viskelake 4. Viskelaken tilsatt stammen A1 gav et antall av Enterobacteriaceae som var signifikant høyere enn for ostebitene visket med viskelake tilsatt henholdsvis LMGT 3601, og ingen tilsetning. Dette innebar også at visking med viskelake tilsatt LMGT 3601, førte til en reduksjon i antall Enterobacteriaceae per gram, sammenlignet med ost visket med viskelake tilsatt A1. Dette resultatet tydet på at tilsetning av den leucocin H-produserende stammen i viskelaken, kunne ha en reduserende effekt på Enterobacteriaceae. Dersom man sammenlignet resultatet av ost visket med viskelake tilsatt LMGT 3601 og kontrollosten visket med viskelake uten tilsetning, er det ingen signifikant forskjell mellom disse.

Viskelake 3 gav i en signifikant forskjell mellom ostene visket med viskelake tilsatt *Leuconostoc*, sammenlignet med ost visket med viskelake uten tilsetning. Det så ut som tilsetning av viskelake resulterte i en stimulering av Enterobacteriaceae, slik at dette antallet økte.

## 5. Referanser

- Abee, T., Krockel, L. & Hill, C. (1995). Bacteriocins: modes of action and potentials in food preservation and control of food poisoning. *International Journal of Food Microbiology*, 28 (2): 169-185.
- Atrazhev, A. M. & Elliott, J. F. (1996). Simplified desalting of ligation reactions immediately prior to electroporation into E-coli. *Biotechniques*, 21 (6): 1024-1024.
- Axelsson, L. (2004). Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology. I: Salminen, S., von Wright, A. & Ouwehand, A. (red.) *Lactic Acid Bacteria-Microbiological and Functional Aspects*, s. 1-66. New York: Marcel Dekker Inc.
- Barik, S. (1995). Site-directed mutagenesis by double polymerase chain reaction. *Mol Biotechnol*, 3 (1): 1-7.
- Beresford, T. P., Fitzsimons, N. A., Brennan, N. L. & Cogan, T. M. (2001). Recent advances in cheese microbiology. *International Dairy Journal*, 11 (4-7): 259-274.
- Bjorkroth, K. J., Geisen, R., Schillinger, U., Weiss, N., De Vos, P., Holzapfel, W. H., Korkeala, H. J. & Vandamme, P. (2000). Characterization of *Leuconostoc gasicomitatum* sp nov., associated with spoiled raw tomato-marinated broiler meat strips packaged under modified-atmosphere conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 66 (9): 3764-3772.
- Blom, H., Katla, T., Holck, A., Sletten, K., Axelsson, L. & Holo, H. (1999). Characterization, Production, and Purification of Leucocin H, a Two-Peptide Bacteriocin from *Leuconostoc* MF215B. *Current Microbiology*, 39 (1): 43-48.
- Bolotin, A., Wincker, P., Mauger, S., Jaillon, O., Malmarme, K., Weissenbach, J., Ehrlich, S. D. & Sorokin, A. (2001). The complete genome sequence of the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IL1403. *Genome Res*, 11 (5): 731-53.
- Booth, M. C., Bogie, C. P., Sahl, H. G., Siezen, R. J., Hatter, K. L. & Gilmore, M. S. (1996). Structural analysis and proteolytic activation of *Enterococcus faecalis* cytolysin, a novel lantibiotic. *Molecular Microbiology*, 21 (6): 1175-1184.
- Borrero, J., Brede, D. A., Skaugen, M., Diep, D. B., Herranz, C., Nes, I. F., Cintas, L. M. & Hernandez, P. E. (2011). Characterization of Garvicin ML, a Novel Circular Bacteriocin Produced by *Lactococcus garvieae* DCC43, Isolated from Mallard Ducks (*Anas platyrhynchos*). *Applied and Environmental Microbiology*, 77 (1): 369-373.
- Brennan, N. M., Cogan, T. M., Loessner, M. & Scherer, S. (2004). Bacterial Surface-ripened Cheese. I: Fox, P. F., McSweeney, P. L. H., Cogan, T. M. & Guinee, T. P. (red.) b. 2 *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*: Elsevier Academic Press.
- Cogan, T. M. & Jordan, K. N. (1994). Metabolism of *Leuconostoc* Bacteria. *Journal of Dairy Science*, 77 (9): 2704-2717.
- Comission Regulation (EC) No 2073. (2005). *Comission Regulation (EC) No 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs.*
- Danisco. (2007). *Choozit Ripening & Mould Cultures*. Danisco (red.). United Kingdom.
- Davidson, A. L. & Chen, J. (2004). ATP-binding cassette transporters in bacteria. *Annu Rev Biochem*, 73: 241-68.
- Davidson, A. L., Dassa, E., Orelle, C. & Chen, J. (2008). Structure, function, and evolution of bacterial ATP-binding cassette systems. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 72 (2): 317-364.
- Dower, W. J., Miller, J. F. & Ragsdale, C. W. (1988). High efficiency transformation of E. coli by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res*, 16 (13): 6127-45.
- Finnzyme. (2011a). *DyNAzyme™ II DNA Polymerase*. I: Scientific, T. (red.). Thermo Scientific. Finland: Thermo Scientific. Tilgjengelig fra: [http://www.finnzymes.fi/pcr/dynazyme2\\_dna\\_polymerase.html](http://www.finnzymes.fi/pcr/dynazyme2_dna_polymerase.html) (lest 23. august).
- Finnzyme. (2011b). *Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase*. I: Scientific, T. (red.). Thermo Scientific. Finland: Thermo Scientific. Tilgjengelig fra:

- [http://www.finnzymes.com/pcr/phusion\\_high\\_fidelity\\_dna\\_polymerase.html](http://www.finnzymes.com/pcr/phusion_high_fidelity_dna_polymerase.html) (lest 1. september).
- Gabrielsen, C., Brede, D. A., Hernandez, P. E., Nes, I. F. & Diep, D. B. (2012). The maltose ABC transporter in *Lactococcus lactis* facilitates high level sensitivity to the circular bacteriocin garvicin ML. *Antimicrob Agents Chemother.*
- Galvez, A., Abriouel, H., Lopez, R. L. & Ben Omar, N. (2007). Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *International Journal of Food Microbiology*, 120 (1-2): 51-70.
- Garneau, S., Martin, N. I. & Vederas, J. C. (2002). Two-peptide bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *Biochimie*, 84 (5-6): 577-592.
- Giraffa, G. (1995). Enterococcal bacteriocins - their potential as anti-listeria factors in dairy technology. *Food Microbiology*, 12 (4): 291-299.
- Gottschalk, G. (1988). Bacterial Fermentation. I: *Bacterial Metabolism*. Berlin: Springer Verlag.
- Gripou, J. C. (1997). Glavour and texture in soft cheese. I: Law, B. A. (red.) *Microbiology and Biochemistry of Cheese and Fermented Milks*, s. 193-206. Berksbire, UK: Blackie Academic & Professional.
- Handwerker, S., Horowitz, H., Coburn, K., Kolokathis, A. & Wormser, G. P. (1990). Infection due to *Leuconostoc* species: six cases and review. *Reviews of infectious diseases*, 12 (4): 602-610.
- Hollenstein, K., Dawson, R. J. P. & Locher, K. P. (2007). Structure and mechanism of ABC transporter proteins. *Current Opinion in Structural Biology*, 17 (4): 412-418.
- Holo, H. & Nes, I. F. (1989). High-Frequency Transformation, by Electroporation, of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* Grown with Glycine in Osmotocally Stabilized Media. *Applied and Environmental Microbiology*, 55 (12): 3119-3123.
- Holo, H., Jeknic, Z., Daeschel, M., Stevanovic, S. & Nes, I. F. (2001). Plantaricin W from *Lactobacillus plantarum* belongs to a new family of two-peptide lantibiotics. *Microbiology-Uk*, 147: 643-651.
- Horton, R. M. (1995). PCR-Mediated Recombination and Mutagenesis. *Molecular biochemistry*, 3. Invitrogen™. (2006). *Blunt® TOPO® PCR Cloning Kit*. technologies™, L. (red.). Paisley, UK: Invitrogen™.
- Ito, Y., Kawai, Y., Arakawa, K., Honme, Y., Sasaki, T. & Saito, T. (2009). Conjugative plasmid from *Lactobacillus gasserii* LA39 that carries genes for production of and immunity to the circular bacteriocin gassericin A. *Appl Environ Microbiol*, 75 (19): 6340-51.
- Jack, R. W., Tagg, J. R. & Ray, B. (1995). Bacteriocins of Gram positive bacteria. *Microbiological Reviews*, 59 (2): 171-200.
- Kandler, O. (1983). Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek Journal of Microbiology*, 49 (3): 209-224.
- Ke, S. H. & Madison, E. L. (1997). Rapid and efficient site-directed mutagenesis by single-tube 'megaprimer' PCR method. *Nucleic Acids Res*, 25 (16): 3371-2.
- Kemperman, R., Jonker, M., Nauta, A., Kuipers, O. P. & Kok, J. (2003). Functional analysis of the gene cluster involved in production of the bacteriocin circularin A by *Clostridium beijerinckii* ATCC 25752. *Appl Environ Microbiol*, 69 (10): 5839-48.
- Klaenhammer, T. R. (1988). Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie*, 70 (3): 337-349.
- Klaenhammer, T. R., Barrangou, R., Buck, B. L., Azcarate-Peril, M. A. & Altermann, E. (2005). Genomic features of lactic acid bacteria effecting bioprocessing and health. *Fems Microbiology Reviews*, 29 (3): 393-409.
- Kleppen, H. P., Nes, I. & Holo, H. (2012). Submitted manuscript
- Kobori, M. & Nojima, H. (1993). A simple treatment of DNA in a ligation mixture prior to electroporation improves transformation frequency. *Nucleic Acids Research*, 21 (11): 2782-2782.
- Liu, W. & Hansen, J. N. (1990). Some chemical and physical properties of nisin, a small-protein antibiotic produced by *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 56 (8): 2551-2558.
- Martin-Visscher, L. A., van Belkum, M. J., Garneau-Tsodikova, S., Whittall, R. M., Zheng, J., McMullen, L. M. & Vederas, J. C. (2008). Isolation and characterization of carnocyclin A, a novel circular

- bacteriocin produced by *Carnobacterium maltaromaticum* UAL307. *Applied and Environmental Microbiology*, 74 (15): 4756-4763.
- Martin-Visscher, L. A., Yoganathan, S., Sit, C. S., Lohans, C. T. & Vederas, J. C. (2011). The activity of bacteriocins from *Carnobacterium maltaromaticum* UAL307 against Gram-negative bacteria in combination with EDTA treatment. *Fems Microbiology Letters*, 317 (2): 152-159.
- Martinez-Bueno, M., Valdivia, E., Galvez, A., Coyette, J. & Maqueda, M. (1998). Analysis of the gene cluster involved in production and immunity of the peptide antibiotic AS-48 in *Enterococcus faecalis*. *Mol Microbiol*, 27 (2): 347-58.
- Moore, D. D. (1999). Preparation and analysis of DNA. I: Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A. & Struhl, K. (red.) b. 1 *Current Protocols in Molecular Biology*. Massachusetts, USA: Wiley Interscience.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. & Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 51 Pt 1: 263-73.
- Navaratna, M., Sahl, H. G. & Tagg, J. R. (1998). Two-component anti-*Staphylococcus aureus* lantibiotic activity produced by *Staphylococcus aureus* C55. *Applied and Environmental Microbiology*, 64 (12): 4803-4808.
- Nes, I. F., Diep, D. B., Havarstein, L. S., Brurberg, M. B., Eijsink, V. & Holo, H. (1996). Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology*, 70 (2-4): 113-128.
- New England Biolabs Inc. (2011a). *Products: DNA Modifying Enzymes and Cloning, Ligases, T4 DNA Ligase*. Tilgjengelig fra: <http://www.neb.com/nebecomm/products/productM0202.asp> (lest 22. august 2011).
- New England Biolabs Inc. (2011b). *Products: Restriction Endonucleases*. Tilgjengelig fra: <http://www.neb.com/nebecomm/products/category1.asp#2> (lest 18. august 2011).
- Ochman, H., Gerber, A. S. & Hartl, D. L. (1988). Genetic Applications of an Inverse Polymerase Chain Reaction. *Genetics*, 120 (3): 621-623.
- Oxoid Ltd. (2011). *Dehydrated Culture Media, VIOLET RED BILE GLUCOSE (VRBG) AGAR (ISO)*. Tilgjengelig fra: [http://www.oxoid.com/UK/blue/prod\\_detail/prod\\_detail.asp?pr=CM1082+&c=UK&lang=EN](http://www.oxoid.com/UK/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=CM1082+&c=UK&lang=EN) (lest 24. januar 2012).
- Pastorino, J., Hansen, C. L. & McMahon, D. J. (2003). Effect of sodium citrate on structure-function relationships of Cheddar cheese. *J Dairy Sci*, 86 (10): 3113-21.
- Peix, A., Ramírez-Bahena, M.-H. & Velázquez, E. (2009). Historical evolution and current status of the taxonomy of genus *Pseudomonas*. *Infection, Genetics and Evolution*, 9 (6): 1132-1147.
- Piard, J. C. & Desmazeaud, M. (1991). Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria.1. Oxygen metabolites and catabolism end-products. *Lait*, 71 (5): 525-541.
- Purco, M., Nelson, W. O. & Wood, W. A. (1951a). The associative action between certain yeasts and *Bacterium linens*. *Journal of Dairy Science*, 34: 699-705.
- Ratray, F. P. & Fox, P. F. (1999). Aspects of enzymology and biochemical properties of *Brevibacterium linens* relevant to cheese ripening: A review. *Journal of Dairy Science*, 82 (5): 891-909.
- Ronaghi, M., Uhlen, M. & Nyren, P. (1998). A sequencing method based on real-time pyrophosphate. *Science*, 281 (5375): 363-+.
- Ross, R. P., Galvin, M., McAuliffe, O., Morgan, S. M., Ryan, M. P., Twomey, D. P., Meaney, W. J. & Hill, C. (1999). Developing applications for lactococcal bacteriocins. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 76 (1-4): 337-46.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74 (12): 5463-5467.
- Sarkar, G. & Sommer, S. S. (1990). The "megaprimer" method of site-directed mutagenesis. *Biotechniques*, 8 (4): 404-7.

- Sawa, N., Zendo, T., Kiyofuji, J., Fujita, K., Himeno, K., Nakayama, J. & Sonomoto, K. (2009). Identification and Characterization of Lactocyclin Q, a Novel Cyclic Bacteriocin Produced by Lactococcus sp Strain QU 12. *Applied and Environmental Microbiology*, 75 (6): 1552-1558.
- Stiles, M. E. (1994). Bacteriocins Produced by *Leuconostoc* Species. *Journal of Dairy Science*, 77 (9): 2718-2724.
- Susiluoto, T., Korkeala, H. & Björkroth, K. J. (2003). *Leuconostoc gasicomitatum* is the dominating lactic acid bacterium in retail modified-atmosphere-packaged marinated broiler meat strips on sell-by-day. *International Journal of Food Microbiology*, 80 (1): 89-97.
- Thunell, R. K. (1995). Taxonomy of the *Leuconostocs*. *Journal of Dairy Science*, 78 (11): 2514-2522.
- Trieuquot, P., Carlier, C., Poyartsalmeron, C. & Courvalin, P. (1990). A pair of mobilizable shuttle vectors conferring resistance to spectinomycin for molecular cloning in *Escherichia coli* and in Gram-positive bacteria. *Nucleic Acids Research*, 18 (14): 4296-4296.
- Tung, W. L. & Chow, K. C. (1995). Efficient Electroporation of *E.coli*. I: Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A. & Struhl, K. (red.) b. 1 *Current Protocols in Molecular Biology*. Massachusetts, USA: Wiley Interscience.
- Tyagi, R., Lai, R. & Duggleby, R. G. (2004). A new approach to 'megaprimer' polymerase chain reaction mutagenesis without an intermediate gel purification step. *BMC Biotechnol*, 4: 2.
- Valdés-Stauber, N., Scherer, S. & Seiler, H. (1997). Identification of yeasts and coryneform bacteria from the surface microflora of brick cheeses. *International Journal of Food Microbiology*, 34 (2): 115-129.
- van Belkum, M., Martin-Visscher, L. & Vederas, J. (2010). Cloning and Characterization of the Gene Cluster Involved in the Production of the Circular Bacteriocin Carnocyclin A. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 2 (4): 218-225.
- van Belkum, M. J., Martin-Visscher, L. S. & Vederas, J. C. (2011). Structure and genetics of circular bacteriocins. *Trends in Microbiology*, 19 (8): 411-418.
- Vandeguchte, M., Vandervossen, J., Kok, J. & Venema, G. (1989). Construction of a Lactococcal Expressopn Vector: Expression of Hen Egg White Lysozyme in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 55 (1): 224-228.
- Vedamuthu, E. R. (1994). The Dairy *Leuconostoc*: Use in Dairy Products. *Journal of Dairy Science*, 77 (9): 2725-2737.
- Vihavainen, E. J. & Björkroth, K. J. (2009). Diversity of *Leuconostoc gasicomitatum* associated with meat spoilage. *International Journal of Food Microbiology*, 136 (1): 32-36.
- Watson, Y. (2007). *Escherichia coli*. I: Granum, P. E. (red.) *Matforgiftning*. Norge: Høyskoleforlaget.
- Wilson, G. G. (1991). Organization of restriction-modification systems. *Nucleic Acids Research*, 19 (10): 2539-2566.
- Yang, J., Cao, Y., Cai, Y. & Terada, F. (2010). Natural populations of lactic acid bacteria isolated from vegetable residues and silage fermentation. *Journal of Dairy Science*, 93 (7): 3136-3145.
- Zhou, X. G., Ren, L. F., Li, Y. T., Zhang, M., Yu, Y. D. & Yu, J. (2010). The next-generation sequencing technology: A technology review and future perspective. *Science China-Life Sciences*, 53 (1): 44-57.