



UiT Norges arktiske universitet

Norges fiskerihøgskole, Fakultet for biovitenskap, fiskeri og økonomi

Bioaktive forbindelser i brunalger

Emilie Kristensen og Frida Helen Broback

Masteroppgave i Akvamedisin (60 stp)

Mai 2020



Forord

Denne masteroppgaven i akvamedisin ble utført på Norges fiskerihøgskole (NFH) ved fakultet for biovitenskap, fiskeri og økonomi (BFE), Universitetet i Tromsø, høst 2019 og vår 2020. Hovedveileder har vært professor Tor Haug, med førsteamanuensis Karl-Erik Eilertsen og stipendiat Christoffer Sivertsen som biveiledere.

Vi ønsker å rette en stor takk til vår hovedveileder Tor Haug, for dine gode tilbakemeldinger og oppmuntrende ord i den harde tiden som har vært. Takk til våre biveiledere Karl-Erik Eilertsen, for din innsikt og lærdom, og Christoffer Sivertsen for din hjelpsomhet og tålmodighet underveis. Takk til Hege Devold, Guro Kristine Edvinsen og Ida-Johanne Jensen for deres hjelp på laboratoriet. Vi ønsker også å takke Stein Mortensen (Havforskningsinstituttet) for tillatelse til å bruke dine illustrasjoner, og Robert Johansen (Marbank) for anskaffelse av det biologiske materialet brukt i dette studiet.

En stor takk rettes også til våre nærmeste. Takk til våre foreldre Edmund og Marianne, og Tor og Sissel - for støtte, gode ord og omsorg gjennom hele studietiden. Vi vil også takke Sindre for at du ha huset oss, holdt ut med oss og holdt oss ved godt mot gjennom masterskrivingen i denne rare tiden. Jeg, Emilie, vil i tillegg takke deg for at du gir meg troen på meg selv og alltid er der for meg.

En stor takk til alle på akvamedisin som har gjort studietiden vår til et evig minne (dere vet hvem dere er), og til våre etterfølgere; husk at badstua er best etter 03.00. En ekstra takk til våre støttespillere Lovise og Synnøve for evig optimisme og stadige klapp på skulderen. Vi vil i tillegg takke hverandre for et godt samarbeid med mye latter, gråt og hyggelige stunder. Sist, men ikke minst, vil vi til ære for vår hovedveileder, Tor Haug, si; «walk on»!

Tromsø, mai 2020

Emilie Kristensen og Frida Helen Broback

Sammendrag

Hensikten med marin bioprospektering er å identifisere interessante bioaktive forbindelser som kan ha potensial for kommersiell utnyttelse og videreutvikles til blant annet legemidler. De fleste av disse bioaktive forbindelsene har man til nå funnet i organismer som lever på land, men når man nå leter etter nye stoffer er det enorme biologiske mangfoldet i havet en veldig interessant plass å fortsette jakten. Over 70% av jordas overflate er dekket av hav og det marine miljøet utgjør den rikeste kilden til biologisk liv. Det er i dag et behov for å identifisere nye bioaktive forbindelser for å supplere eller erstatte allerede eksisterende antioksidanter og antibiotika på markedet. Det er stor økende interesse for marin bioprospektering i flere ulike felt nettopp på grunn av dette.

10 vanlig forekommende arter brunalger, ble i dette studiet undersøkt for innhold av antibakterielle og antioksidative forbindelser, samt deres fenolinnhold og tilstedeværelse av florotanniner. Algene ble ekstrahert med 2 ulike ekstraksjonsmetoder, 60% acetonitril + 0,1% maursyre og kokende Milli-Q vann. Videre ble ekstraktene separert og renset for salter med SPE, og retardert materiale ble eluert med 80% ACN. SPE-eluatene ble testet for antioksidativ aktivitet ved hjelp av ORAC og FRAP analysemetoder, og videre testet for antibakteriell aktivitet mot både terrestriske og marine (inkl. fiskepatogene) bakteriestammer. I tillegg ble det totale fenolinnholdet i SPE-eluatene estimert ved hjelp av Folin-Ciocalteus metode. Eluatene ble til slutt analysert med LC-MS for å påvise tilstedeværelse av florotanniner.

Undersøkelsene i dette studiet har vist at det er tilstedeværelse av bioaktive forbindelser i brunalgene studert. Bioaktivitet ble detektert i eluater fra begge ekstraksjonsmetodene. Hos noen av artene ble det detektert høy antioksidativ og antibakteriell aktivitet, i tillegg til høyt fenolinnhold, noe som samsvarte med LC-MS analysen hvor det ble påvist tilstedeværelse av florotanniner. Av alle brunalgene studert viste *Fucus vesiculosus* (blæretang) høyest antioksidativ og antibakteriell aktivitet, høyest fenolinnhold og flest detekterte florotanniner.

Summary

The purpose of marine bioprospecting is to identify bioactive compounds that may have potential for commercial use, and further development into pharmaceuticals. Most of these bioactive compounds have so far been found in terrestrial organisms, but when looking for new substances, the enormous biodiversity in the ocean is very interesting for further research. The ocean covers over 70% of the planet's surface and the marine environment is the richest source of biological life. There is a need to identify new bioactive compounds to supplement or replace already existing antioxidants and antibiotics. Because of this, there is a growing interest in marine bioprospecting in a wide range of applications.

In this master thesis, 10 common species of brown algae were tested for antibacterial and antioxidative compounds, as well as their total phenolic content and presence of phlorotannins. The algae were extracted using two different methods, 60% acetonitrile + 0,1% formic acid and boiling Milli-Q water, and further separated and purified with SPE, where retarded material was eluted with 80% ACN. The SPE-eluates were tested for antioxidative activity using ORAC and FRAP assay, and further tested for antibacterial activity against both terrestrial and marine (including fish pathogens) bacterial strains. In addition, the total phenolic content of the SPE-eluates was estimated using the Folin-Ciocalteu's method. Finally, the eluates were analyzed with LC-MS to detect the presence of phlorotannins.

The results in this study have shown that there is a presence of bioactive compounds in brown algae. Bioactivity was detected in eluates from both extraction methods. In some of the species, high antioxidative and antibacterial activity, as well as high phenol content, was detected, which was consistent with the LC-MC analysis where phlorotannins were detected. *Fucus vesiculosus* (bladder wrack) showed the highest antioxidative and antibacterial activity, highest phenolic content and most phlorotannins detected, of all the species studied.

Innholdsfortegnelse

Forord	1
Sammendrag	2
Summary	3
Forkortelser	7
1 Innledning	8
1.1 Naturstoffer	8
1.2 Marin bioprospektering	8
1.3 Antioksidanter	10
1.4 Antibiotika	10
1.5 Brunalger	11
1.5.1 Brunalger som ressurs	12
1.5.2 Bioaktive forbindelser i brunalger	13
1.6 Hensikt med studiet	17
1.7 Presentasjon av materiale og metodikk	18
1.7.1 Arter	18
1.7.2 Bakterier	23
1.7.3 Ekstraksjonsmetoder	24
1.7.4 Antioksidativ testing	25
1.7.5 Antibakteriell testing	26
1.7.6 Karakterisering av ekstrakter	27
2 Metode	28
2.1 Metodeforløp	28
2.2 Biologisk materiale og prøveopparbeidelse	29
2.2.1 Ekstraksjon	30
2.2.2 Fast-fase ekstraksjon (Solid Phase Extraction, SPE)	30
2.2.3 Preparering av stockløsning	31
2.3 Antioksidative målinger	31
2.3.1 Preparering av prøver	31
2.3.2 Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC)-assay	31

2.3.3	Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP)-assay	32
2.4	Antibakteriell testing	33
2.4.1	Dyrking av bakterier.....	33
2.4.2	Preparering av prøver	34
2.4.3	Bestemmelse av minimal inhiberende konsentrasjon (MIC)	34
2.5	Bestemmelse av fenolinnhold.....	35
2.5.1	Preparering av prøver	35
2.5.2	Testoppsett	35
2.6	Liquid Chromatography Mass Spectrometry (LC-MS).....	36
3	Resultater.....	37
3.1	Utbytte etter ekstraksjoner.....	37
3.2	Antioksidativ aktivitet	38
3.3	Antibakteriell aktivitet.....	41
3.4	Fenolinnhold.....	44
3.5	LC-MS	45
4	Diskusjon.....	53
4.1	Ekstraksjonsmetoder.....	53
4.2	Antioksidativ aktivitet i SPE-eluate	54
4.3	Antibakteriell aktivitet i SPE-eluate.....	56
4.4	Fenolinnhold i SPE-eluate.....	57
4.5	Separasjon og påvisning av florotanniner	58
5	Konklusjon	61
6	Referanser.....	62
7	Appendix	69
7.1	Appendix 1	69
7.1.1	Kjemikalier.....	69
7.2	Appendix 2	70
7.2.1	Mueller-Hinton agar	70
7.3	Appendix 3	71
7.3.1	Mueller-Hinton dyrkningsmedium.....	71
7.4	Appendix 4	71
7.4.1	Lauryl agar	71

7.5	Appendix 5	72
7.5.1	Lauryl dyrkningsmedium	72
7.6	Appendix 6	72
7.6.1	Bakterieløsninger etter OD ₆₀₀	72
7.7	Appendix 7	73
7.7.1	Standardkurver	73
7.8	Appendix 8	74
7.8.1	Antioksidativ aktivitet (ORAC og FRAP)	74
7.9	Appendix 9	75
7.9.1	TIC	75

Forkortelser

ACN	Acetonitril
AM	60% acetonitril + 0,1% maursyre
AUC	Area Under the Curve (areal under kurve)
BPC	Base Peak Chromatogram
ES	Elementsammensetning
FRAP	Ferric Reducing Antioxidant Power
GA	Gallic Acid (gallussyre)
GAE	Gallic Acid Equivalents (gallussyre-ekvivalenter)
HAT	Hydrogen Atom Transfer (hydrogenatomoverføring)
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (høytrykks-væskekromatografi)
KV	Kokende Milli-Q vann
LC-MS	Liquid Chromatography Mass Spectrometry (væskekromatografi-massespektrometri)
MIC	Minimum Inhibitory Concentration (minste inhiberende konsentrasjon)
MS	Mass Spectrometry (massespektrometri)
OD	Optical Density (optisk tetthet)
ORAC	Oxygen Radical Absorbance Capacity
PG	Phloroglucinol (floroglukinol)
RP-HPLC	Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography (revers fase høytrykks-væskekromatografi)
Rt	Retensjonstid
SET	Single Electron Transfer
SPE	Solid Phase Extraction (fast-fase ekstraksjon)
SPs	Sulphated Polysaccharides (sulfaterte polysakkarider)
TE	Trolox Equivalents (Trolox ekvivalenter)
TIC	Total Ion Chromatogram (total ionekromatogram)
TPC	Total Phenolic Content (totalt fenolinnhold)

1 Innledning

1.1 Naturstoffer

Mennesker har benyttet seg av naturstoffer for å behandle sykdommer helt siden tiden f.Kr. Stoffer som produseres naturlig av planter, mikroorganismer og dyr kalles for naturstoffer. Disse produseres av celler, og kan ha både positiv og negativ effekt på andre organismer (Dias, et al., 2012). Naturstoffer blir ofte referert til som sekundære metabolitter. Sekundære metabolitter og deres funksjoner er enda ikke fullstendig kartlagt, og disse metabolittene er heller ikke nødvendig for overlevelsen til organismen. I motsetning til primære metabolitter som utfører metabolske roller som er essensielle og tydelige (Croteau, et al., 2000). Likevel anses naturstoffer som den mest vellykkede kilden til potensielle legemidler. Grunnen til at naturstoffer ikke brukes mer i legemiddelindustrien kommer av at de er vanskelige å jobbe med, det er vanskeligheter med forsyning og tilgang av metabolittene, og de kan være kjemisk ustabile og lite løselige (Harvey, 2008).

Å utnytte biologiske stoffer fra planter og dyr er noe mennesker alltid har gjort. Disse biologiske stoffene har blitt brukt til flere ulike formål, blant annet som medisiner. De fleste av disse stoffene har man funnet i organismer som lever på land, men når man nå leter etter nye stoffer er det enorme biologiske mangfoldet i havet en veldig interessant plass å fortsette jakten. Det er stor biodiversitet i havet og her finnes det organismer med helt unike biologiske prosesser på grunn av de kontrastfulle miljøene som havet tilbyr. I havet er det organismer som lever i temperaturer under frysepunktet og andre som lever i miljøer med temperaturer over kokepunktet, det finnes arter som klarer seg både med og uten oksygen, med ekstremt mye lys eller helt uten lys og med lav eller høy salinitet. Disse organismene kan inneholde forbindelser som kan være til nytte for oss (Gabrielsen, 2013).

1.2 Marin bioprospektering

Marin bioprospektering er en type forskning som innebærer systematisk leting etter nye molekyler og bestanddeler, bioaktive forbindelser og gener som koder for disse, i marine organismer som for eksempel bakterier, sopp eller større organismer som makroalger, invertebrater og fisk. Begrepet «bioaktiv» er en forkortelse av begrepet «biologisk aktiv». At en forbindelse har biologisk aktivitet vil si at den har evnen til å reagere med komponenter i

levende vev for å skape eller hemme biologiske reaksjoner. Hvor sterke disse reaksjonene er, og om de er positive eller negative, avhenger av forbindelsene, deres biotilgjengelighet og dosen.

Den marine bioprospekteringen har hittil hovedsakelig fokusert seg på organismer som lever i tropiske farvann, og ikke så mye i hav som Barentshavet og Norskehavet. I disse havene er det et veldig bredt artsmangfold som lever under ulike mengder lys, saliniteter og lave temperaturer, noe som gjør at man kan forvente et mangfold av bioaktive forbindelser som har helt unike sammensetninger, strukturer og egenskaper.

Over 70% av jordas overflate er dekket av hav og det marine miljøet utgjør den rikeste kilden til biologisk liv. Sjansene for å finne ulike bioaktive forbindelser er gode, siden de marine organismene man utnytter kan stamme fra ulike nisjer, som for eksempel vannmassene i havet, havbunnen, oljereservoarene under havbunnen, kysten og fjorden. I tillegg tyder en del studier på at produkter fra marine organismer er mer potente sammenlignet med tilvarende produkter fra organismer på land.

Hensikten med marin bioprospektering er å identifisere bioaktive forbindelser som kan ha potensial for kommersiell utnyttelse og videreutvikles til blant annet legemidler, ingredienser i mat og kosmetikk, eller industrielle produkter, enzymer og finkjemikalier. Forbedringer i teknologien gjør at man i dag er i stand til å oppdage, isolere og identifisere veldig små mengder av det stoffet man leter etter, slik at man nå også kan se med nye øyne på organismer som allerede er studert. For å kunne videreutvikle og ta i bruk forbindelsene fra marin bioprospektering til disse ulike næringsområdene kreves det grundig analyse og bearbeiding av innsamlet materiale. Det er stor økende interesse for marin bioprospektering og bioaktive forbindelser i flere ulike felt, blant annet farmakologi, plantevitenskap, kosmetikk, matindustrien, agrokjemikalier, geomedisin og nanobiovitenskap (Capon, 2001; Regjeringen, 2009; Gabrielsen, 2013; Guaadaoui, et al., 2014). I dette bioprospekterings-studiet vil vi søke etter to typer bioaktive forbindelser; naturlige antioksidanter og antibakterielle stoffer (antibiotika) – i brunalger.

1.3 Antioksidanter

Antioksidanter er stoffer som hemmer oksidasjon. Oksidasjonsprosessen er en kjedereaksjon, hovedsakelig mellom fett og oksygenrike forbindelser. Under kroppens energiforbrenning er et typisk biprodukt frie radikaler. Et fritt radikal inneholder uparede elektroner og er svært reaktivt. Siden man assosierer elektroner vanligvis i par vil det frie radikalet angripe fett (fettsyren), motta et hydrogen og en oksidasjon oppstår. Antioksidanter vil hindre denne oksidasjon ved selv å bli oksidert (Ditlefsen & Svihus, 2019). Vi mennesker produserer en rekke antioksidanter selv, som bilirubin, urinsyre, glutatjon og flere enzymer. Andre antioksidanter får vi gjennom maten vi spiser og disse antioksidantkildene er hovedsakelig frukt, bær og grønnsaker. Eksempler på antioksidanter fra nevnte kilder er vitamin C, vitamin E og selen (Ditlefsen & Svihus, 2019). Antioksidanter blir blant annet brukt til å forlenge holdbarheten på fettholdige produkter og for å kunne redusere skadelige oksidasjonsprosesser i kroppen.

Det er en verdensomspennende interesse for å finne nye og trygge antioksidanter fra naturlige kilder, som plantemateriale, for å forhindre oksidativ forringelse av mat og for å minimere oksidativ skade på levende celler. Bruken av syntetiske antioksidanter har blitt redusert fordi man mistenker at de kan promotere karsinogenese, samt at konsumenter er blitt mer skeptiske til syntetiske tilsetningsstoffer (Shalaby, 2011).

1.4 Antibiotika

Antibiotika er et fellesnavn for medikamenter som brukes til å behandle infeksjoner forårsaket hovedsakelig av bakterier. Antibiotika er kjemiske substanser produsert naturlig av ulike organismer, og som motvirker veksten av bakterier. Det første antibiotikumet (penicillin) ble oppdaget i 1928 av Alexander Fleming. Oppdagelsen av antibiotika er blant de medisinske oppdagelsene som i størst grad har bidratt til å øke levealderen og bedre folkehelsen. Det finnes i dag et stort antall ulike typer antibiotika som alle virker på en av to måter; et baktericid antibiotikum dreper bakterien ved for eksempel å forstyrre dannelsen av bakteriens cellevegg eller prosesser i bakteriecellen, mens et bakteriostatisk antibiotikum hemmer veksten til bakterien ved for eksempel å stoppe den fra å formere seg (Henriksen, et al., 2019).

De fleste bakterier har en cellevegg utenfor cellemembranen og disse bakteriene kan farges med spesielle fargestoffer og deles inn i to grupper etter hvor mye av fargen celleveggen tar opp. Dette kalles Gram-farging og bakteriene deles inn i Gram-positive og Gram-negative bakterier (Cockayne, 1998). Antibiotika kan også deles videre inn i to grupper; smalspektrede og bredspektrede antibiotika. Et smalspektret antibiotikum virker bare mot noen få typer bakterier, for eksempel særlig de Gram-positive, eller særlig anaerobe stammer. Et bredspektret antibiotikum derimot, virker mot et vidt spekter av bakterier, for eksempel både Gram-positive og Gram-negative bakterier (Henriksen, et al., 2019).

I dag er man veldig bekymret over at antibiotika-forbruket i verden er så stort, fordi det fører til at flere og flere bakterier blir resistente mot antibiotika. Når antibiotika brukes feil, eller forbruket blir for stort er det høy risiko for at bakterier utvikler egenskaper (muterer) som gjør at de ikke skades eller hemmes av antibiotika, altså blir resistente. Noen bakterier kan bli multiresistente, noe som betyr at bakterien blir motstandsdyktig mot mange eller alle typer antibiotika man har i bruk i dag. Resistente og multiresistente bakterier er en stor trussel for folkehelsen og det har vært en stor økning av infeksjoner med antibiotikaresistente bakterier de seneste årene (Henriksen, et al., 2019). I dag er flere av de originale antibiotikumene og flere av deres etterfølgere ofte ineffektive. Hvis man ikke finner eller utvikler nye typer antibiotika, for eksempel fra havet, er man redd for at antibiotikumenes gullalder snart vil ende (Clardy, et al., 2009).

1.5 Brunalger

Brunalger (*Phaeophyceae*) er en separat fylogenetisk klasse av flercellede alger. Det er en meget polymorf gruppe som består av alt fra mikroskopiske, forgreinede celletråder til meterlange tareplanter. Klassen av brunalger inneholder omtrent 265 slekter og 2040 arter, hvor rundt 95% av disse artene er marine organismer som er mest utbredt i kalde til tempererte farvann. Flere faktorer som art, årstid, alder, geografisk beliggenhet og miljøforhold påvirker algenes fytokjemiske profil og innhold (Mekinic, et al., 2019). Brunalger vokser langs hele norskekysten hvor de ulike artene befinner seg i bestemte vertikale soner. Øverst i fjæra vokser blant annet sauetang (*Pelvetia canaliculata*), og nedenfor sauetangen vokser spiraltang (*Fucus spiralis*), blæretang (*Fucus vesiculosus*),

grisetang (*Ascophyllum nodosum*) og sagtang (*Fucus serratus*). Tareartene butare (*Alaria esculenta*) og fingertare (*Laminaria digitata*) opptrer fra lavvannsnivå, og på beskyttede steder finner man sukkertare (*Saccharina latissima*) (Rueness, 2015). Båetang (*Fucus distichus*) vokser på bølgeutsatte steder (White, 2007), og fra en meters dyp og nedover i sjøen vokser vanlig kjerringhår (*Desmarestia aculeata*) (Stamp, 2015).

1.5.1 Brunalger som ressurs

Brunalger var en gang en viktig kilde til gjødsel og jod. Brunalgene har en evne til å akkumulere veldig mye jod fra det marine miljø, noe som gjorde at algene ble brukt som en jodkilde. Kystbefolkninger utnyttet tang og tare som gjødsel også fordi de inneholder både vitaminer og proteiner, samt kalium, fosfor, nitrogen og magnesium. I tillegg inneholder brunalger viktige mikronæringsstoffer som bor, kobolt, mangan og molybden. Dette gjør at brunalger også i stor grad har blitt brukt som fôrtilsetning i dyreoppdrett. Algene ble malt opp til mel og brukt som nødfôr og tilleggsfôr særlig i Nord-Norge, og på Island og Færøyene. Tangmelet kunne også bli blandet med vanlig mel og dermed bli brukt i vanlig bakst for mennesker (Skard, 2003). Disse makro- og mikronæringsstoffene inngår i biogeokjemiske sykluser i algene. De fungerer blant annet som kofaktorer, koenzymmer, nødvendige bestanddeler i proteiner, nukleinsyrer, fosfolipider, og som del av energimetabolismen (Skaugen, 2009).

I dag blir brunalger brukt til mange ulike formål, for eksempel i helsekost, som kosttilskudd, søtningsmiddel og fortykningsmiddel/bindemiddel. Som søtningsmiddel brukes sukkerarten mannitol som finnes i brunalger som stortare (*Laminaria hyperborea*) og sukkertare. Ved tørking av slike alger dannes et hvitaktig belegg av mannitol på overflaten. Slikt søtningsmiddel brukes av for eksempel diabetikere og i slankekost (Skard, 2003). Brunalger er en viktig kilde til alginat, som er et polysakkarid som brukes som binde- og tykningsmiddel. Det har den evnen at det kan fortykke, stabilisere og danne gele. Alginat brukes i kosmetikk, som for eksempel ulike kremer og tannkrem, og det brukes i maling og lim. Alginat blir også brukt i medisiner for å kapsle inn virkestoffer i tabletter (Gomez-Zavaglia, et al., 2019). Noen arter av brunalger brukes fortsatt som gjødsel og flere arter kan spises, enten som alternativ til grønnsaker eller i forbindelse med tilberedelse av sushi.

1.5.2 Bioaktive forbindelser i brunalger

Brunalger er rik på flere bioaktive forbindelser, blant annet ulike lipider, polysakkarider og fenoler. I tillegg til disse inneholder brunalger andre forbindelser som steroler, flerumettede fettsyrer, og løselige fibre (Eom, et al., 2012).

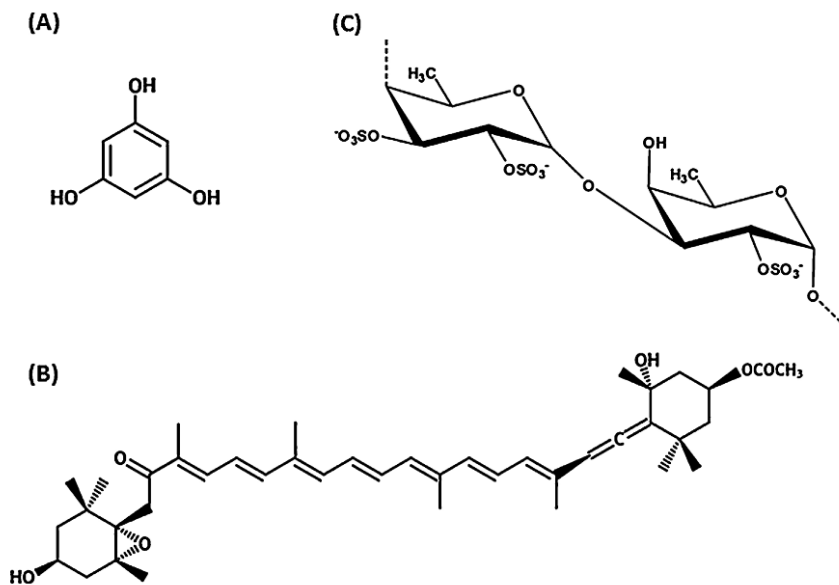
1.5.2.1 Lipider

Lipider er upolare stoffer som hovedsakelig består av karbon og hydrogen. Lipidinnholdet i brunalger er ikke spesielt høyt, men likevel inneholder de noen lipider som er biologisk aktive, som fukoxanthin, omega-3 EPA, SDA og omega-6 ARA. Lipider kan hovedsakelig deles inn i to grupper: egentlige fettstoffer (triglyserider) og fettlignende stoffer (lipoider), der de viktigste gruppene er fosfolipider, glykolipider, steroider og karotenoider (Ahmed & Ahmed, 2016).

Karotenoider er forbindelser med en spesifikk lineær C40 ryggrad som er bygd opp av 8 isopren-molekyler med konjugerte dobbeltbindinger. Karotenoider er vanligvis delt inn i to klasser: karotenoider (inneholder bare hydrogen- og karbonatomer) og xantofyller (har mist ett oksygenatom i tillegg). Fukoxanthin (figur 1) tilhører xantofyll-klassen, og finnes i brunalger hvor de har beskyttende og fotosyntetiserende funksjon (Pádua, et al., 2015). Flere studier har vist at fukoxanthin har sterk antioksidativ aktivitet (Li, et al., 2011; Pádua, et al., 2015).

1.5.2.2 Polysakkarider

Polysakkarider er polymerer av monosakkarider som er bundet sammen med glykosidbindinger. Man finner store mengder polysakkarider i celleveggen hos brunalger hvor deres funksjon er å gjøre celleveggen sterk og fleksibel. Ulike polysakkarider har blitt funnet i brunalger, deriblant alginat (alginsyre) (Wijesinghe & Jeon, 2011), fucoianer og laminariner. Fucoianer (figur 1) er tilstede i alle brunalger som er blitt studert, men hovedsakelig i *Fucales* og *Laminariales* (Pádua, et al., 2015). Fucoianer er vannløselige sulfaterte polysakkarider (SPs), og marine alger er den rikeste kilden til ikke-animalske SPs i naturen (Ngo & Kim, 2013). SPs, inkludert fucoian, fra flere arter av brunalger har betydelig antioksidativ evne. I studier har det vist seg at SPs fra brunalger er mer potente NO (nitrogenoksid)-fjernere enn kommersielle antioksidanter. Fucoianer fra *F. vesiculosus* har betydelig FRAP og hyperoksid-fjernings egenskaper (Ngo & Kim, 2013).



Figur 1. Kjemisk struktur av (A) floroglukinol, (B) fukoxanthin og (C) fucoidan. Hentet fra: (Pádua, et al., 2015).

1.5.2.3 Fenoler

Fenoler er en veldig heterogen gruppe organiske forbindelser som blant annet finnes i planter. De inneholder en aromatisk ring (benzenring: C₆) med en eller flere hydroksylgrupper (OH-grupper), og opptrer som svake syrer og danner ofte salter (fenolater). Flerverdige fenoler danner isomerer ved at hydroksylgruppene inntar ulike stillinger rundt benzenringen i molekylet. Fenoler kan brukes som utgangsstoff i produksjonen av farmasøytiske preparater, plaststoffer og fargestoffer (Aldred, et al., 2009; Uggerud, 2013).

Blant fenolene regnes tanniner (garvestoffer) som er et «nettverk» av fenoler (polyfenoler), noe som betyr at det er mer enn en fenolgruppe per molekyl. Tanniner produseres av ulike planter og alger. De finnes i alle plantedeler og produseres for å beskytte den mot patogene mikrober og beitende organismer. Tanninene fungerer som antibeitestoff for å forhindre nedbryting og infeksjoner fra sopp og bakterier, men de begrenser også beiting fra insekter og dyr ved at tanninene gjør proteinene i planten mindre tilgjengelige (Aarnes, 2016).

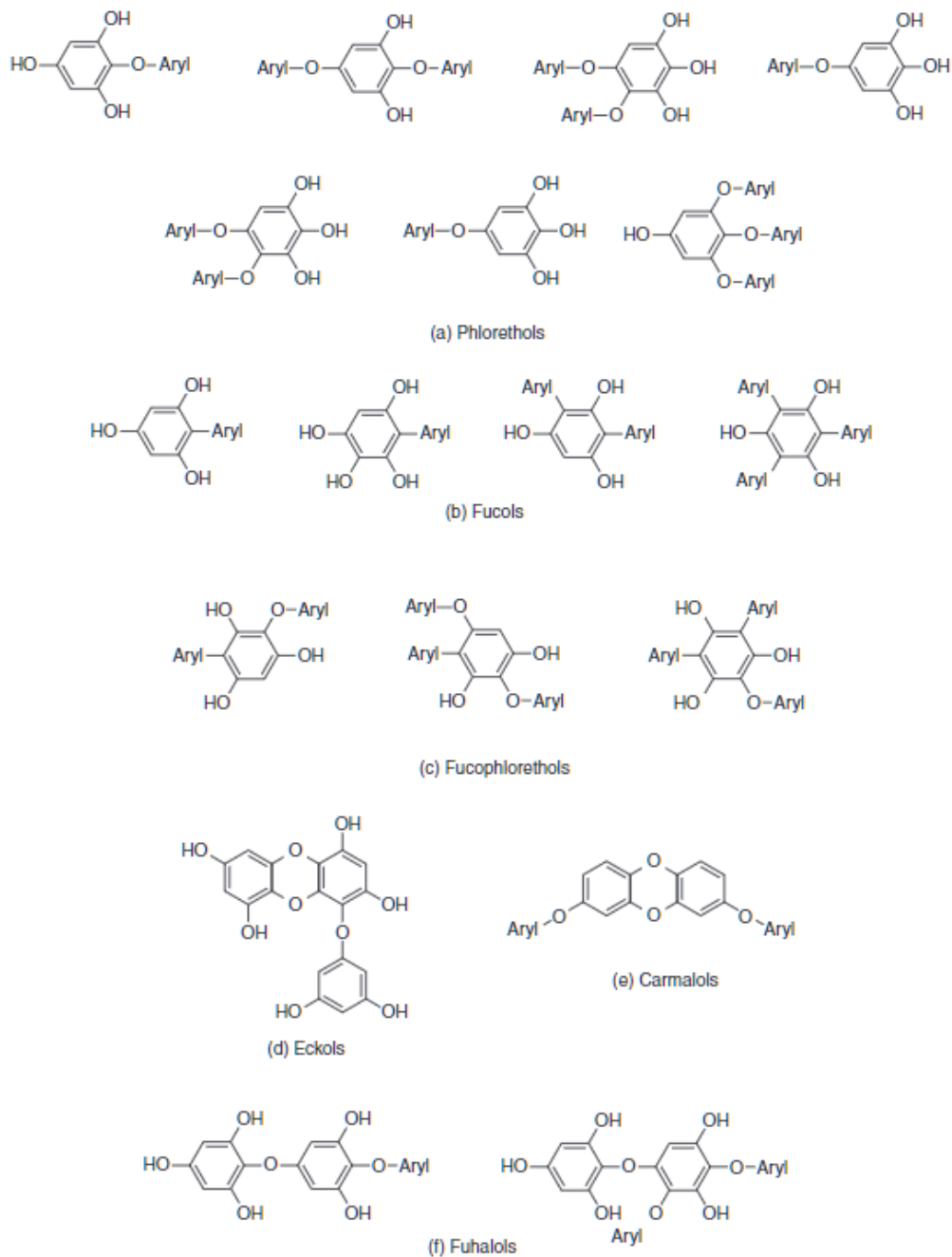
Florotanniner er en gruppe tanniner som finnes hovedsakelig i brunalger. De produseres som sekundære metabolitter og syntetiseres via acetat malonat veien. Molekylvekten av florotanniner varierer fra 126 Da (floroglukinol, 1,3,5-trihydroxybenzen) – 650 kDa, men de fleste florotanninene har en størrelse på 10 – 100 kDa. Florotanniner er satt sammen av

floroglukinolbaserte fenoler og lagres i spesielle vesikler i cellen (Gupta & Abu-Ghannam, 2011; Hermund, 2018). Floroglukinol (PG) (figur 1) er en fenol-forbindelse hvor den kjemiske strukturen inkluderer en aromatisk fenyling med tre hydroksylgrupper (Pádua, et al., 2015). Ved å øke antall PG vil den strukturelle diversiteten og kompleksiteten til florotanniner øke, siden floroglukinol-bindinger kan være lineære, forgreinet eller en kombinasjon av begge (Hermund, 2018). Basert på de strukturelle bindingene mellom PG-enheter, og antall og distribusjon av hydroksylgrupper, kan florotanniner deles inn i 4 underklasser: florotanniner med eterbindinger (floretoleer og fuhaloleer), med fenyl (aryl-aryl)-bindinger (fukoleer), med eter og fenylbindinger (fukofloretoleer) og med dibenzo [1,4] dioksinbindinger (eckoleer og karmaloleer) (Singh & Sidana, 2013; Mekinic, et al., 2019; Santos, et al., 2019). Aryl er en hydrokarbongruppe (et radikal) som dannes når et hydrogenatom fjernes fra et aromatisk hydrokarbon (Uggerud, 2018). De grunnleggende enhetene som er til stede i forskjellige typer florotanniner er vist i figur 2 (Singh & Sidana, 2013).

Florotanninene er essensielle for algens fysiologiske funksjon og beskytter algene mot uttørking, endringer i salinitet og temperatur. Florotanninene er også involvert i en rekke viktige sekundære roller, slik som kjemisk forsvar og beskyttelse mot oksidativ skade som oppstår i respons til endringer i næringstilgjengelighet og UV-ståling. De finnes i algene i fri form eller danner komplekser med forskjellige komponenter i celleveggene, som for eksempel alginat. Konsentrasjonen av florotanniner i brunalger er rapportert til å være veldig varierende blant ulike ordener og etter hvor de lever geografisk sett. Konsentrasjonen er høyere hos arter hentet fra Atlanterhavet og det tempererte Stillehavet, sammenlignet med arter fra det tropiske Stillehavet. Florotanniner har tiltrukket seg betydelig interesse for sine brede helsemessige fordeler og potensielle bruksområder innen terapeutisk behandling (Gupta & Abu-Ghannam, 2011; Christophersen, 2013; Li, et al., 2017).

Mange ulike studier har vist at floroglukinol og florotanniner fra brunalger har flere interessante biologiske effekter. Det har blitt rapportert at florotanniner hemmer HIV-1 (humant immunsviktivirus 1) gjennom blant annet å inhibere virusets enzymer og replikasjon. I tillegg er det rapportert at derivater av florotanniner og andre floroglukinolderivater hemmer veksten av flere humane kreftcellerlinjer, som for eksempel cellerlinjer som representerer livmorhalskreft, beinkreft, adenokarsinom og tykktarmskreft. Dannelsen av kreftceller i

menneskekroppen kan være direkte indusert av frie radikaler, og antioksidative forbindelser som florotanniner kan derfor også brukes indirekte for å redusere kreftdannelse i menneskekroppen (Li, et al., 2011; Gupta & Abu-Ghannam, 2011; Ngo & Kim, 2013).



Figur 2. De grunnleggende enhetene som er tilstede i ulike typer florotanniner: (a) Floretoler (phloretols), (b) fukoler (fucols), (c) fukofloretoler (fucophloretols), (d) eckoler (eckols), (e) karmaloler (carmalols) og (f) fuhaloler (fufalols). Hentet fra: (Singh & Sidana, 2013).

Floroglukinol har vist seg å ha høy antikoagulerende aktivitet. Det vanligste antikoagulerende legemidlet er heparin, men heparin kan ha bivirkninger og man er derfor på jakt etter andre alternative antikoagulerende midler (Ngo & Kim, 2013). Florotanniner har også hemmende effekt på allergiske reaksjoner, ved å redusere utslipp av histamin. Ved utslipp av histamin vil akuttreaksjoner som utslett, kløe og mageplager, utløses. Florotanniner rapporteres i tillegg å ha hemmende effekt på flere kroniske lidelser og betennelser som diabetes, katarakt, nevropati, retinopati, høyt blodtrykk, leddgikt, osteoporose, peridontale sykdommer, og metastase, gjennom å hemme ulike enzymer i kroppen. Florotanniner har også vist seg å være sterke inhibitorer av hyaluronidase, som er assosiert med allergiske reaksjoner, metastase og betennelser. Faktisk kan det se ut som om florotanniner har sterkere inhiberende effekt enn velkjente kommersielle inhibitorer (Li, et al., 2011).

Florotanniner har i flere studier vist seg å ha sterk antioksidativ aktivitet (Li, et al., 2011). Florotanniner har også vist seg å ha antibakteriell effekt mot matbårne patogene bakterier, blant annet har de redusert veksten av *Campylobacter jejuni*, *Vibrio parahaemolyticus* og *Staphylococcus aureus*. I tillegg har de vist god effekt mot antibiotikaresistente bakterier, og soppen *Trichophyton rubrum* som kan gi soppinfeksjon i huden, håret og neglene hos mennesker. Ett studie har også vist at florotanniner fra *A. nodosum* har mye høyere aktivitet mot *Escherichia coli* enn terrestriske florotanniner. Florotanniner kan derfor fungere som potensielle antioksidanter og antibakterielle midler, som kan være nyttig i matindustrien og legemiddelindustrien. (Gupta & Abu-Ghannam, 2011; Li, et al., 2011; Eom, et al., 2012; Pádua, et al., 2015).

1.6 Hensikt med studiet

Hovedmål for denne oppgaven var å undersøke tilstedeværelse av bioaktive (antioksidative og antibakterielle) komponenter i 10 ulike arter av brunalger. Oppgaven hadde følgende delmål:

1. Undersøke effektiviteten av to ulike ekstraksjonsmetoder.
2. Undersøke ekstraktens antioksidative aktivitet med bruk av to ulike metoder.
3. Undersøke ekstraktens antibakterielle aktivitet, både mot terrestriske og marine bakteriestammer.

4. Undersøke sammenheng mellom målte bioaktiviteter og fenolinnhold.
5. Undersøke ekstraktens innhold av florotanniner ved bruk av LC-MS teknologi.

1.7 Presentasjon av materiale og metodikk

1.7.1 Arter

Tabell 1. Oversikt over hvilke brunalger som ble brukt i dette forsøket og deres slektskap.

Norsk navn	Latinsk navn	Class	Order	Family
Butare	<i>Alaria esculenta</i>	Phaeophyceae	Laminariales	Alariaceae
Fingertare	<i>Laminaria digitata</i>	Phaeophyceae	Laminariales	Laminariales
Sukkertare	<i>Saccharina latissima</i>	Phaeophyceae	Laminariales	Laminariales
Grisetang	<i>Ascophyllum nodosum</i>	Phaeophyceae	Fucales	Fucaceae
Båetang	<i>Fucus distichus</i>	Phaeophyceae	Fucales	Fucaceae
Sagtang	<i>Fucus serratus</i>	Phaeophyceae	Fucales	Fucaceae
Kaurtang/spiraltang	<i>Fucus spiralis</i>	Phaeophyceae	Fucales	Fucaceae
Blæretang	<i>Fucus vesiculosus</i>	Phaeophyceae	Fucales	Fucaceae
Sauetang	<i>Pelvetia canaliculata</i>	Phaeophyceae	Fucales	Fucaceae
Vanlig kjerringhår	<i>Desmarestia aculeata</i>	Phaeophyceae	Desmarestiales	Desmarestiaceae

Alaria esculenta (butare)

Butaren vokser på bølgeutsatte steder (åpen kyst), gjerne i tidevannssonen. Den har en rotlignende base nederst og stilken fortsetter oppover gjennom det bølgete bladet, slik at den kan røre seg frem og tilbake i bølgene. Den kan bli flere meter lang. Butaren finnes i Nord-Atlanteren fra Novaya Zemlya til Island, rundt kysten av Storbritannia og rundt Japan i Stillehavet. Arten forekommer også rundt kysten av Grønland og så langt sør som Bretagne (Tyler-Walters, 2008).



Figur 3. Butare (Dabberlocks). Illustrasjon: Stein Mortensen.

Laminaria digitata (fingertare)

Fingertare kan vokse i fjæra, langs kysten og ned til 15-20 meters dybde (vekstområde varierer ut fra hvilket geografisk område den befinner seg i). Den har glatte blader med en stilk som er bøyelig. Fingertaren finnes rundt kysten av Europa i Nord-Atlanteren. Fra Novaya Zemlya i nord til Kanariøyene i sør (Hill, 2008).



Figur 4. Fingertare (Oarweed). Illustrasjon: Stein Mortensen.

Saccharina latissima (sukkertare)

Sukkertaren vokser i rolige områder, som ikke er så utsatt for sjø eller bølger. Nettopp fordi den vokser på lite utsatte steder trenger den ikke en sterk stilk for å tåle strømmene som ville vært på et mer utsatt område. Sukkertaren er en lang og stor tare med ruffede sider og en kort stilk med støtte. Sukkertaren finnes rundt de Nordatlantiske kystene i Europa, fra Novaya Zemlya i nord til Portugal i sør og rundt Island. Arten finnes også på den østlige kysten av Amerika og Japan (White & Marshall, 2007).



Figur 5. Sukkertare (Sugar kelp). Illustrasjon: Stein Mortensen.

Ascophyllum nodosum (grisetang)

Grisetang vokser oftest i strandsonen, gjerne hvor den ikke blir særlig utsatt for sterke strømmer og bølger. Den kan bli opptil 2 meter lang og har såkalte blærer, som vokser enkeltvis med jevne mellomrom. Grisetang er begrenset til Nord-Atlanteren. De sørligste funnene er gjort nord i Portugal og i New Jersey (Hill & White, 2008).



Figur 6. Grisetang (Knotted wrack) Illustrasjon: Stein Mortensen.

Fucus distichus (båetang)

Båetang vokser kun på utsatte steder. Den er relativt liten i vekst og blir ikke mer enn 10-30 cm. Arten har ingen blærer, men små perler på grenene sine. Båetang finnes rundt kysten i Norge, Nord-Skottland, Island og Nord-Amerika (White, 2007).



Figur 7. Båetang (Two headed wrack). Foto: Jennifer Steen Booher.

Fucus serratus (sagtang)

Sagtangen vokser gjerne litt utenfor strandsonen. Den vokser ofte i høye tettheter, kan bli opptil 60 cm lang og er veldig gjenkjennelig med sine tagger på ytterkanten av grenene. Sagtang finnes rundt kysten nord i Portugal og på den atlantiske kysten utenfor Frankrike. Den vokser også utenfor de britiske øyer, opp til Skandinavia og til Novaya Zemlya (Jackson, 2008).



Figur 8. Sagtang (Serrated wrack). Illustrasjon: Stein Mortensen.

Fucus spiralis (kaurtang/spiraltang)

Spiraltangen vokser i fjæra og dermed tåler den et høyt tørkenivå. Den kan bli opptil 40 cm lang og har stalker med blærer på endene. Spiraltang finnes rundt kysten av de Skandinaviske landene, Storbritannia, Spania, Frankrike og Nederland. Den vokser sør til Marokko og finnes også rundt kysten av New Jersey (White, 2008).



Figur 9. Spiraltang (Spiralled wrack). Illustrasjon: Stein Mortensen.

Fucus vesiculosus (blæretang)

Blæretangen vokser på mindre utsatte steder i høye tettheter. Den varierer i størrelse, men det er kjent at den kan bli opptil 2 meter om den vokser i skjermede områder. Grenene er ofte delt i to og har blærer som gjerne er i par. Blæretang finnes rundt kysten i de Skandinaviske landene, Storbritannia og utenfor New Jersey. Den forekommer også utenfor kysten til Svalbard og i Nord-Atlanteren (White, 2008).



Figur 10. Blæretang (Badder wrack). Illustrasjon: Stein Mortensen.

Pelvetia canaliculata (sauetang)

Sauetangen vokser vanligvis i fjæra og har en høy toleranse for uttørking. Den kan overleve opptil 8 dager uten vann. Den blir opptil 15 cm lang og har greiner uten midtribbe med «puter» i endene. Sauetang finnes rundt kysten av Norge, Island, Storbritannia, og den atlantiske kysten av Frankrike, Spania og Portugal (White, 2008).



Figur 11. Sauetang (Chanelled wrack). Illustrasjon: Stein Mortensen.

Desmarestia aculeata (vanlig kjerringhår)

Vanlig kjerringhår vokser fra 1 meters dyp og nedover i sjøen. Den kan bli opptil 2 meter lang og har harde greiner med tornaktige ender. Vanlig kjerringhår er svært utbredt i Nord-Atlanteren fra Svalbard til Portugal (Stamp, 2015).



Figur 12. Vanlig kjerringhår (Landlady's wig). Illustrasjoner: Stein Mortensen.

1.7.2 Bakterier

E. coli er en Gram-negativ stavformet bakterie. Den kan leve både aerobt og anaerobt, og er bevegelig. Bakterien finnes i tarmen hos mennesker og andre varmblodige dyr, og er en viktig del av normalfloraen. *E. coli* gir vanligvis ikke sykdom, men det finnes ulike varianter av bakterien og noen av disse produserer toksiner (giftstoffer). Disse variantene kan forårsake hjernehinnebetennelse, urinveisinfeksjon og kraftig diaré. Man kan bli smittet via forurenset drikkevann, og mat som ikke er varmebehandlet. Noen stammer av *E. coli* er resistent mot antibiotika, noe som kan gjøre det vanskelig å behandle slike infeksjoner. Bakterien brukes også i legemiddelindustrien siden den kan manipuleres og lett tar opp andre gener. Blant annet brukes den i produksjonen av insulin (Kaper, et al., 2004; Sirevåg, 2020).

Pseudomonas aeruginosa er en Gram-negativ stavbakterie som finnes i tarmen hos mennesker. Den vokser i jord, myrer og kysthabitater, samt på planter og i dyrevev. Bakterien har flageller som gjør den bevegelig, og den kan danne biofilm på våte overflater som stein og jord. *P. aeruginosa* forårsaker ofte opportunistiske infeksjoner og er en viktig årsak til alvorlige infeksjoner ved blant annet cystisk fibrose, brannskade og andre sår. I tillegg er noen stammer av bakterien svært motstandsdyktig mot antibiotika og desinfeksjonsmidler (Stover, et al., 2000; Tønjum, et al., 2020).

Bacillus subtilis er en Gram-positiv sporedannende stavbakterie. Den er en vanlig jordbakterie som på grunn av sporedannelsen er veldig motstandsdyktig mot både tørke, varme, lys og desinfeksjonsmidler. *B. subtilis* lever ofte på og rundt planter som spises av dyr og man finner den derfor ofte i mage-tarm systemet og avføringen til dyr. I tillegg til å være sporedannende, danner bakterien også biofilm (Earl, et al., 2008; Tønjum, 2020).

Corynebacterium glutamicum er en Gram-positiv bakterie som er formet som en kort stav. Bakterien skiller ut store mengder L-glutaminsyre, og industrielt brukes den derfor for produksjon av aminosyre (Kalinowski, et al., 2003). *C. glutamicum* er en terrestrisk bakterie som har en optimal veksttemperatur mellom 25 og 37 °C (Liebl, 2005).

Carnobacterium spp. er Gram-positive stavformede melkesyrebakterier. Bakteriene lever i både kalde og tempererte terrestriske og akvatiske miljøer, og vokser best når pH er mellom 7 og 9. *C. divergens*, *C. funditum*, *C. gallinarum*, *C. mobile* og *C. piscicola* er alle funnet i levende fisk, mens *C. piscicola* også er funnet i syk fisk. Sistnevnte kan føre til septikemi og

kroniske infeksjoner i fisk. *Carnobacterium spp.* er mest kjent for å leve på ulike matvarer som kjøtt og sjømat, og forringe kvaliteten (Leisner, et al., 2007; Lorenzo, et al., 2018).

Aeromonas salmonicida subsp. salmonicida er en Gram-negativ stavbakterie som er fakultativ anaerob. Bakterien forårsaker sykdommen furunkulose hos fisk og opptrer både i saltvann og ferskvann. *A. salmonicida subsp. salmonicida* gir sår og byller i fiskens hud og muskulatur, men den mest trolige dødsårsaken ser ut til å være hjerteskaade. Bakterien gir oftest sykdomsutbrudd når vanntemperaturen er over 10 °C, men har optimal vekst ved ca. 17 °C (Fyfe, et al., 1986; Ebanks, et al., 2006; Reith, et al., 2008; Veterinærinstituttet, u.d.). *A. salmonicida subsp. achromogenes* er en Gram-negativ stavbakterie som er fakultativ anaerob. Bakterien forårsaker sykdommen atypisk furunkulose hos veldig mange fiskearter og opptrer både i saltvann og ferskvann. *A. salmonicida subsp. achromogenes* gir også sår og byller i hud og muskulatur hos fisken (Fyfe, et al., 1986; Magnadottir & Gudmundsdottir, 1992; Reith, et al., 2008; Mainous, et al., 2011).

Yersinia ruckeri er en Gram-negativ stavbakterie som er fakultativ anaerob (Kumar, et al., 2015). Bakterien forårsaker sykdommen yersiniose hos fisk, men stort sett bare hos atlantisk laks (*Salmo salar*) i Norge. *Y. ruckeri* fører til klassisk septikemi (blodforgiftning) og kan gi stor dødelighet hvis bakterien får fotfeste i et anlegg. Bakterien forekommer overalt hvor oppdrett drives, både i saltvann og ferskvann, og opptrer ved vanntemperaturer mellom 7 og 28 °C (Mendez, et al., 2018; Veterinærinstituttet, u.d.).

1.7.3 Ekstraksjonsmetoder

1.7.3.1 Ekstraksjon fra biologisk materiale

Det finnes flere ulike metoder for å ekstrahere kjemiske komponenter fra biologisk materiale. En metode er ekstraksjon ved hjelp av en blanding av polare og upolare løsemidler, såkalt væske-væske ekstraksjon. En annen metode er ekstraksjon ved hjelp av oppvarmet vann («te»-varianten), hvor det oppvarmede vannet løser opp/trekker ut komponenter og stoffer.

På forhånd av ekstraksjonsprosessen blir prøvematerialet frysetørket og knust til et fint pulver. Dette gjøres for å øke overflatearealet til materialet slik at ekstraksjonsløsningen vil trenge inn i materialet og ekstraksjonsprosessen blir mer effektiv.

Ved å sette blandingen på omrøring vil hastigheten og utbyttet av ekstraksjonsprosessen øke. Når det oppstår en likevekt mellom stoffene i materialet og løsemidlet vil ekstraksjonen

stoppe. Prosessen kan gjentas flere ganger for å forsikre seg om at mest mulig av de kjemiske komponentene er ekstrahert ut av det biologiske materialet (Seidel, 2012).

1.7.3.2 Fast-fase ekstraksjon (SPE)

Fast-fase ekstraksjon er en kromatografi-lignende metode som kan brukes til å ekstrahere forbindelser. Teknikken brukes for å separere/isolere utvalgte komponenter, vanligvis fra en mobil fase. Dette gjøres ved at den mobile fasen kjøres gjennom en kolonne som inneholder en stasjonær (fast) fase, der ønskede komponenter fester seg (retarderes) til kolonnematerialet, og uønskede stoffer vaskes ut. De retarderte komponentene utvinnes ved eluering, ved bruk av egnet elueringsvæske. Målet med fast-fase ekstraksjon er å oppnå en høy konsentrasjon av ønskede forbindelser og fjerne stoffer som ikke er ønskelige (Poole, 2003). Metoden blir ofte brukt i marin bioprospektering for blant annet å fjerne salter fra marine prøver for dermed å unngå falske positive resultater under bioaktivitetstesting. Metoden kan også fjerne svært upolare stoffer, som ikke lar seg eluere fra kolonnene (Tadesse, et al., 2008).

1.7.4 Antioksidativ testing

Ulike metoder blir brukt for å måle den totale antioksidative aktiviteten til en forbindelse. Hovedsakelig kan antioksidative analyser deles inn i to kategorier: Analyser som er basert på hydrogenoverføring (HAT, hydrogen atom transfer) og analyser som er basert på elektronoverføring (SET, single electron transfer) (Dasgupta & Klein, 2014).

1.7.4.1 ORAC

Oxygen Radical Absorbance Capacity assay (ORAC) er en metode som måler den antioksidative aktiviteten til rene forbindelser, ekstrakter eller biologiske væsker (Bentayeb, et al., 2014). ORAC-analysen er nyttig for å undersøke effektiviteten av kjedebrytende antioksidanter (kjedebrytende: antioksidanten blir forbrukt og må erstattes eller regenereres). Kjedebrytende antioksidanter anses som de viktigste antioksidantene som finnes i matvarer. I ORAC-analysen blir AAPH (2,2'-Azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride) brukt til å produsere peroksyldradikaler. Peroksyldradikalene reagerer med den fluorescerende proben, fluorescein, slik at fluorescensen reduseres over tid. Den antioksidative aktiviteten til en biologisk forbindelse kan måles ved å undersøke forbindelsens evne til å forhindre tap av fluorescenssignal fra proben. Den biologiske forbindelsen hindrer tap av fluorescenssignal ved å nøytralisere peroksyldradikaler. Om reduksjonen av fluorescenssignal er minimalt er

prøven rik på antioksidantforbindelser. Fluorescenssignalet vil falle raskt hvis antioksidantinnholdet i prøven er lavt (Dasgupta & Klein, 2014).

Når reaksjonen er fullført kan arealet under den kinetiske kurven (AUC, area under the curve) bestemmes. Antioksidant aktiviteten, eller den antioksidative effekten, for en forbindelse kan estimeres ved å beregne AUC og trekke fra AUC for blank (AUC 0: med løsemiddel, men uten prøve). Det endelige resultatet blir vanligvis uttrykt relativt til en kjent mengde av antioksidanten Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid), som er en vannløselig analog til vitamin E. Trolox-ekvivalenter (TE) blir brukt som et mål på aktiviteten til ukjente antioksidantforbindelser (Cao, et al., 1993).

1.7.4.2 FRAP

Ferric Reducing Antioxidant Power assay (FRAP) er en annen metode som måler antioksidativ aktivitet. FRAP måler den antioksidative aktiviteten i løsninger/forbindelser ved at antioksidantene som er tilstede i prøvene fungerer som reduksjonsmiddel i en ikke-enzymatisk redoksreaksjon hvor treverdige jern (ferri, Fe^{3+}) reduseres til toverdige jern (ferro, Fe^{2+}). Denne ionereduksjonen (Fe^{3+} til Fe^{2+}) fører til at et fargeløst ferri-tripyridyltriazin (TPTZ)-kompleks omdannes til et blåfarget ferro-TPTZ-kompleks som leses kolorimetrisk ved 594 nm. Analysen er basert på overføring av elektroner i stedet for hydrogen. Elektronoverføringsanalyser, slik som FRAP, kan sammenlignes med redoksreaksjoner. Elektroner blir overført fra antioksidanten til frie radikaler, noe som resulterer i et redusert radikal og en oksidert antioksidant. Når radikalet fjerner elektroner fra antioksidanten forårsaker det fargeendringer av løsningen. Reaksjonen har nådd slutt punktet når fargeendringene stopper (Jensen, 2008).

Resultatet fra FRAP-analysen blir på samme måte som for ORAC-assay uttrykt med referanse til en kjent mengde av antioksidanten Trolox. Prinsippet til FRAP-analysen er basert på elektronoverføringsreaksjoner (SET). Dermed kan ikke FRAP påvise forbindelser som overfører hydrogenatomer, spesielt tioler og proteiner (Cerretani & Bendini, 2010).

1.7.5 Antibakteriell testing

1.7.5.1 MIC-assay

Minimum inhiberende konsentrasjon (MIC) er den laveste konsentrasjonen av et ekstrakt som vil hemme den synlige veksten av en mikroorganisme. Den optiske tettheten til løsninger med

bakteriestammer (eller andre mikroorganismer) leses av i spektrofotometer på OD₆₀₀. Basert på disse målingene lages nye bakterieløsninger etter tabell (Appendix 6) for å få en konsentrasjon av bakterier på 2.5-3 x 10⁴ celler per ml. MIC bestemmes ved å fremstille løsninger ved økende konsentrasjoner, sammen med separate mengder av dyrkede bakteriestammer i 96-brønners mikroplater (Andrews, 2001).

1.7.6 Karakterisering av ekstrakter

1.7.6.1 Fenolmålinger (Folin-Ciocalteu metode)

Folin-Ciocalteu metoden er den mest brukte prosedyren for å bestemme fenolinnhold (Total Phenolic Content, TPC) i for eksempel mat-ekstrakter. Metoden er en kolorimetrisk metode basert på elektronoverføringsreaksjoner mellom Folin-Ciocalteu reagenset og fenol-forbindelser. En ulempe med metoden er at Folin-Ciocalteu reagenset ikke bare måler fenol-forbindelser, det kan også reagere med andre reduserende stoffer, som for eksempel tioler, vitaminer og nitrogenholdige stoffer (Sánchez-Rangel, et al., 2013).

1.7.6.2 Liquid Chromatography Mass Spectrometry (LC-MS)

LC-MS er en analyse som kombinerer separasjonsmetoden høytrykks-væskekromatografi (HPLC) og analysemetoden massespektrometri (MS).

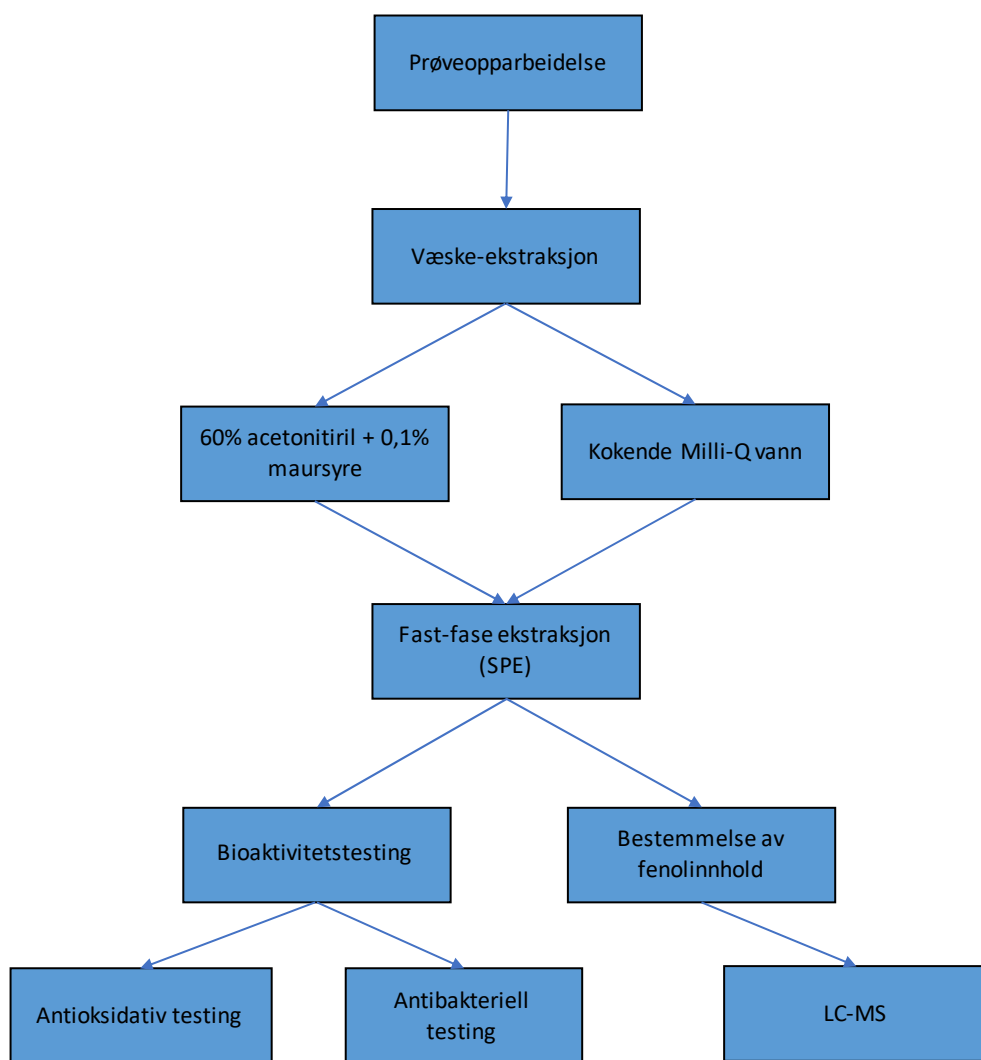
HPLC er en allsidig og rask teknikk som brukes for å separere, identifisere og kvantifisere stoffer. Forbindelser kan separeres etter polaritet, ladning og/eller størrelse. Ved såkalt Reversed-phase HPLC (RP-HPLC) har HPLC-kolonnen en stasjonær fase av upolar karakter og en mobil fase av polar karakter. På denne måten vil mer upolare forbindelser interagere med den stasjonære fasen og bli retardert, mens polare forbindelser vil vaskes ut med den mobile fasen. Jo mer upolar en forbindelse er, jo lengre retensjonstid vil den ha (Latif, 2006).

MS er en sensitiv teknikk som blant annet kan detektere massen/molekylvekten til ukjente komponenter i en prøve. Instrumentene som brukes skiller ioniserte atomer eller molekyler, og separerer disse etter m/z-verdier (m = molekylionets masse og z = molekylionets ladning). Prøven (som er i gass eller væskeform) injiseres inn i systemet og blir omgjort til gass. Gassen går via en ionekilde hvor molekylene vil miste eller få et elektron og dermed bli ionisert (Kaklamanos, et al., 2012).

2 Metode

2.1 Metodeforløp

Metodeforløpet for oppgaven er oppsummert i figur 13. Brunalgene ble frysetørket, pulverisert og ekstrahert med 60% acetonitril + 0,1% maursyre og kokende Milli-Q vann. Videre ble ekstraktene separert og renset for salter med fast-fase ekstraksjon (SPE). De ulike SPE-eluatene ble så testet for antioksidativ og antibakteriell aktivitet, og fenolinnhold. SPE-eluatene ble til sist analysert med LC-MS for, om mulig, å identifisere prøvene for innhold av florotanniner. Alle kjemikaliene som ble brukt i oppgaven er framstilt i Appendix 1.



Figur 13. Flyttdiagram med oversikt over metodeforløpet i oppgaven. Nærmere beskrivelse av metodene brukt er omtalt i de ulike metode-avsnittene.

2.2 Biologisk materiale og prøveopparbeidelse

Frosne prøver av 10 ulike brunalger (tabell 2), levert fra MarBank (Havforskningsintitutet, Tromsø), ble delt opp i passende biter og tørket i en VirTis Genesis 35 EL frysetørker (SP, scientific, USA) over natt.

Tabell 2. Brunalger brukt i dette studiet, samt informasjon om lokalitet og tidspunkt for sanking.

Nr.	Latinsk navn	Norsk navn	ID-kode	Lokalitet	Breddegrad	Lengdegrad	Sanket
1	<i>Alaria esculenta</i>	Butare	M09JAN0062-3	Bjørnøya	74°29'N	18°44'E	Mai 2009
2	<i>Laminaria digitata</i>	Fingertare	M09JAN0046-2	Eggakanten, Framstredet	77°25'N	10°38'E	Mai 2009
3	<i>Saccharina latissima</i>	Sukkertare	M09JAN0165-1	Kobbholmfjorden, Finnmark	69°47'N	30°43'E	Mai 2009
4	<i>Ascophyllum nodosum</i>	Grisetang	M09JAN0200-9	Porsangerfjorden, Finnmark	70°11'N	25°15'E	Mai 2009
5	<i>Fucus distichus</i>	Båetang	M11JOR0203	Hellebotn, Nordland	67°49'N	16°29'E	Mai 2011
6	<i>Fucus serratus</i>	Sagtang	M09JAN0004-1	Kobbholmfjorden, Finnmark	69°47'N	30°42'E	Mai 2009
7	<i>Fucus spiralis</i>	Spiraltang	M07026	Kastnes, Oldervik, Troms	69°74'N	19°69'E	September 2007
8	<i>Fucus vesiculosus</i>	Blæretang	M09JAN0200	Porsangerfjorden, Finnmark	70°11'N	25°15'E	Mai 2009
9	<i>Pelvetia canaliculata</i>	Sauetang	M09JAN0003-1	Kobbholmfjorden, Finnmark	69°47'N	30°42'E	Mai 2009
10	<i>Desmarestia aculeata</i>	Vanlig kjerringhår	M09JAN0165-4	Kobbholmfjorden, Finnmark	69°47'N	30°43'E	Mai 2009

2.2.1 Ekstraksjon

De frysetørkede prøvene ble knust i en IKA A11 Basic analytisk kvern (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), som ble vasket og desinfisert med 70% etanol mellom hver prøve. Det ble så veid ut ca. 10 g pulverisert materiale fra hver art som ble overført til separate 250 ml flasker med skrukork.

Til hver flaske ble det tilsatt 100 ml ekstraksjonsløsning. Det ble utført to ulike ekstraksjonsmetoder: Ekstraksjonsmetode A) bestod av 60% acetonitril + 0,1% maursyre, mens i ekstraksjonsmetode B) bestod ekstraksjonsløsningen av kokende Milli-Q vann. Prøvene ble så satt til ekstraksjon, på omrøring over natt på en KS 260 Basic (ICA®) ristemaskin.

Prøvene ble så tatt av omrøring for å la bunnfallet legge seg. Deretter ble væsken fra prøvene overført til separate 50 ml sentrifugerør (Falcon®), med maks 35 ml væske i hvert rør. Alle prøvene ble så sentrifugert i 10 min ved 2500 rpm (Multifuge 1S-R, Thermo Fisher Scientific), og supernatanten ble deretter overført til nye forhåndsveide 50 ml sentrifugerør. Prøvene ble så tørket i en Scanspeed 40 vacuumsentrifuge (Scanvac AS, Danmark) over natt.

Tørre prøver ble veid og tilsatt 1% maursyre-løsning til de fikk en konsentrasjon på 10 mg/ml, og deretter mikset godt. Etter at prøvene var løst opp ble de sentrifugert i 10 min ved 2500 rpm (Eppendorf Centrifuge 5417R).

2.2.2 Fast-fase ekstraksjon (Solid Phase Extraction, SPE)

De oppløste prøvene ble så ekstrahert ved hjelp av fast-fase ekstraksjon og bruk av Sep-Pak Vac 35cc (10 g) C18 SPE-kolonner (Walters, USA). Ekstraksjonen ble utført i avtrekksskap ved bruk av et Supelco VisiPrep vakuum-kabinett (SupelCo®).

SPE-kolonnene ble aktivert med 30 ml 80% acetonitril og ekvilibrert med 30 ml 1% maursyre. Deretter ble prøvene applisert på kolonnene. Væskehastigheten ble satt til ca. 1 dråpe i sekundet. Kolonnene ble så vasket med 30 ml 1% maursyre før retardert prøvemateriale ble eluert med 30 ml 80% acetonitril + 1% maursyre. Eluatene ble overført til 50 ml sentrifugerør og satt til vacuumsentrifugering (Scanspeed 40, Scanvac AS, Danmark) over natt. Deretter ble de tørkede prøvene veid, og utbyttet for de ulike prøvene etter de to ulike ekstraksjonsmetodene ble beregnet. Prøvematerialet ble så frosset ned (-20 °C) inntil videre analyser.

For lettere å holde styr på de ulike prøvene blir SPE-eluatene fra de to ulike ekstraksjonsmetodene heretter kalt AM-eluater (SPE-eluater av 60% acetonitril + 0,1% maursyre ekstrakter) og KV-eluater (SPE-eluater av kokende Milli-Q vann ekstrakter).

2.2.3 Preparering av stockløsning

Prøvene ble tilsatt Milli-Q vann til en konsentrasjon på 20 mg/ml og satt til risting (Vibrax VXR) over natt ved romtemperatur. Stockløsningen ble så fordelt i eppendorfrør (1 ml per rør) og frosset ned (-20 °C) inntil videre analyser. Opptinte prøver ble sentrifugert i 2 min ved 10 000 rpm (Eppendorf Centrifuge 5417R) før videre analyser.

2.3 Antioksidative målinger

Algeprøvene ble testet for antioksidativ aktivitet med bruk av to ulike testmetoder, ORAC og FRAP.

2.3.1 Preparering av prøver

Fra stock-løsningene ble det laget konsentrasjoner på 4 mg/ml (i totalt 1 ml volum) i eppendorfrør. Eppendorfrørene ble mikset godt på MS2 minishaker og frosset ned (-20 °C) inntil videre analyser.

2.3.2 Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC)-assay

Fra konsentrasjonen 4 mg/ml ble det laget 2-folds fortynninger av prøvene. Prøvene ble fortynnet i eppendorfrør og prosedyren ble utført til ønsket antall fortynninger var laget. Konsentrasjonene som ble laget varierte fra 250 µg/ml til 0,24 µg/ml, avhengig av den antioksidative aktiviteten i de ulike prøvene.

Trolox, 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid, en vannløselig analog til vitamin E, ble brukt som antioksidativ standard ved tillaging av standardkurve. Trolox-stockløsningen ble fortynnet i 75 mM fosfatbuffer (Na₂HPO₄, fortynnet med Milli-Q vann) og hadde en konsentrasjon på 1 mM. Trolox-stockløsningen ble videre fortynnet til følgende konsentrasjoner: 50, 25, 25.5, 6.25 og 3.13 µM. Ligninga som framkom i standardkurvene ble brukt til å beregne ORAC-verdier, µmol TE/gram ekstrakt (Appendix 7).

Deretter ble 25 µl fra standardfortynningene og de fortynnete prøvene (3 paralleller for standardfortynningene og hver prøve) pipettert til svarte 96-brønners plater (Nunc, svart, Thermo Scientific, MA, USA). Det ble også pipettert 125 µl 88 nM fluorescein (fortynnet med fosfatbuffer) til platene. Etter inkubering i 15 min ved 37 °C ble 50 µl 153 mM AAPH (2,2'-Azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride) (fortynnet med fosfatbuffer) pipettert til platene. Platene ble avlest kinestisk på SpectraMax® i3 (Molecular Devices, Sunnyvale, USA) ved bruk av en eksitasjonsbølgelengde på 485 nm og en emisjonsbølgelengde på 520 nm.

2.3.3 Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP)-assay

Fra konsentrasjonen 4 mg/ml ble det laget 2-folds fortynninger av prøvene. Prøvene ble fortynnet i eppendorfrør og prosedyren ble utført til ønsket antall fortynninger var laget. Konsentrasjonene som ble laget varierte fra 4 mg/ml til 0,0156 mg/ml, avhengig av den antioksidative aktiviteten i de ulike prøvene.

Trolox ble også her brukt som antioksidativ standard ved tillaging av standardkurve. Trolox-stockløsningen hadde en konsentrasjon på 100 mM, og ble videre fortynnet til følgende konsentrasjoner: 1000, 500, 250, 125, 62.5 og 31.25 µM. Ligninga som framkom i standardkurvene ble brukt til å beregne FRAP-verdier, µmol TE/gram ekstrakt (Appendix 7).

Det ble så laget FRAP-løsning bestående av; 5 ml 19 mM jernløsning (FeCl₃ fortynnet med Milli-Q vann), 5 ml 10 mM TPTZ-løsning (2,4,6-Tri(2-pyridyl)-2-triazin) (fortynnet med 40 mM HCl) og 50 ml acetatbuffer (Natriumacetat, C₂H₃NaO₂, fortynnet med eddiksyre og Milli-Q vann). FRAP-løsningen ble inkubert i ca. 30 min ved 37 °C.

Deretter ble 10 µl fra standardfortynningene og de fortynnete prøvene (3 paralleller for standardfortynningene og hver prøve) pipettert til 96-brønners plater (Nunc, Thermo Scientific, USA). Det ble også pipettert 30 µl Milli-Q vann og 300 µl FRAP-løsning til platene. Etter inkubering i 30 min ved 37 °C ble absorbansen avlest ved 593 nm på SpectraMax® i3 (Molecular Devices, Sunnyvale, USA).

2.4 Antibakteriell testing

De ulike ekstraktene ble testet for antibakteriell aktivitet mot totalt 12 ulike bakteriestammer, 4 ulike terrestriske laboratorie-stammer og 8 ulike marine bakteriestammer (tabell 3).

Tabell 3. Bakteriestammer som ble brukt for å teste den antibakterielle aktiviteten.

Bakteriestamme	Forkortelse	Kode	Gram-type	Opprinnelse
<i>Escherichia coli</i>	E. c	ATCC 25922	Negativ	Terrestrisk
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	P. a	ATCC 27853	Negativ	Terrestrisk
<i>Bacillus subtilis</i>	B. s	ATCC 9144	Positiv	Terrestrisk
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	C. gl	ATCC 13032	Positiv	Terrestrisk
<i>Carnobacterium funditum</i>	C. f	CCUG 34644*	Positiv	Marin
<i>Carnobacterium divergens</i>	C. d	*	Positiv	Marin
<i>Carnobacterium mobile</i>	C. m	*	Positiv	Marin
<i>Carnobacterium gallinarum</i>	C. ga	*	Positiv	Marin
<i>Carnobacterium piscicola</i>	C. p	*	Positiv	Marin
<i>Aeromonas salmonicida subsp. achromogenes</i>	As. a	NCIMB 1110	Negativ	Marin, Fiskepatogen
<i>Aeromonas salmonicida subsp. salmonicida</i>	As. s	LFI 4014	Negativ	Marin, Fiskepatogen
<i>Yersinia ruckeri</i>	Y. r	CCUG 14190	Negativ	Marin, Fiskepatogen

*Alle de marine, Gram-positive melkesyrebakteriene var en gave fra professor Einar Ringø, NFH, BFE, UiT.

2.4.1 Dyrking av bakterier

Mueller Hinton (MH) plater (Appendix 2) ble brukt for oppdyrking av de terrestriske bakteriestammene, mens Lauryl agar (LA) (Appendix 4) ble brukt for oppdyrking av de marine bakteriestammene. De terrestriske stammene ble platet ut og inkubert i romtemperatur, mens de marine stammene ble platet ut og inkubert i kjøleskap ved 12 °C. Av hver stamme ble det overført en koloni fra platene til separate reagensrør med 5 ml flytende dyrkingsmedium (Appendix 3 og 5): MH-medium for de terrestriske stammene og Lauryl Broth-medium (LB-medium) for de marine stammene. Dyrkingsmedium med de terrestriske

stammene ble satt til risting over natt i varmeskap ved 37 °C. For de marine stammene ble det laget 2 paralleller med dyrkingsmedium for å se hvilken temperatur som ga best vekst. Den ene parallellen ble satt til risting over natt i romtemperatur, mens den andre ble satt til risting ved 12 °C.

Et volum på 20 µl fra hver kultur ble så overført til nye reagensrør med samme dyrkingsmedium (5 ml), som igjen ble satt til risting i 2 timer. Optisk tetthet (OD₆₀₀) ble avlest på spektrofotometer (BioMate 3, Thermo Scientific, USA). Basert på OD₆₀₀-målingene ble 3-20 µl bakterieløsning overført til 10 ml dyrkingsmedium, dette for å få en konsentrasjon av bakterier på 2.5-3 x 10⁴ celler per ml.

2.4.2 Preparering av prøver

Fra stock-løsningene ble det laget konsentrasjoner på 4 mg/ml (i totalt 1 ml volum) i eppendorfrør. Eppendorfrørene ble mikset godt på MS2 minishaker og frosset ned (-20 °C) inntil videre analyse.

2.4.3 Bestemmelse av minimal inhiberende konsentrasjon (MIC)

Mikrotiterplater (96-brønner, Nunc, Thermo Scientific, USA) ble benyttet til MIC-testingen. For hver prøve ble det tilsatt 100 µl fortynnet stockløsning (4 mg/ml, 3 paralleller og totalt 4 prøver per plate) i øverste rekke av brønner. De resterende brønnene på platen ble tilsatt 50 µl Milli-Q vann, så ble det utført 2-folds fortynninger nedover (vertikalt) på platen. Dette ble gjort ved å overføre 50 µl fra øverste rekke over i andre rekke og blandet godt, nye 50 µl fra denne rekka overført til tredje rekke, osv. I den siste rekka ble 50 µl tatt ut og kastet. Konsentrasjonen på fortynningsrekken var dermed 4, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.13, 0.06, 0.03 mg/ml. Etter at fortynningsrekkene var ferdig preparert, ble 50 µl ferdigfortynnet bakterieløsning tilsatt i alle brønnene.

Det ble også laget kontrollplater (positiv kontroll) for hver stamme (3 paralleller) av bakterieløsningene. I første kolonne av platene ble det tilsatt 100 µl oxytetracyklin (80 µM). De resterende brønnene på platen ble tilsatt 50 µl Milli-Q vann, så ble det utført 2-folds fortynninger bortover (horisontalt) på platen. Dette ble gjort ved å overføre 50 µl fra første kolonne over i andre kolonne og blandet godt, nye 50 µl fra denne kolonnen overført til tredje kolonne, osv. I den nest siste kolonnen ble 50 µl tatt ut og kastet. Konsentrasjonene på

fortynningsrekken ble dermed 80, 40, 20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.6, 0.3, 0.16, 0.08 μM . Etter at fortynningsrekken var ferdig preparert, ble 50 μl ferdigfortynnet bakterieløsning tilsatt i brønnene. Den siste kolonnen ble dermed en vekstkontroll (negativ kontroll) bestående av 50 μl bakterieløsning og 50 μl Milli-Q vann.

Platene med terrestriske bakterieløsninger ble inkubert i 24 timer ved 37 °C. Platene med marine bakterieløsninger ble inkubert i 4 dager ved romtemperatur, foruten om platene med bakterieløsning av *A. salmonicida subsp. salmonicida* som ble inkubert ved 12 °C.

Bakterievekst og hemming ble registrert ved å lese av absorbans ved 600 nm. Platene med terrestriske bakterieløsninger ble lest av på plateleseren Synergy H1 (Thermo Fisher), mens platene med marine bakterieløsninger ble avlest på SpectraMax® i3 (Molecular Devices). MIC ble bestemt ved å sammenligne OD-verdiene i algeprøvene med verdiene for vekstkontrollene. Den laveste konsentrasjonen av testmaterialet som ikke viste økning i absorbans under inkubering ble bestemt til å være prøvematerialets MIC-verdi.

2.5 Bestemmelse av fenolinnhold

2.5.1 Preparering av prøver

Fra stock-løsningene ble det laget konsentrasjoner på 1 mg/ml (i totalt 1 ml volum) i nye eppendorfrør for hver prøve. Eppendorfrørene ble mikset godt på MS2 minishaker og frosset ned (-20 °C) inntil videre analyser.

2.5.2 Testoppsett

Folin-Ciocalteus metode ble utført for å bestemme fenolinnholdet i prøvene. Fra konsentrasjonen 1 mg/ml ble det laget 2-folds fortynninger av prøvene. Prøvene ble fortynnet i eppendorfrør og prosedyren ble utført til ønsket antall fortynninger var laget. Konsentrasjonene som ble laget varierte fra 1 mg/ml til 0,0625 mg/ml, avhengig av fenolinnhold i de ulike prøvene.

Gallussyre (eng: Gallic acid, GA) ble brukt som fenolstandard ved tillaging av standardkurve. GA-stockløsningen ble laget av 400 mg GA/l i 50% MeOH. GA-stockløsningen ble videre fortynnet i 50% MeOH til følgende konsentrasjoner: 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125 og 0

mg GA/l. Ligninga som framkom i standardkurvene ble brukt til å beregne fenolinnholdet (Appendix 7).

Deretter ble 0,5 ml av de fortynnede prøvene og standardfortynningene overført til hver sine 50 ml sentrifugerør (Falcon®). Til sentrifugerørene ble det også tilsatt 0,5 ml Folin-Ciocalteu reagens, 10 ml 20% natriumkarbonat og 14 ml Milli-Q vann, og rørene ble ristet godt.

Etter inkubering i 1 time ved romtemperatur ble 200 µl fra standardfortynningene og de fortynnede prøvene (fra sentrifugerørene) pipettert over til mikrotiterplater (96-brønner, Nunc, Thermo Scientific, USA). Absorbansen ble avlest ved 750 nm.

2.6 Liquid Chromatography Mass Spectrometry (LC-MS)

Fra stock-løsningene ble det laget konsentrasjoner på 500 µg/ml (totalt 500 µl) i nye eppendorfrør for hver prøve. Eppendorfrørene ble så mikset godt på MS2 minishaker, for så å bli sentrifugert i 2 min ved 10 000 rpm (Eppendorf Centrifuge 5417R). Deretter ble supernatanten overført til LC-MS rør og satt i kjøleskap (4 °C) inntil analyse.

LC-MS analyse ble utført for å identifisere florotanniner i prøvene, samt vurdere kompleksiteten i ekstraktene (f.eks TIC). Stipendiat Christoffer Sivertsen (NFH, BFE, UiT) utførte selve LC-MS analysene. Mengden materiale som ble injisert på LC-MS var 8 µl av hver prøve på 0,5 mg/ml, altså 4 µg prøve ble injisert. Prøvene ble analysert ved bruk av Agilent 6540 UHPLC-QTOF-MS system (Agilent technologies, Santa Clara, CA, USA). Separasjon ble utført med en mobilfase-gradient på 5-100% ACN + 1% maursyre over 15 min, med bruk av en Phenomenex Kinetex F5 kolonne (Phenomenex, Torrance, CA, USA), med 1.7 µM partikkelstørrelse og dimensjon på 2.1 × 150 mm. Kolonnetemperaturen var på 40 °C og mobilfasen ble pumpet med en hastighet på 300 µl/min. Både positiv og negativ ladede ioner ble detektert med søk etter ioner innenfor et masse-vindu satt til m/z 100-1700.

En liste over kjente florotanniner (med ES: elementsammensetning og teoretiske monoisotopiske masser) ble generert ut fra data som lå i MarinLit-databasen (<http://pubs.rsc.org/marinlit/>), samt manuelt innlagte data fra nyere litteratur. Denne lista ble brukt til å søke etter kjente florotanniner i LC-QTOF-MS dataene.

3 Resultater

3.1 Utbytte etter ekstraksjoner

Frysetørket materiale ble ekstrahert med enten; A) AM: 60% ACN + 0,1% maursyre, eller B) KV: kokende vann. Deretter ble ekstrahert materiale tørket, for så å bli videre ekstrahert med fast-fase ekstraksjon (SPE) for å fjerne salter. Utbyttet i ekstraktene og SPE-eluatene er vist i tabell 4.

Tabell 4. Mengde tørrstoff og utbytte etter væskeekstraksjon (ekstrakt) av 10 gram frysetørket materiale fra 10 ulike brunalger og påfølgende fast-fase ekstraksjon (SPE-eluat) av ekstraktene.

Art	60% acetonitril + 0,1% maursyre				Kokende Milli-Q vann			
	Ekstrakt		SPE-eluat		Ekstrakt		SPE-eluat	
	Tørrvekt (g)	Utbytte (%)	Tørrvekt (mg)	Utbytte (%)	Tørrvekt (g)	Utbytte (%)	Tørrvekt (mg)	Utbytte (%)
<i>A. esculenta</i>	2,23	22,3	51,1	0,51	3,42	34,2	16,9	0,17
<i>L. digitata</i>	3,12	31,2	85,9	0,86	3,52	35,2	57,2	0,57
<i>S. latissima</i>	3,28	32,8	69,9	0,70	1,66	16,6	24,9	0,25
<i>A. nodosum</i>	1,27	12,7	94,2	0,94	2,04	20,4	100,8	1,01
<i>F. distichus</i>	0,53	5,3	16,1	0,16	3,33	33,3	63,9	0,64
<i>F. serratus</i>	2,03	20,3	106,8	1,07	3,12	31,2	50,2	0,50
<i>F. spiralis</i>	1,57	15,7	114,2	1,14	3,25	32,5	156,2	1,56
<i>F. vesiculosus</i>	1,13	11,3	190,0	1,90	2,61	26,1	230,7	2,31
<i>P. canaliculata</i>	1,65	16,5	152,4	1,52	1,70	17,0	98,6	0,99
<i>D. aculeata</i>	1,60	16,0	96,1	0,96	1,20	12,0	43,6	0,44

Utbyttet etter AM-ekstraksjon varierte fra 5,3% til 32,8%, mens utbytte etter ekstraksjon med KV varierte fra 12% til 35,2%. Ekstraksjonen med KV ga høyest utbytte hos nesten alle artene. For *S. latissima* og *D. aculeata* var det ekstraksjonsmetoden med AM som ga høyest utbytte. KV-ekstraktet fra *L. digitata* ga høyest prosentvist utbytte på 35,2%, mens AM-ekstraktet fra *F. distichus* ga lavest prosentvist utbytte på 5,3%. Ved sammenligning av ekstraksjonsmetodene ser man tydelig forskjell på spesielt *S. latissima* (AM-ekstrakt: 32,8% vs. KV: 16,6%), *F. distichus* (AM-ekstrakt: 5,3% vs. KV-ekstrakt: 33,3%) og *F. vesiculosus* (AM-ekstrakt: 11,3% vs. KV-ekstrakt: 26,1%).

Generelt sett var det ikke veldig stor forskjell på utbyttene etter SPE. Utbyttet av AM-eluatene varierte fra 0,16% til 1,9%, mens utbyttet av KV-eluatene varierte fra 0,17% til 2,31%. Generelt ga de fleste av AM-eluatene høyere utbytte enn KV-eluatene. Det var fire av KV-eluatene (*A. nodosum*, *F. distichus*, *F. spiralis* og *F. vesiculosus*) som ga høyere utbytte

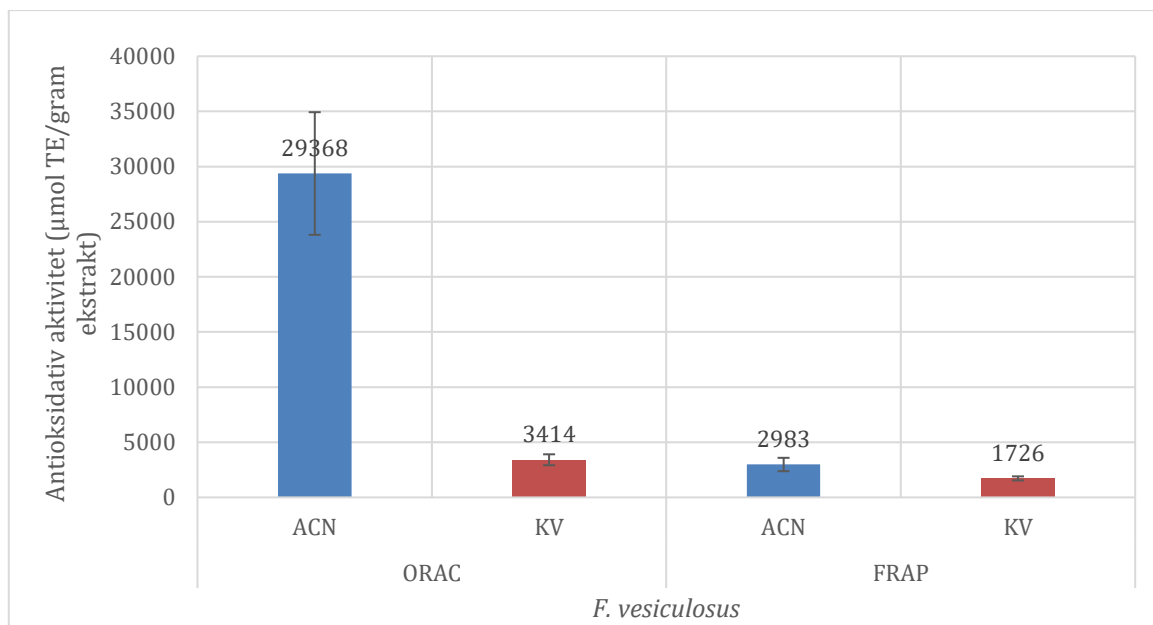
enn AM-eluatene. KV-eluatet fra *F. vesiculosus* ga høyest prosentvis utbytte på 2,31%, mens AM-eluatet fra *F. distichus*, i likhet med væskeekstraksjonen, ga lavest prosentvis utbytte på 0,16%.

Hvis man sammenligner ekstraktene og SPE-eluatene hadde de tre artene *A. esculenta*, *L. digitata* og *S. latissima* et relativt høyt utbytte etter ekstraksjon, men et lavt utbytte etter SPE. For *F. vesiculosus* var det motsatt, den hadde et relativt lavt utbytte etter ekstraksjon, men et relativt høyt utbytte etter SPE.

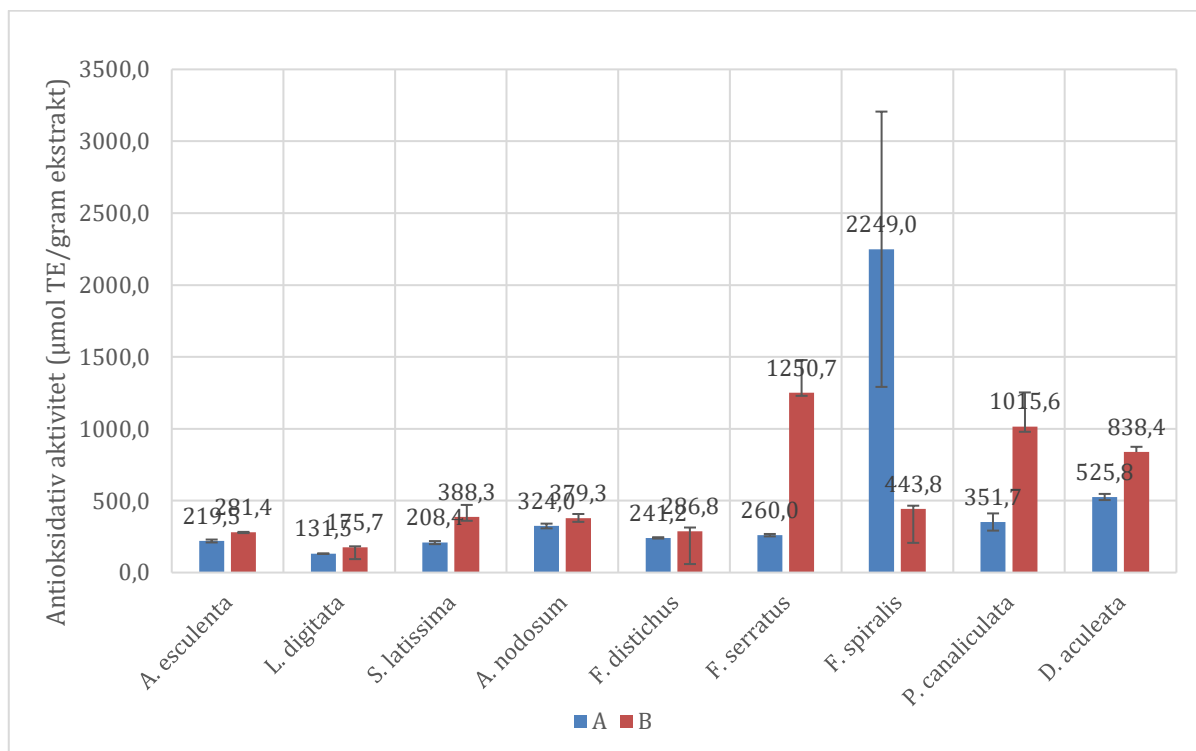
3.2 Antioksidativ aktivitet

Både KV og AM-eluatene ble testet for antioksidativ aktivitet. Det ble benyttet to ulike analysemetoder for antioksidativ testing, ORAC og FRAP. Figur 14, 15 og 16 viser den antioksidative aktiviteten til SPE-eluatene detektert med de to ulike analysemetodene. I Appendix 8 er den antioksidative aktiviteten framstilt i tabell med verdier, for lettere å kunne sammenligne metodene.

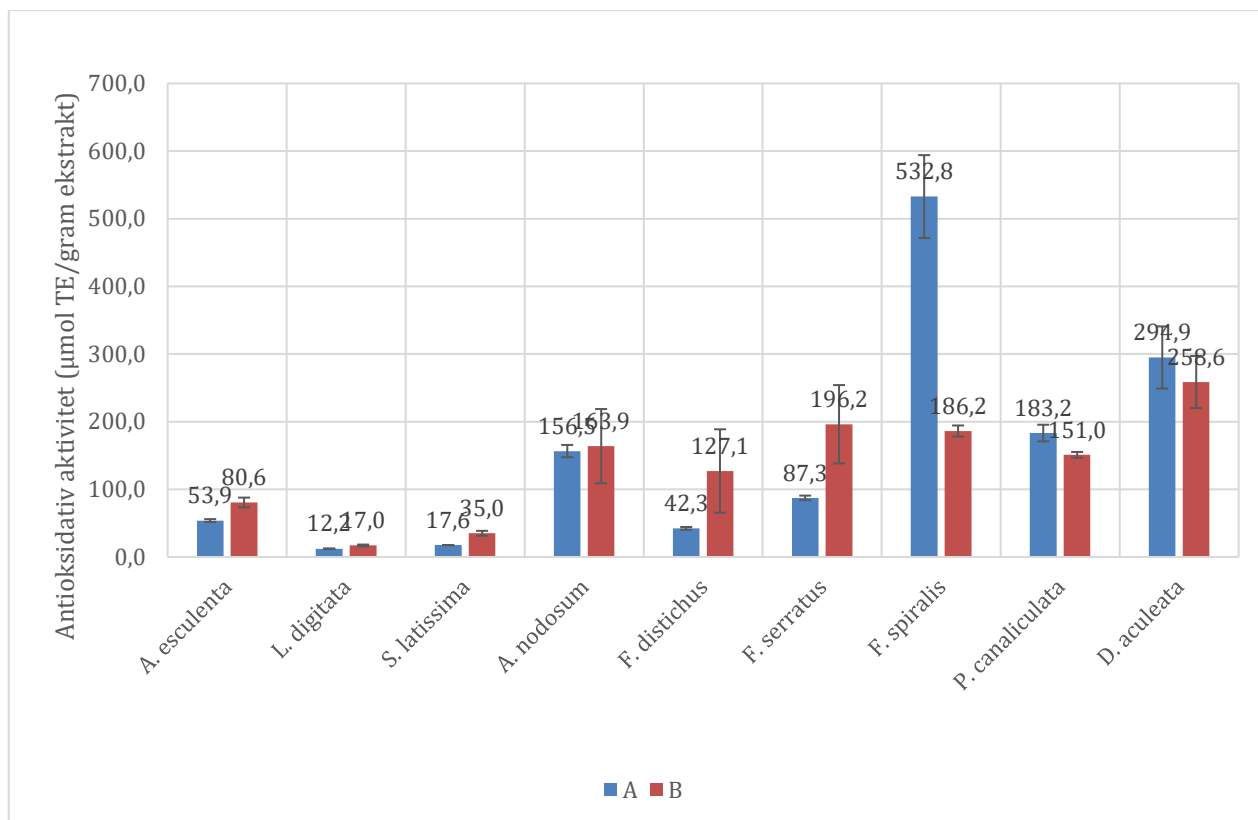
En av artene, *F. vesiculosus*, skilte seg ut ved å ha betydelig høyere antioksidativ aktivitet enn alle de andre artene, og disse er derfor presentert separat i figur 14. Sammenlignet med KV-eluatet hadde AM-eluatet fra denne arten (*F. vesiculosus*) omlag 10-fold høyere antioksidativ aktivitet målt i ORAC (29368 vs. 3413 $\mu\text{mol TE/gram ekstrakt}$). Resultatene fra AM og KV-eluatene var lavere (og innbyrdes likere) for FRAP med henholdsvis 2983 og 1726 $\mu\text{mol TE/gram ekstrakt}$.



Figur 14. Antioksidativ aktivitet ($\mu\text{mol TE/gram ekstrakt}$) i SPE-eluatet fra *F. vesiculosus*, generert fra 2 ulike ekstraksjonsmetoder; A) 60% ACN + 0,1% maursyre, og B) kokende vann, testet ved hjelp av ORAC og FRAP analysemetode. De blå søylene representerer AM-eluatet, mens de røde søylene representerer KV-eluatet. Feilfeltet representerer spredningen av verdiene målt for hvert eluat. Det ble kun regnet gjennomsnitt av verdier som lå innenfor midten av standardkurven, 2 målepunkter for hvert eluat.



Figur 15. Antioksidativ aktivitet ($\mu\text{mol TE/gram ekstrakt}$) i SPE-eluatet fra ni ulike brunalger, generert fra 2 ulike ekstraksjonsmetoder, A) 60% ACN + 0,1% maursyre, og B) kokende vann, testet ved hjelp av ORAC analysemetode. De blå søylene representerer AM-eluatet, mens de røde søylene representerer KV-eluatet. Feilfeltet representerer spredningen av verdiene målt for hvert eluat. Det ble kun regnet gjennomsnitt av verdier som lå innenfor midten av standardkurven, og antall målepunkter varierte fra 2 til 4.



Figur 16. Antioksidativ aktivitet ($\mu\text{mol TE/gram ekstrakt}$) i SPE-eluatere fra ni ulike brunalger, generert fra 2 ulike ekstraksjonsmetoder, A) 60% ACN + 0,1% maursyre, og B) kokende vann, testet ved hjelp av FRAP analysemetode. De blå søylene representerer AM-eluatere, mens de røde søylene representerer KV-eluatere. Feilfeltet representerer spredningen av verdiene målt for hvert eluat. Det ble kun regnet gjennomsnitt av verdier som lå innenfor midten av standardkurven, og antall målepunkter varierte fra 1 til 6.

Generelt sett var det ikke så mange SPE-eluatere som skilte seg ut i ORAC analysemetoden (figur 15). To av eluatene, AM-eluatet fra *F. spiralis* ($2246 \mu\text{mol TE/gram ekstrakt}$) og KV-eluatet fra *F. serratus* ($1251 \mu\text{mol TE/gram ekstrakt}$), hadde høyere antioksidativ aktivitet sammenlignet med de andre eluatene. Foruten eluatene fra *F. spiralis*, hadde KV-eluatene generelt noe høyere antioksidativ aktivitet enn AM-eluatene. AM-eluatet fra *L. digitata* hadde lavest antioksidativ aktivitet ($132 \mu\text{mol TE/gram ekstrakt}$). De fem første eluatene hadde relativt like og lave nivåer av antioksidativ aktivitet for begge ekstraksjonsmetodene. I motsetning til de fire siste eluatene (*F. serratus*, *F. spiralis*, *P. canaliculata* og *D. aculeata*) som viste stor forskjell i aktivitet mellom de to ekstraksjonsmetodene. KV-eluatene fra *F. serratus*, *P. canaliculata* og *D. aculeata* ga mye høyere aktivitet enn AM-eluatene fra de samme artene.

Vurdert ut fra FRAP-metoden (figur 16) var det ett eluat som hadde mer enn dobbel så høy antioksidativ aktivitet sammenlignet med alle de andre eluatene, og det var (som for ORAC) AM-eluatet fra *F. spiralis*. Begge eluatene fra *D. aculeata* hadde også relativt høy antioksidativ aktivitet vurdert ut fra FRAP. KV-eluatene viste høyere antioksidativ aktivitet enn AM-eluatene hos de 6 første artene. Hos de 3 siste artene (*F. spiralis*, *P. canaliculata* og *D. aculeata*) var det AM-eluatet som viste høyest aktivitet. Det eluatet med lavest antioksidativ aktivitet i denne analysemetoden var AM-eluatet fra *L. digitata*, i likhet med ORAC-analysemetode. Eluatet med høyest aktivitet var AM-eluatet fra *F. spiralis*, også i likhet med ORAC-analysemetode. Eluatene fra artene *A. esculenta*, *L. digitata*, *S. latissima*, *A. nodosum*, *P. canaliculata* og *D. aculeata* viste ingen stor forskjell i antioksidativ aktivitet mellom de ulike ekstraksjonsmetodene. I motsetning viste eluatene fra *F. distichus*, *F. serratus* og *F. spiralis* tydelige forskjeller i aktivitet mellom ekstraksjonsmetodene, hvor henholdsvis de to første artene hadde mye høyere aktivitet i KV-eluatene. Hos eluatene fra *F. spiralis*, som viste størst forskjell i aktivitet, var det mye høyere aktivitet i AM-eluatet. Analysemetoden ORAC viste generelt høyere antioksidativ aktivitet enn FRAP metoden.

3.3 Antibakteriell aktivitet

Den minste inhiberende konsentrasjonen (MIC) til de ulike SPE-eluatene ble funnet ved å teste eluatene for antibakteriell aktivitet i 2-folds fortynningsrekker mot 12 ulike terrestriske og marine bakteriestammer (derav 3 fiskepatogene stammer) (tabell 5). Bakteriestammene *C. divergens* og *A. salmonicida subsp. salmonicida*, viste seg å være vanskelige å dyrke i flytende medium, og viste ingen vekst i kontrollene. De er derfor utelatt fra studiet.

Tabell 5. Antimikrobiell aktivitet (MIC, mg/ml) av SPE-eluatet fra 10 ulike brunalger, generert fra 2 ulike ekstraksjonsmetoder (A, 60% ACN + 0.1% maursyre); B, kokende vann), og testet mot 4 terrestriske bakteriestammer og 6 marine bakteriestammer (derav 4 stammer av melkesyrebakterier og 2 fiskepatogene stammer). Grønne felt viser MIC-verdi ≤ 2 .

A; 60% ACN + 0.1% maursyre	Minste inhiberende konsentrasjon (MIC, mg/ml)									
	Terrestriske stammer ¹				Marine stammer ¹					
	B. s	C. gl	E. c	P.a	C. f	C. ga	C. m	C. p	As. a	Y. r
	G+	G+	G-	G-	G+	G+	G+	G+	G-	G-
<i>A. esculenta</i>	>2	1	>2	>2	>2	1	>2	>2	2	>2
<i>L. digitata</i>	2	0,5	>2	>2	>2	0,5	>2	>2	2	>2
<i>S. latissima</i>	>2	1	>2	>2	>2	0,5	>2	>2	2	>2
<i>A. nodosum</i>	2	1	>2	>2	>2	>2	>2	>2	2	>2
<i>F. distichus</i>	>2	2	>2	>2	>2	>2	>2	>2	IT ²	>2
<i>F. serratus</i>	>2	2	>2	>2	>2	2	>2	>2	2	>2
<i>F. spiralis</i>	1	0,5	>2	>2	>2	>2	>2	>2	>2	>2
<i>F. vesiculosus</i>	0,06	0,03	>2	>2	>2	0,25	>2	0,06	0,25	>2
<i>P. canaliculata</i>	0,5	0,25	>2	>2	>2	>2	>2	>2	>2	2
<i>D. aculeata</i>	1	0,5	>2	>2	2	2	>2	>2	1	2
B; Kokende Milli-Q vann	Terrestriske stammer ¹				Marine stammer ¹					
	B. s	C. gl	E. c	P.a	C. f	C. ga	C. m	C. p	As. a	Y. r
	G+	G+	G-	G-	G+	G+	G+	G+	G-	G-
<i>A. esculenta</i>	2	1	>2	>2	2	1	>2	>2	2	>2
<i>L. digitata</i>	>2	2	>2	>2	>2	1	>2	>2	>2	>2
<i>S. latissima</i>	>2	1	>2	>2	>2	0,5	>2	>2	2	>2
<i>A. nodosum</i>	2	1	>2	>2	2	1	>2	>2	2	>2
<i>F. distichus</i>	>2	2	>2	>2	>2	>2	>2	>2	2	>2
<i>F. serratus</i>	>2	2	>2	>2	>2	2	>2	>2	2	>2
<i>F. spiralis</i>	>2	2	>2	>2	>2	2	>2	>2	>2	>2
<i>F. vesiculosus</i>	0,5	0,25	>2	>2	>2	>2	>2	0,06	>2	>2
<i>P. canaliculata</i>	>2	2	>2	>2	2	2	>2	>2	>2	>2
<i>D. aculeata</i>	>2	2	>2	>2	>2	2	>2	>2	2	>2

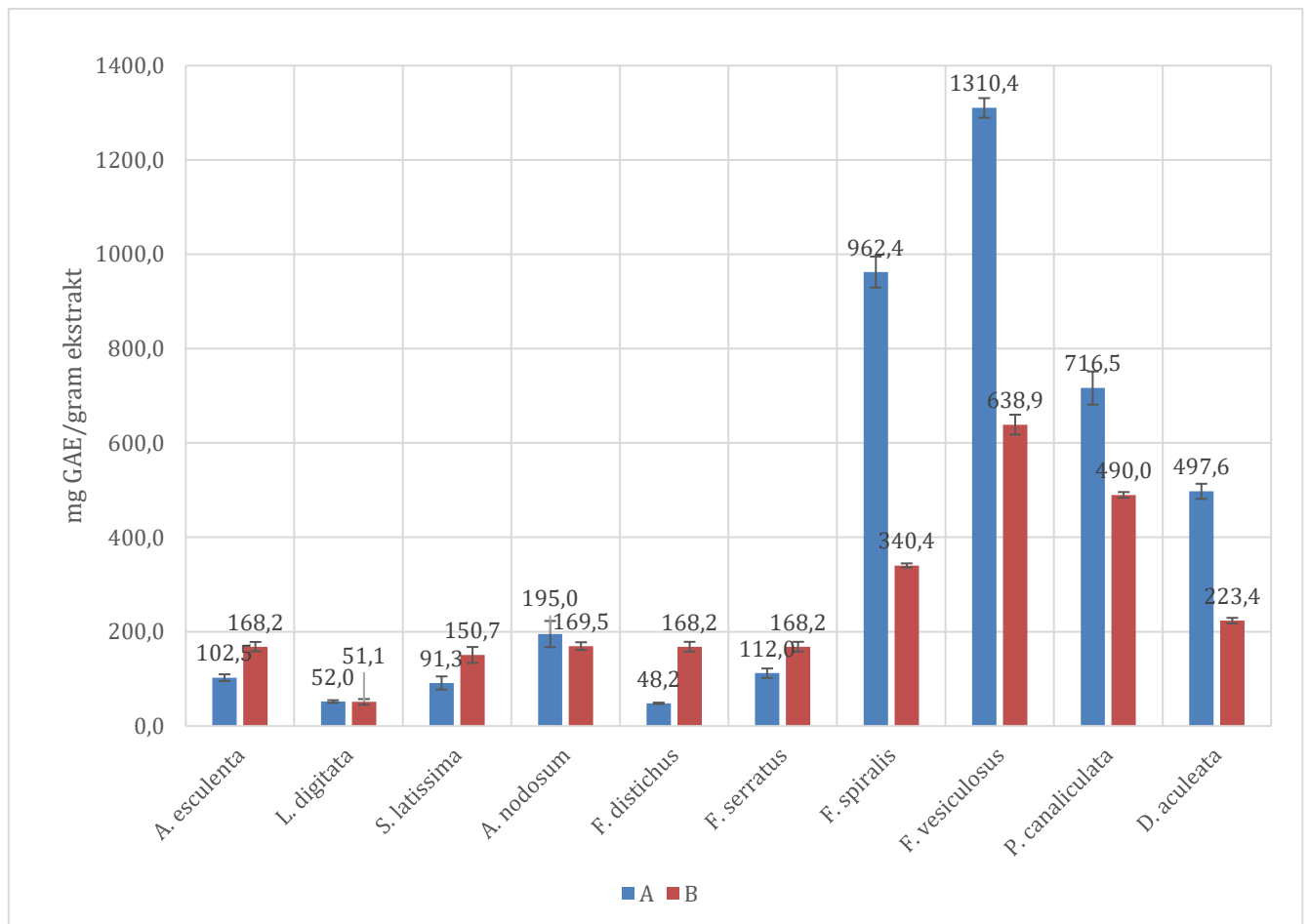
¹ B.s. – *Bacillus subtilis*, C.gl. – *Corynebacterium glutamicum*, E.c. – *Escherichia coli*, P.a. – *Pseudomonas aeruginosa*, C.f. – *Carnobacterium funditum*, C.ga. – *Carnobacterium gallinarum*, C.m. – *Carnobacterium mobile*, C.p. – *Carnobacterium piscicola*, As.a. – *Aeromonas salmonicida subsp. achromogenes*, Y.r. – *Yersinia ruckeri*.

² Ikke testet, pga. lite materiale.

Flere eluater viste antibakteriell aktivitet mot mange av bakteriestammene. MIC-verdiene hos de aktive eluatene fra begge ekstraksjonsmetodene varierte fra 0,03 til 2 mg/ml. Ingen av SPE-eluatene viste noen antibakteriell aktivitet mot *E. coli*, *P. aeruginosa* eller *C. mobile*. Det eluatet som viste høyest aktivitet generelt var AM-eluatet fra *F. vesiculosus*. Sett bort fra ekstraksjonsmetode, var det også *F. vesiculosus* som hadde den høyeste aktiviteten samlet sett. Eluater fra begge ekstraksjonsmetodene viste aktivitet på de samme bakteriene, foruten om *Y. ruckeri* hvor det kun var to eluater, AM-eluatene fra *P. canaliculata* og *D. aculeata*, som viste aktivitet. Det AM-eluatet med høyest aktivitet var *F. vesiculosus* på *C. glutamicum*, som viste en MIC-verdi så lav som 0,03 mg/ml. KV-eluatet med høyest aktivitet var *F. vesiculosus* på *C. piscicola*, som hadde en MIC-verdi på 0,06 mg/ml. SPE-eluatet som viste aktivitet mot flest bakteriestammer (6 stk.) var AM-eluatet fra *D. aculeata*, mens de eluatene som viste aktivitet mot færrest bakterier var AM-eluatet fra *F. distichus* (1 stk.), KV-eluatet fra *L. digitata* (2 stk.) og KV-eluatet fra *F. spiralis* (2 stk.). Ellers hadde AM-eluatene jevnt over høyere aktivitet enn KV-eluatene, i tillegg hadde AM-eluatene flere aktive eluater (31 stk.) enn KV-eluatene (29 stk.). Det ble påvist antibakteriell aktivitet mot mange Gram-positive bakteriestammer, mens det kun ble påvist aktivitet mot to Gram-negative bakteriestammer.

3.4 Fenolinnhold

SPE-eluatene ble testet for fenolinnhold ettersom brunalger er kjent for å inneholde florotanniner som kan ha både antibakteriell og antioksidativ aktivitet. Figur 17 viser det totale fenolinnholdet til SPE-eluatene fra de 10 brunalgene, detektert med Folin-Ciocalteus metode.



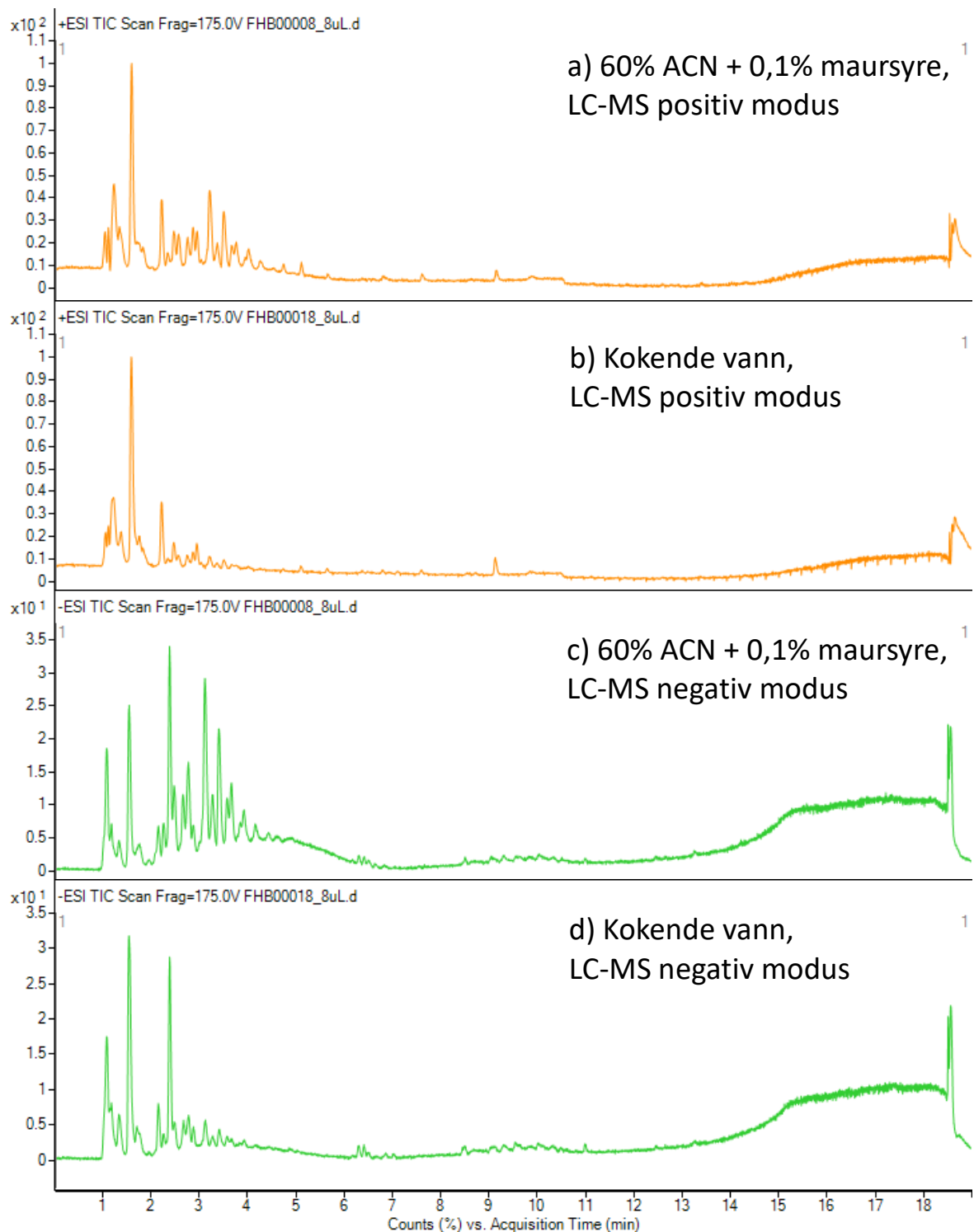
Figur 17. Fenolinnhold (mg GAE/gram ekstrakt) i SPE-eluatere fra 10 ulike brunalger, generert fra 2 ulike ekstraksjonsmetoder, A) 60% ACN + 0,1% maursyre, og B) kokende vann. Fenolinnholdet ble estimert ved bruk av Folin-Ciocalteus metode. De blå søylene representerer AM-eluatene, mens de røde søylene representerer KV-eluatene. Feilfeltet representerer spredningen av verdiene målt for hvert eluat. Det ble kun regnet gjennomsnitt av verdier som lå innenfor midten av standardkurven, og antall målepunkter varierte fra 2 til 3.

Noen av SPE-eluatene (4 stk.) skilte seg ut med noe høyere fenolinnhold enn de andre. Dette var AM-eluatene fra *F. spiralis*, *F. vesiculosus*, *P. canaliculata* og *D. aculeata*. Høyest fenolinnhold ble funnet i *F. vesiculosus* med 1310 (mg GAE/gram ekstrakt). Hos de fire artene *A. esculenta*, *S. latissima*, *F. distichus* og *F. serratus*, var det høyest fenolinnhold i KV-eluatene, men alle disse hadde likevel relativt lavt fenolinnhold. Aller lavest fenolinnhold ble målt i AM-eluatet fra *F. distichus*. Seks av artene viste ingen stor forskjell i fenolinnhold mellom de ulike ekstraksjonsmetodene, mens de fire andre artene (*F. spiralis*, *F. vesiculosus*, *P. canaliculata* og *D. aculeata*) viste relativt stor forskjell mellom ekstraksjonsmetodene. Disse artene hadde et mye høyere fenolinnhold i AM-eluatene. SPE-eluatene fra *F. vesiculosus* viste størst forskjell i fenolinnhold mellom ekstraksjonsmetodene, AM-eluat: 1310,4 vs. KV-eluat: 638,9 mg GAE/gram ekstrakt.

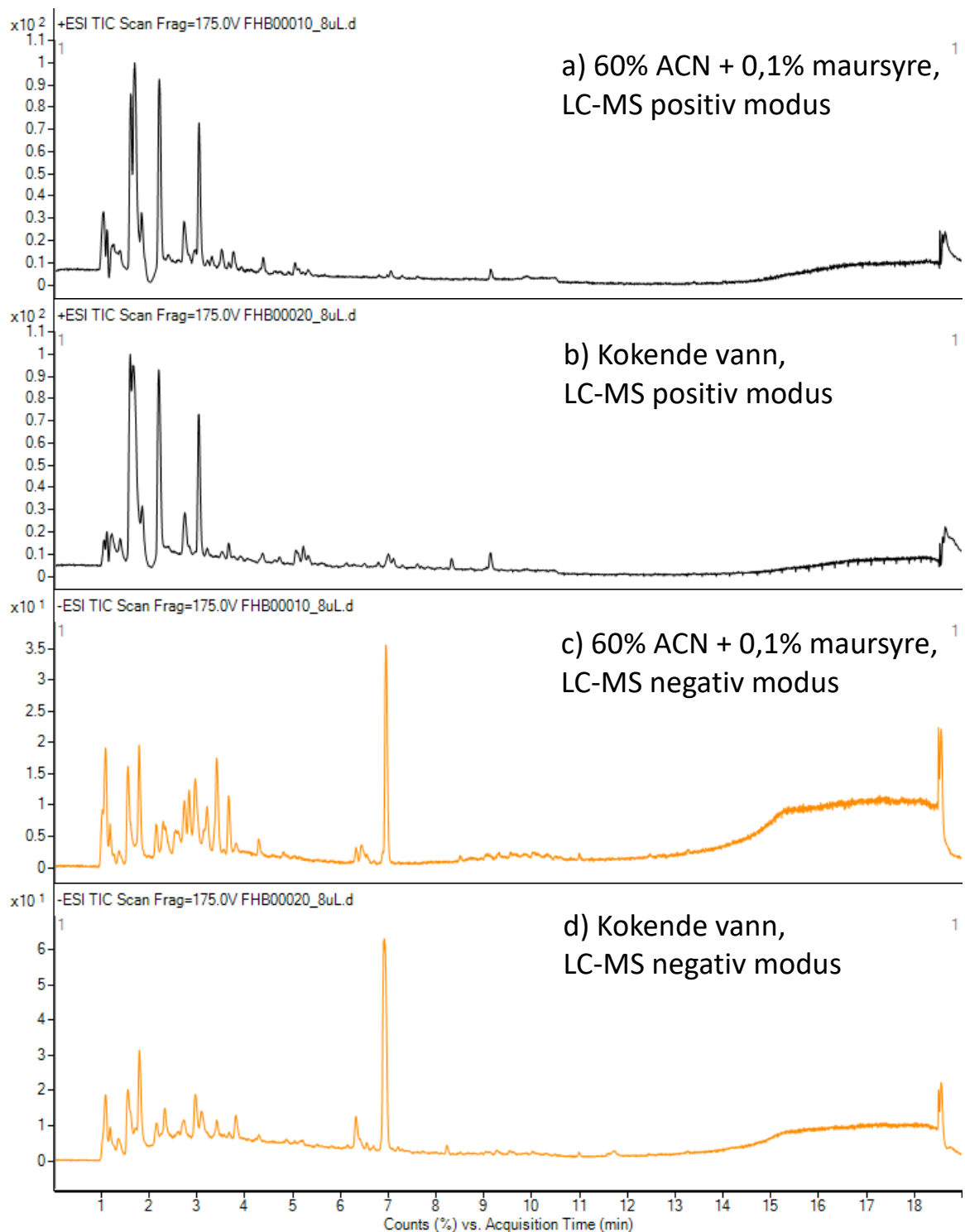
3.5 LC-MS

LC-MS analyser ble kjørt på fortynnede SPE-eluater for, om mulig, å indentifisere florotanniner i prøvene. Florotanniner ble kun detektert i 4 arter; *A. nodosum*, *P. canaliculata*, *F. vesiculosus* og *D. aculeata*.

Figur 18 og 19 viser TIC fra LC-MS analyser av *F. vesiculosus* og *D. aculeata*. TIC for de andre artene er fremstilt i Appendix 9. Kromatogrammene viser analyser av ekstraktene i positiv og negativ modus. Toppene i kromatogrammene viser total mengde ioner detektert per tidsenhet, og trenger i så måte ikke å representere separate forbindelser.



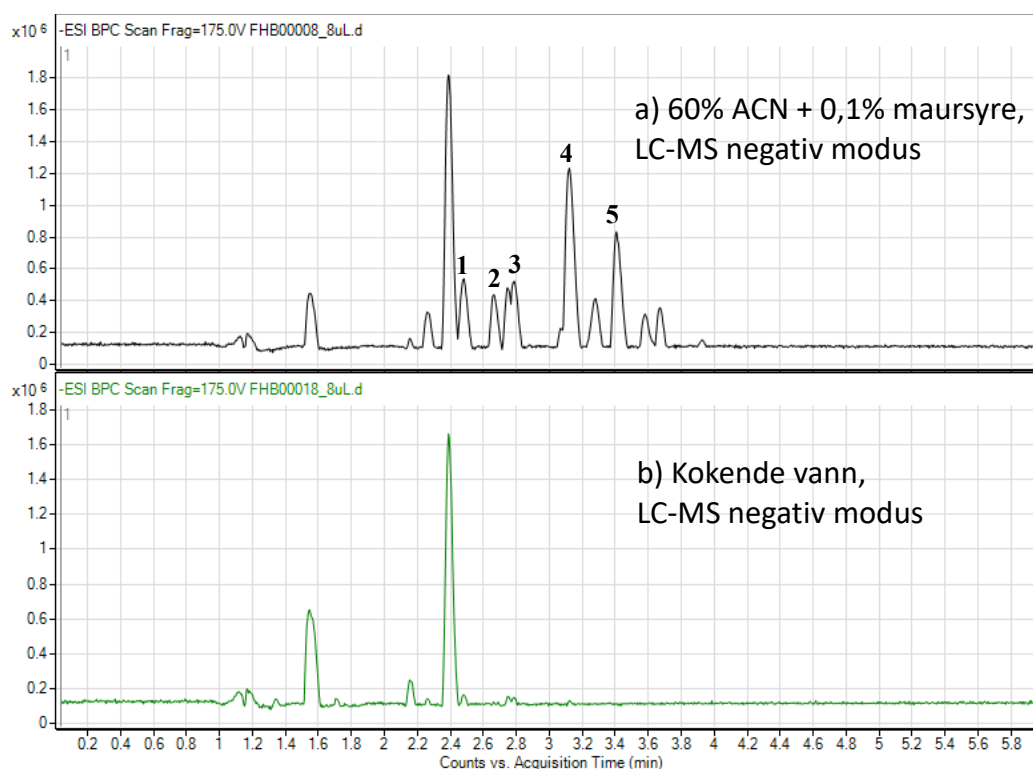
Figur 18. Total ionechromatogram (TIC) etter UHPLC-ESI-QToF MS av SPE-eluat fra *F. vesiculosus*. a) SPE-eluat av 60% ACN+0,1% maursyre ekstrakt, detektert i positiv modus; b) SPE-eluat av kokende vann ekstrakt, detektert i positiv modus; c) SPE-eluat av 60% ACN+0,1% maursyre ekstrakt, detektert i negativ modus; d) SPE-eluat av kokende vann ekstrakt, detektert i negativ modus. En mengde på 4 µg (8 µl) SPE-eluat ble injisert på LC-MS-systemet og materialet ble separert med bruk av en gradient bestående av 5-100% ACN over 15 min.



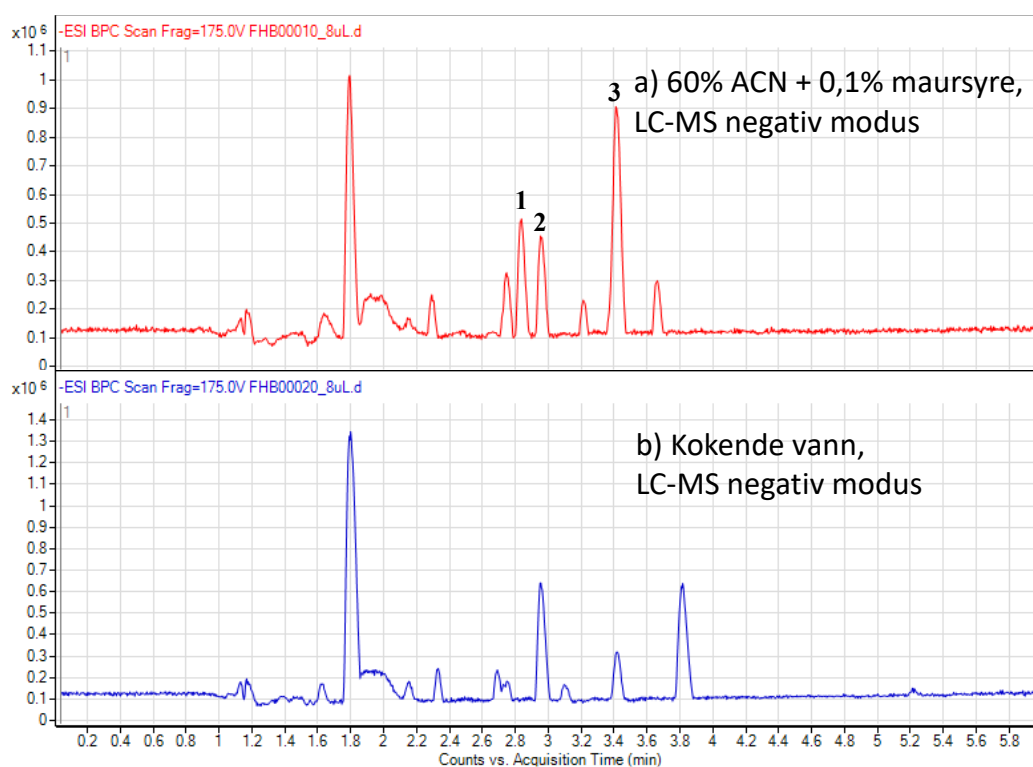
Figur 19. Total ionechromatogram (TIC) etter UHPLC-ESI-QToF MS av SPE-eluat fra *D. aculeata*. a) SPE-eluat av 60% ACN+0,1% maursyre ekstrakt, detektert i positiv modus; b) SPE-eluat av kokende vann ekstrakt, detektert i positiv modus; c) SPE-eluat av 60% ACN+0,1% maursyre ekstrakt, detektert i negativ modus; d) SPE-eluat av kokende vann ekstrakt, detektert i negativ modus. En mengde på 4 µg (8 µl) SPE-eluat ble injisert på LC-MS-systemet og materialet ble separert med bruk av en gradient bestående av 5-100% ACN over 15 min.

For *F. vesiculosus* (figur 18) ser man at det er flere toppe i kromatogrammene (positiv og negativ modus) for AM-eluatet enn for KV-eluatet. Det ble også registrert flere toppe i negativ modus i forhold til positiv modus. I figur 19, for *D. aculeata*, ser man samme trenden, altså flest toppe i AM-eluatet og i negativ modus. Toppen med retensjonstid (Rt) 7 min ble av MS-programvaren predikert å ha elementsammenstening (ES) $C_{10}H_{22}O_4S$ og er sannsynligvis et polart sulfolipid. Det ble detektert flest toppe i retensjonsområdet 1-5 min i kromatogrammene, spesielt for *F. vesiculosus*. For å bedre synliggjøre forskjellene og for å se på de spesifikke forbindelsene ble dette området forstørret og fremstilt som base peak kromatogram (BPC), for begge artene. Basert på det man ser i TIC, negativ modus viser flest forbindelser, blir det heretter kun fokusert på negativ modus.

Figur 20 og 21 viser BPC fra LC-MS analyser av *F. vesiculosus* og *D. aculeata*, respektivt. I motsetning til TIC så representerer toppene i kromatogrammene de forbindelsene det er mest av per tidsenhet.



Figur 20. Base peak kromatogram (BPC) etter UHPLC-ESI-QToF MS av SPE-eluat av *F. vesiculosus*. a) SPE-eluat av 60% ACN+0,1% maursyre ekstrakt, og b) SPE-eluat av kokende vann ekstrakt. En mengde på 4 µg (8 µl) SPE-eluat ble injisert på LC-MS-systemet og materialet ble separert med bruk av en gradient bestående av 5-100% ACN over 15 min. Begge analysene ble utført i negativ modus.



Figur 21. Base peak kromatogram (BPC) etter UHPLC-ESI-QToF MS av SPE-eluat av *D. aculeata*. a) SPE-eluat av 60% ACN+0,1% maursyre ekstrakt, og b) SPE-eluat av kokende vann ekstrakt. En mengde på 4 µg (8 µl) SPE-eluat ble injisert på LC-MS-systemet og materialet ble separert med bruk av en gradient bestående av 5-100% ACN over 15 min. Begge analysene ble utført i negativ modus.

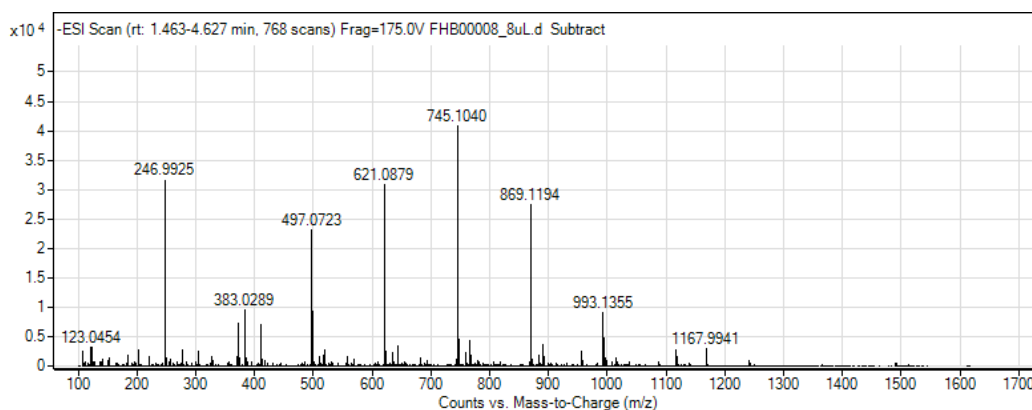
I figur 20 og 21 ser man mye av det samme som i figur 18 og 19. For *F. vesiculosus* (figur 20) er det flest topper (forbindelser) i kromatogrammet fra AM-eluatet, og man kan se tydelig forskjell i antall topper mellom AM og KV-eluatene. I figur 21, for *D. aculeata*, er ikke forskjellen mellom AM og KV-eluatene like tydelig. Likevel ser man flere topper i kromatogrammet fra AM-eluatet.

Ut fra figur 20, BPC fra *F. vesiculosus*, er topp 1 (Rt, på 2.481 min) fra AM-eluatet sannsynligvis et florotannin med ES $C_{30}H_{22}O_{15}$ og 5 PG-enheter. Topp 2 (Rt på 2.666 min) vurderes å være et florotannin med ES $C_{24}H_{18}O_{12}$ og 5 PG-enheter. Topp 3 (Rt på 2.837 min) er sannsynligvis også et florotannin med ES $C_{24}H_{18}O_{16}S$ og 4 PG-enheter. Neste topp, 4, (Rt på 3.123 min) predikeres til å være et florotannin med ES $C_{36}H_{26}O_{18}$ og 6 PG-enheter. Den siste nummererte toppen, topp 5, (Rt på 3.411 min) vurderes å være et florotannin med ES $C_{42}H_{30}O_{21}$ og 7 PG-enheter. De nummererte toppene, foruten om topp 5, er topper som man

også ser antydning til i kromatogrammet for KV-eluatet fra *F. vesiculosus*. Den største toppen i BPC-kromatogrammene (figur 20), med Rt på 2.391 min, er predikert til å ha en ES lik $C_8H_8O_7S$ – og er ikke antatt å være et florotannin.

I figur 21, BPC fra *D. aculeata*, er sannsynligvis topp 1 fra AM-eluatet et florotannin (sulfatert) med ES $C_{24}H_{18}O_{16}S$, Rt på 2.837 min og 4 PG-enheter. Neste topp, 2, (Rt på 2.959 min) kan tenkes å være et florotannin (sulfatert) med ES $C_{18}H_{14}O_{14}S$ og 3 PG-enheter. Den siste nummererte toppen, topp 3, (Rt på 3.416 min) er sannsynligvis også et florotannin (sulfatert) med ES $C_{24}H_{18}O_{15}S$ og 4 PG-enheter. Topp 2 og 3 ser man også i kromatogrammet for KV-eluatet.

MS-spekteret i figur 22 viste innhold av en rekke med m/z-verdier som representerer $[M-H]^{-1}$; blant annet m/z 497, 621, 745, 862, 993 og 1167, noe som tyder på en tilstedeværelse av florotanniner. Ut fra tabell 6 er sannsynligvis m/z-verdi 497 et florotannin med ES $C_{24}H_{18}O_{12}$. Neste m/z-verdi (621) har en ekstra PG-enhet (5 stk.) og har ES lik $C_{30}H_{22}O_{15}$. Ionet med m/z-verdi 745 har enda en ekstra PG-enhet og ES $C_{36}H_{26}O_{18}$, mens m/z-verdi 993 har 8 PG-enheter og ES $C_{48}H_{34}O_{24}$.



Figur 22. MS-spekter av retensjons-tidsrommet 1.4-4.5 min etter UHPLC-ESI-QToF MS av SPE-eluatet fra *F. vesiculosus* ACN-ekstrakt. Analysen ble utført i negativ modus.

Tabell 6 framstiller de florotanninene som ble detektert i ekstraktene fra de ulike artene. Tabellen ble laget på bakgrunn av nøye undersøkelse av m/z-data (og kalkulerte monoisotopiske masser og elementsammensetninger) fra LC-MS analysen, sammenlignet med teoretiske monoisotopiske masser fra kjente, publiserte florotanniner i brunalger.

Tabell 6. Florotanniner detektert i eluater av *A. nodosum*, *P. canaliculata*, *F. vesiculosus* og *D. aculeata* ved bruk av LC-QTOF-MS (negativ modus). I tabellen vises retensjonstid (*Rt*, min) og masseavvik (ppm, i parentes) i forhold til teoretisk masse.

Antall PG-enheter	Element-sammensetning	Teoretisk masse (Da)	<i>Ascophyllum nodosum</i>	<i>Pelvetia canaliculata</i>	<i>Fucus vesiculosus</i>		<i>Desmarestia aculeata</i>		
			60% acetonitril + 0,1% maursyre	60% acetonitril + 0,1% maursyre	60% acetonitril + 0,1% maursyre	Kokende Milli-Q vann	60% acetonitril + 0,1% maursyre	Kokende Milli-Q vann	
2	C12 H10 O6	250.0477	2.628 (0.5)*	2.621 (0.1)	2.621 (0.3)*			2.621 (0.1)	
	C12 H10 O9 S	330.0046		2.611 (0.1)	2.606 (0.1)			2.593 (0.1)	
	C12 H10 O10 S	345.9995						2.403 (0.2)	
3	C18 H14 O9	374.0638			2.264 (0.1)*	2.263 (0.1)*		3.215 (0.0)*	
	C18 H14 O12 S	454.0206						2.959 (0.2)	2.958 (0.3)
	C18 H14 O13 S	470.0155						2.295 (0.1)	
4	C24 H18 O12	498.0798			1.754 (0.0)* 2.104 (0.4)* 2.666 (0.3)* 2.787 (0.2)*	1.753 (0.5)* 2.667 (0.1)* 2.787 (0.0)*		3.662 (0.3)*	
	C24 H18 O15 S	578.0366						3.416 (0.2)	3.419 (0.3)
	C24 H18 O16 S	594.0316						2.837 (0.5) 2.943 (0.3)	
5	C30 H22 O15	622.0959			2.481 (0.4)* 2.681 (0.7)* 3.071 (0.4)* 3.148 (0.3) 3.278 (0.5)*	2.483 (0.7)* 3.074 (0.7)* 3.146 (0.7)* 3.274 (0.8)*			
6	C36 H26 O18	746.1119			2.762 (0.5)* 3.123 (0.5)* 3.586 (0.5)*	2.769 (0.5)* 3.127 (0.3)* 3.585 (0.3)*			
7	C42 H30 O21	870.128			3.411 (0.6)* 3.854 (0.7)* 3.928 (0.2)	3.414 (0.3)*			
8	C48 H34 O24	994.144			3.671 (0.5)* 4.176 (0.4)*				
Totalt antall florotanniner detektert			1	2	20	12		10	2

*Også detektert i LC-QTOF-MS (positiv modus)

I de artene det ble detektert florotanniner var det flest i AM-eluatene. Den beste LC-MS deteksjonen av florotanniner ble gjort i negativ modus. SPE-eluatene fra *F. vesiculosus* viste høyest innhold av florotanniner (totalt 20 stk.), og flest fra begge typer ekstraksjonsmetoder (20 stk. i AM-eluatet, 12 stk. i KV-eluatet). Florotanninene ble også detektert i både positiv og negativ MS ioniserings-modus. I AM-eluatet fra *D. aculeata* ble det også detektert en relativ høy andel florotanniner (totalt 10 stk.). I AM-eluat fra *A. nodosum* ble det kun detektert 1 stk. florotannin, med ES C₁₂H₁₀O₆. For *P. canaliculata* og *D. aculeata* var det enten veldig få eller ingen florotanniner som ble detektert i begge modusene.

Samlet sett ble flere florotanniner detektert jo flere PG-enheter det var i molekylene, men bare opp til 5 enheter, utover 5 enheter avtok deteksjonen av florotanniner igjen. Det ble med andre ord detektert flest florotanniner med 5 PG-enheter. I tabellen ser man at det ble detektert flere varianter (3 stk.) med ulik ES i florotanninene bestående av 2, 3 og 4 PG-enheter, mens det var detektert kun en og samme ES i florotanninene bestående av 5, 6, 7 og 8 PG-enheter.

4 Diskusjon

10 vanlig forekommende arter brunalger, ble undersøkt for antibakterielle og antioksidative forbindelser. Algene ble ekstrahert med to ulike ekstraksjonsmetoder, 60% acetonitril + 0,1% maursyre og kokende Milli-Q vann. Videre ble ekstraktene separert og renset for salter med SPE, og retardert materiale ble eluert med 80% ACN. SPE-eluatene ble testet for antioksidativ aktivitet ved hjelp av ORAC og FRAP analysemetoder. Deretter testet for antibakteriell aktivitet mot både terrestriske og marine (inkl. fiskepatogene) bakteriestammer. I tillegg ble det totale fenolinnholdet i SPE-eluatene estimert ved hjelp av Folin-Ciocalteus metode. Eluatene ble til slutt analysert med LC-MS for å påvise tilstedeværelse av florotanniner.

4.1 Ekstraksjonsmetoder

Ekstraksjonsmetoder velges ut fra om der er et kjent stoff som skal isoleres, eller om man ønsker å ekstrahere et bredt spekter av stoffer (Seidel, 2012). I denne masteroppgaven ble det valgt metoder for å ekstrahere et bredt spekter av stoffer, men med et særskilt fokus på lavmolekylære florotanniner. Materialet ble ekstrahert med 60% ACN + 0,1% maursyre, da denne metoden tidligere har vist gode resultater for ekstraksjon av ulike forbindelser fra forskjellige marine organismer (Haug, et al., 2004; Tadesse, et al., 2008). I tillegg ble stoffene ekstrahert med kokende vann, dette fordi metoden er enkel, og det er ingen bruk av kjemikalier. Tang og tare ekstrakter har vist å ha en rekke helsebringende effekter (Gupta & Abu-Ghannam, 2011; Li, et al., 2011; Eom, et al., 2012; Ngo & Kim, 2013; Pádua, et al., 2015; Li, et al., 2017). Ettersom mange brunalger er relativt lett tilgjengelig for folk som bor langs kysten og har et høstingspotensiale, kan «te-varianten» (kokende vann) eventuelt også benyttes til hjemmebruk.

Det var ikke en veldig stor forskjell mellom ekstraksjonsmetodene når det kommer til utbytte etter ekstraksjonen (tabell 4), men man kan se at det jevnt over er noe høyere utbytte etter ekstraksjonen med KV. Dette kan være fordi det varme vannet vil trekke ut veldig polare stoffer (som salter) som senere separeres ut i SPE. SPE fjerner urenheter og stoffer som ikke er ønskelige (svært polare stoffer retarderes ikke på kolonnene/svært upolare stoffer retarderes). Hvis man sammenligner ekstraktene og SPE-eluatene hadde tre av artene (A.

esculenta, *L. digitata* og *S. latissima*) et relativt høyt utbytte etter ekstraksjonen, men et lavt utbytte etter SPE. Det tyder på at disse eluatene inneholder mye salter, lipider (som karotenoider), proteiner og polare stoffer (som polysakkarider) som ikke retarderes på SPE-kolonnene (Santos, et al., 2019). For *F. vesiculosus* var det motsatt, den hadde et lavt utbytte etter ekstraksjonen, men et høyt utbytte etter SPE.

4.2 Antioksidativ aktivitet i SPE-eluater

Analysemetodene (ORAC og FRAP) ble valgt ut fordi de henholdsvis baserer seg på analyse av to ulike oksidative reaksjoner; hydrogenoverføring (HAT) og elektronoverføring (SET) (Dasgupta & Klein, 2014). Antioksidativ aktivitet som detekteres i den ene metoden detekteres ikke nødvendigvis i den andre, og ved å bruke begge metodene får man dermed et bedre bilde av den antioksidative aktiviteten i ekstraktene fra de ulike artene.

I ORAC var det generelt ikke så mange SPE-eluater som skilte seg ut (figur 14), foruten om KV-eluatet fra *F. serratus*, AM-eluatet fra *F. spiralis* og begge eluatene fra *F. vesiculosus* som alle hadde en del høyere antioksidativ aktivitet enn de andre eluatene. KV-eluatet fra *F. serratus* ga ikke så høyt utbytte etter SPE (tabell 4) i forhold til de andre eluatene. Dette samsvarer ikke helt med det vi ser i figur 14, men den høye aktiviteten kan tenkes å være på grunn av en konsentrert mengde antioksidative stoffer i eluatet. Den relativt høye antioksidative aktiviteten til AM-eluatet fra *F. spiralis*, samsvarer imidlertid med tilsvarende relativt høyt utbytte etter SPE. *F. vesiculosus* viste helt klart høyest antioksidativ aktivitet i begge eluatene (figur 16), men klart høyest i AM-eluatet. Disse resultatene samsvarer med tilsvarende høyest utbytte etter SPE.

Omtrent alle KV-eluatene viste høyere antioksidativ aktivitet enn AM-eluatene. Dette kan tenkes å være på grunn av at KV-ekstraksjonen har ekstrahert flere antioksidative stoffer enn ekstraksjonsmetoden med AM. AM-eluatet fra *F. spiralis* viste høyere aktivitet enn KV-eluatet, til tross for at dette eluatet ga høyere utbytte etter SPE. Grunnen til dette kan være at AM-eluatet har en høyere konsentrasjon av antioksidative stoffer. AM-eluatet fra *L. digitata* hadde lavest antioksidativ aktivitet av alle eluatene, noe som samsvarer med dets relativt lave utbytte etter SPE. AM-eluatet fra *F. spiralis* var det eluatet med høyest aktivitet (figur 14).

Dette stemmer godt overens med utbyttet, som er relativt høyt i forhold til flere av de andre AM-eluatene.

For å nøyaktig kunne måle den antioksidative aktiviteten med FRAP så er det mange krav som må oppfylles, blant annet må reaksjonsraten være tilstrekkelig siden analysen kun varer i noen minutter. Dette kan by på problemer siden noen antioksidanter, blant annet polyfenoler, reduserer Fe^{3+} sakte. Dermed vil ikke disse antioksidantene vise noen aktivitet i analysen (Ou et al., 2002). Dette kan forklare hvorfor FRAP analysen viser så mye lavere aktivitet enn ORAC på de samme eluatene.

I FRAP (figur 15) var det heller ikke så mange av SPE-eluatene som skilte seg nevneverdig ut, foruten om AM-eluatet fra *F. spiralis* og begge eluatene fra *F. vesiculosus* (figur 16) - som hadde mye høyere aktivitet enn resten av artene. Dette kan forklares på samme måte som for ORAC, nemlig at den antioksidative aktiviteten samsvarer med det relativt høye utbytte etter SPE. Noe som også er verdt å merke seg er at *F. spiralis* (i motsetning til de andre artene) var høstet i september, som kan bety at den har vært utsatt for mer sollys i en lengre periode og dermed har et høyere innhold av antioksidanter. Flere faktorer som art, årstid, alder, geografisk beliggenhet og miljøforhold påvirker algenes fytokjemiske profil og innhold (Mekinic, et al., 2019). Flesteparten av KV-eluatene viste også i FRAP metoden generelt høyere antioksidativ aktivitet enn AM-eluatene. Hos 3 av artene (*F. spiralis*, *P. canaliculata* og *D. aculeata*) var det derimot AM-eluatene som viste høyest aktivitet. For *P. canaliculata* og *D. aculeata* samsvarer ikke dette med resultatene fra ORAC analysen. Dette kan tenkes å være på grunn av at AM-ekstraksjonen trekker ut flere forbindelser som overfører elektroner, i forhold til metoden med KV. Det eluatet som hadde lavest antioksidativ aktivitet i denne analysemetoden var AM-eluatet fra *L. digitata*, og var i likhet med aktiviteten detektert med ORAC metoden. Eluatet med høyest aktivitet i figur 16 var AM-eluatet fra *F. spiralis*, også i likhet med ORAC (figur 15). På grunn av disse likhetene kan man tenke seg at *L. digitata* ikke inneholder et betydelig antall hydrogenoverførende eller elektronoverførende forbindelser, mens *F. spiralis* inneholder et betydelig antall. *A. nodosum* viser betydelig høyere aktivitet sammenlignet med de andre artene i FRAP, i forhold til ORAC, dette kan også relateres til forbindelsenes evne til elektronoverføring.

4.3 Antibakteriell aktivitet i SPE-eluatere

For å undersøke hvorvidt SPE-eluatene fra de ulike artene hadde antibakteriell aktivitet ble det brukt en metode hvor man kunne estimere minimum inhiberende konsentrasjon (MIC). MIC er definert som den laveste konsentrasjonen av et ekstrakt eller en forbindelse som hemmer den synlige veksten av en mikroorganisme *in vitro* (Andrews, 2001). Metoden er passende til denne oppgaven fordi man får et innblikk i hvor mye hvert av SPE-eluatene inhiberer de ulike bakteriestammene.

Ekstraksjonsmetoden med AM viste jevnt over lavere MIC-verdier (mer potente) og flere aktive eluater (tabell 5). Dette kan tyde på at ekstraksjonsmetoden med AM er bedre på å ekstrahere antibakterielle forbindelser sammenlignet med KV. SPE-eluatene som viste høyest aktivitet var begge fra *F. vesiculosus*, noe som kan ha sammenheng med at disse eluatene også hadde høyest utbytte etter SPE. Eluatene som viste aktivitet mot færrest bakteriestammer var AM-eluatet fra *F. distichus*, KV-eluatet fra *L. digitata* og KV-eluatet fra *F. spiralis*. Den lave aktiviteten til *F. distichus* skyldes nok at den ga det absolutt laveste utbyttet etter SPE. *L. digitata* ga også relativt lavt utbytte etter SPE. I motsetning ga *F. spiralis* nest høyest utbytte etter SPE og man kan dermed anta at den lave aktiviteten skyldes at konsentrasjonen av antibakterielle forbindelser var lav på grunn av årstid for innsamling, gamle prøver (2007) eller at ekstraksjonsmetoden var uegnet for denne arten. Alle eluatene viste aktivitet mot *C. glutamicum*, som kan forklares med at denne bakteriestammen tidligere har vist seg å være mer sensitiv i antibakterielle forsøk (Si, et al., 2014).

Ingen av SPE-eluatene viste noen antibakteriell aktivitet mot *E. coli*, *P. aeruginosa*, *C. divergens*, *C. mobile* eller *A. salmonicida subsp. salmonicida*. *E. coli* har tidligere vist seg å være lite sensitiv i antibakteriell testing (Assadian, et al., 2011; Mukhtar & Ghor, 2012), noe som kan forklare hvorfor ingen av eluatene hemmet bakterien. Man kan også anta at *P. aeruginosa* og *C. mobile* er lite sensitive overfor alge-ekstraktene med tanke på at de begge vokste godt i vekstkontrollene. *C. divergens* og *A. salmonicida subsp. salmonicida* hadde ingen vekst i kontrollene, noe som kan tyde på at bakteriestammene ikke trivdes under vekstforholdene, og det blir dermed vanskelig å si om SPE-eluatene hadde noe aktivitet mot disse.

Totalt sett ble det påvist antibakteriell aktivitet mot 2 av 5 Gram-negative bakteriestammer, men mot 5 av 7 Gram-positive bakteriestammer i SPE-eluatere fra begge ekstraksjonsmetodene. De fleste aktive eluatene viste imidlertid aktivitet mot begge typer av bakterier, noe som kan tyde på at de ekstraherte aktive forbindelsene er mer bredspektret enn smalspektret.

4.4 Fenolinnhold i SPE-eluatere

Fenolinnholdet i eluatene ble målt ved bruk av Folin-Ciocalteus metode på bakgrunn av at dette er den mest brukte prosedyren for å bestemme fenolinnhold. Analysen er en kolorimetrisk metode basert på elektronoverføringsreaksjoner mellom Folin-Ciocalteu reagenset og fenol-forbindelser (Sánchez-Rangel, et al, 2013).

Generelt sett var det få av SPE-eluatene som skilte seg ut i Folin-Ciocalteus metode (figur 17), men man ser tydelig at AM-eluatene fra *F. spiralis* og *F. vesiculosus* (høyest fenolinnhold) hadde en del høyere fenolinnhold enn SPE-eluatene fra de andre artene. Andre studier har også vist at ekstraksjon med vann (i forhold til andre ekstraksjonsløsninger) gir lavere fenolinnhold hos *F. vesiculosus*. I tillegg har andre forsøk fått resultater hvor *F. vesiculosus* har vist et veldig høyt fenolinnhold i forhold til andre studerte arter (Mekinic, et al., 2019). Disse resultatene samsvarer med resultatene fra ORAC og FRAP analysene, og man kan dermed anta at en stor andel av stoffene som ble trukket ut av ekstraktet, med SPE, var florotanniner. De fleste artene hadde høyest fenolinnhold i AM-eluatene. Dette stemmer ikke helt overens med det man ser i figur 15 og 16, hvor flesteparten viste høyere antioksidativ aktivitet i KV-eluatene. Grunnen til denne forskjellen kan være at KV-eluatene også inneholder mange antioksidative forbindelser som ikke er fenoler. Flere andre studier har rapportert at bruk av aceton som ekstraksjonsløsning ga høyere innhold av ekstraherte fenoler. Dette kan sannsynligvis være på grunn av at forbindelser i aceton-ekstraksjonsløsningen hemmer interaksjoner mellom tanniner og proteiner under ekstraksjonen. Eller til og med bryter hydrogenbindinger mellom tannin-proteinkomplekser (Mekinic, et al., 2019). Eluatet som viste lavest fenolinnhold var AM-eluatet fra *F. distichus*, noe som samsvarer med resultatene fra ORAC og FRAP analysene. Det man også kan se av fenolmålingene, er at AM-eluatet fra *F. vesiculosus* har konsentrasjonen 1310,4 mg GAE/gram ekstrakt, altså over

1 gram GAE/gram ekstrakt. Dette tyder på at eluatet gir større fargeforandring enn GA per gram tørrvekt. Fargeforandringen skjer når Folin-Ciocalteu reagenset blir redusert ved elektronoverføring fra fenolforbindelser.

Imidlertid kan det hende at ekstraksjonsmetodene brukt i denne oppgaven ikke er optimal for å ekstrahere fenoler. Andre studier har vist at kokende vann ekstraksjon resulterte i betydelig lavere TPC enn ekstraksjon med kaldt vann, noe som kan komme av at det varme vannet bryter ned noen florotannin-forbindelser (Wang, et al., 2012). Studier har også vist at det er hensiktsmessig å tilsette antioksidative midler (som askorbinsyre) i ekstraksjonsløsningen for å øke stabiliteten til fenolforbindelsene og dermed bevare deres antioksidative potensial. Bruken av opptil 0,3% askorbinsyre har vist seg å øke mengde florotanniner i ekstrakter av *F. vesiculosus*. Ekstraksjonen av fenolforbindelser fra naturstoffer er en kompleks oppgave på grunn av ulike parametere som ekstraksjonstid og temperatur, lagringsforholdene til ekstraktene og tilstedeværelsen av forstyrrende komponenter (Santos, et al., 2019).

4.5 Separasjon og påvisning av florotanniner

Analysen som ble brukt for å detektere florotanniner i artene var LC-MS, som er en analyse som kombinerer separasjonsmetoden HPLC og deteksjonsmetoden MS. Metoden var passende i denne oppgaven på bakgrunn av at man får separert, identifisert og kvantifisert stoffer, samtidig som man kan detektere massen/molekylvekten på ukjente komponenter (Latif, 2006; Kaklamanos et al., 2012). Metoden ble også brukt til å vurdere kompleksiteten i ekstraktene (f.eks TIC). Den beste LC-MS deteksjonen av florotanniner ble gjort i negativ modus, derfor ble det valgt å bruke kun resultater med negativ modus i BPC og MS-spekter. Studier har vist at florotanniner med større grad av polymerisering detekteres bedre i negativ modus (Kellogg, et al., 2014; Steevensz, et al., 2012). Siden masse-vinduet i LC-MS analysen var satt til m/z 100-1700, kan man tenke seg at de florotanninene med lav grad av polymerisering ikke ville kommet innenfor dette vinduet, og at negativ modus derfor fungerte best.

Florotanniner ble kun detektert i fire arter; *A. nodosum*, *P. Canaliculata*, *F. vesiculosus* og *D. aculeata*. De tre førstnevnte vokser alle høyt i fjæra og er utsatt for mer sollys. Det kan dermed tenkes at de har behov for mer antioksidanter (f. eks florotanniner) (Gupta & Abu-

Ghannam, 2011; Christophersen, 2013; Rueness, 2015; Li, et al., 2017;). *A. nodosum* har, etter *F. vesiculosus*, *F. spiralis*, *P. canaliculata* og *D. aculeata*, høyest fenolinnhold i AM-eluatet. Dette kan imidlertid være grunnen til at det også ble detektert florotanniner i AM-eluatet. I tillegg til å vokse øverst i fjæra (av alle artene) har *P. canaliculata* høy toleranse for uttørking. Som man vet beskytter også florotanniner mot uttørking, noe som kan forklare artens relativt høye fenolinnhold og deteksjonen av florotanniner med LC-MS (Gupta & Abu-Ghannam, 2011; Christophersen, 2013; Rueness, 2015; Li, et al., 2017). *F. vesiculosus* hadde høyest antioksidativ aktivitet (i både ORAC og FRAP) og antibakteriell aktivitet, av alle SPE-eluatene som ble testet. Dette er i samsvar med resultatene fra Folin-Ciocalteus metode hvor *F. vesiculosus* også hadde høyest fenolinnhold. LC-MS analysen underbygger dette, da *F. vesiculosus* hadde flest detekterte florotanniner i både positiv og negativ modus av alle SPE-eluatene. TIC og BPC bekrefter også dette, spesielt i forhold til fenolanalysen. BPC fra *F. vesiculosus* viste de høyeste toppene og man fant disse til å være florotanniner. I tillegg viste MS-spekteret innhold av en rekke m/z-verdier, hvor flere av dem sannsynligvis er florotanniner. Andre studier har også vist at florotanniner isolert fra *F. vesiculosus* har høy antibakteriell aktivitet (Imbs & Zvyagintseva, 2018). En grunn til den høye antioksidative aktiviteten og mange florotanniner detektert i *F. vesiculosus*, kan som nevnt være at arten vanligvis vokser relativt høyt i fjæra (høyere enn de andre *Fucus*-artene i denne oppgaven). *D. aculeata* hadde også relativt høyt fenolinnhold og antioksidativ aktivitet. Siden det ble detektert flere ulike florotanniner i LC-MS (tabell 6) kan man anta at fenolinnholdet og mye av aktiviteten detektert med ORAC og FRAP, skyldes florotanniner. Sett i sammenheng med fenolanalysen, underbygger TIC og BPC de resultatene som ble funnet for *D. aculeata*. I TIC, figur 19 negativ modus, ser man bort fra toppene med Rt på 7 min da ioner detektert (y-aksen) ikke kan sammenlignes med den antioksidative aktiviteten detektert i de to ulike eluatene. Dette er en indikasjon på at det ikke er denne forbindelsen som er årsaken til den antioksidative aktiviteten til *D. aculeata*. I BPC for denne arten ble de høyeste toppene i hvert eluat ikke funnet til å være florotanniner. Det virker sannsynlig at det ikke ble detektert noen florotanniner i de øvrige artene fordi de tydelig viste et lavt fenolinnhold, i tillegg til at de jevnt over viste lav antioksidativ aktivitet, foruten om *F. spiralis*. AM-eluatet fra *F. spiralis* viste nest høyest fenolinnhold etter analyse med Folin-Ciocalteus metode, men likevel ble ingen florotanniner detektert i LC-MS analysen. Dette kan være fordi Folin-Ciocalteus metoden har sine svakheter, siden reagenset ikke bare måler fenolforbindelser, men også kan

reagere med andre forbindelser og reduserende stoffer (tioler, vitaminer og nitrogenholdige stoffer) (Sánchez-Rangel, et al, 2013). *F. spiralis* viste også veldig høy antioksidativ aktivitet, men man kan altså anta at den aktiviteten skyldes andre stoffer enn florotanniner.

I SPE-eluatene fra *F. vesiculosus* ble det detektert florotanniner med 2-8 PG-enheter. Trenden i flere andre studier har også vært å detektere florotanniner med under 10 PG-enheter (Santos, et al., 2019). Det ble detektert flest florotanniner med 5 PG-enheter, og færrest florotanniner detektert med 8 PG-enheter. Generelt sett vil flere isomere florotanniner bli detektert jo flere PG-enheter det er i forbindelsene. Dette er fordi at man ved å øke antall PG-enheter vil øke den strukturelle diversiteten og kompleksiteten til florotanniner, siden PG-bindinger kan være lineære, forgreinet eller en kombinasjon av begge (Hermund, 2018). Grunnen til at det ble detektert forbindelser med samme elementsammensetning, men ulike retensjonstider skyldes ulike forgreininger/koblinger av PG-enhetene.

Man hadde forventet å se flere florotanniner i LC-MS analysen, men det kan hende det ble injisert for lite prøve og man dermed ikke fikk detektert det som eventuelt var av florotanniner i eluatene. I tillegg ble sensitiviteten på MS-maskinen stilt lavere enn optimalt for ikke å få med så mye «bakgrunns-støy». Andre studier har også vist at ekstraksjonsmetoder, med blant annet aceton, resulterer i et ekstrakt som inneholder mye polysakkarider og andre metabolitter som vil svekke separasjon og karakterisering av fenolforbindelser fra makroalger i for eksempel LC-MS (Santos, et al., 2019). Dermed kan det jo tenkes at de valgte ekstraksjonsmetodene ikke var optimale for florotanniner. For fullstendig identifisering av de ulike florotanninene kreves det ytterligere analyser, for eksempel LC-MS/MS (fragmentering)-analyser og/eller kjernemagnetisk resonans (NMR, nuclear magnetic resonance) studier.

5 Konklusjon

Undersøkelsene i dette studiet har vist at det er tilstedeværelse av bioaktive forbindelser i de brunalgene som er studert. Av de to ulike ekstraksjonsmetodene som ble brukt kan man konkludere med at ekstraksjon med AM ga de beste resultatene, da det var eluater fra denne ekstraksjonen som ga høyest bioaktivitet, fenolinnhold og flest florotanniner detektert. Under den antioksidative testingen ble det brukt to metoder, ORAC og FRAP, hvor ORAC ga de resultatene med høyest antioksidativ aktivitet. Antibakteriell aktivitet ble testet mot både terrestriske og marine bakteriestammer, hvor den høyeste aktiviteten ble detektert mot *C. glutamicum*. Etter de nevnte undersøkelsene kan man konkludere med at det var sammenheng mellom bioaktiviteter og fenolinnhold, da de eluatene med høyest bioaktivitet også viste høyest fenolinnhold. Ved bruk av LC-MS teknologi ble det detektert florotanniner i fire av artene. Av alle arter brunalger studert hadde *F. vesiculosus* høyest bioaktivitet, høyest fenolinnhold og fleste florotanniner detektert.

6 Referanser

Aarnes, H., 2016. *tanniner*. [Internett]
Available at: <https://snl.no/tanniner>

Ahmed, N. & Ahmed, K., 2016. Chemical and Different Nutritional Characteristics of Brown Seaweed Lipids. *Advances in Science, Technology and Engineering Systems Journal*, 1(1), pp. 23-25.

Aldred, E. M., Buck, C. & Vall, K., 2009. Chapter 21 - Phenols. *Pharmacology : A Handbook for Complementary Healthcare Professionals*, pp. 149-166.

Andrews, J. M., 2001. Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, Volum 48, p. 5–16.

Assadian, O. et al., 2011. Minimum inhibitory (MIC) and minimum microbicidal concentration (MMC) of polihexanide and triclosan against antibiotic sensitive and resistant *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* strains. *GMS Krankenhhyg Interdiszip*, 6(1), p. Doc06.

Bentayeb, K., Vera, P., Rubio, C. & Nerín, C., 2014. The additive properties of Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) assay: The case of essential oils. *Food Chemistry*, Volum 148, pp. 204-208.

Cao, G., Alessio, H. M. & Cutler, R. G., 1993. Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. Volum 14, pp. 303-311.

Capon, R. J., 2001. Marine Bioprospecting – Trawling for Treasure and Pleasure. *European Journal of Organic Chemistry*, 2001(4).

Cerretani, L. & Bendini, A., 2010. Chapter 67 - Rapid Assays to Evaluate the Antioxidant Capacity of Phenols in Virgin Olive Oil. pp. 625-635.

Christophersen, C., 2013. Brunalger er enestående. *Dansk Kemi*, Issue 11.

Clardy, J., Fischbach, M. & Currie, C., 2009. The natural history of antibiotics. *Current biology : CB*, 19(11), pp. 437-441.

Cockayne, A., 1998. Bacterial Cell Walls. *Encyclopedia of Immunology (Second Edition)*, pp. 320-323.

Croteau, R., Kutchan, T. M. & Lewis, N. G., 2000. Natural Products (Secondary Metabolites). I: *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. s.l.:American Society of Plant Physiologists, p. 1250.

Dasgupta, A. & Klein, K., 2014. Chapter 2 - Methods for Measuring Oxidative Stress in the Laboratory. pp. 19-40.

Dias, D. A., Urban, S. & Roessner, U., 2012. A Historical Overview of Natural Products in Drug Discovery. *Metabolites*, 2(2), pp. 303-336.

- Ditlefsen, A. & Svihus, B., 2019. *antioksidanter*. [Internett]
Available at: <https://snl.no/antioksidanter>
- Earl, A. M., Losick, R. & Kolter, R., 2008. Ecology and genomics of *Bacillus subtilis*. *Trends in microbiology*, 16(6), pp. 269-275.
- Ebanks, R. O. et al., 2006. Expression of and secretion through the *Aeromonas salmonicida* type III secretion system. *MICROBIOLOGY*, 152(5).
- Eom, S.-H., Kim, Y.-M. & Kim, S.-K., 2012. Antimicrobial effect of phlorotannins from marine brown algae. *Food and Chemical Toxicology*, 50(9), pp. 3251-3255.
- Fyfe, L., Coleman, G. & Munro, A., 1986. A comparison of the distribution of extracellular proteins produced by the protease-secreting organism *Aeromonas salmonicida* during aerobic and anaerobic growth. *Annales de l'Institut Pasteur / Microbiologie*, 137(1), pp. 117-123.
- Gabrielsen, K. L., 2013. Marin bioprospektering - på jakt etter unike molekyler fra marine dyr og alger. *Havforskningsrapporten 2013*, pp. 128-129.
- Gomez-Zavaglia, A. et al., 2019. The Potential of Seaweeds as a Source of Functional Ingredients of Prebiotic and Antioxidant Value. *Antioxidants (Basel)*, p. 406.
- Guaadaoui, A. et al., 2014. What is a bioactive compound? A combined definition for a preliminary consensus. *International Journal of Nutrition and Food Sciences*, 3(3), pp. 174-179.
- Gupta, S. & Abu-Ghannam, N., 2011. Bioactive potential and possible health effects of edible brown seaweeds. *Trends in Food Science & Technology*, 22(6), pp. 315-326.
- Harvey, A. L., 2008. Natural products in drug discovery. *Drug Discovery Today*, 13(19-20), pp. 894-901.
- Haug, T. et al., 2004. Antibacterial activities in various tissues of the horse mussel, *Modiolus modiolus*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 85(2), pp. 112-119.
- Henriksen, S. D., Bøvre, K. & Smebye, M. L., 2019. *antibiotika*. [Internett]
Available at: <https://sml.snl.no/antibiotika>
- Hermund, D. B., 2018. 10 - Antioxidant Properties of Seaweed-Derived Substances. *Bioactive Seaweeds for Food Applications : Natural Ingredients for Healthy Diets*, pp. 201-221.
- Hill, J., 2008. *Laminaria digitata* Oarweed. *Marine Life Information Network: Biology and Sensitivity Key Information Reviews*.
- Hill, J. & White, N., 2008. *Ascophyllum nodosum* Knotted wrack. *Marine Life Information Network: Biology and Sensitivity Key Information Reviews*.
- Imbs, T. I. & Zvyagintseva, T. N., 2018. Phlorotannins are Polyphenolic Metabolites of Brown Algae. *Russian Journal of Marine Biology*, Volum 44, p. 263-273.

- Jackson, A., 2008. *Fucus serratus* Toothed wrack. *Marine Life Information Network: Biology and Sensitivity Key Information Reviews*.
- Jensen, I.-J., 2008. *Changes in the antioxidative capacity of saithe (Pollachius virens) and shrimp (Pandalus borealis) press juice and muscle during a simulated gastrointestinal digestion.*, s.l.: s.n.
- Kaklamanos, G., Aprea, E. & Theodoridis, G., 2012. Chapter 9 - Mass Spectrometry. *Chemical Analysis of Food: Techniques and Applications*, pp. 249-283.
- Kalinowski, J. et al., 2003. The complete *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 genome sequence and its impact on the production of l-aspartate-derived amino acids and vitamins. *Journal of Biotechnology*, 104(1-3), pp. 5-25.
- Kaper, J. B., Nataro, J. P. & Mobley, H. L. T., 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*, Volum 2, pp. 123-140.
- Kellogg, J., Grace, M. H. & Lila, M. A., 2014. Phlorotannins from Alaskan Seaweed Inhibit Carbohydrate Enzyme Activity. *Marine Drugs*, 12(10), pp. 5277-5294.
- Kumar, G., Menanteau-Ledouble, S., Saleh, M. & El-Matbouli, M., 2015. *Yersinia ruckeri*, the causative agent of enteric redmouth disease in fish. *Veterinary Research*, 46(103).
- Latif, Z., 2006. Isolation by Preparative High-Performance Liquid Chromatography. *Natural Products Isolation*, Volum 20, pp. 213-232.
- Leisner, J. J. et al., 2007. *Carnobacterium*: positive and negative effects in the environment and in foods. *FEMS microbiology reviews*, 31(5), pp. 592-613.
- Liebl, W., 2005. *Corynebacterium* Taxonomy. *Handbook of Corynebacterium glutamicum*, p. 21.
- Li, Y. et al., 2017. Extraction and Identification of Phlorotannins from the Brown Alga, *Sargassum fusiforme* (Harvey) Setchell. *Marine drugs*, 15(2), p. 49.
- Li, Y.-X., Wijesekara, I., Li, Y. & Kim, S.-K., 2011. Phlorotannins as bioactive agents from brown algae. *Process Biochemistry*, 46(12), pp. 2219-2224.
- Lorenzo, J. M. et al., 2018. Chapter 3 - Main Groups of Microorganisms of Relevance for Food Safety and Stability: General Aspects and Overall Description. *Innovative Technologies for Food Preservation*, pp. 53-107.
- Magnadóttir, B. & Guðmundsdóttir, B., 1992. A comparison of total and specific immunoglobulin levels in healthy Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and in salmon naturally infected with *Aeromonas salmonicida* subsp. *achromogenes*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 32(1-2), pp. 179-189.
- Mainous, M. E., Kuhn, D. D. & Smith, S. A., 2011. Efficacy of Common Aquaculture Compounds for Disinfection of *Aeromonas hydrophila*, *A. salmonicida* subsp. *salmonicida*,

and *A. salmonicida* subsp. *achromogenes* at Various Temperatures. *North American Journal of Aquaculture*, 73(4), pp. 456-461.

Mekinic, I. G. et al., 2019. Phenolic Content of Brown Algae (Pheophyceae). Species: Extraction, Identification, and Quantification. *biomolecules*, 9(6), p. 244.

Mendez, J., Cascales, D., Garcia-Torrico, A. I. & Guijarro, J. A., 2018. Temperature-Dependent Gene Expression in *Yersinia ruckeri*: Tracking Specific Genes by Bioluminescence During in Vivo Colonization. *Frontiers in microbiology*, 9(1098).

Mukhtar, S. & Ghor, I., 2012. Antibacterial Activity of Aqueous and Ethanolic Extracts of Garlic, Cinnamon and Turmeric Against *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Bacillus subtilis* DSM 3256.. *International journal of applied biology and pharmaceutical technology*, 3(2), pp. 131-136.

Ngo, D.-H. & Kim, S.-K., 2013. Sulfated polysaccharides as bioactive agents from marine algae. *International Journal of Biological Macromolecules*, Volum 62, pp. 70-75.

Ou, B. et al., 2002. Analysis of Antioxidant Activities of Common Vegetables Employing Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) and Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) Assays: A Comparative Study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(11), pp. 3122-3128 .

Pádua, D., Rocha, E., Gargiulo, D. & Ramos, A. A., 2015. Bioactive compounds from brown seaweeds: Phloroglucinol, fucoxanthin and fucoidan as promising therapeutic agents against breast cancer. *Phytochemistry Letters*, Volum 14, pp. 91-98.

Poole, C. F., 2003. New trends in solid-phase extraction. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 22(6), pp. 362-373.

Regjeringen, 2009. *Marin bioprospektering – en kilde til ny og bærekraftig verdiskaping*, s.l.: s.n.

Reith, M. E. et al., 2008. The genome of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* A449: insights into the evolution of a fish pathogen. *BMC Genomics*, 9(427).

Rueness, J., 2015. *brunalger*. [Internett]
Available at: <https://snl.no/brunalger>

Sánchez-Rangel, J. C. et al., 2013. The Folin–Ciocalteu assay revisited: improvement of its specificity for total phenolic content determination. Volum 5, pp. 5990-5999.

Santos, S. A. O. et al., 2019. The Quest for Phenolic Compounds from Macroalgae: A Review of Extraction and Identification Methodologies. *Natural and Bio-inspired Molecules*, 9(12), p. 847.

Seidel, V., 2012. Initial and Bulk Extraction of Natural Products Isolation. *Natural Products Isolation*, Volum 864, pp. 27-41.

- Shalaby, E. A., 2011. Algae as promising organisms for environment and health. *Plant signaling and behavior*, 6(9), pp. 1338-1350.
- Si, M. et al., 2014. Functional Characterization of *Corynebacterium glutamicum* Mycothiol S-Conjugate Amidase.
- Singh, I. P. & Sidana, J., 2013. 5 - Phlorotannins. *Functional Ingredients from Algae for Foods and Nutraceuticals*, pp. 181-204.
- Sirevåg, R., 2020. *E. coli*. [Internett].
- Skard, O., 2003. Alger. I: *Ville vekster : røtter i kulturhistorien*. Oslo: Landbruksforl., pp. 174-182.
- Skaugen, R., 2009. Mineralnæring. *Planteanatomi og plantefysiologi*, p. 46.
- Stamp, T., 2015. Dense [*Desmarestia*] spp. with filamentous red seaweeds on exposed infralittoral cobbles, pebbles and bedrock. *Marine Life Information Network: Biology and Sensitivity Key Information Reviews*.
- Steevensz, A. J. et al., 2012. Profiling Phlorotannins in Brown Macroalgae by Liquid Chromatography–High Resolution Mass Spectrometry. *Phytochemical Analysis*, 23(5), pp. 547-553.
- Stover, C. K. et al., 2000. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature*, Volum 406, pp. 959-964.
- Tadesse, M. et al., 2008. Screening for antibacterial and antifungal activities in marine benthic invertebrates from northern Norway. *Journal of Invertebrate Pathology*, 99(3), pp. 286-293.
- Tyler-Walters, H., 2008. Dabberlocks (*Alaria esculenta*). *Marine Life Information Network: Biology and Sensitivity Key Information Reviews*.
- Tønjum, T., 2020. *basiller*. [Internett]
Available at: <https://sml.snl.no/basiller>
- Tønjum, T., Bøvre, K. & Sletten, A., 2020. *Pseudomonas*. [Internett]
Available at: <https://sml.snl.no/Pseudomonas>
- Uggerud, E., 2013. *fenoler*. [Internett]
Available at: <https://snl.no/fenoler>
- Uggerud, E., 2018. *aryl*. [Internett]
Available at: <https://snl.no/aryl>
- Veterinærinstituttet, u.d. *Furunkulose*. [Internett]
Available at: <https://www.vetinst.no/sykdom-og-agens/furunkulose>
- Veterinærinstituttet, u.d. *Yersiniose hos fisk - Yersinia ruckeri*. [Internett]
Available at: <https://www.vetinst.no/sykdom-og-agens/yersinia-ruckeri-yersiniose>

Wang, T. et al., 2012. Antioxidant Capacities of Phlorotannins Extracted from the Brown Algae *Fucus vesiculosus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(23), pp. 5874-5883.

White, N., 2007. *Fucus distichus* A brown seaweed. *Marine Life Information Network: Biology and Sensitivity Key Information Reviews*.

White, N., 2008. *Fucus spiralis* Spiral wrack. *Marine Life Information Network: Biology and Sensitivity Key Information Reviews*.

White, N., 2008. *Fucus vesiculosus* Bladder wrack. *Marine Life Information Network: Biology and Sensitivity Key Information Reviews*.

White, N., 2008. *Pelvetia canaliculata* Channelled wrack. *Marine Life Information Network: Biology and Sensitivity Key Information Reviews*.

White, N. & Marshall, C., 2007. *Saccharina latissima* Sugar kelp. *Marine Life Information Network: Biology and Sensitivity Key Information Reviews*.

Wijesinghe, W. A. J. P. & Jeon, Y.-J., 2011. Biological activities and potential cosmeceutical applications of bioactive components from brown seaweeds: a review. *Phytochemistry Reviews*, Volum 10, pp. 431-443.

7 Appendix

7.1 Appendix 1

7.1.1 Kjemikalier

Oversikt over kjemikalier brukt i oppgaven.

Tabell 3. Oversikt over kjemikalier brukt i oppgaven

Kjemikalier/reagenser	Leverandør
Acetonitril	Honeywell, Muskegon, MI, USA
Maursyre	Merck KGaA, Darmstadt, Tyskland
Milli-Q vann	Millipore Corp., Bedford, MA, USA
6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (trolox)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Na ₂ HPO ₄ (Natriumfosfat)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Fluorescein sodium salt	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
2,2'-Azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
FeCl ₃ (Jern(III)klorid)	Merck KGaA, Darmstadt, Tyskland
2,4,6-Tri(2-pyridyl)-2-triazin (TPTZ)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Natriumacetat	Merck KGaA, Darmstadt, Tyskland
Eddiksyre	Merck KGaA, Darmstadt, Tyskland
Hydrogenklorid (HCl)	Merck KGaA, Darmstadt, Tyskland
Mueller-Hinton agar broth	Difco Laboratories, Detroit, USA

Lauryl broth	
Oxytetracyklin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Gallussyre (Gallic acid, GA)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Metanol (MeOH)	Merck KGaA, Darmstadt, Tyskland
Folin-Ciocalteu-reagens	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Na ₂ CO ₃ (natriumkarbonat)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

7.2 Appendix 2

7.2.1 Mueller-Hinton agar

Sammensetning av ingredienser i Mueller-Hinton agar.

Tabell 4. Sammensetning av ingredienser i Mueller-Hinton agar

Mueller-Hinton agarplater	
Innhold	Mengde
Milli-Q vann	1000 ml
Mueller-Hinton broth	21 g
Agar	20 g

7.3 Appendix 3

7.3.1 Mueller-Hinton dyrkningsmedium

Sammensetning av ingredienser i Mueller-Hinton dyrkningsmedium.

Tabell 5. Sammensetning av ingredienser i Mueller-Hinton dyrkningsmedium

Mueller-Hinton dyrkningsmedium	
Innhold	Mengde
Milli-Q vann	1000 ml
Mueller-Hinton broth	21 g

7.4 Appendix 4

7.4.1 Lauryl agar

Sammensetning av ingredienser i Lauryl agar.

Tabell 6. Sammensetning av ingredienser i Lauryl agar

Lauryl agarplater	
Innhold	Mengde
Milli-Q vann	1000 ml
Gjærekstrakt	5 g
Tryptone	10 g
NaCl	10 g
Agar	20 g
1M NaOH	1 ml

7.5 Appendix 5

7.5.1 Lauryl dyrkningsmedium

Sammensetning av ingredienser i Lauryl dyrkningsmedium.

Tabell 7. Sammensetning av ingredienser i Lauryl dyrkningsmedium

Lauryl dyrkningsmedium	
Innhold	Mengde
Milli-Q vann	1000 ml
Gjærekstrakt	5 g
Tryptone	10 g
NaCl	10 g
1M NaOH	1 ml

7.6 Appendix 6

7.6.1 Bakterieløsninger etter OD₆₀₀

Mengden bakterieløsning som ble tilsatt medium etter oppgitt absorban.

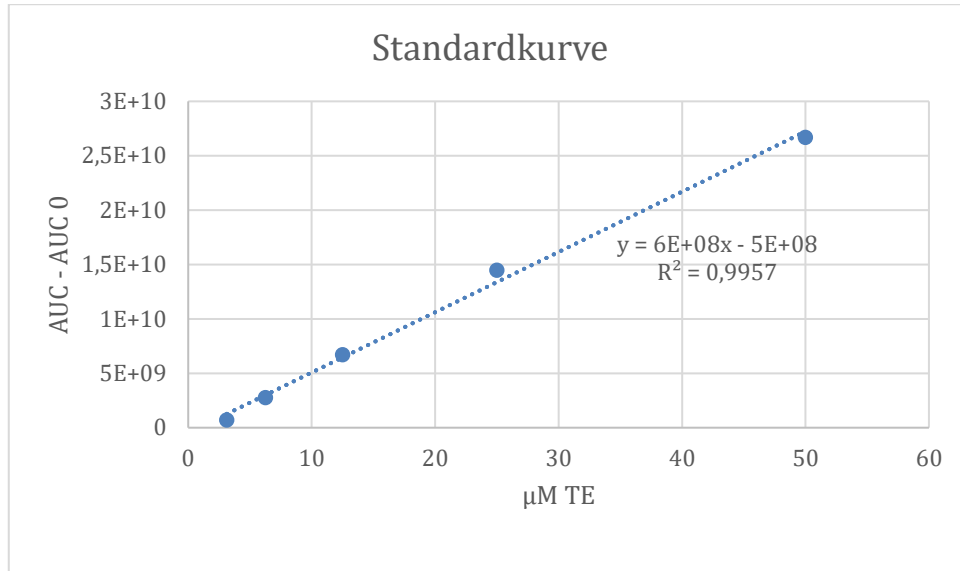
Tabell 6. Mengden bakterieløsning som ble tilsatt medium etter oppgitt absorban

Optisk tetthet (OD ₆₀₀)	
Absorbans (nm)	Mengde bakterieløsning i medie
0,003-0,010	20 µl i 10 ml medium
0,010-0,030	10 µl i 10 ml medium
0,030-0,075	5 µl i 10 ml medium
0,075-0,100	4 µl i 10 ml medium
0,100-0,150	3 µl i 10 ml medium

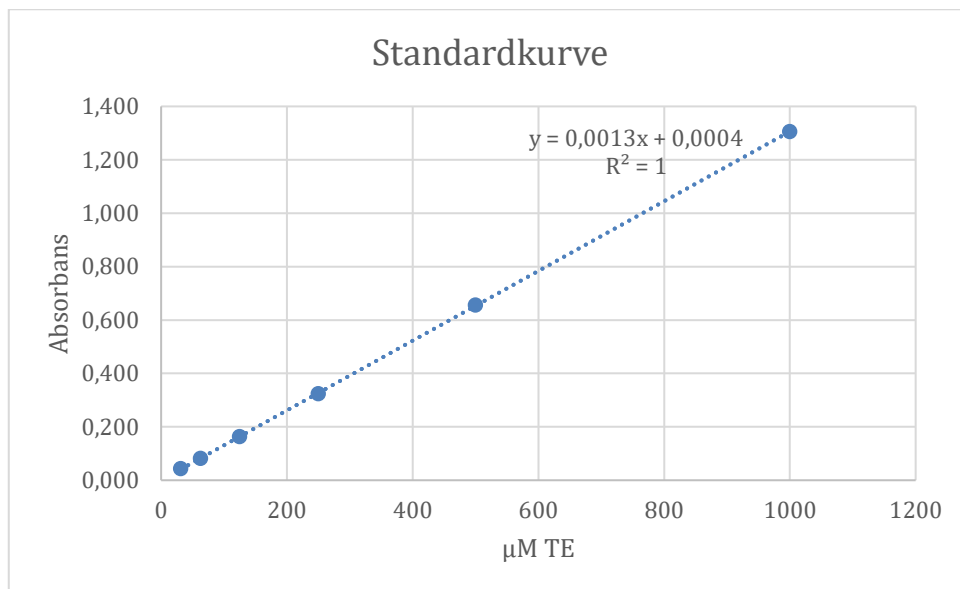
7.7 Appendix 7

7.7.1 Standardkurver

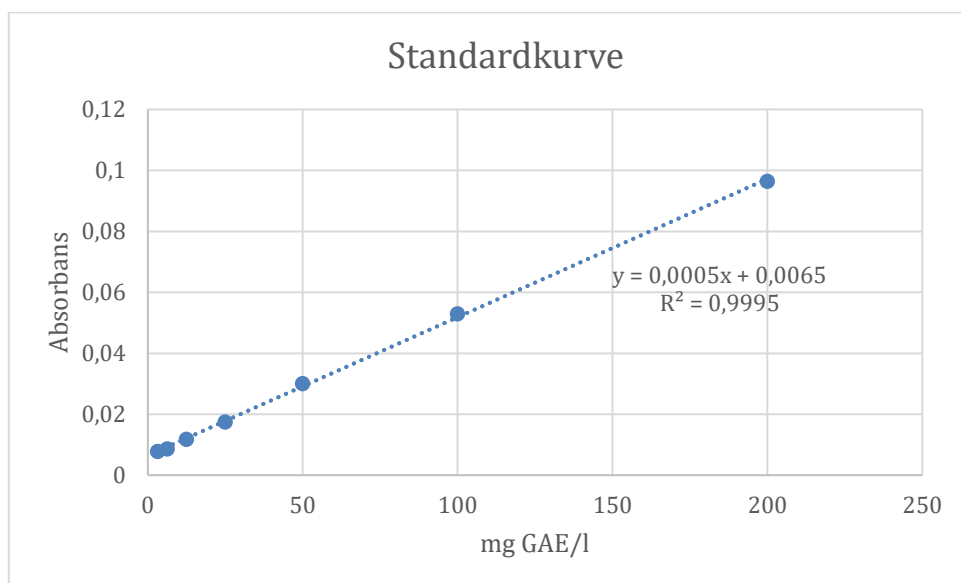
Standardkurver fra analysen ORAC og FRAP og Folin-Ciocalteus's metode



Figur 1. Standardkurve fra analysen ORAC



Figur 2. Standardkurve fra analysen FRAP



Figur 3. Standardkurve fra Folin-Ciocalteus' metode

7.8 Appendix 8

7.8.1 Antioksidativ aktivitet (ORAC og FRAP)

Den antioksidative aktiviteten til algene, detektert med de 2 ulike analysemetodene, ORAC og FRAP.

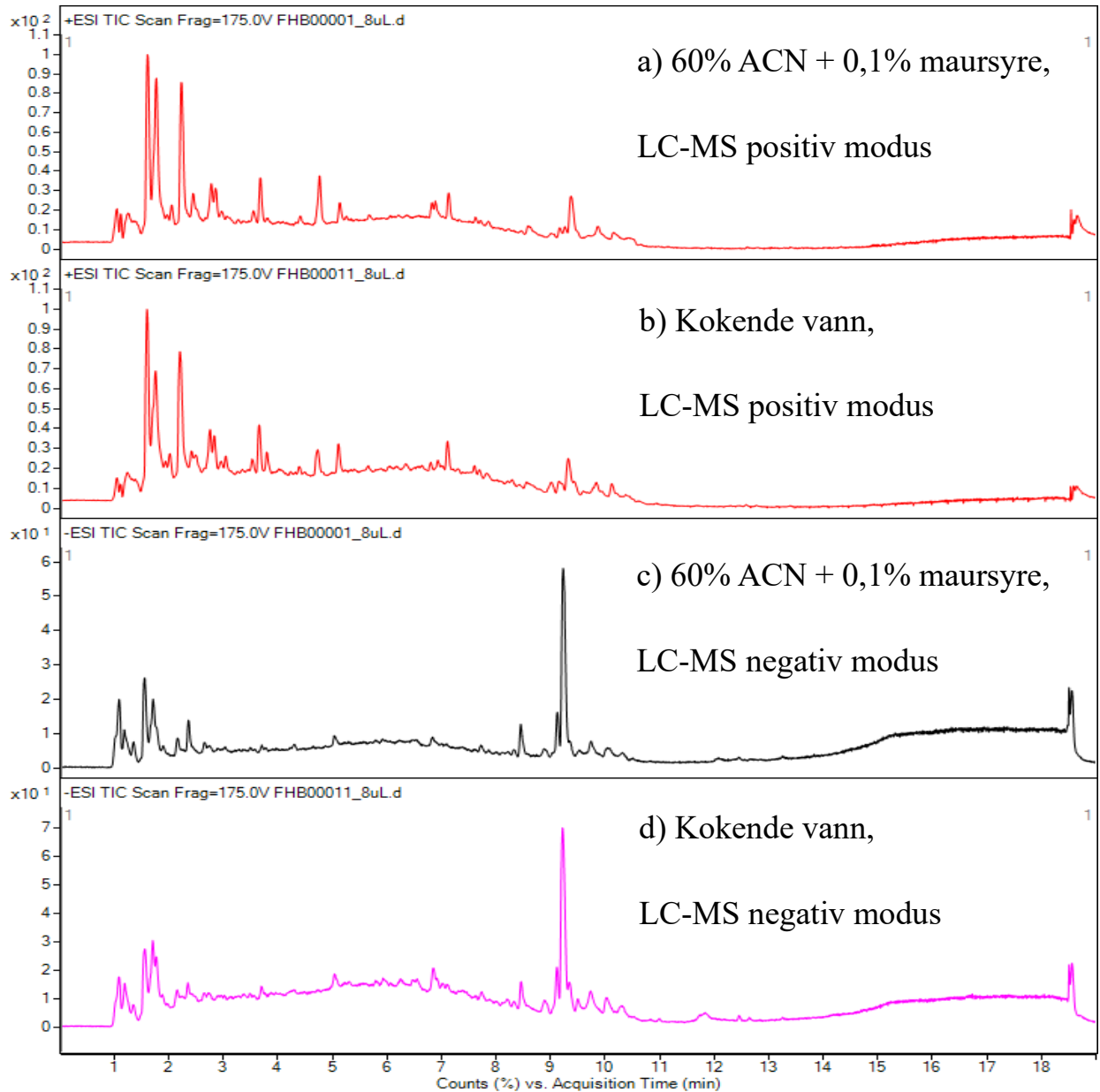
Tabell 7. Antioksidativ aktivitet ($\mu\text{mol TE/gram ekstrakt}$) i SPE-eluateer fra 10 ulike brunalger, generert fra 2 ulike ekstraksjonsmetoder, og testet ved hjelp av 2 ulike analysemetoder: ORAC og FRAP assay.

	60% acetonitril + 0,1% maursyre		Kokende Milli-Q vann	
	ORAC	FRAP	ORAC	FRAP
<i>A. esculenta</i>	219,5	53,9	281,4	80,6
<i>L. digitata</i>	140,6	12,3	175,7	17,0
<i>S. latissima</i>	208,4	17,6	388,3	35,0
<i>A. nodosum</i>	324,0	156,6	379,3	163,9
<i>F. distichus</i>	241,2	42,3	286,8	127,1
<i>F. serratus</i>	260,0	87,3	1250,7	196,2
<i>F. spiralis</i>	2249,0	532,8	443,8	184,4
<i>F. vesiculosus</i>	29368,3	2982,6	3413,8	1726,2
<i>P. canaliculata</i>	351,7	183,2	1015,7	151,0
<i>D. aculeata</i>	525,8	294,9	838,4	258,6

7.9 Appendix 9

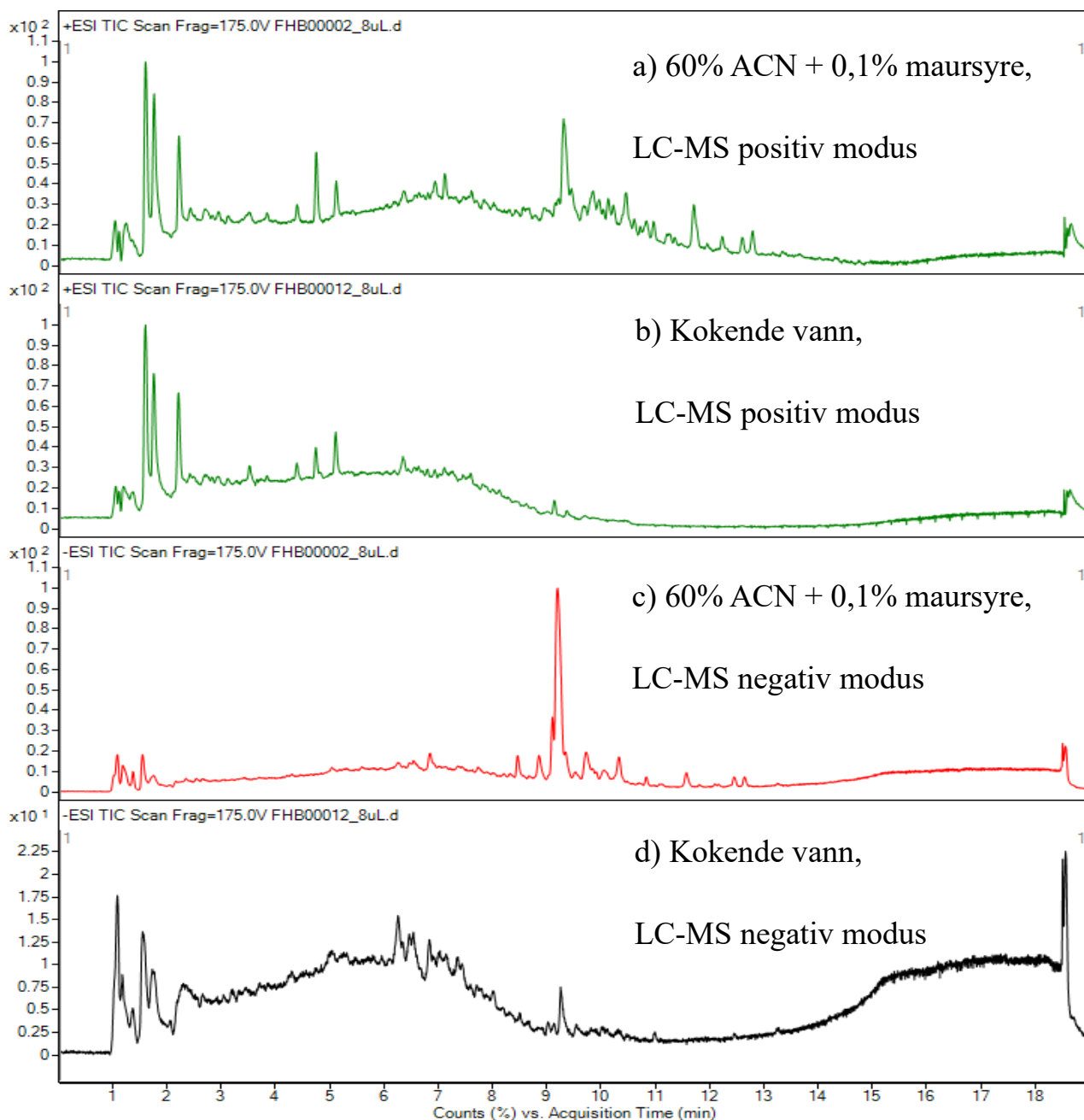
7.9.1 TIC

Total ionekromatogram (TIC, Total Ion Chromatogram) fra LC-MS analyser.



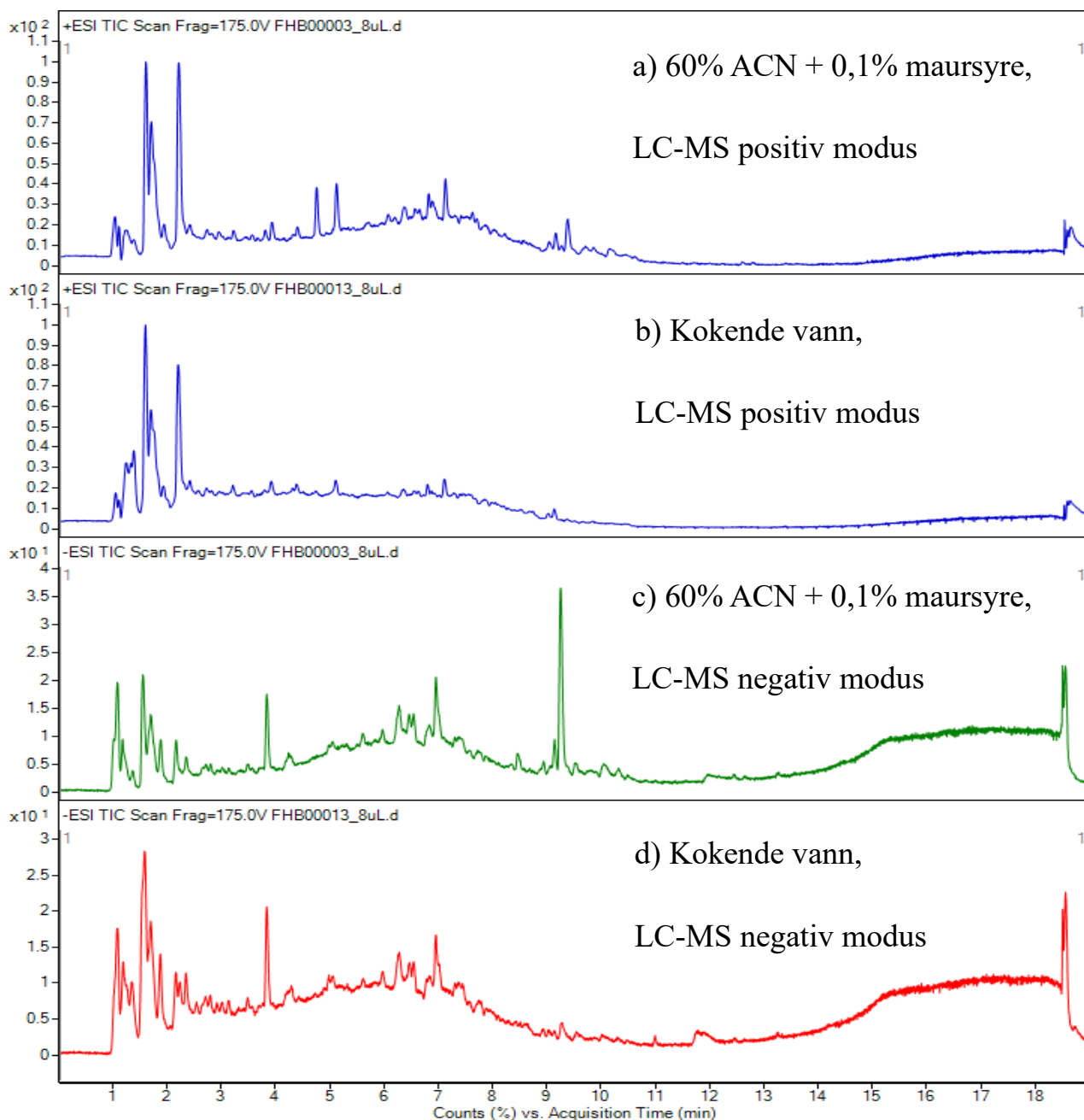
Figur 4. Total ionekromatogram (TIC) etter UHPLC-ESI-QToF MS av SPE-eluat fra *A. esculenta*. a) SPE-eluat av 60% ACN + 0,1% maursyre ekstrakt, detektert i positiv modus; b) SPE-eluat av kokende vann ekstrakt, detektert i positiv modus; c) SPE-eluat av 60% ACN + 0,1% maursyre ekstrakt, detektert i negativ modus; d) SPE-eluat av kokende vann ekstrakt, detektert i negativ modus. En mengde på 4 µg (8 µl) SPE-eluat ble injisert på LC-MS-systemet og materialet ble separert med bruk av en gradient bestående av 5-100% ACN over 15 min.

Toppen med Rt 9.2 min (figur 4) ble av MS-programvaren predikert å ha element-sammensetning C₂₅H₄₈O₁₁S (sannsynligvis et polart sulfolipid).



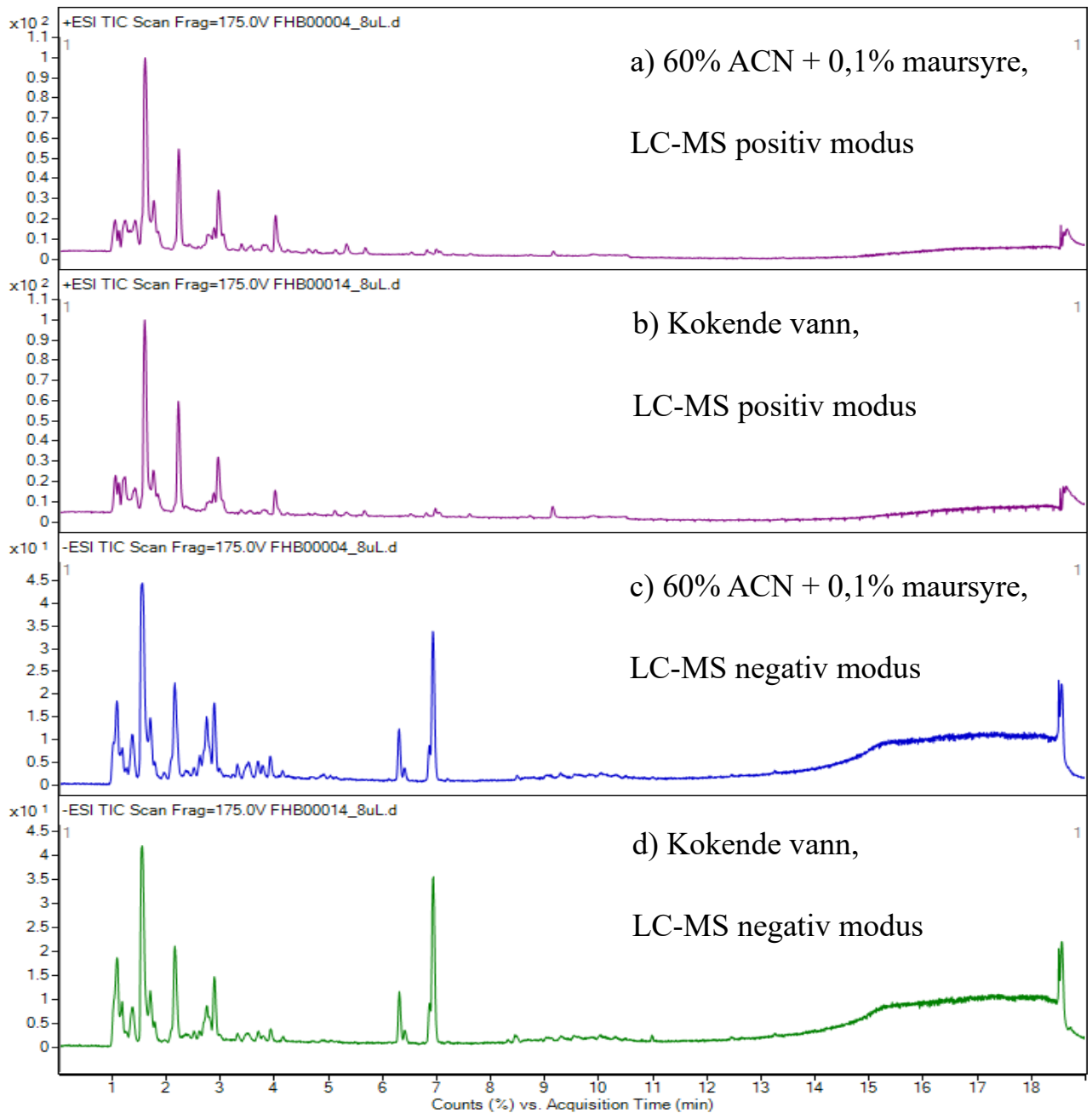
Figur 5. Total ionekromatogram (TIC) etter UHPLC-ESI-QToF MS av SPE-eluat fra *L. digitata*. a) SPE-eluat av 60% ACN + 0,1% maursyre ekstrakt, detektert i positiv modus; b) SPE-eluat av kokende vann ekstrakt, detektert i positiv modus; c) SPE-eluat av 60% ACN + 0,1% maursyre ekstrakt, detektert i negativ modus; d) SPE-eluat av kokende vann ekstrakt, detektert i negativ modus. En mengde på 4 µg (8 µl) SPE-eluat ble injisert på LC-MS-systemet og materialet ble separert med bruk av en gradient bestående av 5-100% ACN over 15 min.

Toppen med Rt 9.2 min (figur 5) ble av MS-programvaren predikert å ha element-sammensetning C₂₅H₄₈O₁₁S (sannsynligvis et polart sulfolipid).



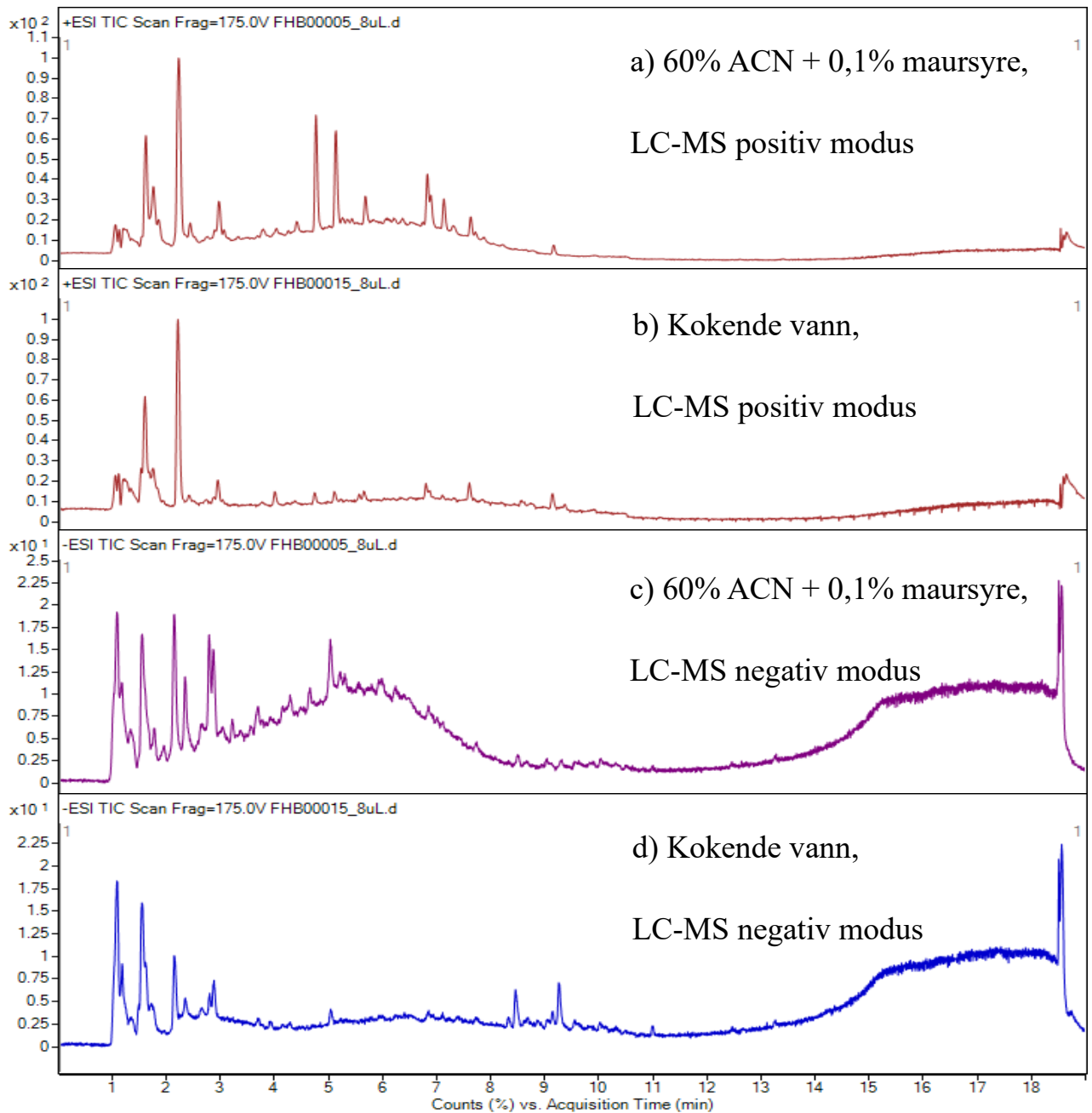
Figur 6. Total ionekromatogram (TIC) etter UHPLC-ESI-QToF MS av SPE-eluat fra *S. latissima*. a) SPE-eluat av 60% ACN + 0,1% maursyre ekstrakt, detektert i positiv modus; b) SPE-eluat av kokende vann ekstrakt, detektert i positiv modus; c) SPE-eluat av 60% ACN + 0,1% maursyre ekstrakt, detektert i negativ modus; d) SPE-eluat av kokende vann ekstrakt, detektert i negativ modus. En mengde på 4 µg (8 µl) SPE-eluat ble injisert på LC-MS-systemet og materialet ble separert med bruk av en gradient bestående av 5-100% ACN over 15 min.

Toppen med Rt 9.2 min (figur 6) ble av MS-programvaren predikert å ha element-sammensetning C₂₅H₄₈O₁₁S (sannsynligvis et polart sulfolipid).

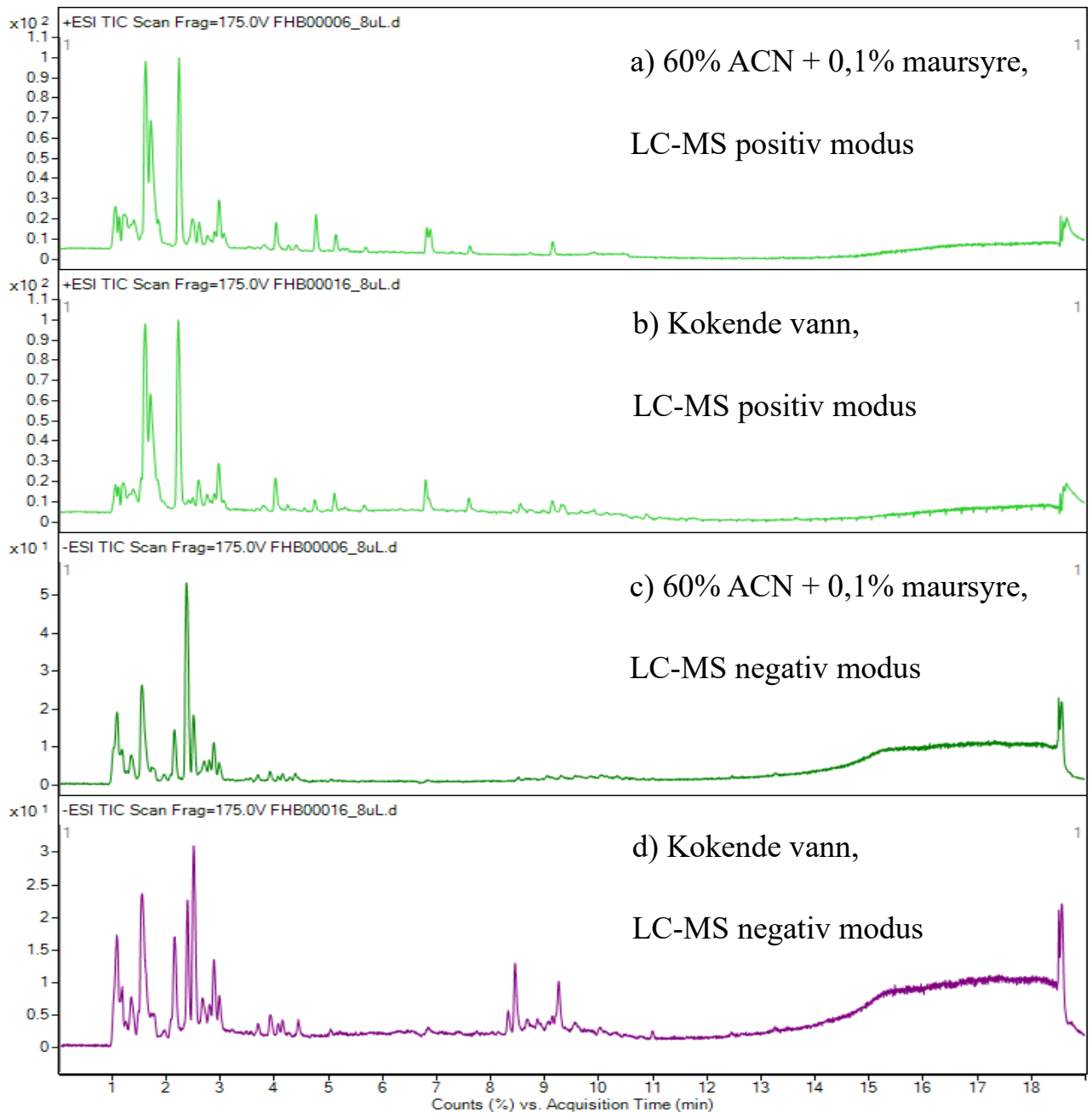


Figur 7. Total ionekromatogram (TIC) etter UHPLC-ESI-QToF MS av SPE-eluat fra *A. nodosum*. a) SPE-eluat av 60% ACN + 0,1% maursyre ekstrakt, detektert i positiv modus; b) SPE-eluat av kokende vann ekstrakt, detektert i positiv modus; c) SPE-eluat av 60% ACN + 0,1% maursyre ekstrakt, detektert i negativ modus; d) SPE-eluat av kokende vann ekstrakt, detektert i negativ modus. En mengde på 4 µg (8 µl) SPE-eluat ble injisert på LC-MS-systemet og materialet ble separert med bruk av en gradient bestående av 5-100% ACN over 15 min.

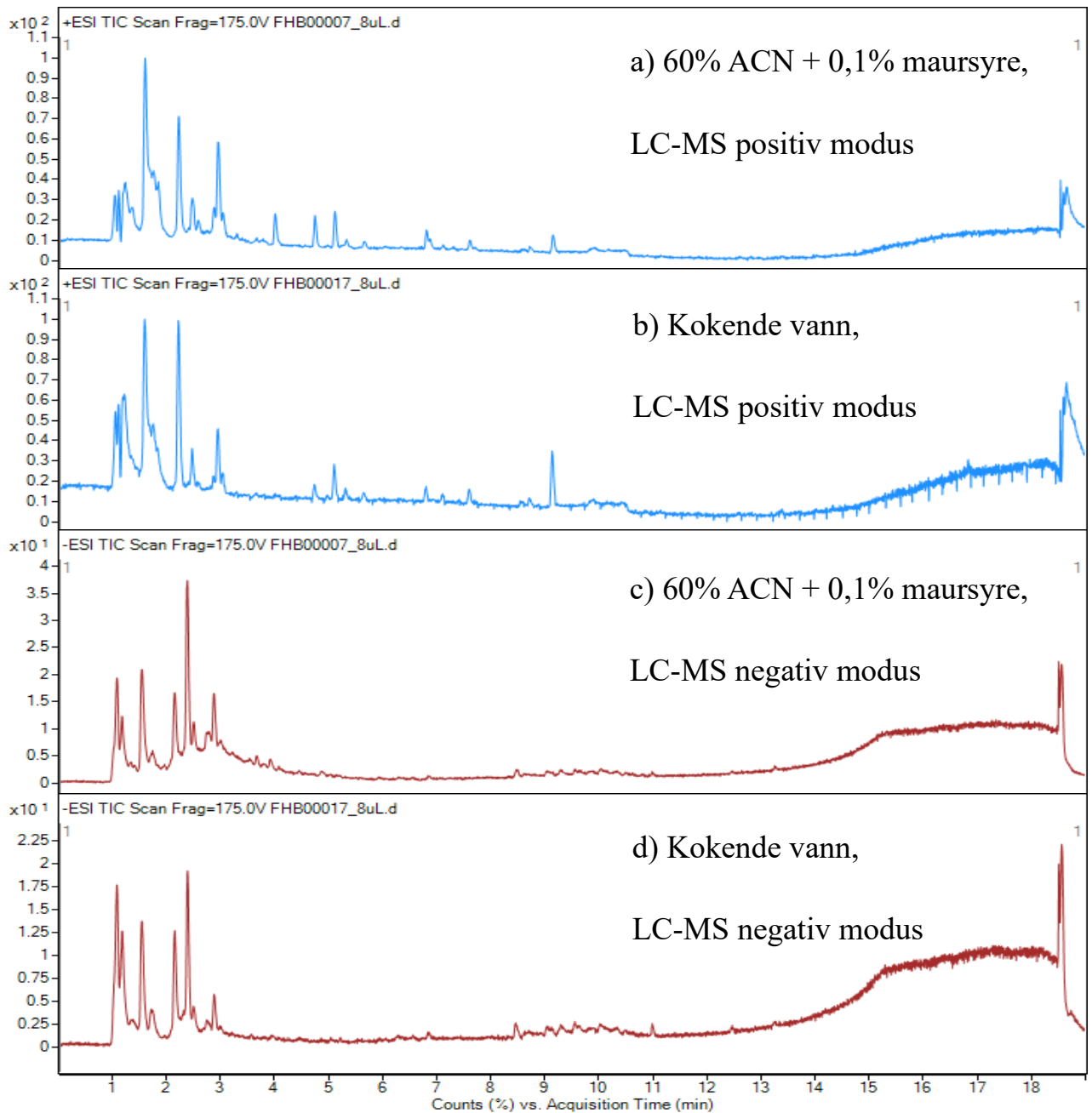
Toppen med Rt 7 min (figur 7) ble av MS-programvaren predikert å ha element-sammensetning C₁₀H₂₂O₄S (sannsynligvis et polart sulfolipid).



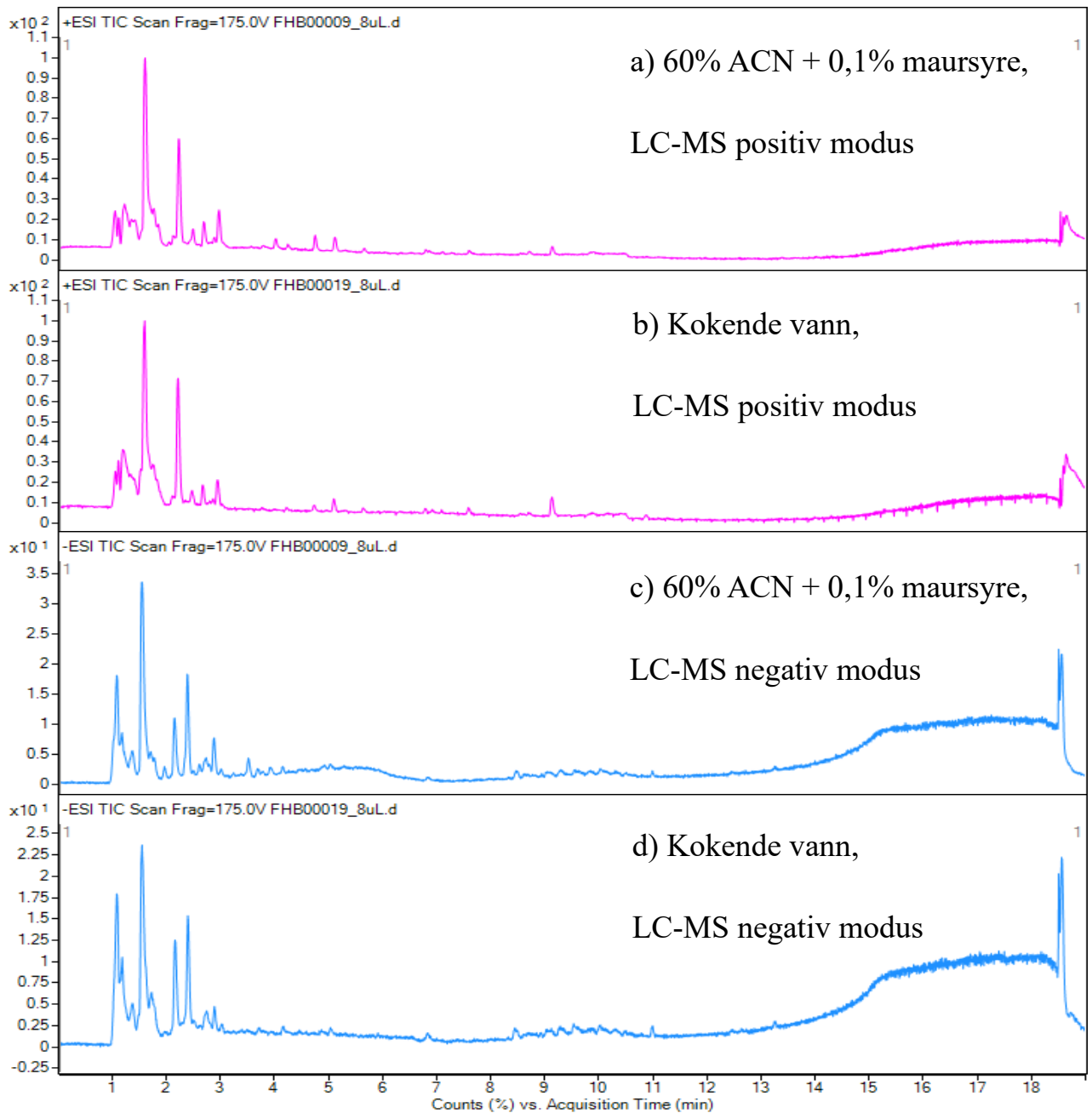
Figur 8. Total ionechromatogram (TIC) etter UHPLC-ESI-QToF MS av SPE-eluater fra *F. distichus*. a) SPE-eluat av 60% ACN + 0,1% maursyre ekstrakt, detektert i positiv modus; b) SPE-eluat av kokende vann ekstrakt, detektert i positiv modus; c) SPE-eluat av 60% ACN + 0,1% maursyre ekstrakt, detektert i negativ modus; d) SPE-eluat av kokende vann ekstrakt, detektert i negativ modus. En mengde på 4 µg (8 µl) SPE-eluat ble injisert på LC-MS-systemet og materialet ble separert med bruk av en gradient bestående av 5-100% ACN over 15 min.



Figur 9. Total ionekromatogram (TIC) etter UHPLC-ESI-QToF MS av SPE-eluate fra *F. serratus*. a) SPE-eluat av 60% ACN + 0,1% maursyre ekstrakt, detektert i positiv modus; b) SPE-eluat av kokende vann ekstrakt, detektert i positiv modus; c) SPE-eluat av 60% ACN + 0,1% maursyre ekstrakt, detektert i negativ modus; d) SPE-eluat av kokende vann ekstrakt, detektert i negativ modus. En mengde på 4 µg (8 µl) SPE-eluat ble injisert på LC-MS-systemet og materialet ble separert med bruk av en gradient bestående av 5-100% ACN over 15 min.



Figur 10. Total ionekromatogram (TIC) etter UHPLC-ESI-QToF MS av SPE-eluateer fra *F. spiralis*. a) SPE-eluat av 60% ACN + 0,1% maursyre ekstrakt, detektert i positiv modus; b) SPE-eluat av kokende vann ekstrakt, detektert i positiv modus; c) SPE-eluat av 60% ACN + 0,1% maursyre ekstrakt, detektert i negativ modus; d) SPE-eluat av kokende vann ekstrakt, detektert i negativ modus. En mengde på 4 µg (8 µl) SPE-eluat ble injisert på LC-MS-systemet og materialet ble separert med bruk av en gradient bestående av 5-100% ACN over 15 min.



Figur 11. Total ionekromatogram (TIC) etter UHPLC-ESI-QToF MS av SPE-eluater fra *P. canaliculata*. a) SPE-eluat av 60% ACN + 0,1% maursyre ekstrakt, detektert i positiv modus; b) SPE-eluat av kokende vann ekstrakt, detektert i positiv modus; c) SPE-eluat av 60% ACN + 0,1% maursyre ekstrakt, detektert i negativ modus; d) SPE-eluat av kokende vann ekstrakt, detektert i negativ modus. En mengde på 4 µg (8 µl) SPE-eluat ble injisert på LC-MS-systemet og materialet ble separert med bruk av en gradient bestående av 5-100% ACN over 15 min.

