

Antibakteriell aktivitet i uer (*Sebastes marinus*)

av

Espen Jacobsen



Mastergradsoppgave i fiskerifag

Marine næringsmidler (60 stp)



Institutt for marin bioteknologi

Norges fiskerihøgskole

Universitetet i Tromsø

November 2008

Forord

Denne mastergradsoppgaven ble gjennomført ved Institutt for marin bioteknologi, Norges fiskerihøgskole, Universitetet i Tromsø i perioden februar til november 2008.

Veiledere har vært førsteamanuensis Tor Haug og førsteamanuensis Klara Stensvåg ved IMAB, NFH. Takk for hjelpsomme tilbakemeldinger, på både store og små spørsmål underveis i arbeidet med oppgaven.

I tillegg vil jeg takke Olaf Styrvold for hjelp med å komme i gang med oppgaven og Margey Tadesse spesielt for hjelp med å kjøre MS.

Tilslutt vil jeg takke mine andre medstudenter på laboratoriet.

Til minne Jens Halvdan Mosli

Tromsø, november 2008

Espen Jacobsen

Sammendrag

Det ble i denne oppgaven gjennomført en undersøkelse for antibakteriell aktivitet i ulike vev og organer i vanlig uer (*Sebastes marinus*). Totalt ble 11 forskjellige organer undersøkt for antibakteriell aktivitet mot *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Corynebacterium glutamicum* og *Staphylococcus aureus*. Frysetørkede prøver ble ekstrahert med 60% (v/v) acetonitril tilsatt 0,1% trifluoreddiksyre. På grunn av høyt saltinnhold dannet løsningen to faser; en acetonitrilrik organisk fase og en vannfase rik på salt. Vannfasen ble videre separert vha. fast fase ekstraksjon (SPE). Eluater fra SPE og organisk fase ble deretter screenet mot de fire nevnte bakteriene for antibakteriell aktivitet i Bioscreen C. Aktivitet ble registrert i alle organer/vev. Særlig stor grad av aktivitet ble målt i enkelte vannfaseeluater fra blant annet; galleblære, hjerte, mage, milt, skinn og øye. *C. glutamicum* var generelt den mest følsomme bakterien av de testede bakteriestammene, men også den andre Gram positive bakterien *S. aureus* viste høy følsomhet overfor noen eluater. De Gram negative bakteriene *E.coli* og *P.aeruginosa* viste høyere toleranse for de testede prøvene. Det ble for noen få eluater funnet antibakteriell aktivitet mot disse. For alle ekstrakter fra organisk fase ble det registret liten eller ingen hemming.

På bakgrunn av resultatene etter den innledende screeningen og gjenværende materiale ble ekstrakter valgt ut til videre fraksjonering vha. høytrykk væskekromatografi (HPLC). Påfølgende antibakterielle aktivitetsmålinger av fraksjoner fra HPLC viste at for flere organer fant man igjen stor grad av antibakteriell aktivitet funnet i disse ved den innledende screeningen. Det ble i 80% SPE eluat fra skinn funnet fraksjoner med høy antibakteriell aktivitet med en retensjonstid på mellom 48-61 minutter fraksjonering. Disse ble testet vha. masse spektrometri (MS) og struktur ble identifisert ved flere av fraksjonene til å være lysofosfatidylkolin, nærmere bestemt palmitoyl-lysofosfatidylkolin (16:0).

Abstract

It was in this paper conducted a screening for antibacterial activity in various tissues and organs in common redfish (*Sebastes marinus*). A total of 11 different organs were tested for antibacterial activity against *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Corynebacterium glutamicum* and *Staphylococcus aureus*. Freezedried samples were extracted with 60% (w/v) acetonitrile added 0,1% trifluoroacetic acid. Because of high amount of salt the solution separated into two phases; one organic phase rich in acetonitrile and one water phase rich in salt. The water phase was further separated using solid phase extraction (SPE). Eluates from SPE and organic phase were then screened against the four bacteria for antibacterial activity in Bioscreen C. Activity were registered for all organs/tissues. Particular high activity were found in some water phase eluates from; gall bladder, heart, gut, spleen, skin and eye. *C. glutamicum* was in general the most sensitive test-bacterium, but also the other Gram positive bacteria *S. aureus* showed high sensitivity against some organs. The Gram negative bacteria *E. coli* and *P. aeruginosa* showed a lot higher tolerance for the tested samples, and for some extracts there were registered little or no inhibition.

The results from the initial screening and remaining material were considered when choosing extracts for further fractionating using high performance liquid chromatography (HPLC). Subsequent measurements of antibacterial activity showed that for some extracts the previous demonstrated antibacterial activity was retained from the initial screening. There was in 80% SPE eluat from skin found fractions with high antibacterial activity with a retention time of about 48-61 minutes. These were further tested using mass spectrometry (MS) and a structure was identified from some of the fractions to be lysophosphatidylcholine, more precisely palmitoyl-lysophosphatidylcholine (16:0).

Innholdsfortegnelse

1	INNLEDNING	5
1.1	BAKGRUNN.....	5
1.2	FOSFATIDYLKOLIN.....	6
1.2.1	Lysofosfatidylkolin.....	7
1.3	HENSIKT	8
2	MATERIALE OG METODE	9
2.1	RÅSTOFF	9
2.2	KJEMIKALIER OG UTSTYR.....	10
2.3	LØSEMIDDEL-EKSTRAKSJON.....	11
2.4	FAST FASE EKSTRAKSJON (SOLID PHASE EXTRACTION, SPE)	12
2.5	PRØVEMATERIALE.....	12
2.5.1	Vekt tørrstoff	12
2.5.2	Skjematisk fremstilling av ekstraksjons –og renselsesmetodene av prøvemateriale.....	13
2.6	BAKTERIESTAMMER OG VEKSTFORHOLD	14
2.7	ANTIBAKTERIELL AKTIVITETSTESTING AV SPE-ELUATER OG ACN-EKSTRAKTER..	14
2.8	HPLC (HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY).....	15
2.9	ANTIBAKTERIELL TESTING AV HPLC-FRAKSJONER I BIOSCREEN C	16
2.10	MS (MASSE SPEKTROMETRI).....	16
3	RESULTATER	18
3.1	ANTIBAKTERIELL AKTIVITET	18
3.1.1	Antibakteriell aktivitet funnet i skinn.....	20
3.1.2	Antibakteriell aktivitet funnet i milt.....	21
3.2	HPLC-FRAKSJONERING AV AKTIVE SPE-ELUATER OG ACN-EKSTRAKTER	22
3.2.1	HPLC fraksjonering av skinn 80% SPE.....	22
3.2.2	HPLC fraksjonering av milt 80% SPE.....	25
3.2.3	HPLC-fraksjonering av milt 10% SPE	26
3.2.4	HPLC fraksjonering av milt ACN ekstrakt.....	27
3.2.5	HPLC-fraksjoner med andre materialer	28
3.3	MS AV FRAKSJONER AV SKINN 80% SPE.....	30
3.3.1	MSMS av fraksjoner av skinn 80% SPE.....	32
4	DISKUSJON	34
4.1	VIDERE ARBEID	36
4.2	KONKLUSJON	36
5	REFERANSER	37
5.1	INTERNETTADRESSER	38
6	VEDLEGG	39

1 Innledning

1.1 Bakgrunn

Utviklingen av stadig flere antibiotikaresistente bakterier har gjort det nødvendig å lete etter nye antibakterielle forbindelser fra nye kilder. Det marine miljøet er i så måte enestående rikt på muligheter når det gjelder oppdagelse av nye forbindelser. Verdenshavene dekker 71% av jordens overflate og utgjør omkring halvparten av det totale biologiske mangfoldet, som estimeres til mellom 3 til 500×10^6 forskjellige organismer. Estimerer for den marine makrofaunaen alene er mellom 0,5 til 10×10^6 organismer, med en større bredde i klassifiseringen av mangfold enn for landlevende organismer (De Vries og Hall 1994).

Fisk er i nær kontakt med omgivelsene, som kan inneholde store mengder bakterier og virus. Mange av disse er saprofytiske, noen er patogene og begge kan bryte ned fiskevev. Likevel kan fisk, under normale forhold, leve i en sunn tilstand hvor skadelige mikrober blir uskadeliggjort av en rekke mekanismer som inngår i det medfødte immunforsvaret hos fisk. Disse mekanismene er det første forsvaret mot invaderende mikrober og hindrer at de fester seg, invaderer eller formerer seg på eller i vev. Denne beskyttelsen kan deles inn i tre viktige virkemåter. For det første er disse reaksjonene ikke spesifikke og er derfor ikke avhengig av gjenkjenning av spesielle molekyllære strukturer hos mikrobene. Videre starter disse mekanismene med ingen eller svært liten forsinkelse som dermed gir invaderende patogener liten tid til å etablere seg på fisken. For det tredje er de relativt temperatuavhengige. For kaldblodige vertebrater er disse karakteristikene veldig viktige fordi det spesifikke immunforsvaret bruker betydelig lengre tid på å reagere og er veldig temperaturavhengig. Eksempelvis kan nevnes at for laks tar produksjon av antistoff 4-6 uker ved optimal temperatur, og mange patogener kan drepe fisk i løpet av noen dager med infeksjon (Ellis 2001).

En viktig del av det medfødte immunforsvaret er antimikrobielle peptider. Disse korte, strukturelt enkle, proteinene har den egenskapen at de kan trenge gjennom membraner og raskt begynne å bryte ned bakterier raskere enn mikroben kan reproducere seg selv (Gallo 2005). Disse antimikrobielt aktive molekyllene er eksempel på bioaktive forbindelser som finnes i organismer.

Fosfatidylkolin er et annet eksempel på bioaktive forbindelser med antibakteriell aktivitet. Disse lipidene er viktige byggesteiner i membraner i eukaryote celler og Kondo et. al., (1985) viser at de har flere virkemekanismer mot bakterier.

Vanlig uer (*Sebastes marinus*) er en kommersielt viktig matfisk. Finnes i store deler av Nord Atlanteren langs den Europeiske og Nord Amerikanske kystlinjen [6]. Norske fangster av uer skjer hovedsakelig utenfor kysten av Nord-Norge (Fiskeridirektoratet). Aldersbestemmelse har vist seg vanskelig for uer, da fisken vokser sakte og når høy levealder. Stransky et. al., (2005), gir den første radiometriske aldersbestemmelsen for *S. marinus*, fanget i Irminger havet mellom Island og Grønland. Alder ble bestemt for individer mellom 10-55 cm lange varierte fra 3 til 31 år, fanget på mellom 97 til 386 meters dyp.

1.2 Fosfatidylkolin

Fosfatidylkolin (1,2-dehexadecanoyl-sn-glycero-3-fosfokolin) er et av de mest vanlige fosfolipidene i dyr og planter, og er en av de viktigste bestanddelene i cellemembraner hos pattedyr (Kondo et. al. 1985). Fosfatidylkolin utgjør en stor del av det lipide dobbeltlaget i cellemembraner, hvor de amfipatiske molekylene danner en todimensjonal struktur hvor de hydrofobe endene står mot hverandre bort fra omgivelsene og de polare gruppene danner overflaten. Fosfatidylkolin består av en glyserolgruppe som er bundet til to hydrofobe fettsyrekjeder og en hydrofil fosfatgruppe med esterbindinger ved de tre oksygenatomene i glyserolkomponenten (fig.3) [1].

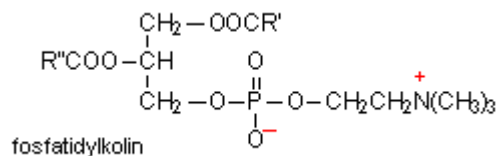


Fig. 3. Fosfatidylkolin består av en glyserolgruppe som er bundet til to fettsyrekjeder (indikert ved R' og R'') og en fosfatgruppe.

Det er flere mekanismer i biosyntesen av fosfatidylkolin i dyr og planter. Kolin blir ikke selv syntetisert av celler og er derfor et essensielt næringsstoff. Det må bli tatt opp gjennom mat eller fra nedbrytning av eksisterende lipider med kolin. Kolin som blir tatt opp i celler, blir umiddelbart fosforylert inne i cellen ved kolin kinase til

fosfatkolin, som reagerer med cytidin trifosfat til å danne cytidin difosfatkolin. Enzymet cytidin difosfatkolin:1,2-diacylglycerol kolinfosfattransferase i cytoplasma katalyserer reaksjonen til komponenten sn-1,2-diacylglycerol som danner fosfatidylkolin. Dette er den vanligste måten fosfatidylkolin blir syntetisert på i dyr og planter (fig. 4) (The lipid library).

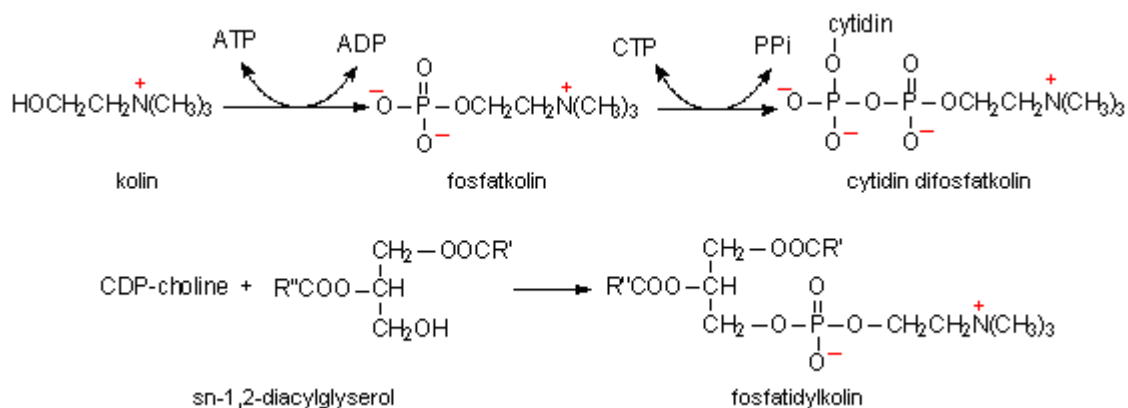


Fig. 4. Vanligste reaksjon for syntetisering av fosfatidylkolin i dyr og planter. Kolin blir i trinn en fosforylert til fosfatkolin, som videre blir dannet til cytidin difosfatkolin (CDP) i trinn to. CDP + sn-1,2-diacylglycerol blir katalysert i prosessen som gir fosfatidylkolin.

1.2.1 Lysofosfatidylkolin

Lysofosfatidylkolin kan finnes i små mengder i de fleste vev. Det blir dannet ved hydrolyse av fosfatidylkolin vha. enzymet fosfatlipase _{A2} (The lipid library), både på et fysiologisk nivå og patologisk nivå som ved degradering av celler (Kondo et. al., 1985). Lysofosfatidylkolin har betennelsesfremmende egenskaper *in vitro*, hvor degraderingsproduktene fungerer som næring (Kondo et. al., 1985), og er kjent for å være en patologisk komponent i oksiderte lipoproteiner i plasma og i aterosklerotiske skader. I den senere tid er det også funnet til å ha funksjoner i celledisignalisering, og spesifikke reseptorer har blitt identifisert (The lipid library).

Molekylet består av en glyserolgruppe som er bundet til en fettsyrekjede og en fosfatgruppe. Fettsyrekjeden kan variere i antall karbonatomer, som gir opphav til mange varianter av dette molekylet (fig. 5).

Lysofosfatidylkolin er kjent for å ha hemolystiske egenskaper. Tilstedeværelsen av både en hydrofob og hydrofil halvdel gir lipidet en sterk overflate aktivitet. I Kondo et. al., (1985) presenteres lysofosfatidylkolin (LPC) testet mot *M. phlei*, *S. aureus* og *E. coli* for antibakteriell aktivitet. LPC dreper mykobakterier etter

frigivelse av fettsyrekjeder. Mot *Staphylococcus* viser LPC (inkludert 16:0) en annen bakteriedrepende effekt, ved at det skjer en umiddelbar reaksjon ved påvirkning uavhengig av molekylstruktur. Den antibakterielle aktiviteten tilskrives LPC molekylet som en helhet og dets detergerende funksjon som ved hemolytisk virkning. LPC viste ingen aktivitet for *Escherichia*.

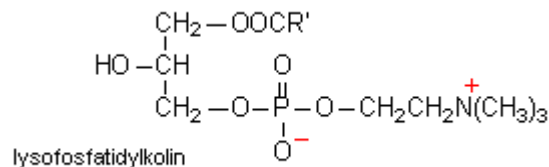


Fig. 5. Lysofosfatidylkolin består av en glyserolgruppe som er bundet til en fettsyrekjede (indikert ved R') og en fosfatgruppe.

1-palmitoyl-2-hydroxy-sn-glycero-3-fosfatkolin er navnet til et lysofosfatidylkolin molekyl med 16 karbonatomer i fettsyrekjeden, hvor palmitoyl er navnet på fettsyrekjeden (16:0) (Avanti Polar Lipids, Inc).

1.3 Hensikt

Det er gjort lite arbeid omkring antibakterielle forbindelser i *S. marinus*. Det ble i denne oppgaven derfor gjort et bredt søk for antibakteriell aktivitet i uer med ønske om å kartlegge eventuelle antibakterielle forbindelser i fiskens organer. Det er tidligere påvist antimikrobielle forbindelser i marine organsimer tidligere (Haug et. al., 2002, 2002, 2004) og påvist antibakterielle forbindelser i skinn hos *Sebastes schlegeli* testet mot *A. hydrophila*, *A. salmonicida*, *P. damsela*, *V. parahaemolyticus* og *S. putrefaciens* (Nagashima et. al., 2003). Videre ble det forsøkt gjort forsøk på å isolere og karakterisere noen av de aktive komponentene.

2 Materiale og metode

2.1 Råstoff

Åtte runde uer (*Sebastes marinus*) på 2-3 kg hver, ble levert av Dragøy i januar (leveranse I). Fisken ble levert på is og behandlet innen ett døgn etter fangst. Ekstra materiale fra fire uer på 1-2 kg hver ble hentet fra Malangen i mai/juni (leveranse II). Fra disse ble det gjort screening på lever og øyevæske, og videre ble HPLC-fraksjonering på hjerte, milt, galleblære og øye gjennomført. I tillegg ble det gjort ny antibakteriell aktivitetsmåling i Bioscreen C på skinn og videre HPLC-fraksjonering på annet materiale; levert fra Dragøy (leveranse III). Leveranse II og III var nødvendige da leveranse I, for flere organer, ikke ga tilstrekkelig med materiale til både screening i Bioscreen C og fraksjonering vha. HPLC.

Uer er kjent for å ha finner med giftige pigger, spesielt en kraftig pigg i fremre del av ryggfinner. Man vet lite om innholdet i disse piggene. Startet derfor ved å skjære av ryggfinne, halefinne og brystfinner, heretter kalt "finner". Det er også kjent blant fiskere at øyevæske har en lindrende effekt på giften i disse piggene. Det ble benyttet sprøyte for å trekke ut øyevæske. Deretter ble gjellene kuttet løs, buken åpnet og organene ble forsiktig dissekert ut. Mage og tarm ble åpnet og rengjort ved å forsiktig skrape av slim og ufordøyd mat. Skinnen ble dratt løs fra fiskekjøttet og eventuelle kjøttrester ble skåret av. De ulike organene ble homogenisert, pakket separat og fryst ned ved -20°C til senere ekstraksjon.

Tabell 1

Oversikt over hvilke organer og leveranse (I, II og/eller III) som ble testet for antibakteriell aktivitet, separert vha. HPLC og analysert vha. MS.

Organ	Bioscreen	HPLC	MS
Finner ^m /giftpigger	I	I	
Galleblære	I	II	
Gjelle	I	I	
Hjerte	I	II	
Lever	II	II	
Mage	I	I	
Milt	I	II	
Skinn	I og III	III	III
Tarm	I		
Øye	I	II	
Øyevæske	II		

Tabell 1 viser hvilken leveranse (I, II og/eller III) av råstoff som ble benyttet for testing i Bioscreen C, HPLC og MS. Skinn ble screenet to ganger i Bioscreen C med materiale fra leveranse I (tab. 13, vedlegg) og III (tab. 6).

2.2 Kjemikalier og utstyr

Tabell 2 og 3 gir en oversikt over kjemikalier^m/produsent benyttet i forsøkene til denne oppgaven. Tabell 3 viser også funksjonen til utstyret under produktnavnet.

Tabell 2
Kjemikalier og produsent

Kjemikalie	Produsent
Acetonitril	LiChrosolv, Merck, Darmstad, Tyskland
Milli-Q vann	Millipore Corp., USA
Mueller Hinton medium	Difco Laboratories, Detroit, USA
Trifluoreddiksyre	Flucka Chemie AG, Bucks, Sveits

Tabell 3
Utstyr og produsent

Utstyr/funksjon	Produsent
Genesis EL 35	VirTis, NY, USA
Frysetørker	
ScanVac CoolSafe™ Scanspeed 40	ScanVac, Lynge, Danmark
Vakuumsentrifuge	
Sep-Pac® C18 SPE kolonne (10g)	Waters Corp., MA, USA
SPE	
BioMate™3, Spectrophotometer	Thermo Electron Corp., WI, USA
Spektrofotometer	
Microbiology Workstation Bioscreen C	Labsystems Oy, Helsinki, Finland
Optisk tetthetsmåler for bakterievekst	
10x10 Honeycomb plater	Labsystems Oy, Helsinki, Finland
Pipeteringsplater	
MassLynx NT	Micromass Ltd, Water Corp., MA, USA
Masse spektrometri	
HPLC system I	
Høytrykks væskekromatografi	
HPLC Alliance®	Waters Corp., MA, USA
Waters 474 Scanning Fluorescence Detector	Waters Corp., MA, USA
Waters 2695 Separation Module	Waters Corp., MA, USA
Waters 2996 Photodiode Array Detector	Waters Corp., MA, USA
FC 204 Fraction Collector	Gilson Inc, IL, USA
Fraksjonsamler	
SymmentryPrep™ C8, 7 µm, 7,8 x 150 mm	Waters Corp. MA, USA
HPLC kolonne	

HPLC system II	
Høytrykks væskekromatografi	
Waters 717 Autosampler	Waters Corp., MA, USA
Waters 600E System Collector	Waters Corp., MA, USA
Waters In-Line Degasser AF	Waters Corp., MA, USA
Waters 2996 Photodiode Array Detector	Waters Corp., MA, USA
FC 204 Fraksjonsamler	Gilson Inc, IL, USA
Fraksjonsamler	
SunFire™ C18, 5µm, 10 x 250 mm	Waters Corp. MA, USA
HPLC kolonne	

2.3 Løsemiddel-ekstraksjon

Frysetørket prøvemateriale (>10 g) ble knust og ekstrahert med 10 volum (v/v tørrvekt) 60% acetonitril (ACN) tilsatt 0,1% trifluoreddiksyre (TFA) over 24 timer (+4°C) under omrøring. Lever ble ekstrahert med 4 volum (v/v tørrvekt) på grunn av at store mengder oljer i organet ga en ufullstendig frysetørking og dertil høyere vekt etter tørking. Materialet ble sentrifugert ved 4000 rpm i to minutter for å spinne ned partikler i løsningen. Supernatant ble overført til nye rør for oppbevaring. Resterende materiale ble ekstrahert på nytt over 24 timer (+4°C). Etter sentrifugering ble supernatant tatt av og blandet med supernatant etter 24 timer. Resterende pellet ble kastet. Supernatant ble satt til kjøling i 1-2 timer for faseskillelse (fig. 1). På grunn av høyt saltinnhold dannet løsningen to faser; en acetonitrilrik organisk fase på toppen og en vannfase rik på salt under. Begge fasene ble separert og oppbevart på frys (-20°C) inntil vakuumsentrifugering. Tørrvekt ble målt etter avdamping av vann/løsemidler.

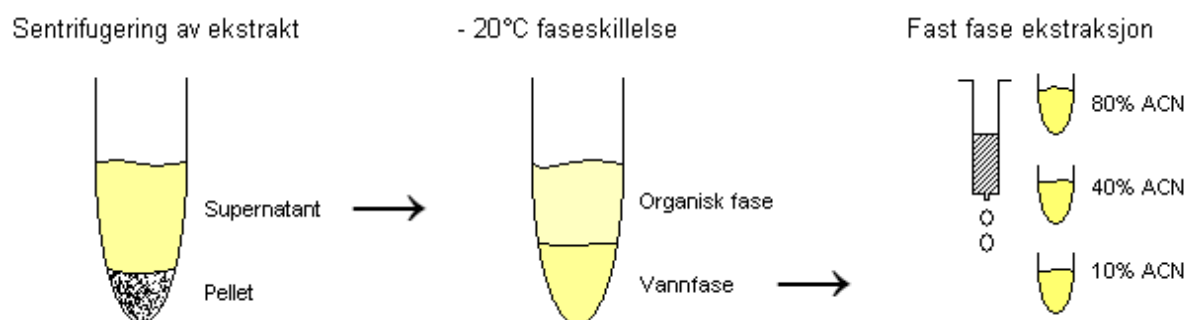


Fig. 1. Viser metode for separasjon av supernatant og materiale, samt faseskillelse. Vannfase ble videre separert vha. fast fase ekstraksjon i 10%, 40% og 80% ACN eluater.

Figur 1 viser metode for separasjon av supernatant og materiale ved ekstraksjon og fast fase ekstraksjon.

2.4 Fast fase ekstraksjon (Solid phase extraction, SPE)

SPE består av to faser; en stasjonær fase som består av kolonnematerialet og en mobil fase hvor prøven tilsettes og suges gjennom kolonnen. Kinetisk molekylær bevegelse gir kontinuerlig utveksling av oppløste molekyler mellom fasene. Molekyler med lav affinitet for den stasjonære fasen vil lettere vandre med den mobile fasen og bli transportert bort fra molekyler som blir retardert lengre i den stasjonære fasen [5].

Det ble i forsøkene benyttet C18 kolonne. Den består av kjeder med 18 karbonatomer, hvor ikke-polare interaksjoner mellom karbonkjedene og prøven gir retensjon i kolonnen. De fleste organiske komponenter har en upolar struktur og kan bli absorbert til upolare absorbanter vha. van-der-Waals krefter (Chromabond).

De inndampede prøvene (vannfase) fra vakuumsentrifugering ble løst i destillert vann til et totalt volum på 15 ml pr rør pr fast fase gjennomføring. Prøvene ble videre satt på Sep-Pak C-18 SPE-kolonne som på forhånd ble kondisjonert med 30 ml 100% ACN og ekvilibrert med 30 ml 0,05% TFA. Prøver ble kjørt gjennom kolonne og uretardert materiale (bl.a. salter) ble vasket ut med 30 ml 0,05% TFA. Deretter ble retardert materiale stegvis eluert med 30 ml 10%, 40% og 80% ACN, heretter omtalt som henholdsvis 10%, 40 og 80% SPE fraksjoner (fig. 1 og 2). Fraksjonene ble deretter tørket i vakuumsentrifuge og tørrvekt ble målt.

2.5 Prøvemateriale

2.5.1 Vekt tørrstoff

Tabell 5 viser tørrvekt for alle vannfaseekstraktene både før og etter fast fase ekstraksjon. Reduksjonen av tørrstoff før og etter fast fase ekstraksjon var relativt lik for alle ekstraktene, utenom galleblære (40% SPE) hvor mengde tørrstoff var veldig høy sammenlignet med andre eluater. Ekstraktet av lever var, pga. store mengder oljer, ikke fullgodt tørket før ekstraksjon.

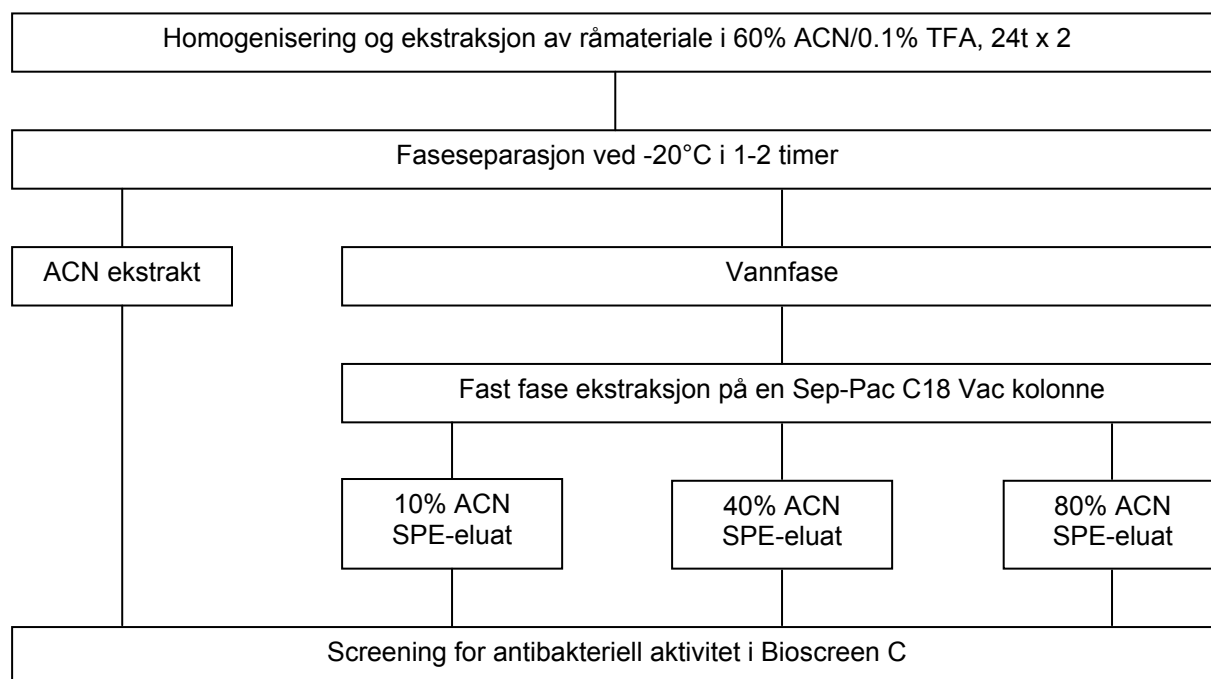
Tabell 5

Tørrvekt etter vakuumsentrifugering før og etter fast fase ekstraksjon (SPE).

Organ	Vekt tørrstoff før SPE, (g)	Vekt tørrstoff etter SPE, (g)		
		10 %	40 %	80 %
Finne	0,89	0,04	0,06	0,02
Galleblære	0,70	0,02	0,39	0,05
Gjelle	2,19	0,09	0,14	0,01
Hjerte	0,25	0,01	0,02	0,01
Lever II	6,16*	0,08	0,04	0,02
Mage	0,89	0,04	0,08	0,03
Milt	0,28	0,03	0,02	0,01
Skinn I	0,82	0,04	0,09	0,03
Tarm	1,32	0,03	0,07	0,02
Øye	0,36	0,02	0,03	0,01
Øyevæske II	0,68	0,03	0,02	0,02

Forklaring: Lever og øyevæske fra leveranse II, samt skinn leveranse I. *, materiale ikke fullstendig tørket pga. høyt innhold av oljer. Viser tørrvekt for organene før og etter SPE, som hovedsaklig skyldes at salter og andre urenheter har blitt vasket ut av prøvene.

2.5.2 Skjematisk fremstilling av ekstraksjons –og renselsesmetodene av prøvemateriale



Figur 2. Skjematisk oversikt over alle ekstraksjons –og renselsesmetodene benyttet frem til antibakteriell screening. Råmaterialet ble ekstrahert i 24 timer med 60% ACN og 0,1% TFA. Prøvene ble etter 24 timer sentrifugert for å lettere kunne skille supernatant fra pellet. Materiale ble tilsatt ny løsning og satt til ekstraksjon i 24 timer. Etter sentrifugering ble suspensjon fra første og andre ekstraksjon blandet og satt til kjøling i 1-2 timer for bedre faseskillelse. ACN eluat ble oppbevart ved -20°C til senere testing. Vannfaseekstraktene ble videre rensert for salter ved hjelp av fast fase ekstraksjon. Forbindelsene som ble værende i kolonnen ble deretter stegvis eluert ut ved 10%, 40% og 80% ACN SPE fraksjonene ble tørket og oppbevart ved -20°C til senere screening i Bioscreen C.

Figur 2 gir en oversikt over alle forberedende steg av prøvemateriale frem til screening i Bioscreen C, slik som beskrevet i foregående avsnitt.

2.6 Bakteriestammer og vekstforhold

De Gram negative bakteriene *Escherichia coli* (ATCC 25922) og *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) og de Gram positive bakteriene *Corynebacterium glutamicum* (ATCC 13032) og *Staphylococcus aureus* (ATCC 9144) ble benyttet som test organismer. Alle bakteriestammene ble dyrket på Mueller Hinton (MH) plater ved romtemperatur i 1-2 døgn. Utplatete bakterier ble byttet etter ca. 30 dager.

2.7 Antibakteriell aktivitetstesting av SPE-eluat og ACN-ekstrakter

Bakteriemedium for *E. coli*, *P. aeruginosa*, *C. glutamicum* og *S. aureus* ble forberedt 24 timer før antibakteriell aktivitet ble testet i Bioscreen C. Et lite antall bakteriekolonier ble overført fra MH plate til MH broth (5ml) medium og dyrket ved risting i varmeskap (37°C) i 24 timer. 20 µl bakteriemedium ble videre overført til nye 5 ml MH medium og inkubert ved risting i varmeskap (37°C) i 2-3 timer. OD målinger ble deretter gjort ved å måle 1 ml bakteriesuspensjon for OD₆₀₀ i spektrofotometer, og 3-20 µl bakteriesuspensjon ble deretter overført til nye 10 ml MH medium avhengig av bakterietettheten. Antall bakterier tilsatt hver brønn ble estimert til ca. 1250-1500 ved start av inkuberingen. Fast fase eluater og ACN ekstrakter ble løst opp i Milli-Q vann og satt til passiv oppløsning i 1-2 timer ved romtemperatur. Prøver med mengde materiale ≥ 0,02 g ble fortynnet i Milli-Q vann til en konsentrasjon på 80 mg/ml. Prøver med mengde < 0,02 g ble fortynnet til 40 mg/ml. Prøvene ble så ristet/blandet og pipetert og deretter sentrifugert ved 2000 rpm i 2 min. Til testing ble det benyttet en 10x10 brønner flatbunnet plate. Det ble tilsatt 50 µl utgangskonsentrasjon til brønnrekke én og to fold fortynning ble gjort til og med brønnrekke ni. 50 µl bakteriesuspensjon ble tilsatt hver brønn like før testing i Bioscreen C, som gir et total volum på 100 µl i hver brønn med en startkonsentrasjon i brønnrekke én på 20 mg/ml, og 10 mg/ml i prøver med mengde <0,02 g materiale. Antibakteriell aktivitet ble bestemt i Bioscreen C ved måling av absorpsjon OD₄₂₀₋₅₈₀ hver andre time i 24 timer ved 37°C. MH medium og bakteriesuspensjon ble benyttet

som vekstkontroll i brønnrekke ti og ga grunnlag for vurdering av positiv antibakteriell aktivitet definert som bakterietetthet $OD \leq 50\%$ av kontroll etter at bakteriekontrollene for optisk tetthet hadde nådd en verdi på ca. 0,4. Fraksjoner ble vurdert som aktive hvor optisk tetthet var ca. 0,2 eller lavere og MIC ble satt til denne verdien, også kalt $OD_{50\%}$. Høy antibakteriell aktivitet definert ved konsentrasjon $\leq 0,63$ mg/ml. *E. coli*, *P. aeruginosa*, *C. glutamicum* og *S. aureus* viste ulik veksthastighet i Bioscreen C, og oppnådde kontrollpunkt for optisk tetthet ($OD_{420-580}$) etter henholdsvis ca. 12, 10, 20 og 16 timer (tab. 6).

2.8 HPLC (High performance liquid chromatography)

HPLC utnytter prinsippet at ved å presse prøve gjennom en kolonne med innsiden dekket av en tynn film med væske oppnår man en veldig god separasjon av prøven. Små partikler inni kolonnen er bundet til molekyler som skaper en tynn film med væskelignende egenskaper [3]. Forskjellige typer molekyler kan benyttes, et upolart molekyl kan bindes til partiklene og en polar mobil fase presses gjennom kolonnen. Denne metoden kalles revers fase høytrykkskromatografi. Prøver kan bestå av løsemidler med både svak og høy grad av retensjon i kolonnen. Ved å kontinuerlig øke konsentrasjonen av gradienten (ACN), altså økende grad av upolaritet, oppnår man økende grad av eluering fra kolonnen over tid [4].

Eluater/ekstrakter som etter Bioscreen C analyse viste høy antibakteriell aktivitet, definert som aktivitet ved konsentrasjon $\leq 0,63$ mg/ml, ble vurdert for videre fraksjonering vha. HPLC.

Prøvene ble separert ved bruk av lineære gradienter, bestående av acetonitril, TFA og vann. Mobilfasen bestod av: Flaske A: 0,065% TFA; flaske B: 80% ACN + 0,05% TFA. Valg av gradient ble basert på hvilken fraksjon som ble testet. 10%, 40% og 80% fraksjoner ble henholdsvis gradiert ved 0-40%, 0-60% og 20-80% ACN. Alle tester ble gjort med gradient over 60 minutter i tillegg til en 10 minutter for-fase hvor ACN konsentrasjonen var den samme som startverdien av ACN i gradienten. Standard mengde injisert for HPLC fraksjonering av vannfaseeluater var 90 μ l (3,6 mg) prøve injisert ved flow 2 ml/min, og 6 ml etter injeksjon av 500 μ l (40 mg) ved 80 mg/ml for ACN ekstrakter. SymmetryPrep C8, HPLC kolonne ble brukt i fraksjonering av vannfaseeluater, mens for fraksjonering av ACN ekstrakter ble SunFire C18, HPLC kolonne benyttet.

Tabell 4

Metodeoppsett for HPLC fraksjonering av ulike SPE eluater og organisk fase (ACN ekstrakt).

Parameter	ACN ekstrakt	Vannfaseeluater		
		10% SPE	40% SPE	80%SPE
Gradient (ACN)	0-60%	0-40%	0-60%	20-80%
Flow (ml/min)	6	2	2	2
Tid (min)	60	60	60	60
Injisert (μ l)	500	90	90	90
Kolonne	SunFire	Sym.Prepare	Sym.Prepare	Sym.Prepare

Forklaring: Alle HPLC fraksjoner ble gjort med en 10 minutter for-fase hvor ACN konsentrasjonen var den samme som startverdien av ACN i gradienten og deretter med gradient over 60 minutter. Standard for HPLC fraksjonering av vannfaseeluater var 90 μ l prøve injisert ved flow 2 ml/min, oppløst i 200 μ l Milli-Q vann etter injeksjon av 90 μ l (3,6 mg), og 1 ml etter injeksjon av 500 μ l (40 mg) ved 80 mg/ml for ACN ekstrakter.

Tabell 4 viser metodeoppsett for HPLC fraksjonering av ulike SPE eluater og organisk fase. HPLC-fraksjoner fremkommet etter injeksjon av 3,6 mg prøve (90 μ l) ble etter tørking løst opp i 200 μ l vann. Fraksjoner fremkommet etter injeksjon av 40 mg prøve (500 μ l) ble etter tørking løst opp i 1 ml vann.

2.9 Antibakteriell testing av HPLC-fraksjoner i Bioscreen C

HPLC-fraksjoner ble testet for antibakteriell aktivitet mot *E. coli*, *P. aeruginosa*, *C. glutamicum* og *S. aureus*, hvor det ble benyttet samme fremgangsmåte for bakterieinkubering og bestemmelse av bakterietetthet som tidligere beskrevet. Brønnerke en til ti ble tilsatt 50 μ l fraksjonsløsning og 50 μ l bakteriesuspensjon. Milli-Q vann og bakteriesuspensjon ble benyttet som vekstkontroll.

Antibakteriell aktivitet ble vurdert positiv når fraksjon + bakterie ga $OD_{50\%}$ av vekstkontroll (bakterie + vann) eller lavere. (tab. 7, 11, 12, 14 + vedlegg)

2.10 MS (Masse spektrometri)

Elektrospray ionisering (ESI) er en teknikk hvor prøve blir injisert inn i et kraftig elektronisk felt som sprer den til en fin spray av ladede dråper. Når dråpene fordampes og blir mindre øker det elektriske feltet på overflaten så mye at molekyler blir kastet av dråpen og frie ioner blir dannet, klare for analysering i ESI-MS [2]. Etter ioniseringen akselereres ionene ut av ionekilden og inn i en masseanalysator, hvor de separeres etter masse (m) og ladning (z). Resultatet fra en massespektrometisk

analyse registreres i et massespektrum hvor mengden av ioner plottes i et stolpediagram som funksjon av m/z .

Fraksjoner fra skinn-80% ble løst i 50% metanol tilsatt 0,05% maursyre. Løsningen ble deretter presset sakte inn i massespektrometeret med en flow på 20 $\mu\text{l}/\text{min}$ vha. en sprøyte koblet til maskinen.

3 Resultater

Tabell 6 viser resultatene fra *in vitro* antibakteriell screening av totalt 172 ulike ACN ekstrakter og vannfaseeluater fra vanlig uer (*Sebastes marinus*). Det ble for alle organene funnet aktivitet mot en eller flere av bakteriestammene benyttet i forsøkene.

3.1 Antibakteriell aktivitet

Organiske ekstrakter og SPE-eluater ble screenet mot *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Corynebacterium glutamicum* og *Staphylococcus aureus* for antibakteriell aktivitet i Bioscreen C. Resultatene fra den innledende screeningen er presentert i tabell 6. Tabell 6 viser minste konsentrasjon med hemming (MIC), hvor grensevekst ble satt til OD_{50%} av vekstkontroll.

C. glutamicum var generelt den mest følsomme bakterien av de testede bakteriestammene, da det ble registrert 15 eluater hvor MIC ble satt til 0,63 mg/ml eller lavere. *S. aureus* viste for noen eluater høy følsomhet, da det ble registrert fem eluater og ett ekstrakt hvor MIC ble satt til 0,63 mg/ml. *E. coli* og *P. aeruginosa* viste liten følsomhet ovenfor de fleste ekstrakter og eluater, bare for *E. coli* testet mot milt 10% SPE og 80% SPE ble MIC satt til henholdsvis 0,31 mg/ml og 0,16 mg/ml. Man fant ikke igjen aktiviteten i disse to eluatene etter HPLC-fraksjonering.

Tabell 6 viser at for 80% eluater av; finner, gjelle, lever og tarm, testet mot *C. glutamicum*, ble MIC satt til 0,63 mg/ml. For 80% eluat av galleblære ble det registrert hemming ved 0,31 mg/ml. MIC ble for alle eluatene av hjerte satt til 0,63 mg/ml. For mage ble MIC satt til 0,16 mg/ml for både 10% SPE og 80% SPE. For milt 10% SPE ble MIC vurdert til 0,31 mg/ml, for 40% SPE 0,63 mg/ml og for 80% SPE 0,04 mg/ml (fig. 9), som var den laveste konsentrasjonen i forsøkene hvor det ble målt antibakteriell aktivitet. For skinn 10% SPE ble MIC registrert ved 0,63 mg/ml og for 80% SPE ved 0,31 mg/ml (fig. 7).

For eluater testet mot *S. aureus* viste tre eluater høy antibakteriell aktivitet hvor det også ble registrert høy aktivitet mot *C. glutamicum*. Galleblære 80% SPE, milt 80% SPE og skinn 80% SPE ble alle satt til 0,63 mg/ml MIC. Lever 10% SPE og milt ACN ekstrakt viste begge veksthemming OD_{50%} ved 0,63 mg/ml.

Tabell 6
Antibakteriell aktivitet målt i ulike vev og organer i uer (*Sebastes marinus*).

Organ	Fraksjon (% ACN)	Antibakteriell aktivitet (MIC; mg/ml)			Sa
		<i>Ec</i>	<i>Pa</i>	<i>Cg</i>	
Finner	10	10	10	2,5	10
	40	5	2,5	1,25	2,5
	80	10	2,5	0,63	5
	Organisk	10	5	5	10
Galleblære	10	5	5	1,25	2,5
	40	10	10	1,25	5
	80	10	10	0,31	0,63
	Organisk	-	-	2,5	2,5
Gjelle	10	5	5	2,5	2,5
	40	5	5	1,25	5
	80	2,5	-	0,63	2,5
	Organisk	20	20	10	20
Hjerte	10	2,5	1,25	0,63	1,25
	40	5	1,25	0,63	2,5
	80	5	2,5	0,63	2,5
	Organisk	-	-	10	20
Lever II	10	5	5	2,5	0,63
	40	-	-	-	-
	80	-	-	0,63	-
	Organisk	-	-	10	2,5
Mage	10	5	2,5	0,16	5
	40	5	5	1,25	5
	80	10	5	0,16	5
	Organisk	20	20	5	20
Milt	10	0,31	2,5	0,31	5
	40	5	5	0,63	2,5
	80	0,16	5	0,04	0,63
	Organisk	20	-	20	0,63
Skinn III	10	5	5	0,63	2,5
	40	5	2,5	1,25	2,5
	80	10	10	0,31	0,63
	Organisk	-	-	10	10
Tarm	10	5	5	2,5	2,5
	40	10	10	2,5	20
	80	10	-	0,63	1,25
	Organisk	-	-	10	20
Øye	10	5	2,5	2,5	5
	40	2,5	2,5	1,25	2,5
	80	-	10	2,5	0,63
	Organisk	20	20	5	10
Øyevæske II	10	20	-	5	-
	40	-	-	5	-
	80	5	-	2,5	5
	Organisk	-	-	-	-

Antibakteriell aktivitet ble screenet mot *Escherichia coli* (*Ec.*), *Pseudomonas aeruginosa* (*Pa.*) *Corynebacterium glutamicum* (*Cg.*) og *Staphylococcus aureus* (*Sa.*), i Bioscreen C. Forklaring: Lever og øyevæske ble screenet med materiale fra leveranse II. ACN ekstrakt av øyevæske ble ikke screenet. Skinn ble screenet med materiale fra leveranse III. -, ingen hemming eller hemming lavere enn OD_{50%} av kontroll. Høyeste konsentrasjon testet var 20 mg/ml (10 mg/ml for prøver med mengde <0,02 g) med en påfølgende to fold fortykning. Tabellen viser laveste konsentrasjon hvor bakteriehemming var lik eller høyere enn MIC.

3.1.1 Antibakteriell aktivitet funnet i skinn

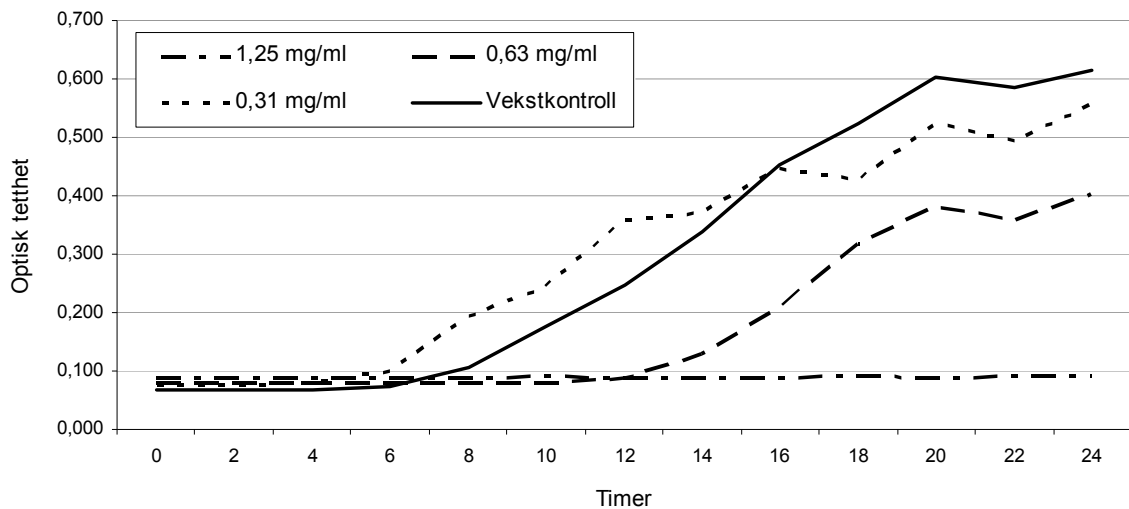
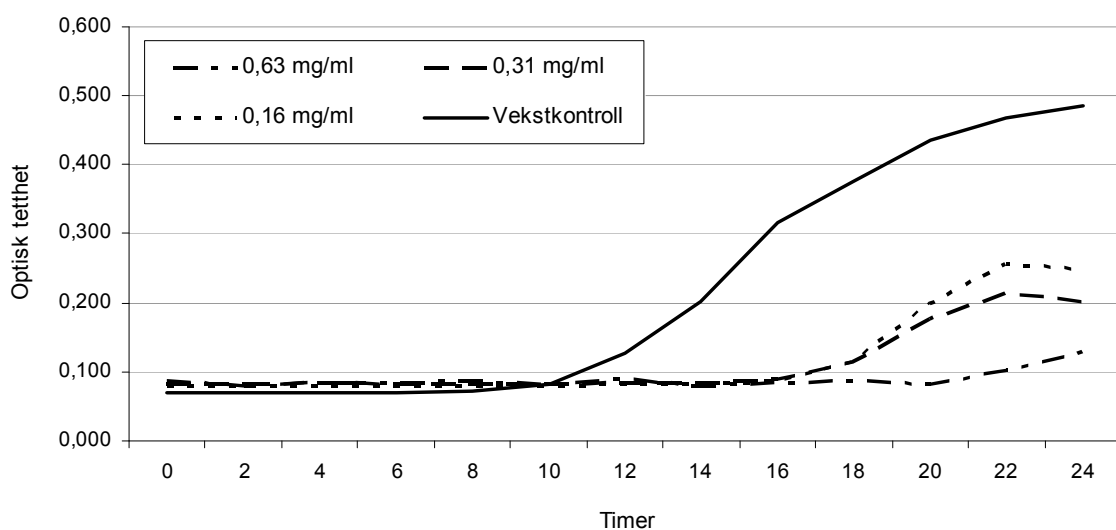


Fig. 6. Vekstkurve for *Staphylococcus aureus* ved tilsetning av 80% SPE eluat fra skinn i ulike konsentrasjoner. Vekstkontroll for *S. aureus* er merket med heltrukket linje. Bakterievekst ble bestemt etter 16 timer i Bioscreen C.

Figur 6 viser vekstkurver for *S. aureus* etter tilsetning av skinn 80% SPE i ulike konsentrasjoner. Man ser en markant forandring i bakterievekst mellom ekstraktkonsentrasjon på 1,25 mg/ml og 0,63 mg/ml. Hvor det for 1,25 mg/ml er 100% bakteriell hemming, er det for 0,63 mg/ml omkring 50% hemming (>50% reduksjon i OD₄₂₀₋₅₈₀ sammenlignet med kontroll) etter 16 timer inkubering.

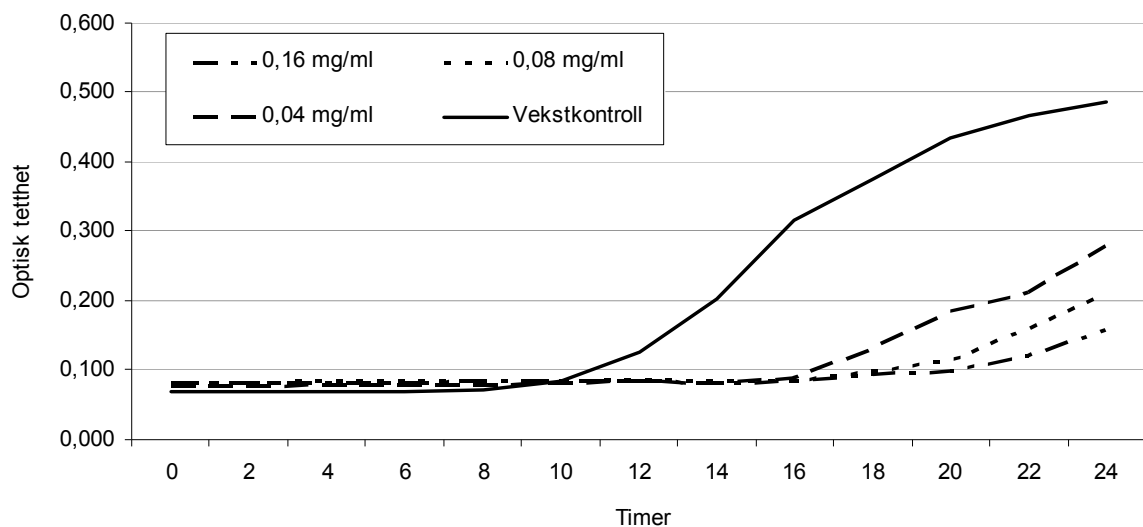


Figur. 7 Vekstkurve for *Corynebacterium glutamicum* testet for skinn 80% SPE. Vekstkontroll for *C. glutamicum* er merket med heltrukket linje. Bakterievekst ble bestemt etter 20 timer i Bioscreen C

Figur 7 viser vekstkurver for *C. glutamicum* etter tilsetning av skinn 80% SPE i ulike konsentrasjoner. Heltrukket linje viser vekstkontroll. Striplet linje viser bakterievekst ved konsentrasjon 0,31 mg/ml som gir OD_{50%} av vekstkontroll (MIC) for *C. glutamicum*. Prikket linje og blandet linje viser bakterievekst ved henholdsvis en fortykning høyere (0,63 mg/ml) og en lavere (0,16 mg/ml) enn MIC. Bakterievekst bestemt etter 20 timer i Bioscreen C.

Optisk tetthet er etter 20 timer inkubering ved ekstraktkonsentrasjon 0,31 mg/ml nærmest 50% bakteriell hemming av vekstkontroll.

3.1.2 Antibakteriell aktivitet funnet i milt



Figur 21. Vekstkurve for *Corynebacterium glutamicum* testet for milt 80% SPE. Vekstkontroll for *C. glutamicum* er merket med heltrukket linje. Bakterievekst ble bestemt etter 20 timer i Bioscreen C.

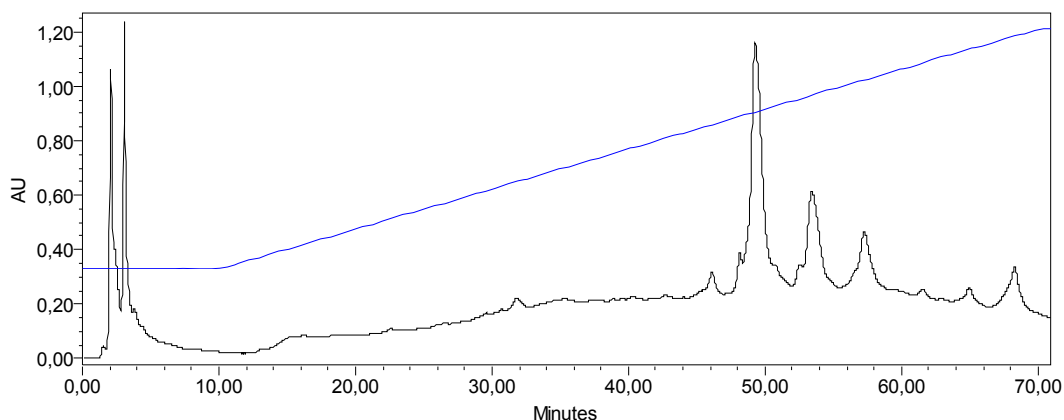
Figur 21 viser vekstkurver for *Corynebacterium glutamicum* etter tilsetning av milt 80% SPE i ulike konsentrasjoner. Heltrukket linje viser vekstkontroll. Striplet linje viser bakterievekst ved konsentrasjon 0,04 mg/ml som gir OD_{50%} av vekstkontroll (MIC) for *C. glutamicum*. Prikket linje og blandet linje viser bakterievekst ved henholdsvis en fortykning høyere (0,08 mg/ml) og to høyere (0,16 mg/ml) enn MIC. Bakterievekst bestemt etter 20 timer i Bioscreen C.

3.2 HPLC-fraksjonering av aktive SPE-eluater og ACN-ekstrakter

Totalt ble 12 forskjellige eluater og ekstrakter fraksjonert i HPLC. I avsnitt 3.2 blir resultatene fra skinn 80% SPE og mildt 80% SPE, 10% SPE og ACN ekstrakt presentert. Disse eluatene og ekstraktet viste alle antibakteriell aktivitet etter fraksjonering, men i varierende grad.

Skinn 80% SPE ga veldig stabile resultater (tab. 7), som var lette å gjenskape. Resultatene fra undersøkelsene med mildt var mer varierende og den antibakterielle aktiviteten var vanskeligere å forfølge med ytterligere fortynning (data ikke vist). Likevel viste eluater og ekstrakt av mildt utvilsomt en veksthemming på spesielt *C. glutamicum* (tab. 8, 9 og 10).

3.2.1 HPLC fraksjonering av skinn 80% SPE



Figur 8. HPLC-kromatogrammet for skinn 80% SPE (III). Etter fast fase ekstraksjon ble prøven injisert i en SymmetryPrep C8 kolonne. Prøven ble deretter fraksjonert vha. en lineær gradient av acetonitril fra 20% - 80% ACN over 60 minutter, med en 10 minutter for-fase hvor gradienten var konstant 20% ACN. Absorbansen ble målt ved 206 nm. Acetonitrilgradienten er presentert som en skrå linje gjennom kromatogrammet. Flow 2 ml/min. Injisert 90 µl prøve ved 40 mg/ml konsentrasjon.

Figur 8 viser HPLC-kromatogrammet ved 206 nm for skinn 80% SPE (III). Fraksjoner med høy antibakteriell aktivitet starter ved 48 minutter fraksjonering og fortsetter med fraksjoner med 100% veksthemming og/eller >50% veksthemming, hvor aktiviteten slutter brått etter 61 minutter fraksjonering.

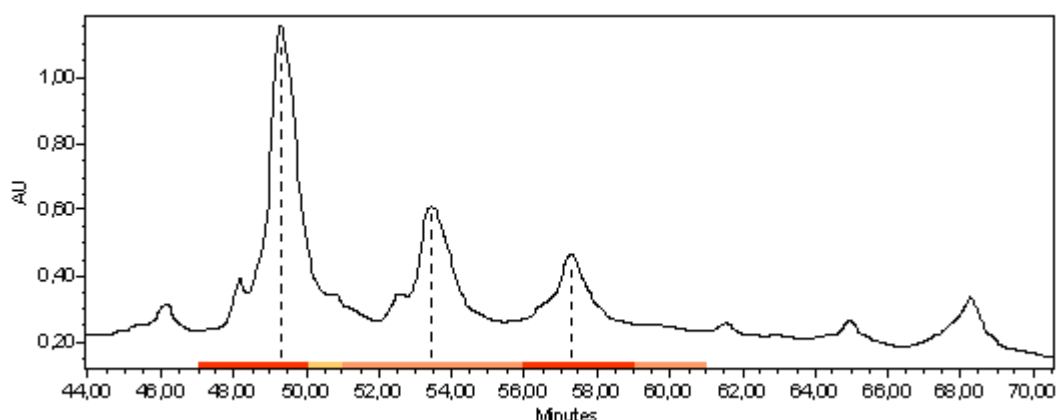
Tabell 7 viser fraksjoner fra skinn 80% SPE (III) som etter HPLC-fraksjonering viste antibakteriell aktivitet i Bioscreen C. De Gram positive bakteriene viste høy

følsomhet mot mange av fraksjonene. Spesielt ser man fraksjoner mellom 48 – 61 minutter hvor alle viste stor grad av antibakteriell aktivitet. Fraksjonene 50 og 54 for *C. glutamicum* og 58 for *S. aureus* samsvarer med de tre største toppene i figur 8 ved 206 nm.

Tabell 7
Antibakteriell aktivitet i skinn 80 % SPE i HPLC fraksjoner.

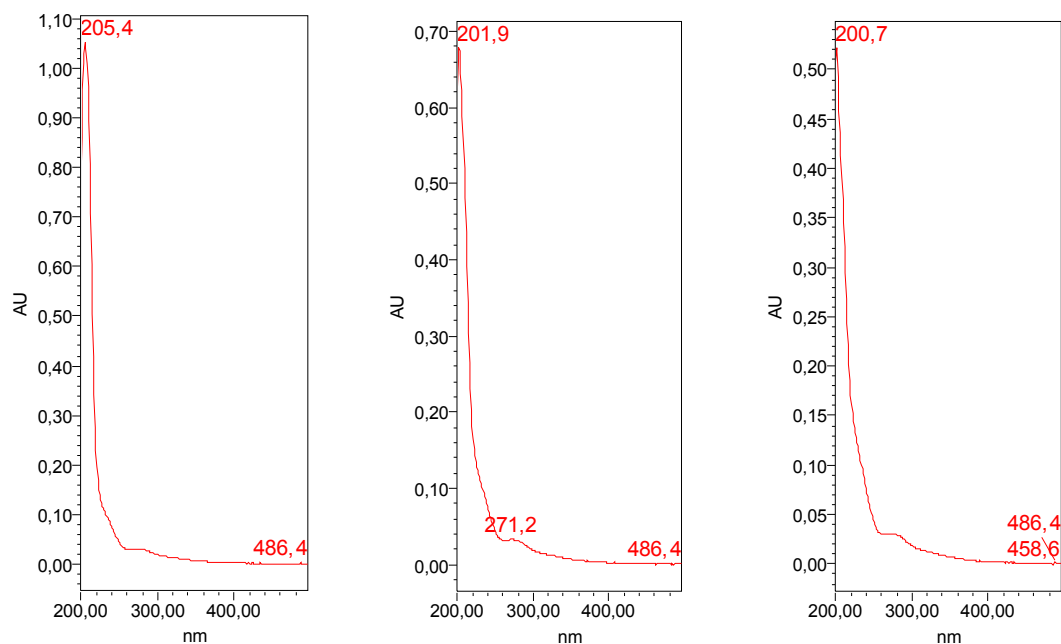
	Antibakteriell aktivitet			Sa
	Ec	Pa	Cg	
Hemming* (min)	2	-	2, 3, <u>36</u>, 48, 49, 50, <u>51</u>, 52, 53, 54, 55, 57, 58, 59, 60	1, 2, <u>4</u> , 5, 6, 8, 9, 10, 11, 12, <u>16</u> , 20, 21, <u>22</u> , 28, <u>31</u> , 56, 57, 58 , 59, 61

Forklaring: Uthevede fraksjoner indikerer 100% veksthemming, mens vanlige tall indikerer >50% veksthemming. Understreket fraksjoner indikerer 50% antibakteriell aktivitet. -, indikerer ingen antibakteriell aktivitet. *, Aktivitet definert som mindre enn 50% bakterievekst OD₄₂₀₋₅₈₀ sammenlignet med vekstkontroll.



Figur 9. HPLC-kromatogrammet for skinn 80% SPE (III) for fraksjonene 45-70. Etter fast fase ekstraksjon ble prøven injisert i en SymmetryPrep C8 kolonne. Prøven ble deretter fraksjonert vha. en lineær gradient av acetonitril fra 20% - 80% ACN over 60 minutter, med en 10 minutter for-fase hvor gradienten var konstant 20% ACN. Absorbansen ble målt ved 206 nm. Flow 2 ml/min. Injisert 90 µl prøve ved 40 mg/ml konsentrasjon. Farge indikerer grad av antibakteriell aktivitet funnet etter HPLC-fraksjonering (tab. 7).

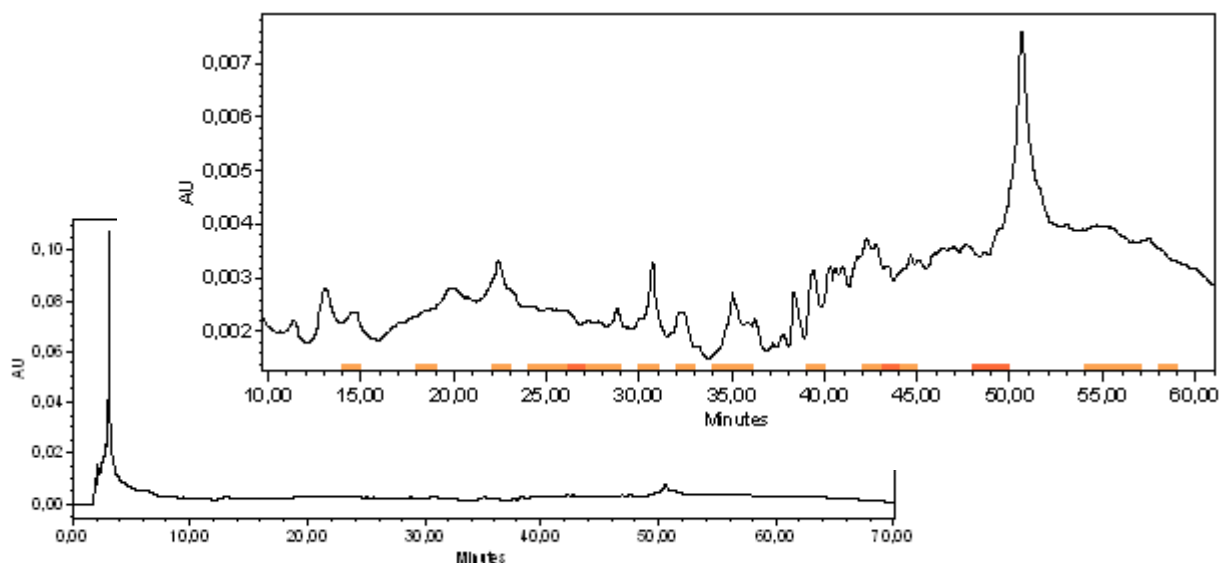
Figur 9 gir en mer detaljert oversikt fra figur 8 for fraksjonene 45-70, hvor man i fraksjonene 48-61 fant antibakteriell aktivitet etter HPLC-fraksjonering. Aktivitet i figur 9 indikert med mørk farge for 100% veksthemming, grå farge for >50% veksthemming og lys farge for 50% aktivitet (tab. 7). Striplete linjer markerer toppunktet for fraksjonene; 50, 54 og 58. Figur 10, 11, og 12 viser disse punktene mer i detalj.



Figur 10. Viser absorbans etter 49,5 min. Figur 11. Viser absorbans etter 53,5 min. Figur 12. Viser absorbans etter 57,5 min. UV-spekter av fraksjon 50 (fig. 10), 54 (fig. 11) og 58 (fig. 12) fra skinn 80% SPE. Spektrene har alle maks absorbans ved ca. 200 nm og ei skulder ved ca. 270 nm.

Figurene 10, 11 og 12 viser UV-spekter for henholdsvis fraksjonene; 50, 54 og 58. Figur 10 viser UV-spekter etter 49,5 minutter fraksjonering. Man ser absorbansen er høyest ved 205,4 nm. Ved høyere bølglengder faller absorbansen raskt og etter 300 nm er den redusert til støy. Figur 11 viser UV-spekter etter 53,5 minutter fraksjonering hvor absorbansen er høyest ved 201,9 nm. Figur 12 viser UV-spekter etter 57,5 minutter fraksjonering hvor absorbansen er høyest ved 200,7 nm.

3.2.2 HPLC fraksjonering av milt 80% SPE



Figur 22. HPLC-kromatogrammet for milt 80% SPE for fraksjonene 11-60. Etter fast fase ekstraksjon ble prøven injisert i en SymmetryPrep C8 kolonne. Prøven ble deretter fraksjonert vha. en lineær gradient av acetonitril fra 20% - 80% ACN over 60 minutter, med en 10 minutter for-fase hvor gradienten var konstant 20% ACN. Absorbansen ble målt ved 240 nm. Flow 2 ml/min. Injisert 90 µl prøve ved 40 mg/ml konsentrasjon. Farge indikerer grad av antibakteriell aktivitet funnet etter HPLC-fraksjonering (tab. 8).

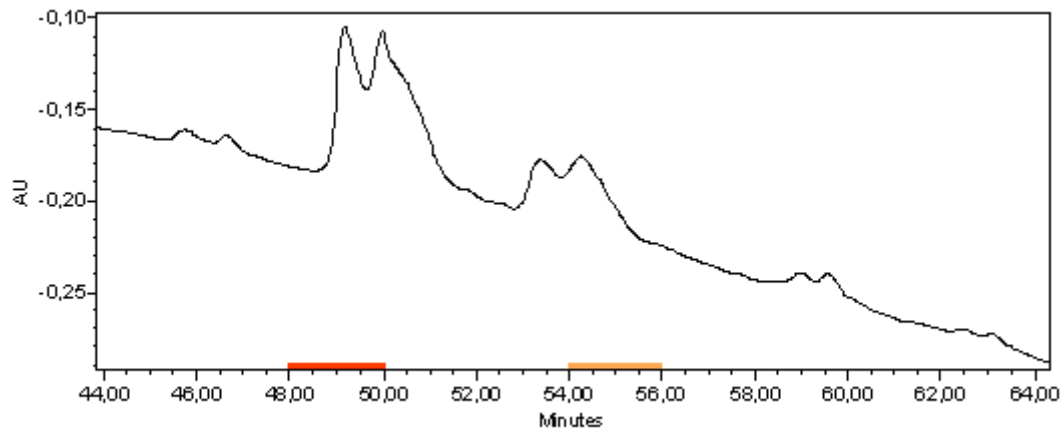
Figur 22 viser HPLC-kromatogrammet ved 240 nm for milt 80% SPE. Bølgelengden 240 nm er valgt fordi den best viser samsvar mellom toppene i kromatogrammet og aktivitet funnet i fraksjonene. Veldig liten absorbans i kromatogrammet i figur 22, viser derfor også utfelling av prøve i for-fasen.

Tabell 8 gir en oversikt over alle fraksjoner funnet med aktivitet i milt 80% SPE. Stort antall fraksjoner med antibakteriell aktivitet med varierende styrke.

Tabell 8
Antibakteriell aktivitet for milt 80% SPE i HPLC-fraksjoner.

	Antibakteriell aktivitet <i>C_g</i>
Hemming* (min)	2, 7, 8, 9, <u>15</u>, <u>19</u>, 23, <u>25</u>, 26, 27, <u>28</u>, <u>29</u>, 31, <u>33</u>, <u>35</u>, <u>36</u>, 39, 40, <u>41</u>, <u>43</u>, 45, 49, 50, 55, <u>56</u>, <u>57</u>, <u>58</u>, <u>59</u>, <u>62</u>, 65, 70

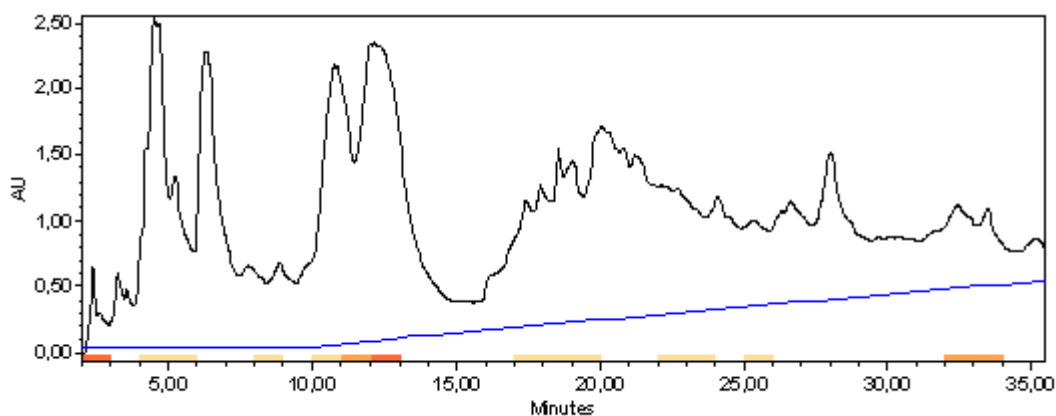
Forklaring: Uthevede fraksjoner indikerer 100% veksthemming, mens vanlige tall indikerer >50% veksthemming. Understrekete fraksjoner indikerer 50% antibakteriell aktivitet. *, Aktivitet definert som mindre enn 50% bakterievekst OD₄₂₀₋₅₈₀ sammenlignet med vekstkontroll.



Figur 23. HPLC-kromatogrammet for mildt 80% SPE for fraksjonene 45-70. Etter fast fase ekstraksjon ble prøven injisert i en SymmetryPrep C8 kolonne. Prøven ble deretter fraksjonert vha. en lineær gradient av acetonitril fra 20% - 80% ACN over 60 minutter, med en 10 minutter for-fase hvor gradienten var konstant 20% ACN. Absorbansen ble målt ved 206 nm. Flow 2 ml/min. Injisert 90 µl prøve ved 40 mg/ml konsentrasjon.

Figur 23 viser i detalj absorbans ved 206 nm for fraksjonene 45-64. Som man ser er kromatogrammet negativt, men topper ved fraksjonene; 49, 50, 55 og 56 viser alle antibakteriell aktivitet.

3.2.3 HPLC-fraksjonering av mildt 10% SPE



Figur 24. HPLC-kromatogrammet for skinn 10% SPE for fraksjonene 1-35. Etter fast fase ekstraksjon ble prøven injisert i en SymmetryPrep C8 kolonne. Prøven ble deretter fraksjonert vha. en lineær gradient av acetonitril fra 0% - 40% ACN over 60 minutter, med en 10 minutter for-fase hvor gradienten var konstant 0% ACN. Acetonitrilgradienten er presentert som en skrå linje gjennom kromatogrammet. Flow 2 ml/min. Injisert 90 µl prøve ved 40 mg/ml konsentrasjon. Farge indikerer grad av antibakteriell aktivitet funnet etter HPLC-fraksjonering (tab. 9).

Figur 24 viser absorbansen ved 206 nm for mildt 10% SPE. Ser også i detalj hvor topper og aktivitet i fraksjoner sammenfaller, spesielt for fraksjonene; 5, 6, 11, 12 og 13 (tab. 9).

Tabell 9 gir en oversikt over alle fraksjoner i mildt 10% SPE med antibakteriell aktivitet.

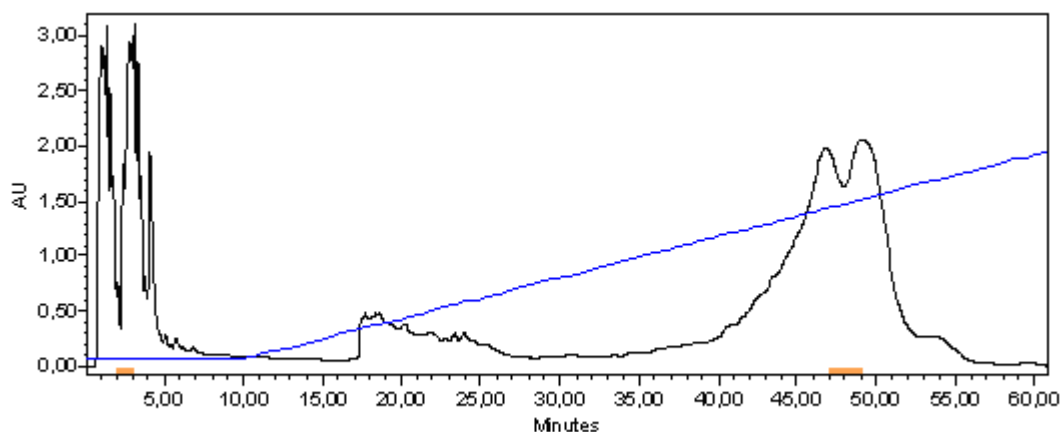
Tabell 9
Antibakteriell aktivitet for mildt 10% SPE i HPLC fraksjoner.

	Antibakteriell aktivitet	
	<i>Ec</i>	<i>Cg</i>
Hemming* (min)	-	<u>3</u> , <u>5</u> , <u>6</u> , <u>9</u> , <u>11</u> , 12, <u>13</u> , <u>18</u> , <u>19</u> , <u>20</u> , <u>23</u> , <u>24</u> , <u>26</u> , 33, 34

Forklaring: Uthevede fraksjoner indikerer 100% veksthemming, mens vanlige tall indikerer >50% veksthemming. Understreket fraksjoner indikerer 50% antibakteriell aktivitet. -, indikerer ingen antibakteriell aktivitet. *, Aktivitet definert som mindre enn 50% bakterievekst OD₄₂₀₋₅₈₀ sammenlignet med vekstkontroll.

3.2.4 HPLC fraksjonering av mildt ACN ekstrakt

ACN ekstrakt av mildt ble fraksjonert ved både 7,2 mg prøve injisert (data ikke vist) og ved 40 mg prøve injisert. Det ble ikke funnet aktivitet for 7,2 mg prøve, men siden antibakteriell aktivitet ble funnet ved den innledende screeningen valgte man å øke mengde stoff injisert for å finne igjen denne aktiviteten.



Figur 25. HPLC-kromatogrammet for mildt ACN ekstrakt for fraksjonene 1-60. Etter fast fase ekstraksjon ble prøven injisert i en SunFire C18 kolonne. Prøven ble deretter fraksjonert vha. en lineær gradient av acetonitril fra 0% - 60% ACN over 60 minutter, med en 10 minutter for-fase hvor gradienten var konstant 0% ACN. Absorbansen ble målt ved 206 nm. Acetonitrilgradienten er presentert som en skrå linje gjennom kromatogrammet. Flow 6 ml/min. Injisert 500 µl prøve ved 80

mg/ml konsentrasjon. Farge indikerer grad av antibakteriell aktivitet funnet etter HPLC-fraksjonering (tab. 10).

Figur 25 viser absorbansen ved 206 nm for ACN ekstrakt av milt 80% SPE. Det ble funnet aktivitet ved fraksjon 3, 48 og 49 etter injeksjon av 500 µl prøve ved 80 mg/ml, altså betydelig mer prøve injisert (40 mg) enn for andre forsøk (3,6 mg).

Tabell 10 viser fraksjoner med antibakteriell aktivitet funnet i ACN ekstrakt i milt.

Tabell 10
Antibakteriell aktivitet for milt ACN ekstrakt i HPLC-fraksjoner.

	Antibakteriell aktivitet <i>Sa</i>
Hemming* (min)	3, 48, 49

Forklaring: Aktivitet definert som mindre enn 50% bakterievekst OD₄₂₀₋₅₈₀ sammenlignet med vekstkontroll.

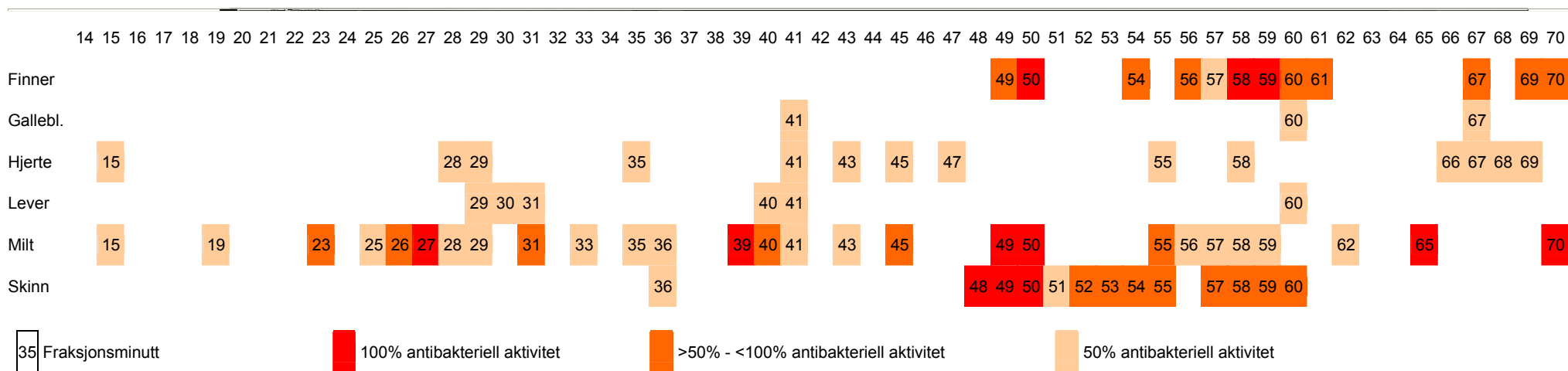
3.2.5 HPLC-fraksjoner med andre materialer

Tabell 11 viser fraksjonene 14-70 for 80% SPE-eluatet testet mot *C. glutamicum*. Tabellen viser de eluatene hvor det ble funnet antibakteriell aktivitet. Hjerte, lever og milt viser alle aktivitet i fraksjon 29, og 41 sammen med galleblære. Fraksjonene 49, 50, 57 og 59 viser alle aktivitet hos finner, milt og skinn. Fraksjon 55 viser aktivitet hos hjerte, milt og skinn, og 58 hvor også finner viser aktivitet. Fraksjon 60 viser aktivitet hos finner, galleblære, lever og skinn. Fraksjon 67 viser aktivitet hos finner, galleblære og hjerte.

Tabell 12 viser fraksjonene 14-70 for 80% SPE-eluatet testet mot *S. aureus*. Tabellen viser at det ble funnet aktivitet i de tre eluatene som ble testet mot denne bakterien for 80% eluat. Skinn 80% SPE viser høy antibakteriell aktivitet mot *S. aureus* for flere av fraksjonene, spesielt fraksjonene 56, 57, 58, 59 og 61. Tabellen viser også at eluat fra øye gir aktivitet ved fraksjon 57.

Tabell 11

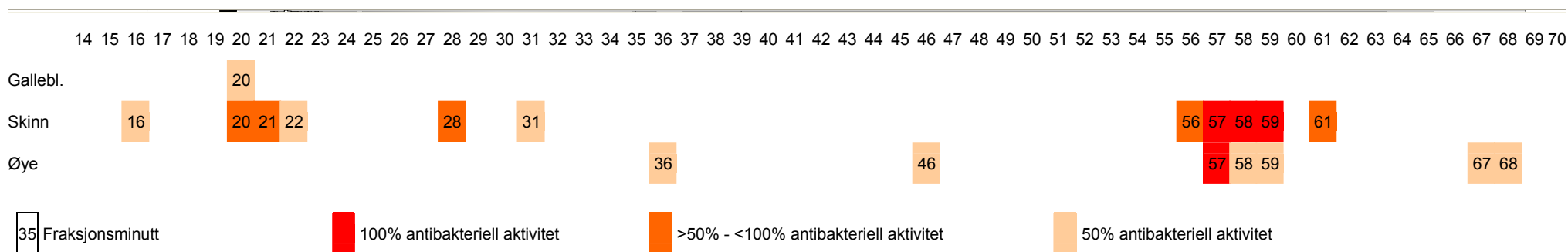
Sammenligning av HPLC fraksjoner fra 80% SPE eluater med antibakteriell aktivitet for *Corynebacterium glutamicum*.



Sammenligning av HPLC fraksjoner fra 80% SPE eluater med antibakteriell aktivitet for *Corynebacterium glutamicum*. Finner, milt og skinn viser høy antibakteriell aktivitet for fraksjonene 48 – 61. Galleblære, hjerte og lever viser svak antibakteriell aktivitet (50%).

Tabell 12

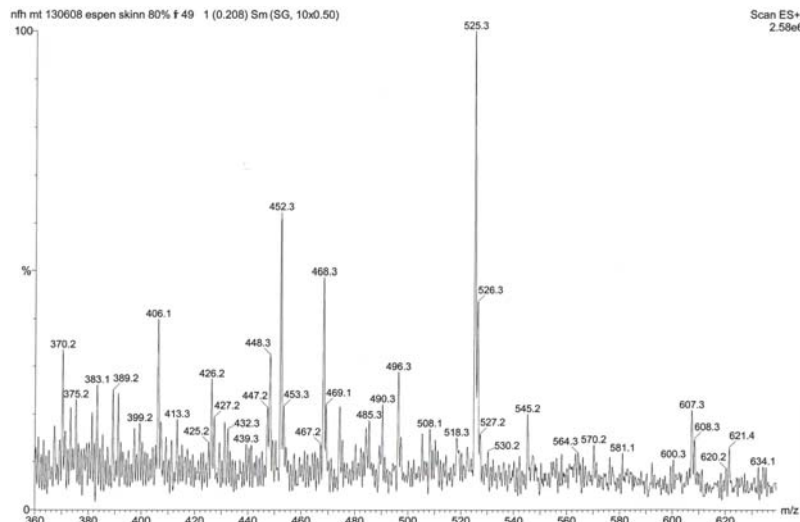
Sammenligning av HPLC fraksjoner fra 80% SPE eluater med antibakteriell aktivitet for *Staphylococcus aureus*.



Sammenligning av HPLC fraksjoner fra 80% SPE eluater med antibakteriell aktivitet for *Staphylococcus aureus*.

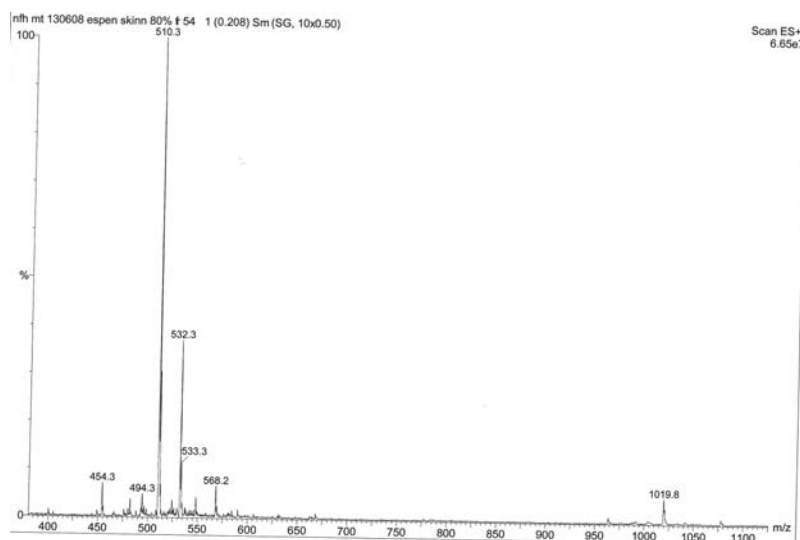
3.3 MS av fraksjoner av skinn 80% SPE

Det ble kjørt ESI-MS og MSMS av fraksjonene; 50, 54, 58 og 59 av skinn 80% SPE. Ioner ble i flere av fraksjonene identifisert og masse på forbindelsene ble bestemt.



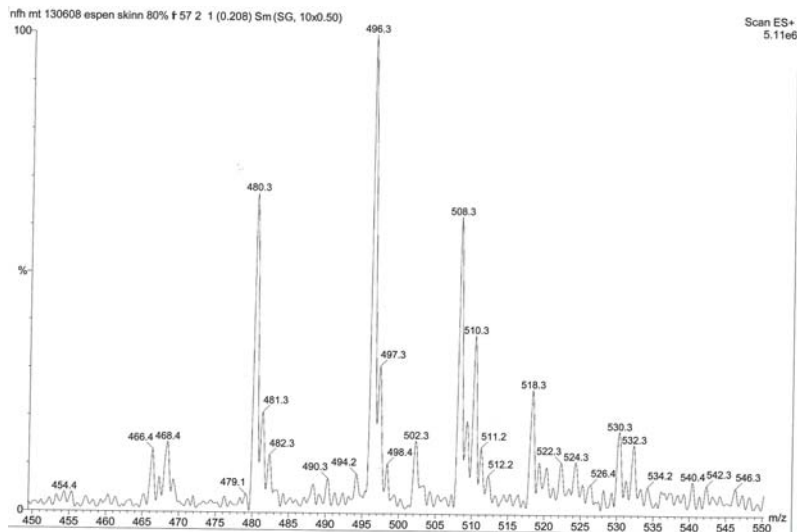
Figur 13a. ESI-MS av fraksjon 50 fra skinn 80% SPE. Spekteret viser et hovedsignal ved $m/z = 525.3$ som tilsvarer $[M+H]^+$.

Figur 13a viser ESI-MS av fraksjon 50 fra skinn 80% SPE. Signalet med $m/z = 525.3$ tilsvarer $[M+H]^+$, som igjen indikerer at forbindelsen har en masse på ca 524 Da.



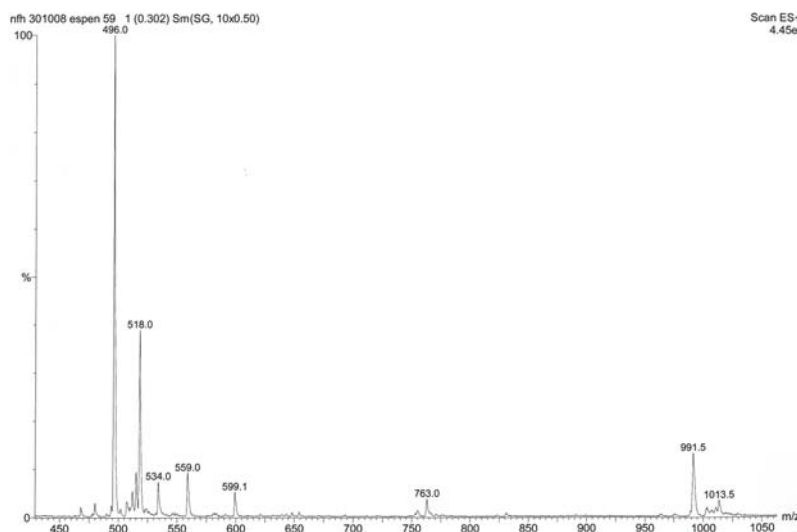
Figur 14a. ESI-MS av fraksjon 54 fra skinn 80% SPE. Spekteret viser et hovedsignal ved $m/z = 510.3$ som tilsvarer $[M+H]^+$.

Figur 14a viser ESI-MS av fraksjon 54 fra skinn 80% SPE. Signalet med $m/z = 510.3$ tilsvarer $[M+H]^+$, som igjen indikerer at forbindelsen har en masse på ca. 509 Da. Signalet ved $m/z = 532.3$ er $[M+Na]^+$, som indikerer en masse på ca. 531 Da. Natrium har molekylvekt på 23 Da. Signalet ved $m/z = 1019.8$ er $[2M+H]^{2+}$ og er to ioner, med masse 509 Da, som har gått sammen $((1019.8-1)-(510.3-1))= 509,5$ Da.



Figur 15a. ESI-MS av fraksjon 58 fra skinn 80% SPE. Spekteret viser et hovedsignal ved $m/z = 496.3$ som tilsvarer $[M+H]^+$.

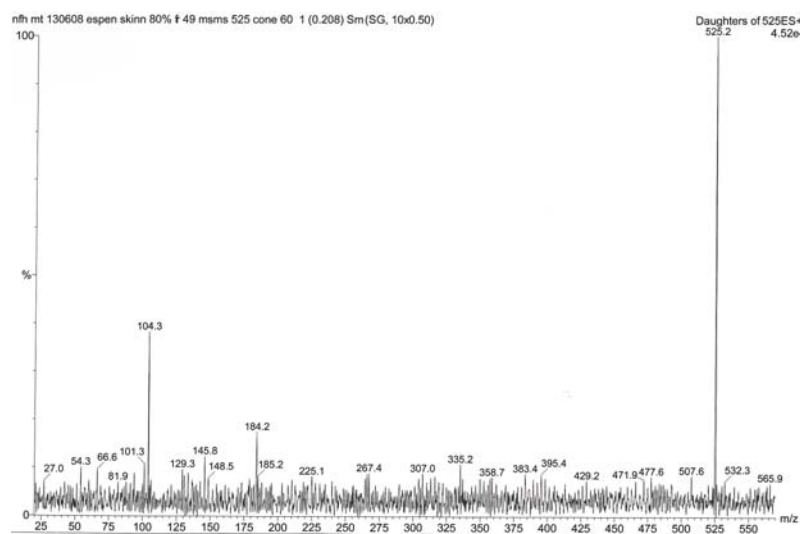
Figur 15a viser ESI-MS av fraksjon 58 fra skinn 80% SPE. Signalet med $m/z = 496.3$ tilsvarer $[M+H]^+$, som igjen indikerer at forbindelsen har en masse på ca. 495 Da. Figur 15a viser mange $[M+H]^+$ -ioner i spekter. Signalet $m/z = 466.4$ indikerer en masse på ca. 465 Da.



Figur 16. ESI-MS av fraksjon 59 fra skinn 80% SPE. Spekteret viser et hovedsignal ved $m/z = 496.0$ som tilsvarer $[M+H]^+$.

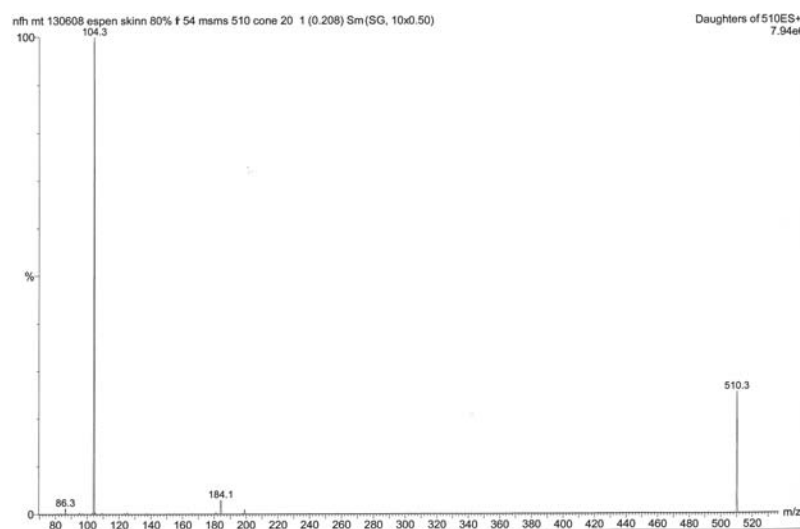
Figur 16 viser ESI-MS av fraksjon 59 fra skinn 80% SPE. Signalet med $m/z = 496.0$ tilsvarer $[M+H]^+$, som igjen indikerer at forbindelsen har en masse på ca. 495 Da. Signalet ved $m/z = 518.0$ tilsvarer $[M+Na]^+$, som igjen tilsvarer en masse på ca. 517 Da. Signalet ved $m/z = 534.0$ tilsvarer $[M+K]^+$, som tilsvarer en masse på ca. 533 Da. Kalium har en molekylvekt på 39 Da.

3.3.1 MSMS av fraksjoner av skinn 80% SPE



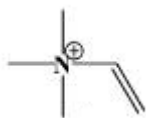
Figur 13b. MSMS av ion 525.3 av fraksjon 50 fra skinn 80% SPE (fig. 13a).

Figur 13b viser MSMS av ion $m/z = 525.3$ av fraksjon 50 fra skinn 80% SPE (fig. 13a), hvor $m/z 525.3$ blir knust til ionefragmenter.

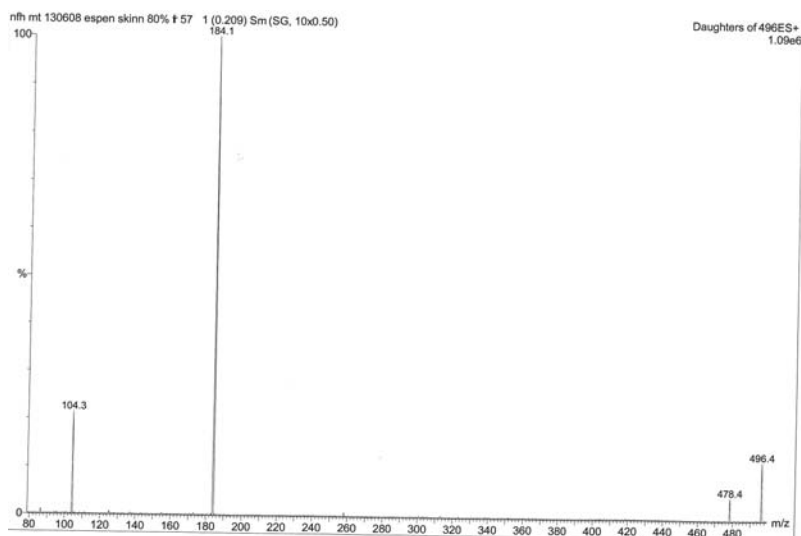


Figur 14b. MSMS av ion 510.3 av fraksjon 54 fra skinn 80% SPE (fig. 14a).

Figur 14b viser MSMS av ion $m/z = 510.3$ av fraksjon 54 fra skinn 80% SPE (fig. 14a). Signalet med $m/z = 510.3$ tilsvarer $[M+H]^+$. Signalet med $m/z = 86.3$ tilsvarer $[M+H]^+$. Figur 14ba viser struktur for $m/z 86.3$ (Ham 2005).

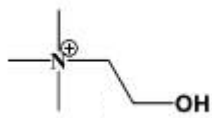


Figur 14ba. Struktur for $m/z 86.3$.



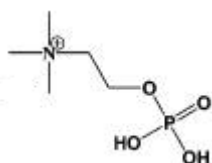
Figur 15b. MSMS av ion 496.3 av fraksjon 58 fra skinn 80% SPE (fig. 15a).

Figur 15b viser MSMS av ion $m/z = 496.3$ av fraksjon 58 fra skinn 80% SPE (fig. 15a). Signalet med $m/z = 496.4$ tilsvarer $[M+H]^+$, som tilsvarer protonert palmitoyl-lysofosfatidylkolin. Signalet med $m/z = 478.3$ tilsvarer $[M-H_2O+H]^+$. Signalet med $m/z = 104.3$ tilsvarer $[M+H]^+$, som er et fragmentert ion $C_5H_{14}NO^+$, struktur figur 15ba (Ham 2005).



Figur 15ba. Struktur for $m/z 104.3$.

Signalet med $m/z = 184.1$ tilsvarer $[M+H]^+$, som er en protonert gruppe av lysofosfatidylkolin med struktur presentert i figur 15bb (Ham 2005).



Figur 15bb. Struktur for $m/z 184.1$.

4 Diskusjon

Det marine miljø er rikt på muligheter når det gjelder oppdagelse av forbindelser med antibakteriell aktivitet. Man vet ikke nødvendigvis til å begynne med hva man leter etter, og identifisering kan skje tilfeldig. Resultater i denne oppgaven viser at uer inneholder flere forbindelser med antibakteriell aktivitet.

Det ble i starten i forsøkene leitet etter antimikrobielle peptider. Ingen HPLC-kromatogram tilsa funn av slike strukturer ved tilhørende bølgelengder. Da den antibakterielle aktiviteten ikke kunne tilskrives peptider, startet man å lete etter andre årsaker. Det ble bl.a. undersøkt etter feilkilder som kunne forklare aktiviteten. Vaskemiddel ble testet i HPLC, med negativt resultat (fig. 17, vedlegg). Flere eluater ble også fraksjonert flere ganger og testet for aktivitet. Skinn 80% SPE ble fraksjonert tre ganger med nesten identiske kromatogram.

Da man ved veldig lave bølgelengder fant klare topper, spesielt for skinn 80% SPE, undersøkte man muligheten for at andre forbindelser enn proteiner var årsak til aktivitet. Lipider absorberer UV-lys dårlig, men ved 206 nm kunne man tydelig se markante topper, sammenlignet med bølgelengder på 220 nm og 280 nm som det først ble undersøkt for.

Ved løsemiddel-ekstraksjon (tab. 5) av organene, utenom galleblære og lever, ble det observert et vekttap på mellom 80-90 %. Lever ga på grunn av store mengder oljer i organet en ufullstendig frysetørking og derfor en veldig høy vekt etter tørking. Galleblære hadde et vekttap på bare 34 %, noe som hovedsakelig skyldes at 39 mg stoff ble eludert ved 40 % SPE. Kan nevnes at galleblæreeluater generelt var mørke i farge, og galleblære 40 % SPE var mørk rød i farge noe som tyder på store mengder pigmenter i tørrstoffet. Også for andre eluater var farge tydeligst ved 40 % SPE, men typisk lys gul til mørk gul farge.

Hensikten med denne oppgaven var å undersøke alle vev og organer i uer (*S. marinus*) for antibakteriell aktivitet. Noen organer viste høy aktivitet mens andre viste lav aktivitet. Interessant kunne man sammenligne resultater fra de forskjellige organene og dermed avgjøre hva som faktisk var høy aktivitet og lav aktivitet.

SPE-eluater av vannfasen viste gjennomgående høyere antibakteriell aktivitet enn ACN ekstrakter. Videre viste SPE-eluater generelt høyere aktivitet testet mot de Gram positive bakteriene; *C. glutamicum* og *S. aureus*, enn mot de Gram negative bakteriene; *E. coli* og *P. aeruginosa*. For enkelte organer ble det registrert høy

antibakteriell aktivitet ($\leq 0,63$ mg/ml) for flere av eluatene. Både 10% SPE og 40% SPE viste for noen organer høy aktivitet mot *C. glutamicum* og til en viss grad *S. aureus*, men særlig følsom var *C. glutamicum* mot 80% SPE eluater. Milt eluat 80% SPE testet mot *C. glutamicum* viste aktivitet ved 0,04 mg/ml. Dette var den laveste konsentrasjonen testet i denne oppgaven, noe som indikerer en mulig enda høyere aktivitet. Eluat av skinn 80% SPE ga aktivitet ned til 0,31 mg/ml mot samme bakterie. Begge disse eluatene viste også høy aktivitet etter HPLC-fraksjonering, hvor enkelte fraksjoner fullstendig hemmet bakterieveksten. Interessant var det at, spesielt for skinn, utpreget deg seg et intervall mellom 48 – 61 minutter fraksjonering hvor fraksjoner viste høy antibakteriell aktivitet. Også 80% SPE eluat av milt viste aktivitet i dette området, men ikke så utpreget som for skinn.

Tabell 11 sammenligner fraksjoner med antibakteriell aktivitet funnet i 80% SPE eluater testet mot *C. glutamicum*. For mange fraksjoner sammenfaller aktiviteten for flere av organene. Tabell 12 sammenligner fraksjoner med antibakteriell aktivitet funnet i 80% SPE eluater testet mot *S. aureus*. For de fleste fraksjoner med aktivitet for *S. aureus* kan man se at disse fraksjonene sammenfaller med fraksjoner funnet i tabell 11. Spesielt fraksjonene 56, 57, 58, 59 og 61 fra eluat av skinn 80% SPE ligner på resultatene for skinn og finner 80% SPE mot *C. glutamicum*.

Elutat 80% SPE av finner viste, ikke overraskende, mange likhetstrekk med resultater fra skinn, noe som kan forklares med at ekstrakt av finner inneholdt også en god del skinn.

Det ble i fraksjon 58 og 59 fra skinn 80% SPE identifisert palmitoyllysofosfatidylkolin (16:0) ved hjelp av MS. Lysofosfatidylkolin er kjent for å ha antibakterielle egenskaper (Kondo et. al., 1985) og er trolig årsaken til den antibakterielle aktiviteten funnet i disse fraksjonene. Da man med denne nye kunnskapen gikk tilbake til HPLC kromatogrammene for disse eluatene kunne man tydelig se klare topper hvor lysofosfatidylkolin er kjent for å absorbere lys best. Yoon et. al., (2002) måler absorbans for lysofosfatidylkolin ved 206 nm.

For skinn 80% SPE kan man se (tab. 8 og 9) tre klare topper etter henholdsvis 50, 54 og 58 minutter fraksjonering (fig. 10, 11 og 12). Høy antibakteriell aktivitet ble målt også for fraksjoner mellom disse toppene. Det kan forklares med at toppene ikke samsvarer nøyaktig med fraksjonene. Når man også vet at lysofosfatidylkolin er et lipid som absorberer lys dårlig, kan man tenkte seg at ikke toppene i seg selv

indikerer styrke på antibakteriell aktivitet. Stoffer kan også opptre i små konsentrasjoner med høy grad av aktivitet eller store konsentrasjoner med lav grad av aktivitet.

De indre organene; galleblære, hjerte, lever og milt, viste alle lignende svak antibakteriell aktivitet ($OD_{50\%}$) for eluatene 80% SPE testet mot *C. glutamicum*. Bare for eluat av milt 80% SPE ble det for enkelte fraksjoner registrert $OD_{100\%}$. Dette kan skyldes mange forhold, mest nærliggende kan være tap av synergieffekter som man mistet etter HPLC. Molekylene i prøven fraksjoneres ut etter hvilken retensjonstid de har gjennom kolonnen, og således splittes fra andre molekyler med eventuelle synergieffekter.

Når det gjelder giftpiggene på uer, fant man ingen resultater som kan gi noen svar på spørsmål angående disse. Gift i pigger hos uer fra kalde områder er svak sammenlignet med slektninger fra varmere breddegrader (Reefkeeping). Men det er uansett ubehagelig å stikke seg på disse piggene og øyevæske har en lindrende virkning, noe som er godt kjent hos fiskere.

4.1 Videre arbeid

Mye arbeid gjenstår for en komplett oversikt over alle forbindelser i uer. Man kunne ønsket seg flere paralleller i testing mot bakteriestammer og detaljerte MIC-studier mot flere bakteriestammer. MS kunne med fordel vært kjørt mot flere fraksjoner for både skinn og andre organer. Den påviste aktiviteten i milt SPE eluater kunne vært interessant å teste på nytt i Bioscreen C for enten bekrefte eller avkrefte den antibakterielle aktiviteten. Også MS av eluater av milt kunne gitt informasjon om eventuelle bioaktive forbindelser.

4.2 Konklusjon

Hovedmålet med denne oppgaven var å undersøke alle vev/organer i uer (*S. marinus*) for antibakteriell aktivitet, og eventuelt identifisere forbindelser med aktivitet. Det ble observert aktivitet i alle fiskens organer, da i varierende grad av aktivitet. Spesielt følsom var bakteriestammen *C. glutamicum* testet mot eluater av de fleste organer. *S. aureus* viste følsomhet ovenfor enkelte eluater, mens de Gram negative bakteriestammene viste mye høyere toleranse for eluatene og ekstraktene. Videre

fraksjonering vha. HPLC viste høy antibakteriell aktivitet for eluater testet mot de Gram positive bakteriestammene, mens aktivitet mot de Gram negative ikke var tilstede. Dette er i samsvar med Kondo et. al., (1985) som observerer antibakteriell aktivitet for palmitoyl-lysofosfatidylkolin mot *S. aureus*, men ikke mot *E. coli*.

5 Referanser

- Chromabond. Solid phase extraction. [Macherey-Nagel].
- De Vries, D.J., Hall, M.R., 1994.
Marine biodiversity as a source of chemical diversity. *Drug Development Research*. 33, 161-173.
- Ellis, A.E., 2001.
Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria. *Development and Comparative Immunology*. 25, 827-839.
- Gallo, R.L., 2005.
Antimicrobial peptides in human health and disease. Horizon bioscience, USA.
- Ham, B.M., Jacob, J.T., Cole, R.B., 2005.
MALDI-TOF of phosphorylated lipids in biological fluids using immobilized metal affinity chromatography as a solid ionic crystal matrix. *American Chemical Society*. 77, 4439-4447.
- Haug, T., Kjuul, A.K., Stensvåg, K., Sandsdalen, E., Styrvold, O.B., 2002.
Antibacterial activity in four marine crustacean decapods. *Fish & Shellfish Immunology*. 12, 371-385.
- Haug, T., Kjuul, A.K., Styrvold, O.B., Sandsdalen, E., Olsen, Ø.M., Stensvåg, K., 2002. Antibacterial activity in *Strongylocentrotus droebachiensis* (Echinoidea), *Cucumaria frondosa* (Holothroidea), and *Asterias rubens* (Asteroidea). *Journal of Invertebrate Pathology*. 81, 94-102.
- Haug, T., Stensvåg, K., Olsen, Ø.M., Sandsdalen, E., Styrvold, O.B., 2004.
Antibacterial activities in various tissues of the horse mussel, *Modiolus modiolus*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 85, 112-119.
- Kondo, E., Kanai, K., 1985.
Mechanism of bacterial activity of lysolecithin and its biological implication. *Japan. J. Med. Sci. Biol*. 38, 181-194.
- Nagashima, Y., Kikuchi, N., Shimakura, K., Shiomi, K., 2003.
Purification and characterization of an antibacterial protein in the skin secretion of rockfish *Sebastes schlegeli*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*. 136, 63-71.
- Stransky, C., Kanisch, G., Krüger, A., Purkl, S., 2005.
Radiometric age validation of golden redfish (*Sebastes marinus*) and deep-sea redfish (*S. mentella*) in Northeast Atlantic. *Fisheries Research*. 74, 186-197.
- Tadesse, M., Gulliksen, B., Strøm, M.B., Styrvold, O.B., Haug, T., 2008.
Screening for antibacterial and antifungal activities in marine benthic invertebrates from northern Norway. *Journal of Invertebrate Pathology*. 99, 286-293.
- Yoon, T.H., Kim, I.H., 2002. Phosphatidylcholine isolation from egg yolk phospholipids by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 949, 209-216.

5.1 Internettadresser

Avanti Polar Lipids, Inc

www.avantilipids.com/SyntheticLysophospholipids.asp#Lysophosphatidylcholine

Encyclopædia Britannica online

[1] search.eb.com/eb/article-9059778

[2] search.eb.com/eb/article-228946

[3] search.eb.com/eb/article-80507#619722.hook

[4] search.eb.com/eb/article-80518

[5] search.eb.com/eb/article-9110405

[6] search.eb.com/eb/article-9062976

Fiskeridirektoratet

www.fiskeridir.no/fiskeridir/fiskeri/statistikk/kart/kart_norske_fangster_2004/uer_sebastes_marinus_norske_fangster_2004

The lipid library

www.lipidlibrary.co.uk/Lipids/pc/index.htm

Reefkeeping, coldwater Scorpaeonids

reefkeeping.com/issues/2002-11/rs/index.php

6 Vedlegg

Tabell 13

Antibakteriell aktivitet målt i ulike vev og organer i uer (*Sebastes marinus*).

Organ	Fraksjon (% ACN)	Antibakteriell aktivitet (MIC; mg/ml)			Sa
		<i>Ec</i>	<i>Pa</i>	<i>Cg</i>	
Skinn I	10	5	2,5	1,25	2,5
	40	20	5	2,5	5
	80	2,5	2,5	0,08	0,63
	Organisk	-	-	20	20

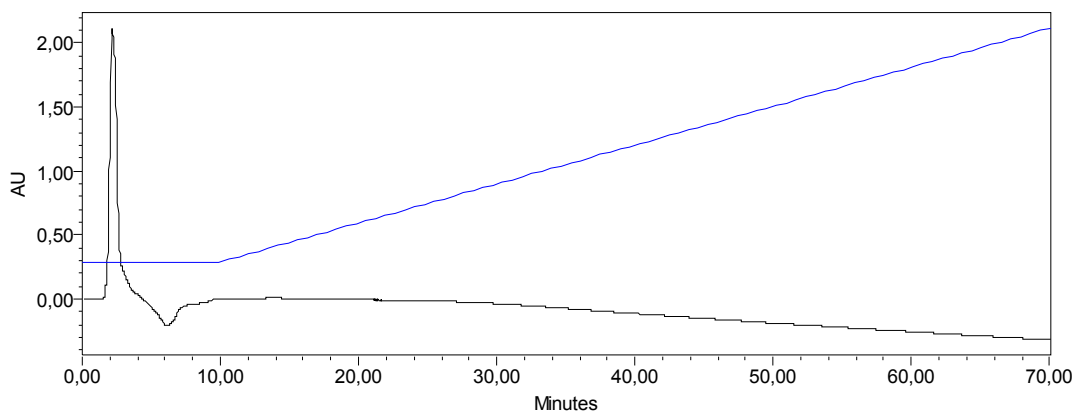


Fig. 17. HPLC-fraksjonering av vaskemiddel med 10 ml tilsatt ca. 30 korn vaskemiddel som ga blakket løsning. Kromatogrammet viser ved bølgelengde 206 nm.