UiT

NORGES ARKTISKE UNIVERSITET

NORGES FISKERIHØGSKOLE

Antimikrobielle forbindelser i marine makroalger

—

Sandra Danielsen Wiik

Masteroppgave i Fiskehelse (60stp) - November 2013

UNIVERSITETET I TROMSØ

FORORD

Oppgaven ble utført som et samarbeid mellom Norges Fiskerihøgskole (NFH) og institutt for arktisk og marin biologi (AMB), ved fakultetet for biovitenskap, fiskeri og økonomi, Universitetet i Tromsø. Arbeidet ble utført vårsemester 2012 – høstsemester 2013. hovedveileder førsteamanuensis Tor Haug (NFH). I tillegg har professor Klara Stensvåg (NFH) og stipendiat Runar Gjerp Solstad vært med- veiledere.

Først og fremst vil jeg takke veilederne for at de har satt sammen en veldig spennende oppgave til meg. Tusen takk for uunnværlig hjelp og veiledning, og ikke minst all kunnskap dere har gitt meg i løpet av denne masteren. Jeg vil takke Runar og Hege for veiledning i labarbeidet. Dere har vært god støtte. Videre vil jeg takke Einar Ringø for at jeg fikk bruke hans marine bakterier. Jeg må takke Frøydis Strand for det gode samarbeidet på plakaten min til Bioprosp 2013.

En stor takk til alle mine medstudenter på NFH, og resten av UiT. Spesielt stor takk til alle masterstudentene på D-207 for de timene vi tilbrakte sammen i denne stressende perioden. Kakefredag har vært ukas høydepunkt.

Tilslutt, takk til mamma, pappa og min kjære ektefelle, Mathias. Takk for all støtte som har gjort gjennomføringen av denne masteren mulig. Takk for at dere alltid er der for meg.

Sandra

Tromsø november 2013

ABSTRAKT

Marin bioprospektering er definert som letingen etter og karakterisering av nye bioaktive forbindelser fra havets ressurser med hensikt å benytte denne kunnskapen kommersielt til utvikling av medisiner, helsekost eller stoffer med annen anvendelse. Verdenshavene dekker 70 % av jordas overflate, og innehar en enorm biodiversistet som er lite utforsket. Det er i dag et behov for å identifisere nye aktive komponenter for å supplementere eller erstatte allerede eksisterende konvensjonelle antibiotika på markedet. Marin bioprospektering er et lovende forskningsfelt for dette, og har derfor fått stor oppmerksomhet rundt om i verden.

Dette studiet besto av ekstraksjon, og videre separasjon ved hjelp av fast-fase separasjon (SPE), av seks marine makroalger (*Desmarestia aculeata, Fucus distichus, Alaria esculenta, Enteromorpha intestinalis, Cladophora rupestris, Palmaria palmata*). Eluatene/ ekstraktene ble testet for antimikrobiell aktivitet mot fire terrestriske (*Pseudomonasaeruginosa, Escherichia coli , Staphylococcus aureus* og *Corynebacterium* glutamicum) og fire marine bakteriestammer (*Aeromonas salmonicida* og *Listonella anguillarum, Carnobacterium divergens* og *Carnobacterium mobile*). Det ble registrert antimikrobiell aktivitet i SPE-eluater fra alle de ulike makroalgene, men bare enkelte av de organiske ekstraktene. Noen av eluatene viste antimikrobiell aktivitet mot alle de 8 bakteriestammene. Aktive SPE- eluater ble videre fraksjonert ved hjelp av høytrykks- væskekromatografi (HPLC), og fraksjonene ble testet for antimikrobiell aktivitet. De aktive fraksjonene ble analysert med massespektrometri LC-MS.

Det ble oppdaget antimikrobielle forbindelser i alle de utvalgte marine makroalgene. I HPLC-fraksjonene til Båetang, ble det karakterisert en rekke florotanniner innenfor i alle fall to av hovedgruppene; floroetholer og eckoler. I HPLC- fraksjoner fra Søl ble det funnet noe som kan tenkes å være mycopsorin-lignende aminosyrer som synes å være ukjente, da de ikke er beskrevet i litteratur, og det kan se ut som HPLC- fraksjoner fra Tarmgrønske inneholder nevrotoksinene anatoksin-a og homo-anatoksin-a. Videre analyse med mer følsomme maskiner må til for å bekrefte identiteten til forbindelsene funnet i dette studiet.

ABSTRACT

Marine bioprospecting is defined as research where one search for, and characterize new bioactive compounds from marine resources with the intent to use this knowledge to commercial development of pharmaceuticals, health foods or compounds with other commercial applications. The oceans cover 70 % of the Earth's surface and holds an enormous Biodiversity that is little explored. There is currently a need to identify new active components to supplement or replace existing conventional antibiotics on the market. Marine bioprospecting is a promising field of research for this and has therefore received considerable attention around the world.

This study consisted of extraction, and further separation using solid phase separation (SPE), of six marine macro algae (*Desmarestia aculeata, distichus Fucus, Alaria esculenta, Enteromorpha intestinalis, Cladophora rupestris, Palmaria palmata*). The eluates/extracts were tested for antimicrobial activity against four terrestrial - (*Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli, Staphylococcus aureus and Corynebacterium glutamicum*) and four marine bacterial strains (*Aeromonas salmonicida and Listonella anguillarum, Carnobacterium divergens and Carnobacterium mobile*). It was noted antimicrobial activity in SPE eluates from all the different macro algae, but only some of the organic extracts. Some of the eluates showed antimicrobial activity against all eight strains. Active SPE eluates were further fractionated by high pressure liquid chromatography (HPLC), and fractions were tested for antimicrobial activity. The active fractions were analyzed by mass spectrometry LC-MS.

It was discovered antimicrobial compounds in each of the selected marine macroalgae. It was possible to characterize what seem to be a number of phlorotannins in the HPLC fractions from Fucus distichus. The phlorotannins characterized seem to belong within at least two main groups; phloroethols and eckols. In HPLC fractions from Palmaria palmata there seemed to be what looked like be mycopsorin-like amino acids, which appears to be unknown, as they are not described in the literature. It looks like HPLC fractions from Enteromorpha intestinalis might contain the neurotoxins; anatoxin-a and homo-anatoxin-a. Further analysis with more sensitive equipment will be required to verify the identity of the compounds found in this study.

INNHOLDSFORTEGNELSE

FORORD I

ABSTRAKT II

ABSTRACT III

INNHOLDSFORTEGNELSE IV

FORKORTELSER VI

1. INTRODUKSJON 1

1.1 BAKGRUNN 1

1.2 ANTIBIOTIKA OG INFEKSIØSE SYKDOMMER 2

1.3 MARIN BIOPROSPEKTERING 3

1.4 MAKROALGER 3

1.5 BIOAKTIVE KOMPONENTER FRA MAKROALGER 4

1.6 MÅL FOR OPPGAVEN 7

1.7 BESKRIVELSE AV MAKROALGENE BENYTTET I OPPGAVEN 8

1.7.1 *Alaria esculenta*- Butare 8

1.7.2 *Fucus distichus*- Båetang 9

1.7.3 *Desmarestia aculeata*- Vanlig kjærringhår 10

1.7.4 *Cladophora rupestris* – Vanlig grønndusk 11

1.7.5 *Enteromorpha intestinalis* - Tarmgrønske 12

1.7.6 *Palmaria palmata* – Søl 13

1.8 GENERELT OM VALGT METODIKK- BIOASSAY 14

1.8.1 Ekstraksjon fra biologisk materiale 14

1.8.2 Kromatografisk separasjon 15

1.8.3 Biologisk testing 16

1.8.4 Massespektrometri 16

2. MATERIAL OG METODE 17

2.1 Metodeforløp 17

2.2 Kjemikalier 18

2.3 Tang 18

2.4 PREPARERING OG EKSTRAKSJON AV MATERIALE 19

2.4.1 Preparering 19

2.4.2 Ekstraksjon og væske-væske kromatografi 19

2.4.3 Fast fase ekstraksjon 20

2.5 Bioaktivitetstesting 20

2.5.1 Bakteriestammer 20
2.5.2 Dyrkingsmedier til dyrking av bakterier 21
2.5.3 Dyrking av bakterier 21
2.5.4 Minimums inhiberende konsentrasjons test (MIC) 22
2.6 Revers-fase høytrykks væskekromatografi (RP-HPLC) 24
2.7 Massespektrometri (LC-MS) 24
3. RESULTATER 25
3.1 Tørrstoffutbytte 25
3.2 Antimikrobiell aktivitet 26
3.2.1 Antimikrobiell aktivitet i SPE eluater og ACN ekstraker 26
3.2.2 Antimikrobiell aktivitet i HPLC fraksjoner 31
3.3 Innledende karakterisering 35
3.3.1 *Fucus distichus*- Båetang 35
3.3.2 *Enteromorpha intestinalis* - Tarmgrønske 38
3.3.3 *Palmaria palmata* - Søl 42
4. DISKUSJON 45
4.1 Ekstraksjonsmetode 46
4.2 Antimikrobiell aktivitet 46
4.2.1 RP-HPLC 48
4.3 Innledende karakterisering av aktive forbindelser 49
4.3.1 Florotanniner 49
4.3.2 Lavmolekylære forbindelser 51
5. KONKLUSJON 51
6. REFERANSER 53
7. APPENDIKS 58
Appendiks 1 58
Appendiks 2 58
Appendiks 3 58
Appendiks 4 59

FORKORTELSER

ACN	Acetonitrile
HPLC	Høytrykks- væskekromatografi (High pressure column chromatography)
m/z	Masse/ ladnings ratio
MH	Mueller-Hinton medium
TGGA	Tryptone- Gjærekstrakt- Glukose- Agar
MIC	Minimums inhiberende konsentrasjons test (Minimum inhibitory concentration)
PDA	Photodiode array detector
OD	Optisk densitet (Optical density)
RP- HPLC	Revers fase høytrykkskromatografi
SPE	Fast- fase ekstraksjon (Solid phase extraction)
TFA	Trifluoreddiksyre (Trifluoro acetic acid)
UV- Vis	Ultrafiolett- synlig lys (Ultraviolet- Visual)
HR-MS	Høy oppløsnin (High resolution) masse spektrometri

1. INTRODUKSJON

1.1 BAKGRUNN

Mikroorganismer eksisterte på jorden før planter og dyr oppstod. De er å finne i de fleste miljøer på kloden, og er jordens viktigste «kjemikere». Uten mikroorganismer ville ikke noen av de livsformene vi kjenner til i dag kunne eksistert. Livet på jorden er avhengig av mikroorganismer, men enkelte typer forårsaker sykdom og lidelse hos mennesker, planter og dyr (Madigan *et al.*, 2009). Menneskeheten har lidd under disse sykdomsfremkallende mikrobene hele vår eksistens, men kloke hoder har opp gjennom tiden lært å utnytte naturens ressurser i kampen for å overleve. Den helbredene effekten av enkelte terrestriske planter har lenge vært kjent, og er fortsatt en del av den tradisjonelle medisinen som fortsatt blir brukt i enkelte deler av verden (Cragg & Newman, 2001). Kunnskapen fra tradisjonell medisin har vært og kan fortsatt være utgangspunktet for moderne medisin. I, og i dag er 40 % av medisiner på markedet nettopp basert på naturstoffer. Blant gruppen av, med naturstoffer sterkest representert blant kreftmedisiner og medisiner mot infeksiøse sykdommer, som er sterkt representert blant legemidlene på markedet, der opp mot 75 % av legemidlene er basert på naturstoffer (Samuelsson & Bohlin, 2009).

Alexander Fleming oppdaget i 1922 lysozymets bakteriedrepende virkning. Opptakten var at han la merke til at en muggsopp, senere kalt *Penicillium notatum*, hemmet vekst av bakterier på en bakteriedyrkingsplate. Soppen måtte derfor ha antimikrobielle egenskaper og han lyktes å identifisere den aktive komponenten (Madigan *et al.*, 2009). Fremskritt innen syntetisk kjemi gjorde det mulig å identifisere nye kjemiske molekyler, og vi fikk fremvekst av den moderne farmasøytiske industrien. Resultatet av denne industrien var utviklingen av potente molekyler med svært selektiv aktivitet ovenfor en rekke sykdommer. Denne «gullalderen» innen farmasøytisk industri førte til at man så for seg en slutt på sykdommer. Det var først på 1970 tallet at antibiotikaresistens (nedsatt følsomhet hos mikroorganismer) ble oppfattet som et problem. I dag er infeksiøse sykdommer blitt den ledende dødsårsaken på verdensbasis. Feil bruk av antibiotika mot infeksiøse sykdommer, som stort forbruk og misbruk, har forverret resistensproblemet. Verden har etter hvert endret seg og vi lever nå i et globalt samfunn der resistensmekanismene overføres stadig hurtigere fra resistente bakterier til en bakterie som ikke hadde resistens. Det er derfor et akutt behov for nye antimikrobielle substanser med varierte kjemiske strukturer og nye virkemekanismer for å bekjempe nye og allerede eksisterende resistente mikroorganismer (Chanda *et al.*, 2010).

1.2 ANTIBIOTIKA OG INFEKSIØSE SYKDOMMER

Antibiotika er vanligvis definert som naturlige, halv- eller hel syntetiske stoffer produsert av mikroorganismer som selektivt hemmer vekst eller dreper andre mikroorganismer (Rang *et al.*, 2012). Planter og dyr har imidlertid vist seg å være produsenter av ulike typer antibakterielle stoffer. Antibiotika kan være smalspektrede og fungere på bare for eksempel Gram-positive bakterier, eller de kan fungere på flere typer mikroorganismer, og vil da være klassifisert som bredspektrede. Antibiotika kan ha flere virkningsmekanismer, men de vanligste er å forstyrre bioprosesser i bakteriene som fører til dannelsen av cellevegg eller å hindre proteinsyntesen (Rang *et al.*, 2012).

Antibiotika som tidligere nevnt var spådd, å bety slutten på infeksiøse sykdommer, men i dag er noen av disse et stort problem. Flere patogene bakterier som framkalte sykdom som før var kurerbare, har utviklet multiresistens overfor ulike antibiotikatyper. Disse sykdommene er spesielt et problem på sykehus og andre helseinstitusjoner som bruker antibiotika, et eksempel er **Methillicin**- resistens *Staphylococcus aureus* (MRSA). Til nå har glykopeptid- antibiotika, som f. eks. **Vancomycin** fungert som en «siste utvei» mot disse bakteriene, men det har i senere tid blitt rapportert om stammer av MRSA med redusert følsomhet for denne typen antibiotika (Rang *et al.*, 2012).

Tuberkulose (TB) har tidligere vært en av sykdommene som ble kraftig redusert og kontrollert ved hjelp av antibiotika og vaksiner. I dag er tuberkulose nest etter HIV/AIDS den største dødsårsaken på verdensbasis som skyldes et enkelt smittestoff. Multiresistent tuberkulose (MDR - TB) er en form for tuberkulose forårsaket av bakterier som ikke kureres av minst **Isoniazid** og **Rifampicin**, de to mektigste "første linje" (eller standard) anti-TB medisiner. I noen tilfeller kan mer alvorlig medikament-resistens utvikle seg. Omfattende multiresistent tuberkulose, XDR -TB, er en form for multiresistent tuberkulose som kureres av enda færre tilgjengelige medisiner, inkludert de mest effektive andre-linje anti -TB medisiner (WHO, 2013). Det er i tillegg flere Gram-positive patogener, som **Vancomycin** resistente *Staphylococcus aureus* (VRSA) og MRSA, **Penicillin** -resistente streptokokker, og **Vancomycin** resistente *Enterococcus* (VRE) (Simor *et al.*, 1995; Bassetti *et al.*, 2013). Utviklingen av multiresistens fører til et akutt behov for nye antimikrobielle substanser med nye virkemekanismer som kan bekjempe nye og allerede eksisterende resistente mikroorganismer (Chanda *et al.*, 2010).

Siden midten av 1970-tallet har det foregått en systematisk utforskning av det marine miljøet. Det er i dag funnet tusenvis av bioaktive komponenter, men det er kun et fåtall som er utviklet

til legemidler og som er ute på markedet (Cragg & Newman, 2013a). Mange av de bioaktive komponentene har vist antimikrobiell aktivitet, også mot multiresistente bakteriestammer(Vairappan *et al.*, 2004; Mayer *et al.*, 2011).

1.3 MARIN BIOPROSPEKTERING

Det er i dag et behov for å identifisere og utvikle nye aktive komponenter for å supplere eller erstatte allerede eksisterende konvensjonelle antibiotika på markedet. Marin bioprospektering er et lovende forskningsfelt med optimistisk tilnærming for å kunne dekke behovet for nye antiinfeksiøse midler, og dette strategiske fokuset har derfor fått stor oppmerksomhet innen forskning på verdensbasis.

Marin bioprospektering er blant annet rettet mot isolering og karakterisering av bioaktive forbindelser fra det marine miljø som potensielt kan utnyttes i en kommersiell sammenheng, som f.eks. til medisiner eller som kosttilskudd.

Optimismen og troen på marin bioprospektering ligger i forventningene om nettopp å oppdage noe nytt og revolusjonerende fra det marine miljøet. Begrunnelsen for det store potensialet er at verdenshavene dekker ca. 70 % av jordens overflate, med 32 av 33 fyla representert, og der 15 utelukkende er marine (Cragg & Newman, 2013b). Havenes store mangfold av liv utgjør en viktig ressurs i jakten på nye bioaktive forbindelser. Opp gjennom tidene har ikke marine ressurser fått like mye oppmerksomhet som det terrestriske miljøet (i for eksempel regnskogene), men dette har endret seg de senere årene(Chanda *et al.*, 2010).

Per i dag er over 15 000 unike marine forbindelser kjemisk bestemt (Cardozo *et al.*, 2007). Videre utforskning av disse, samt oppdagelsen av nye forbindelser for farmasøytiske formål vil åpenbart være viktig for utviklingen av nye legemidler. De første godkjente medikamentene som var avledet fra det marine miljøet var Aciclovir/Vidarabine (antiviral), Zidovudine (antiviral) og Cytarabine (antitumoral)(Haug, 2013a), og stammet alle fra en og samme svamp (*Cryptotethya crypta*) (Sepcic, 2000).

1.4 MAKROALGER

Marine alger er primær produsenter av organisk materiale i havet. De er å finne i de frie vannmasser, gror på sedimentet eller vokser på andre organismer. Makroalger som er hovedfokuset i denne oppgaven deles fylogenetisk opp i *Rhodophyta* (rødalger), *Phaeophyta* (brunalger) og *Chlorophyta* (grønnalger). Makroalger er lovende organismer for å gi både nye biologiske virkestoffer og viktige forbindelser for menneskelig ernæring («Functional foods»)

(Tringali, 1997). Av spesiell interesse, grunnet sine økonomiske potensial i matvitenskap, farmasøytisk industri og offentlig helse, er: fettsyrer, steroider, karotenoider, polysakkarider, lektiner, mykosporin-lignende aminosyrer, halogenerte forbindelser, polyketider og giftstoffer (Cardozo *et al.*, 2007). Dette blir beskrevet nærmere i avsnittet om bioaktivitet i makroalger, og et utvalg av bioaktive forbindelser blir vist i tabell 1.

Det marine miljøet er variert, og makroalger utsettes for en rekke påkjennelser. Det er konkurranse om habitat med både andre makroalger og andre organismer/mikroorganismer. Makroalger produserer og skiller ut sekundærmetabolitter som virker ved å endre vekst, atferd eller populasjons dynamikk hos andre arter. Begroing av bakterier og andre organismer kan være et problem for å bestemme opprinnelsen av en bioaktive forbindelse som isoleres fra ekstrakter.

Bakterietettheten i sjøvannvann og sediment kan være veldig høy (henholdsvis 10^6 og 10^9 per milliliter) (Haug *et al.*, 2004), og vil dermed være tilstede tett sammen med alt annet som er der; planter, dyr, alger, etc.

Makroalger har vist seg å produsere forskjellige former for antimikrobielle substanser. Makroalger utsettes også for predasjon, det er blitt påvist at algene kan produsere forbindelser som virker avskrekkende på predatorene (Klausen, 2002; Selvin & Lipton, 2004). Makroalger som gror i de øvre vannmassene utsettes for lys og høye oksygenkonsentrasjoner. Dette medfører dannelse av mange frie radikaler som utsetter makroalgene for oksydasjonspress, selv om makroalgene ikke ser ut til å ta skade av dette. Makroalger har gjennom evolusjonen tilpasset seg det marine miljøet ved å utvikle et bredt spekter sekundærmetabolitter med varierte biokjemiske funksjoner inkl. antioksidanter (Chanda *et al.*, 2010). En forståelse av forholdet mellom tang, miljø og andre organismer kan gi oss en ledetråd om substanser av biomedisinsk interesse (Selvin & Lipton, 2004).

1.5 BIOAKTIVE KOMPONENTER FRA MAKROALGER

I perioden 1965-2005 er mer enn 15 000 natur produkter fra marine kilder isolert (Blunt *et al.*, 2007; Blunt *et al.*, 2013), og ca. 2400 av disse er isolert fra makroalger (Faulkner, 2001; Blunt *et al.*, 2007). Blant disse marine forbindelsene er det funnet stoffer med antibakteriell, antikoagulant, soppdrepende, anti-inflammatorisk, anti-malaria, antiprotozoisk, anti-tuberkulose, og antiviral aktivitet (Mayer *et al.*, 2011). Eksempler på bioaktive metabolitter (med karakterisert kjemisk struktur) fra den marine flora omfatter bromerte fenoler, oksygen

heterosykler, nitrogen heterosykler, svovel/nitrogen heterosykler, steroler, terpenoider, polysakkarider, peptider og proteiner (Cardozo *et al.*, 2007), nedenfor følger et lite utvalg.

Akrylsyre fra tang har antibakteriell aktivitet. Denne syren kan være fri, bundet som salter eller delvis bundet til dimethylsulfid i en inaktiv form. Glombitza (1979) fant at akrylsyre bundet til dimethylsulfid kunne enzymatisk omdannes av algen til en aktiv form, dimethyl –β-propiothetin, som viste seg å være spesielt aktiv mot Gram-positive bakterier (Glombitza, 1979).

Halogenerte forbindelser finnes i flere ulike klasser av primære og sekundære metabolitter, hovedsakelig i marine rød- og brunalger. Eksempler inkluderer indoler, terpener, acetogeniner, fenoler, fettsyrer og flyktige halogenerte hydrokarboner. I mange tilfeller har de biologiske aktiviteter av farmakologisk interesse, inkludert antibakterielle (Vairappan *et al.*, 2001; Vairappan *et al.*, 2004) og antitumorale aktiviteter (Fuller *et al.*, 1992). Polyhalogenert monoterpener (plocoralide A) fra rødalger av slektene *Plocamium*, *Chondrococcus* og *Ochtodes* viser et bredt spekter av farmakologiske aktiviteter, inkludert antimikrobiell, antituberkulær og cytotoksisk aktivitet (Fuller *et al.*, 1992; Darias *et al.*, 2001; Blunt *et al.*, 2003; Knott *et al.*, 2005)

Sekundær metabolitter av interesse fra makroalger er Polyketider. Polyketider har enorm innvirkning på den farmasøytiske industrien på grunn av deres høye kommersielle verdi (Dos Santos *et al.*, 2005). Polyketider er makrolid-antibiotika (antibiotika som binder seg til bakteriens ribosomer og dermed hemmer proteinsyntesen) produsert av stammer av bakterietypen *Streptomyces*. Polyketider produseres også av makroalger, eksempler er *Labophora variegata* (Kubanek et al., 2003) og *Sagassum binderi* (Baharum et al., 2011).

Marine alger inneholder flere nitrogenholdige heterosykliske forbindelser, de mest interessante forbindelser er domoinsyre og kainsyre. Disse forbindelsene er antiparasittmidler (anthelmintika). Flere preparater av kainsyre er tilgjengelig på markedet, inkludert **Digenin** og **Helminal** (Stecher, 1968).

Spesielt for brunlager er fysoder, intracellulære vesikler, som skiller ut fenoliske forbindelser (florotanniner og polyfenoler) (Lobban & Harrison, 1994). Den antimikrobielle aktiviteten til polyfenoler er vell-kjente (Burkholder & Sharma, 1969). De fleste er også effektive

antioksidanter, og enkelte gir predasjonsbeskyttelse. Bromfenol-derivater fra *Leathesia nana* har vist seg å være cytotoksiske mot er rekke menneskelige kreftcelletyper (Xu *et al.*, 2004), og ekstrakter fra *Zonaria diesingiana* har vist antibakteriell aktivitet mot *S. aureus* og *Bacillus subtilis* (Wisespongpand & Kuniyoshi, 2003). Glombitza (1979) isolerte en antibakteriell fenolisk forbindelse, florglucinol, fra fysodene til *Fucus spiralis* (Glombitza, 1979).

Fucaner er polysakkarider med innehold av sulfat funnet hos brunalger. Det best studerte fucanet er fucoidan. Senthilkumar og medarbeidere (2013) påviste cytotoksisk aktivitet hos fucoidan (Senthilkumar *et al.*, 2013).

Ekstrakter av de marine algen *Laminaria angustata* og *Chondria amata* er rapportert å inneholde proteinet Laminin med hypotensiv-, antiviral- og antibakteriell aktivitet. Laminine minsker kontraksjonen av eksitert glatt muskulatur, og er ansett å være et potensielt nyttig medikament (Bhakuni & Rawat, 2005).

I tabell 1 er det listet opp et utvalg av rapporterte bioaktive forbindelser isolert fra makroalger.

Tabell 1: ***Bioaktive forbindelser isolert og karakterisert fra ulike arter av makroalger.***

Strukturell klasse	Forbindelse	Aktivitet	Makroalge	Referanse
Terpener	Plocoralide A	Antibakteriell Antituberkular Cytotoksisk	Familie Plocamium sp.	(Darias *et al.*, 2001)
Polyketider	Polyketide	Antibakteriell	*Labophora variegata*	(Kubanek *et al.*, 2003)
Fenoler	Phlortanniner og polyfenoler	Antibakteriell	*Leathisia nana*	(Xu *et al.*, 2004)
		Cytotoksisk		(Wisespongpand & Kuniyoshi, 2003)
Aminosyrer	Laminin	Antiviral Antibakteriell Hypotensiv	Familie Laminaria	(Bhakuni & Rawat, 2005
Fettsyrer	C18 og C20 umettede fettsyrer	Antibakteriell Antiviral	*Laminaria saccharina*	(Rosell & Srivastava, 1987)
Polysakkarider	Fucoidan	Cytotoksisk	Phaeophyta	(Senthilkumar *et al.*, 2013)

1.6 MÅL FOR OPPGAVEN

Hovedmålet med denne oppgaven var å lete etter, og påvise forekomst av bioaktive forbindelser med antimikrobiell effekt i 6 ulike marine makroalger. Oppgaven har videre 3 delmål:

1. Lage ekstrakter av seks ulike arter av marine makroalger; *Desmarestia aculeata, Fucus distichus, Alaria esculenta, Enteromorpha intestinalis, Cladophora rupestris, Palmaria palmata*. Ekstraktene grovsepareres med fast fase ekstraksjon (SPE).

2. Screene for antibakteriell aktivitet og undersøke om ekstraktene er mer aktive overfor marine bakterier enn terrestriske bakterier. Ekstraktene testes for antimikrobiell aktivitet mot fire terrestriske patogener, to Gram-negative marine fiske -patogene bakterier og to Gram-positive marine bakterier

3. Isolere og utføre innledende karakterisering av aktive komponenter i fraksjoner som viser innhold av aktive komponenter i screeningsanalyser (punkt 2).

1.7 BESKRIVELSE AV MAKROALGENE BENYTTET I OPPGAVEN

I denne studien ble det valgt 6 ulike arter av makroalger der tre er brunalger (*A. esculenta, Fucus distichus, Desmarestia aculeata)*, en er rødalge(*Palmaria palmata*) og to er grønnalger (*Cladophora rupestris og Enteromorpha intestinalis*). I de følgende avsnittene vil de ulike artene presenteres nærmere.

1.7.1 *Alaria esculenta*- Butare

Butare er en brunalge som vokser på utsatte steder, vanligvis i lavvannslinjen. Arten er flerårig, med krftuige hefterøtter, bldet og sporebladene felles hvert år(Rueness, 1998). Arten kan bli flere meter lang. Tidligere ble Butare brukt til fôr, og mat i nødstider(SNL, 2005-2007). Butare er rapportert å ha antimikrobiell- og antioksidant aktivitet (Hornsey & Hide, 1974; Choi *et al.*, 2009).

Taksonomi:

Rekke: Heterokontophyta

Klasse: Phaeophyceae

Orden: Laminariales

Familie: Alariaceae

Genus: Alaria

Figur 1. Bildet viser bruntaren Butare, *Alaria esculenta*, som kan bli flere meter lang. Illustrasjon © Sandra Wiik; *Alaria esculenta*

1.7.2 *Fucus distichus*- Båetang

Båetang er en brunalge som vokser i fjærsonen. Båetang er liten av vekst, 10-15 cm (Rueness, 1998). Arten har physoder som skiller ut fenoliske forbindelser (phlorotanniner og ployfenoler) (Lobban & Harrison, 1994). Den antimikrobielle aktiviteten til polyfenoler er vell-kjente (Burkholder & Sharma, 1969).

Taksonomi:

Rekke: Heterokontophyta

Klasse: Chromista

Orden: Fucales

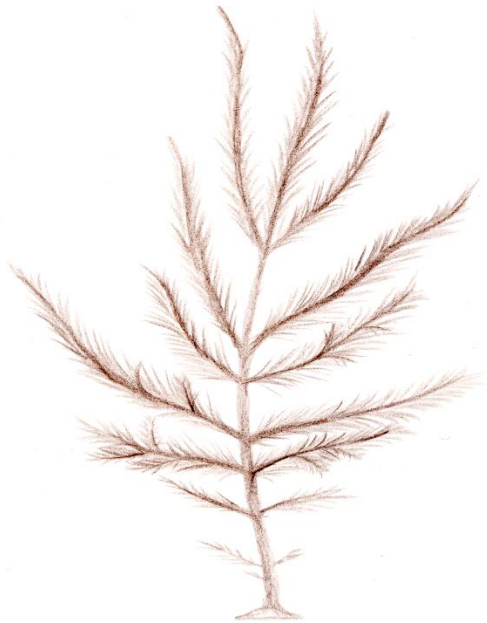
Familie: Fucaceae

Genus: Fucus

Figur 2. Bildet viser bruntaren Båetang, *Fucus distichus,* arten er liten av vekst (10-15cm). Illustrasjon © Sandra Wiik; *Fucus distichus*

1.7.3 *Desmarestia aculeata*- Vanlig kjærringhår

Vanlig kjerringhår er en brunalge som vokser på 5-20 meters dyp. Arten har mange forgreninger som får den til å ligne på langt hår, navnet er gitt ut fra denne likheten. Vanlig kjerringhår kan bli ca. 2 meter lang, men er vanligvis 30-60 cm. Arten er flerårig. De eldste delene er stive og mørkebrune, men de yngre delene er lyse og myke dusker som kastes av i løpet av året (Rueness, 1998). Arten produserer og lagrer svovelsyre, og derfor dårlig egnet som føde (Holmes, 2007).



Taksonomi:

Rekke: Heterokontophyta

Klasse: Chromista

Orden: Desmarestiales

Familie: Desmarestiaceae

Genus: Desmarestia

Figur 3. Bildet viser bruntaren Kjærringhår, *Desmarestia aculeata*, arten kan bli opp til 2m. Illustrasjon © Sandra Wiik; *Desmarestia aculeata*

1.7.4 *Cladophora rupestris* – Vanlig grønndusk

Vanlig grønndusk er en grønnalge. Vanlig grønndusk er en «busk lignende» makroalge på 5-10cm, som ofte er å finne under andre større makroalger(f. eks. Sagtang) (Rueness, 1998). Arten er rapportert å ha antimikrobiell aktivitet (Hellio *et al.*, 2001).

Taksonomi:

Rekke: Chlorophyta

Klasse: Ulvophyceae

Orden: Cladophorales

Familie: Cladophoraceae

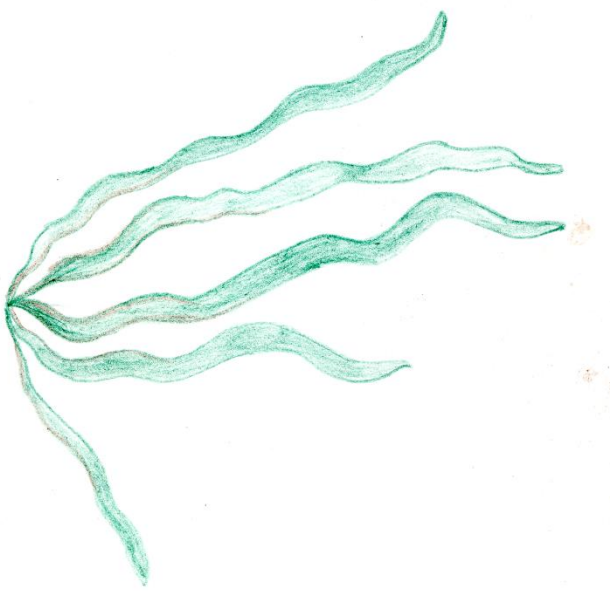
Genus: Cladophora

Figur 4. Bildet viser grønntaren Vanlig grønndusk, *Cladophora rupestris,* arten er liten av vekst (5-10cm). Illustrasjon © Sandra Wiik; *Cladophora rupestris*

1.7.5 *Enteromorpha intestinalis* - Tarmgrønske

Tarmgrønske er en grønnalge som er å finne i grunt vann(0-7m) og fjærpytter. Arten tåler store forskjeller i saltholdighet. Artssystematikken innen slekten *Enteromorpha* er intrikat, det finnes ca. 10 arter *Enteromorpha intestinalis* i Norge. Tarmgrønske blir ca. 10-30 cm lang(Rueness, 1998).

Arten inneholder dimetylsulfid og akrylsyre som har antimikrobiell aktivitet (Bywood & Challenger, 1953; Glombitza, 1970). Tarmgrønske inneholder også et alkali-ekstrahert polysakkarid med antitumoraktivitet (Jiao *et al.*, 2009).



Taksonomi:

Rekke: Chlorophyta

Klasse: Ulvophyceae

Orden: Ulvales

Familie: Ulvaceae

Genus: Enteromorpha

Figur 5. Bildet viser grønntaren Tarmgrønske, *Enteromorpha intestinalis,* arten er liten av vekst (10-30cm). Illustrasjon © Sandra Wiik; *Enteromorpha intestinalis*

1.7.6 *Palmaria palmata* – Søl

Søl er en rødalge som vokser vanligst omkring lavvannsnivå på fjell og på stilken av tang og tare. Arten blir 50 cm lang, med 20-30 cm brede blader. Arten er flerårig. Søl er næringsrik, den har meget lite fett og bare en liten mengde av proteiner og cellulose, men er meget rik på sporstoffer og vitaminer, særlig vitamin A. I fersk tilstand er Søl læraktig og usmakelig, men etter tørking egner den seg godt til å tygge eller å bruke i mat. Søl har blitt sanket og spist av folk i lange tider, og verdsatt som en viktig marin ressurs. Den er nevnt i de Islandske sagaene hvor en av heltene blir gitt Søl i melken sin for å lulle han i søvn før han ble drept. Irland og Island bruker enda Søl(Rueness, 1998).

Arten har vært antatt å ha positiv helseeffekt i lang tid. Det man vet med sikkerhet i dag er at arten inneholder askorbinsyre (vitamin C), jern og som tidligere nevnt kainsyre. Sist nevnte er antihelmintik, og har innvirkning på nervesystemet (Wikipedia, 2013c). Søl inneholder hydroksyl og stabile frie radikaler. Arten er rapportert å inhibere lipid-peroksidasjon, dette tilskrives den reduserende aktiviteten til polyfenooler funnet hos arten. Arten har antioksidant- og antiproliferative aktiviteter (Yuan *et al.*, 2005).

Taksonomi:
Rekke: Rhodophyta
Klasse: Florideophycidae
Orden: Palmariales
Familie: Palmariaceae
Genus: Palmaria

Figur 6. Bildet viser rødtaren Søl, *Palmaria palmata,* arten er liten av vekst (50cm). Illustrasjon © Sandra Wiik; *Palmaria palmata*

1.8 GENERELT OM VALGT METODIKK- BIOASSAY

Bioassay er en biologisk analyse for påvisning av kjemiske stoffers aktivitet ved hjelp av levende organismer/ celler (Lawrence, 2008). I denne oppgaven brukes det en bioassay basert separasjon. Ved ekstraksjon av makroalgene får man en veldig kompleks blanding av ulike kjemiske stoffer. Veien fra denne komplekse blandingen til karakterisering av bioaktive komponenter er lang, og består av flere bioassay og separasjoner. For hver separasjon tester man bioaktiviteten for å kunne ekskludere fraksjoner uten bioaktivitet, og føre videre fraksjoner med bioaktive komponenter til videre isolering og evnt. karakterisering.

Figur 7. Skjematiskfremstilling av bioassay bassert seperasjon, SPE; fast-fase ekstraksjon, HPLC; høytrykks-kromatografi, MS; masse spektrometri, NMR; kjernemagnetisk resnas, UV; UV-absorbans. Figuren er modifisert fra Sarker og medarbeidere (2006) (Sarker *et al.*, 2006; Osvik, 2013)

1.8.1 Ekstraksjon fra biologisk materiale

Det finnes flere måter å ekstrahere kjemiske komponenter fra biologisk materiale. En metode som er brukt er væske- væske ekstraksjon ved hjelp av polare og upolare løsemidler. For å få en mest mulig effektiv ekstraksjon er det fordelaktig at overflatearealet til materialet er størst mulig. Dette oppnås ofte med å frysetørke det biologiske materialet, knuse det til et finest

mulig pulver, for så å tilsette løsningsmiddelet. For å øke hastigheten og utbyttet av ekstraksjonen kan blandingen settes i omrøring. Ekstraksjonen stopper når det oppstår likevekt mellom de kjemiske komponentene i materialet og de ekstraherte komponentene i løsemiddelet/ekstraktet. For å forsikre seg om at mest mulig av de kjemiske komponentene er ekstrahert ut av det biologiske materialet kan prosessen gjentas i flere omganger (Seidel, 2012).

1.8.2 Kromatografisk separasjon

Det finnes flere metoder for å separere marine ekstrakter, men i denne oppgaven ble det brukt to forskjellige kromatografiske metoder, revers-fase fast fase kromatografi (RP-SPE) og revers-fase høytrykks-væskekromatografi (RP-HPLC). Kromatografiske metoder separerer kjemiske komponenter i en mobil fase ut fra fysiske og kjemiske egenskaper som; størrelse, polaritet eller ladning.

Fast-fase kromatografi (SPE)

Løsemiddel-ekstraksjonene gjennomgikk en grovseperasjon ved å bruke revers-fase fast i kombinasjon med fase kromatografi (RP-SPE). Her er den faste fasen bestemt av kolonnematerialet (pakket i kolonne) C-18 bundet til silika partikler, overflate-modifisert med RMe2SiCl. Den stasjonære fasen er av upolar karakter, og vil derfor retardere middels- og upolare forbindelser. Retensjonen av organiske analytter fra den polare væskefasen til den upolare fast-fasen skyldes tiltrekningskreftene mellom karbon-hydrogen bindinger i analytten og de funksjonelle gruppene på silikaoerflaten. For å eluere de retarderte forbindelsene bruker man et upolart løsningsmiddel, og ved å endre polariteten på den mobile fasen (økt andel upolart løsemiddel) vil forbindelsene med ulik polaritet vaskes ut i forskjellige eluater (Haug *et al.*, 2004; Seidel, 2012).

Høytrykks- væskekromatografi (HPLC)

Høytrykks- væskekromatografi (HPLC) er en kromatografisk seperasjonsmetode som skiller ikke-flyktige blandinger i sine individuelle komponenter. Prinsippet er det samme som med SPE. Komponentene i prøven blir drevet av en mobil-fase gjennom en kolonne under høyt trykk ved hjelp av en pumpe som er tilknyttet et reservoar med væske (mobilfasen). Komponentene i mobilfasen vekselvirker med fastfasen (blir retardert), slik at forskjellige forbindelser blir separert og vil bruke forskjellig tid gjennom kolonnen. Ved å endre polariteten på den mobile-fasen vil forbindelsene med ulik polaritet vaskes ut i forskjellige eluater. I denne oppgaven ble det brukt revers-fase HPLC (RP- HPLC). Her er den mobile-

fasen polar (f.eks acetonitrile og/eller vann) og fast-fasen upolar (typisk C18-materiale)(Haug, 2013b; Wikipedia, 2013b).

HPLC systemet er koblet opp mot en spektrofotometrisk detektor; PDA (Photodiode- array), som til enhver tid detekterer et spekter av absorbsjon fra ultrafiolett lys til synlig lys (UV-Vis; 600-200nm) (Dinana, 2005). Målingene til PDA registreres som topper på et kromatogram. Toppene angir retensjonstiden og mengden av en komponent. Retensjonstid er den tiden det tar stoffet å vandre gjennom kolonnen, dette kan gi en indikasjon på komponentens identitet, selv om denne indikasjon ikke er fullstendig pålitelig, da flere forskjellige forbindelser kan ha de samme eller lignende retensjonstider (Thanki, 2010). Ved hjelp av PDA- detektor vil man kunne studere de ulike toppenes (forbindelsenes) UV- Vis spekter, noe om også gir informasjon om type struktur.

1.8.3 Biologisk testing

Minimums inhiberende konsentrasjons test (MIC) er en antimikrobiell test for å finne laveste konsentrasjon til ekstraktet som vil hemmer vekst av en mikroorganisme. Denne testen gjennomføres mellom hvert steg i seperasjonen for å identifisere fraksjoner som inneholder komponenter med biologisk aktivitet. Etter MIC-testing registrerer man de aktive ekstraktene som tas til videre separasjon. Prosessen gjentas på delfraksjoner helt til den aktive forbindelsen er ideelt sette isolert til en ren forbindelse. Denne kan testes videre og strukturen bestemmes mer nøyaktig.

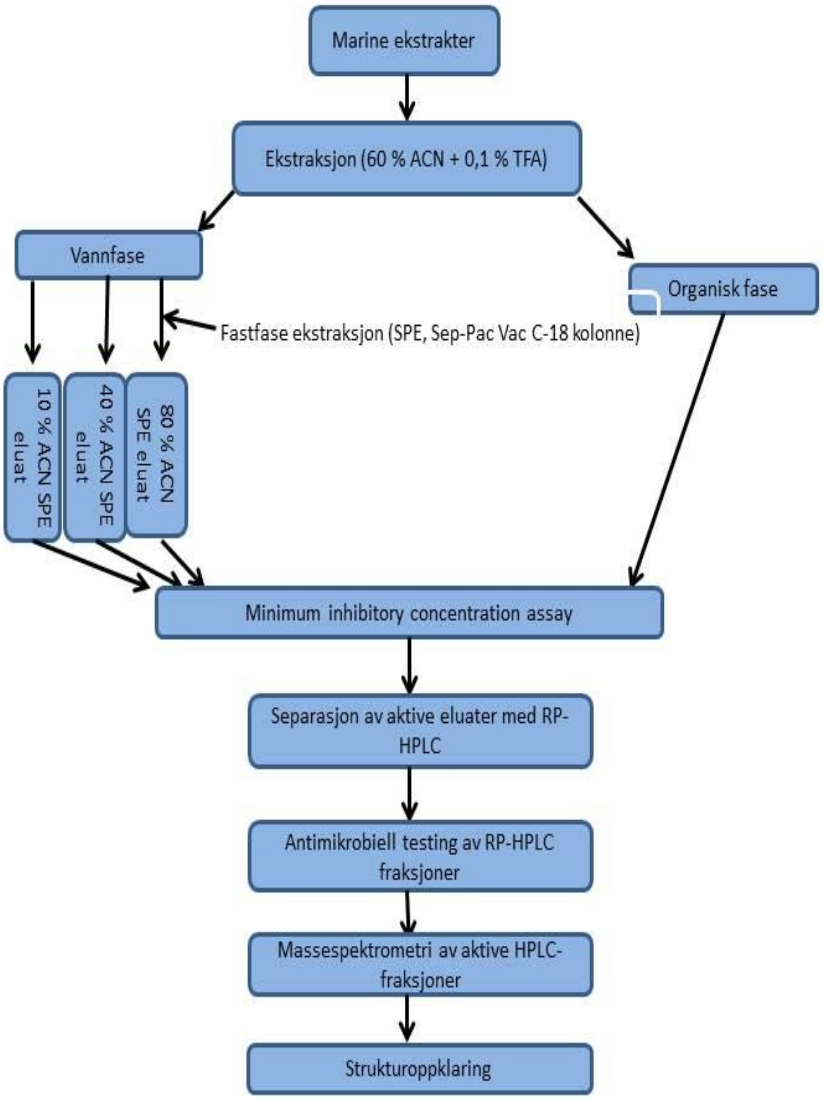
1.8.4 Massespektrometri

Massespektrometri (MS) er en kjemisk analysemetode hvor molekylet blir gitt elektronisk ledning (og evt. Brutt opp i fragmenter), hvoretter de dannede ionene separeres etter forskjellige m/z-verdier (m= ionets masse, z=ionets ladning) og registreres med et fintfølende elektrisk måleinstrument (detektor). Metoden gjør det mulig å identifisere molekylvekten til de ulike stoffene i en prøve. Prøven blir injisert inn i systemet og omgjort til gass, for så å bli ført over en ionekilde for å få ladning. Deretter ledes ionene inn i en masseanalysator met et fluktuerende magnetfelt hvor ionene separeres ut fra m/z-verdi. Komponentene blir deretter kvantifisert og prosessert av datasystem som gir resultatene i form av massespekter (Holtebekk *et al.*, 2013).

2. MATERIAL OG METODE

2.1 Metodeforløp

Metodeforløpet i masteroppgaven oppsummeres i figur 1. Makroalgene ble frysetørket, pulverisert, og ekstrahert med 60 % ACN + 0,1 % TFA. Ekstraktene ble kjølt ned for å få fase-separasjon; to faser, vann- og organisk fase. Vannfasen ble renset for salter, og grovseparert med fast-fase ekstraksjon (SPE). Den organiske fasen og ekstraktene fra SPE ble videre testet for antimikrobiell aktivitet (MIC). De mest aktive ekstraktene ble videre separert med HPLC før de gjennomgikk en ny antimikrobiell test. Aktive fraksjoner ble så analysert med væskekromatografi- massespektrometri (LC-MS) for innledende strukturoppklaring.



Figur 8. Metodeforløp for arbeidet som ble gjort i masteroppgaven. ACN: Acetonitril, TFA: Trifluoreddiksyre, SPE: Fast-fase ekstraksjon, RP-HPLC: Revers fase høytrykkssøyle kromatografi.

2.2 Kjemikalier

Det ble brukt en del kjemikalier, disse er oppført i tabell 2.

Tabell 2. Oversikt over ulike kjemikalier benyttet i masteren.

Kjemikaliumer/reagenser	Leverandør, by og land
MilliQ- vann	Millipore Corp., Ma. USA
Acetonitril	Sigma- Aldrich, Missouri, USA
Triflouredddiksyre	Sigma- Aldrich, Missouri, USA
Mueller- Hinton agar broth	BD, Difco, USA
Oxytetracyclin	

2.3 Tang

I denne masteroppgaven ble det brukt 6 arter marine makroalger. Makroalgene, lokalitet og tidspunktet for innsanking er vist i tabell 3.

Tabell 3. Oversikt over algene som er brukt i dette forsøket. Artene er oppgitt med klasse, latinsk navn og norsk navn, tidspunktet og lokaliteten hvor de ble sanket.

Klasse	Artsnavn: Latin	Artsnavn: Norsk	Lokalitet	Sanket
Brunalger	*Desmarestia aculeata*	Vanlig kjærringhår	Jarfjorden i Varanger, Finnmark	mai.09
	Fucus distichus	Båetang	Alvenes i Skjærstadfjorden, Nordland	okt.10
	Alaria esculenta	Butare	Bjørnøya, Barentshavet	mai.09
Grønnalger	*Enteromorpha intestinalis*	Tarmgrønske	Hellemobotn i Tysfjorden, Nordland	okt.10
	Cladophora rupestris	Vanlig grønndusk	Brømholman i Saltenfjorden, Nordland	okt.10
Rødalger	*Palmaria palmata*	Søl	Kvanvika i Skjærstadfjorden, Nordland	okt.10

Algene var allerede sanket inn før dette forsøket startet og var lagret ved -20°C.

2.4 PREPARERING OG EKSTRAKSJON AV MATERIALE

2.4.1 Preparering

De fryste prøvene ble tatt ut av -20°C fryseren og tint opp nok til at man kunne ta ut en mindre prøve. Denne prøven ble delt opp i mindre deler før den ble lagt i en biofryser ved -80°C over natten. Den frosne prøven ble tørket i en kolbe ved hjelp av en VirTis Genesis (SP Scientific, NY, USA) frysetørker.

2.4.2 Ekstraksjon og væske-væske kromatografi

Den frysetørkede prøven ble knust i morter. Materialet ble veid og overført til 1 liters flasker og tilsatt ekstraksjonsløsningen som besto av 60 % acetonitril + 0,1 % trifluoreddiksyre. Mengden ekstraksjonsløsning varierte fra prøve til prøve. I utgangspunktet ble det tilsatt 10 volum (v/w), men der prøven ikke ble dekket av ekstraksjonsvæsken (*P. palmata* og *D. aculeata*) eller der prøven ble svært tyktflytende ble mengden ekstraksjonsløsning doblet (20 volum (v/w)) for å få en mer homogen og effektiv løsning. Løsningen ble deretter satt til ekstraksjon i 24 timer ved 4°C. Magnetrører ble anvendt for å holde biomassen i suspensjon gjennom hele ekstraksjonsprosessen. Neste dag ble supernatanten oppsamlet og lagret ved 4 ˚ C. Restmaterialet ekstraheres nok en gang under samme betingelser.

De kombinerte supernatantene ble slått sammen overført til 50 ml Falconrør, og sentrifugert ved 3000 r.p.m i 5 minutter (Multifuge 1S- R Heraeus, Thermo Fisher Scientific, Tyskland) for å fjerne partikler. Supernatantene ble så overført til en flaske (1 l), inkubert ved -20˚C i 1-2 timer for å skille supernatanten i to flytende faser, en saltrik vannfase (nederst) og en ACN-rik, organisk fase (øverst). Fasene ble så separert og overført til på forhånd veide 50 ml Falconrør. Rørene ble overført til en ScanSpeed 40 vacuuminndamper med kjølefelle frysetørker (Scanvac AS, Danmark) og MD-4 Diaphragm vakuumpumpe (vacuumbrand GMBH, Wertheim, Tyskland) for å fjerne ekstraksjonsvæsken. De inndampede prøvene ble veid og tørrstoffutbyttet ble beregnet.

De organiske fraksjonene ble rekonstituert med Milli-Q vann til en konsentrasjon på 40 mg/ml før testing for antibakteriell aktivitet ble foretatt i henhold til punkt 2.5.

Vannfasene ble oppløst i surgjort vann (0,05 % TFA) til en konsentrasjon på 100 mg/ml før den ble videre ekstrahert med fastfase- ekstraksjon (engelsk: solid phase extraction; SPE).

2.4.3 Fast fase ekstraksjon

SPE ble gjennomført med bruk av Sep-Pak Vac 35 cc (10 g) C18 SPE- kolonner (Waters). Kolonnen ble koblet på SPE kabinettet og kondisjonert med 30 ml ACN + 0,05 % TFA, før den ble ekvilibrert med 30 ml 0,05 % TFA.

Prøven ble så applisert på kolonnen (maks 100 ml), og kjørt gjennom uten å bli samlet opp. Væskehastigheten på den mobile fasen ble satt til ca. 1 dråpe i sekundet, slik at analyttene fikk tid å feste seg på den stasjonære fasen. Når prøven hadde passert gjennom kolonnen, ble den vasket med 50 ml 0,05 % TFA. Videre ble det retarderte prøvematerialet eluert ut med stegvis økende konsentrasjon av ACN (10-, 40- og 80 % ACN + 0,1 % TFA). For hver stegvis fraksjonering ble 30 ml mobilfase kjørt gjennom kolonnen, og eluatene ble samlet opp i reagensrør. De tre eluatene ble overført til forhåndsveide 50 ml Falconrør, og deretter vakuumsentrifugert for å fjerne væsken (som beskrevet i avsnittet ovenfor).

Rørene ble veid på nytt og tørrstoffutbyttet ble beregnet.

Tørrstoffet ble rekonstituert med Milli-Q vann til en konsentrasjon på 40 mg/ml før testing for antibakteriell aktivitet. Om fraksjonene **ikke** skulle brukes samme dag ble de lagret i fryseboks ved – 20°C.

2.5 Bioaktivitetstesting

2.5.1 Bakteriestammer

Det ble benyttet 8 ulike bakteriestammer til antibakteriell testing. En oversikt over de ulike stammene, samt stamme- ID vises i Tabell 4. De marine Gram-positive melkesyre bakteriene var en gave fra professor Einar Ringø, NFH, BFE, UiT.

Tabell 4. Bakteriestammer benyttet til antibakteriell testing av ekstrakter.

Bakteriestamme	ID	Gram	Type
Pseudomonas aeruginosa	ATCC 25853	Negativ	Terrestrisk
Escherichia coli	ATCC 25922	Negativ	Terrestrisk
Staphylococcus aureus	ATCC 9144	Positiv	Terrestrisk
Corynebacterium glutamicum	ATCC 13032	Positiv	Terrestrisk
Aeromonas salmonicida	AL2020	Negativ	Fiskepatogen
Listonella anguillarum	FT1801	Negativ	Fiskepatogen
Carnobacterium divergens	Lab01	Positiv	Marin
Carnobacterium mobile	C.mob	Positiv	Marin

Bakteriestammene ble oppbevart som stamløsning på 80 % glyserol i biofryser ved -80°C.

Nedfrysing av bakterier i glycerol (til kultursamling) foretas ved å tilsette steril glycerol (finalt 80 %) til en aktivt voksende kultur (eksponentiell fase). Blandingen aliquoteres i rør med skrukork og merkes godt før innfrysing i -80°C.

C. mobile var isolert fra Piggvar, mens de andre marine bakteriene er isolert fra Atlantisk laks. Bakterien *C. glutamicum* er en salt-tolerant bakterie isolert fra kloakkutslipp. Den er muligens en marin art.

2.5.2 Dyrkingsmedier til dyrking av bakterier

Mueller- Hinton agar og dyrkingsmedium

Plater med Mueller- Hinton (MH) agar ble benyttet til oppdyrking av de terrestriske bakteriene. Sammensetningen av MH- agar vises i appendiks 1. Mueller-Hinton dyrkingsmedium ble benyttet til dyrking av terrestriske bakterier i flytende medium til antibakterielle tester. Oppskrift på MH- broth vises i appendiks 2. Bakteriene ble dyrket ved romtemperatur. For oppdyrking i flytende medium ble oksygen tilført ved konstant orbital omrøring.

Blodagar

De marine og fiske-patogene bakteriene ble dyrket på blodagar plater (Merck KGaA, Darmstadt, Tyskland). Bakteriene ble dyrket ved romtemperatur.

TGGA + NaCl dyrkingsmedium

TGGA + NaCl dyrkingsmedium ble benyttet til dyrking av marine og fiskepatogene bakterier i flytende medium til antibakterielle tester. Oppskrift på TGGA + NaCl vises i appendiks 3. Bakteriene ble dyrket ved romtemperatur.

2.5.3 Dyrking av bakterier

Den antimikrobielle aktiviteten til ekstraktene ble screenet mot et panel av bakterier som nevnt i avsnittet om bakterier (Tabell 4).

De terrestriske bakteriene ble strøket ut på Mueller-Hinton agar plater, og dyrket ved romtemperatur i 1-3 dager til det ble dannet kolonier. De marine/ fiske- patogene bakteriene ble strøket ut på blodagar plater, og dyrket ved romtemperatur i 3 dager til det ble dannet kolonier. Plater med kolonier ble oppbevar i plastposer for å forhindre uttørking, ved 4°C i maks 2 uker. Gamle bakterieplater ble destruert og nye laget henhold til prosedyren.

Før testing av antibakteriell aktivitet, ble bakteriene kultivert i flytende dyrkingsmedium. En koloni fra platene ble inokulert i 5 ml passende dyrkingsmedium (MH for terrestriske- og TGGA+ NaCl for marine/ fiskepatogene bakterier) og satt til inkubering på rister over natten ved romtemperatur. Neste dag ble 20 µl fra hver kultur overført til 5 ml dyrkingsmedium og satt til risting i 2 timer. Etter 2 timer ble det utført OD_{600}- målinger (BioMate 3 Spectrophotometer, Thermo, USA) av hver enkelt kultur. Avhengig av resultatet av denne målingen, ble en gitt mengde bakteriesuspensjon overført til nye 10 ml dyrkingsmedium. Hensikten med dette var å få en bakteriekonsentrasjon på 2,5-3 * 10^4 celler/ml der samtlige bakterieceller er omtrent i samme vekstfase. Bakteriekulturen var deretter klar til å benyttes til antibakteriell testing.

2.5.4 Minimums inhiberende konsentrasjons test (MIC)

Alle SPE eluatene og de organiske fasene fra de ulike artene ble testet for antibakteriell aktivitet i 2- folds fortynninger for å bestemme hvor stor konsentrasjon som var nødvendig for å hemme vekst av de ulike bakteriene.

Tørrstoffet ble løst i MilliQ-vann til en konsentrasjon på 8 mg/ml (stamløsning). Det ble brukt «honeycomb» plater, med 10*10 brønner. Første brønn ble tilsatt 100 µl prøve med en konsentrasjon på 8 mg/ml, de neste 4 brønnene i fortynningsrekken (nedver) ble tilsatt 50 µl Milli-Q vann. Det ble utført fem 2-folds fortynninger av hvert eluat/ekstrakt på platen ved at 50 µl prøve ble overført fra første brønn til andre brønn og blandet godt. Deretter ble nye 50 µl fra denne siste brønnen overført til neste fortynning og blandet godt. Prosedyren ble gjentatt til ønsket antall fortynninger var laget. Konsentrasjonene i fortynningsrekken var 4.0-, 2.0-, 1.0-, 0,5- og 0,25 mg tørrstoff/ml. Enkelte eluater hadde pga. lite materiale, en lavere startkonsentrasjon (dette gjaldt 10 % SPE Søl (4 mg/ml), 80 % SPE Tarmgrønske (4mg/ml), 80 % SPE Butare (7 mg/ml)).

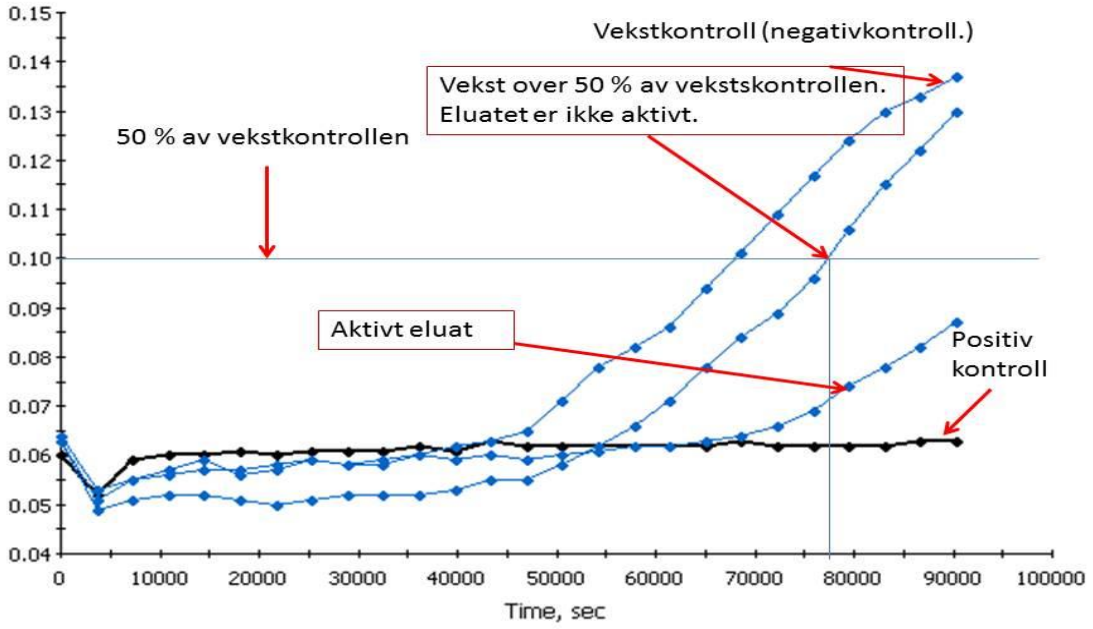
Etter at fortynningsrekken var klar, ble det tilsatt 50 µl ferdig fortynnet bakteriesuspensjon til hver brønn.

Referansebrønnene inneholdt kun vann (50 µl i isteden for eluat) og 50 µl bakterieløsning. Veksten av bakteriekulturen her, ble satt som 100 % referanse kontroll som all bakterievekst bel sammenlignet med.

Det ble brukt Oxytetracyclin som positiv kontroll (40 µM), mens MilliQ-vann ble brukt som negativ kontroll. Volum av kontrollen var på 50 µl som for prøven og resten av prosedyren var akkurat som for prøven.

Alle tester og samtlige kontroller ble satt opp med samtlige 8 teststammer.
Det ble i tillegg benyttet en mediekontroll (100 µl medium) for å sjekke at mediet ikke var kontaminert. Ferdig preparerte test- plater ble satt i BioScreen C (Oy Growth Curves Ab Ltd, Finland) for å registrere bakterieveksten annen hver time i 48 timer. De terrestriske bakteriene ble dyrket/inkubert ved 37 ^{o}C, mens de marine ble dyrket/ inkubert ved 20 ^{o}C.
Etter 48 timer ble mikrotiterplata tatt ut og satt til avlesningene i Bioscreen C. I tillegg ble plata inspisert visuelt da det er lett å observere vekst (opak løsning som melk) eller ikke vekst (klar løsning) av bakterier i brønner. Konsentrasjonen av elulatene i den siste brønnen i fortynningsserier som ikke viste tegn til bakterievekst etter visuelt inspeksjon, ble angitt som den minste hemmende konsentrasjon (MIC) av eluatet (eller den rensede isolerte forbindelsen).

I denne oppgaven ble fraksjoner ansett som aktive (= MIC) når den optiske tettheten var mindre enn 50 % av vekstkontrollen (etter at kontrollen hadde oppnådd maksimal vekst). Figur 9 viser en illustrasjon av MIC-graf, og hvordan man analyserer den for å avgjøre om det er antimikrobiell aktivitet i noen av eluatene.



Figur 9. Illustrasjon av MIC-graf

2.6 Revers-fase høytrykks væskekromatografi (RP-HPLC)

Prøver som hadde vist seg å ha lav MIC, ble tatt videre til seperasjon med RP-HPLC. Et volum på 200 µl av de utvalgte eluatene ble sentrifugert i 1 min med 1000 rpm for å sedimentere partikler. Et volum på 150 µl av prøven ble injisert på kolonnen i HPLC-systemet. Dette systemet som ble brukt besto av en Sunfire Prep C18 kolonne (5 µm; 10*250mm), 717 autosampler, 600 E pumpe og 2996 PDA detektor (alle fra Waters Associates, Millipore Corp., Massachusetts, USA). Softwaren som ble benyttet til å registrere resultatene var Millenium v 4.00. Mobilfasen som ble brukt ble pumpet fra to reservoarer (flasker): A) 0.05 % TFA og B) ACN + 0,05 % TFA.

Det ble benyttet fire ulike gradienter i denne masteroppgaven, de vises i tabell 5. Gradientene ble bestemt ut i fra hvilken ACN konsentrasjon prøven hadde blitt eluert med SPE.

Tabell 5. Gradientoppsett for HPLC ved fraksjonsering avulike SPE-eluater. * Oppsett bare benyttet på 40 % ACN *P. palmata*.

SPE- eluat	1.del, isokratisk	2.del, lineær gradient	3. del, lineær gradient	Flow
10 %	0 % B i 20 min	0-20 % B over 20 min	20-100 % B over 5 min	4 ml/min
40 %*	0 % B i 20 min	0-60 % B over 60 min	60-100 % B over 5 min	4 ml/min
40 %		0-50 % B over 50 min	50-100 % B over 5 min	4 ml/min
80 %		20-80 % B over 50 min	80-100 % B over 5 min	4 ml/min

Mobilfasen hadde en væskehastighet (flow) på 4 ml/min, og fraksjoner ble samlet opp hvert min ved hjelp av en Gilson FC 420 fraksjonssamler (Gilson, Wilsconsin, USA). Detektoren registrerte lysspredning ved 200-600 nm. Ut fra kromatogrammet ble det tatt en vurdering hvor man kunne regne med å finne de evt. aktive substanser. Fraksjoner innenfor området med topper i kromatogrammet ble tatt med videre i forsøket. Mobilfasen ble dampet av i en vakuumsentrifuge (som tidligere beskrevet). Tørrstoffet fra fraksjonene ble løst opp i 400 µl MilliQ- vann, og antibakteriell test ble utført som beskrevet i 2.5.4, eneste forskjellen var at RP-HPLC fraksjonene ikke ble fortynnet.

2.7 Massespektrometri (LC-MS)

De aktive fraksjonene fra RP-HPLC ble analysert av LC-MS som en del av den innledende karakteriseringen av komponentene. Det ble brukt et Waters system (Waters Associates, Millipore Cor., MA, USA) som bestod av Waters 2690 seperasjonsmodul med en C18 kolonne (Sunfire 2,1*100 mm) og Waters Micromass ZQ analysator med Masslynx v 4,1 programvare.

Ved hjelp av LC-MS fikk man en oversikt over hvilke komponenter som var til stede, og renheten av fraksjonene. MS- spekteret kan benyttes til å kalkulere ladning og molekylvekt ut fra ioneladningen(z).

For lavmolekylære forbindelser, der m/z tilsvarte $[M+H]^{+1}$ ble molekylvekten (M) beregnet ved å trekke fra massen til et proton (H+ =1) fra m/z- verdien (altså M= m/z -1).

For høymolekylære forbindelser (>2kDa) det var mistanke om var beslektede kunne man sjekke ladningen (z) for å finne ut om molekylene hadde fått påkoblet ulikt antall protoner i ioniseringsprosessen med formelen:

$$zB=\frac{(m/zA-1)}{(m/zB-m/zA)}$$

m/zA= masse/ladning-verdi for ionet med lavest verdi (m/zB>m/zA)

m/zB= masse/ladning-verdi for ionet med høyest verdi

zB= ladning til ionet m/zB

Dersom zB har blitt beregnet til å være lik 2, da er zA lik zB+1=3.

Molekylvekten (M) til forbindelsen kan da regnes ut fra formelen:

M= zB (m/zB-1) eller/og zA(m/zA-1) (Haug, 2013c; Wikipedia, 2013d).

3. RESULTATER

3.1 Tørrstoffutbytte

Tabell 6 viser en oversikt over tørrstoffutbyttet i vannfase og organisk fase etter løsemiddelekstraksjon (60 % ACN + 0,1 % TFA).

Tabell 6. Vekt av prøvematerialet og ekstraktene, og utbytte av vannfasen og den organiske fasen (ACN-ekstrakt) etter ekstraksjon.

	Utgangspunkt	Vannfase		Organiskfase(ACN- ekstrakt)	
	Vekt (g)	Vekt (g)	Utbytte (%)	Vekt (g)	Utbytte (%)
Butare	49,1	11,5	23,4	2,1	4,3
Båetang	100,1	9,9	9,9	2,9	2,9
Vanlig kjærringhår	50,1	7,6	15,2	2,5	5,0
Vanlig grønndusk	50,0	9,6	19,2	2,5	5,0
Tarmgrønske	31,4	2,4	7,5	0,8	2,7
Søl	50,1	13,8	27,5	1,3	2,7

Tabell 7 viser en oversikt over utbyttet for SPE-eluatene fra fast-fase ekstraksjon.

Tabell 7. Vekt av vannfasen og, vekt og utbytte (%) av fraksjonene etter SPE.

Art	Butare		Båetang		Vanlig kjærringhår	
	Mengde (mg)	Utbytte (%)	Mengde (mg)	Utbytte (%)	Mengde (mg)	Utbytte (%)
Vannfase	11500		9890		7600	
10 % SPE	35	0,3	238	2,4	105	1,4
40 % SPE	68	0,6	273	2,8	18	2,4
80 % SPE	6	0,05	4	0,08	3	0,04
Art	Vanlig grønndusk		Tarmgrønske		Søl	
	Mengde (mg)	Utbytte (%)	Mengde (mg)	Utbytte (%)	Mengde (mg)	Utbytte (%)
Vannfase	9610		2370		13780	
10 % SPE	475	4,9	54	2,3	130	0,9
40 % SPE	146	1,5	57	2,4	14	0,1
80 % SPE	21	0,2	3,7	0,2	18	0,1

Alle 80 % SPE eluatene gav lavt utbytte. Søl gav minst utbytte etter ekstraksjon og SPE-fraksjonering av alle makroalgene.

3.2 Antimikrobiell aktivitet

3.2.1 Antimikrobiell aktivitet i SPE eluater og ACN ekstraker

SPE- eluatene og ACN- ekstraktene fra alle makroalgene ble testet for antimikrobiell aktivitet mot fire terrestriske- og fire marine bakteriestammer. Tabell 8 viser en oversikt over

antimikrobiell aktivitet i de ulike eluatne/ekstraktene mot de terrestriske bakteriestammene; *E. coli*, *P. aeruginosa*, *C. glutamicum* og *S. Aureus*.

De fleste makroalgene var aktive mot *C. glutamicum* og *S.aureus.* Det mest aktive SPE-eluatet var 10 % SPE fra Søl med en MIC på 0,25mg/ml. Ellers ligger de aktive MIC-konsentrasjonene til makroalgene mellom 2 og 4 mg/ml, utenom 80 % SPE fra Tarmgrønske som ligger på 1 mg/ml mot *S. aureus* og 80 % SPE fra Båetang som er aktiv ved 1 mg/ml mot *C. glutamicum*, *S. aureus* og *E. coli*. Søl (10 % SPE) er det mest aktive SPE-eluatet mot alle bakteriestammene. Tarmgrønske har samlet sett flest aktive fraksjoner. Det ble ikke detektert aktivitet i noen av ACN ekstraktene mot de terrestriske bakteriestammene.

Tabell 9 viser en oversikt over antimikrobiell aktivitet i de ulike eluatene/ekstraktene mot de marine bakteriestammene; *Aeromonas salmonicida* og *Listonella anguillarum* og to marine bakterier *Carnobacterium divergens* og *Carnobacterium mobile.*

C. mobile er den bakteriestammen som er mest sensitiv ovenfor flest eluater/ekstrakter av de marine bakteriene, med 14 aktive SPE-eluater og 3 aktive ACN ekstrakter. Søl 10 % SPE er det mest aktive eluatet mot alle bakteriestammene, men spesielt mot *C. mobile* (MIC=0,12 mg/ml). Tarmgrønske 10 og 80 % SPE, og Søl 40 % SPE har alle lav MIC (0,25 mg/ml) mot *C. mobile*.

A. salmonicida ble hemmet av 13 eluater/ekstrakter og *L. anguillarum* av 11 eluater/ekstrakter. Søl 10 % SPE, Tarmgrønske 10 % SPE og Butare 10 % SPE har alle en MIC (0,25 mg/ml) mot *L. anguillarum*.

Tabell 8. Antimikrobiell aktivitet i SPE-eluatene og ACN- ekstraktene fra seks arter av makroalger mot terrestriske bakterier (*E.coli, P. aeruginosa, C. glutamicum* og *S. aureus*). Antall aktive eluater/ekstrakter. Laveste konsentrasjon testet var 0,25 mg/ml. — = ingen aktivitet.

Art	Fraksjon	Antimikrobiell aktivitet (MIC; mg/ml)				Aktivitet
		E.c Gram -	*P.a* Gram -	*C.g* Gram +	*S.a* Gram +	—= ingen aktivitet
Butare *Alaria esculenta*	10 % SPE	4	4	4	4	
	40 % SPE	4	4	4	4	
	80 % SPE	—	—	4	—	
	ACN ekstrakt	—	—	—	—	—
Båetang *Fucus distichus*	10 % SPE	—	—	2	2	
	40 % SPE	—	—	2	2	
	80 % SPE	1	—	1	1	
	ACN ekstrakt	—	—	—	—	—
Vanlig kjærringhår *Desmarestia acueleata*	10 % SPE	—	—	2	2	
	40 % SPE	—	—	—	—	
	80 % SPE	—	—	4	—	
	ACN ekstrakt	—	—	—	—	—
Vanlig grønndusk *Cladophora rupestris*	10 % SPE	—	4	—	4	
	40 % SPE	4	4	4	4	
	80 % SPE	—	—	4	—	
	ACN ekstrakt	—	—	—	—	—
Tarmgrønske *Enteromorpha intestinalis*	10 % SPE	1	2	2	1	
	40 % SPE	2	4	2	2	
	80 % SPE	4	4	4	1	
	ACN ekstrakt	—	—	—	—	—
Søl *Palmaria palmata*	10 % SPE	0,25	0,50	0,25	0,25	
	40 % SPE	2	4	2	2	
	80 % SPE	—	—	—	—	—
	ACN ekstrakt	—	—	—	—	—
Totalt		9	9	15	13	16

Tabell 9: Antimikrobiell aktivitet i SPE-fraksjonene (SPE) og ACN- ekstraktene fra seks arter av makroalger mot to marine fiske-patogene stammer (*A. salmonicida* og *L. anguillarum*) og to marine melkesyrebakterier (*C. divergens* og *C. mobile*). Antall aktive eluater/ekstrakter. Laveste konsentrasjon testet er 0,25 mg/ml for alle andre enn 10 % SPE av *P.palmata*, som hadde laveste konsentrasjon 0,12 mg/ml. IT = Ikke testet.

Art	Fraksjon	Antimikrobiell aktivitet (MIC; mg/ml)				Aktivitet
		A.s Gram -	*L.a* Gram -	C.m Gram +	*C.d* Gram +	—= ingen aktivitet
Butare	10 % SPE	1	0,25	0,5	—	
	40 % SPE	2	—	2	—	
	80 % SPE	1	1	1	—	
	ACN ekstrakt	—	—	4	1	
Båetang	10 % SPE	—	—	—	—	—
	40 % SPE	—	—	—	—	—
	80 % SPE	—	2	2	—	
	ACN ekstrakt	—	1	—	—	
Vanlig kjærringhår	10 % SPE	—	—	—	—	—
	40 % SPE	—	—	2	—	
	80 % SPE	IT	IT	IT	IT	
	ACN ekstrakt	—	—	—	—	—
Vanlig grønndusk	10 % SPE	—	4	—	—	
	40 % SPE	4	—	—	4	
	80 % SPE	4	—	—	2	
	ACN ekstrakt	4	1	4	0,5	
Tarmgrønske	10 % SPE	1	0,25	0,25	2	
	40 % SPE	1	—	1	—	
	80 % SPE	2	—	0,25	—	
	ACN ekstrakt	—	1	—	—	
Søl	10 % SPE	0,12	0,25	0,12	0,25	
	40 % SPE	1	1	0,25	2	
	80 % SPE	4	4	4	—	
	ACN ekstrakt	4	—	1	—	
Totalt		13	11	14	7	19

Tabell 10 viser en oversikt over antall aktive eluater/ekstrakter (MIC ≤ 4 mg/ml) mot hver bakteriestamme, og fordelingen mellom marine og terrestriske bakteriestammer.

Tabell 10. Antall aktive eluater/ekstrakter mot hver bakteriestamme, og fordelingen av aktivitet mellom marine og terrestriske bakteriestammer.

Gram	Marine Bakterier	Antall aktive fraksjoner/ekstrakter (MIC ≤ 4 mg/ml)		Terrestriske bakterier
+	*C.divergens*	7 av 23	14 av 24	*C. glutamicum*
+	*C.mobile*	14 av 23	12 av 24	*S. aureus*
-	*L.anguillarum*	11 av 23	8 av 24	*E. coli*
-	*A.salmonicida*	13 av 23	9 av 24	*P. aeruginosa*
Totalt		19 av 23 (83 %)	16 av 24 (67 %)	

Tabell 11 viser en oversikt over antall aktive eluater/ekstrakter som viser aktivitet mot en eller flere stammer ved ≤ 1 mg/ml, fordelt mellom Gram-positive og Gram negative-marine og terrestriske bakteriestammer**.**

Tabell 11. Antall aktive eluater/ekstrakter som hemmer ved ≤ 1mg/ml fordelt mellom Gram positive/Gram negative, marine- og terrestriske bakterier.

Gram	Marine Bakterier	Antall aktive fraksjoner/ekstrakter som hemmer ved ≤ 1 mg/ml		Terrestriske bakterier
+	*C .divergens*	3 av 23	2 av 24	*C. glutamicum*
+	*C. mobile*	8 v 23	4 av 24	*S. aureus*
-	*L. anguillarum*	8 av 23	3 av 24	*E. coli*
-	*A. Salmonicida*	6 av 23	1 av 24	*P. aeruginosa*
Totalt		12 av 23 (51 %)	4 av 24 (17 %)	

I tabell 10, som viser antall fraksjoner/ekstrakter med antibakteriell aktivitet fordelt mellom marine og terrestriske bakteriestammer, kommer det ikke frem noen stor forskjell i antall aktive eluateter/ekstrakter (MIC ≤ 4 mg/ml) mellom marine og terrestriske bakteriestammer. Det er derimot en forskjell i sensitiviteten mellom marine og terrestriske bakteriestammer når man ser på en lavere konsentrasjon (MIC ≤ 1 mg/ml). Man ser da at de marine bakteriestammene er generelt mer sensitiv. Det var 12 aktive eluater/ekstrakter mot de marine

bakteriestammene, men bare 4 aktive eluater mot de terrestriske bakteriestammene. Det er ingen stor forskjell å observere i aktivitet rettet mot Gram-positive og Gram-negative bakteriestammer.

3.2.2 Antimikrobiell aktivitet i HPLC fraksjoner

Basert på MIC- resultatene i tabell 8 og 9 ble *C. glutamicum, C. mobile* og *L. anguillarum* plukket ut som de mest sensitive bakteriestammene, enten pga. at de viste sensitivitet ovenfor mange eluater (*C. glutamicum*) eller at de hadde høy sensitivitet for flere av eluatene/fraksjonene (*C. mobile* og *L. anguillarum*). Det var også et poeng å velge ut minst en Gram-positiv og en Gram-negativ bakteriestamme for å se om det var noen forskjell på aktiviteten mot Gram-positive og Gram-negative bakterier.

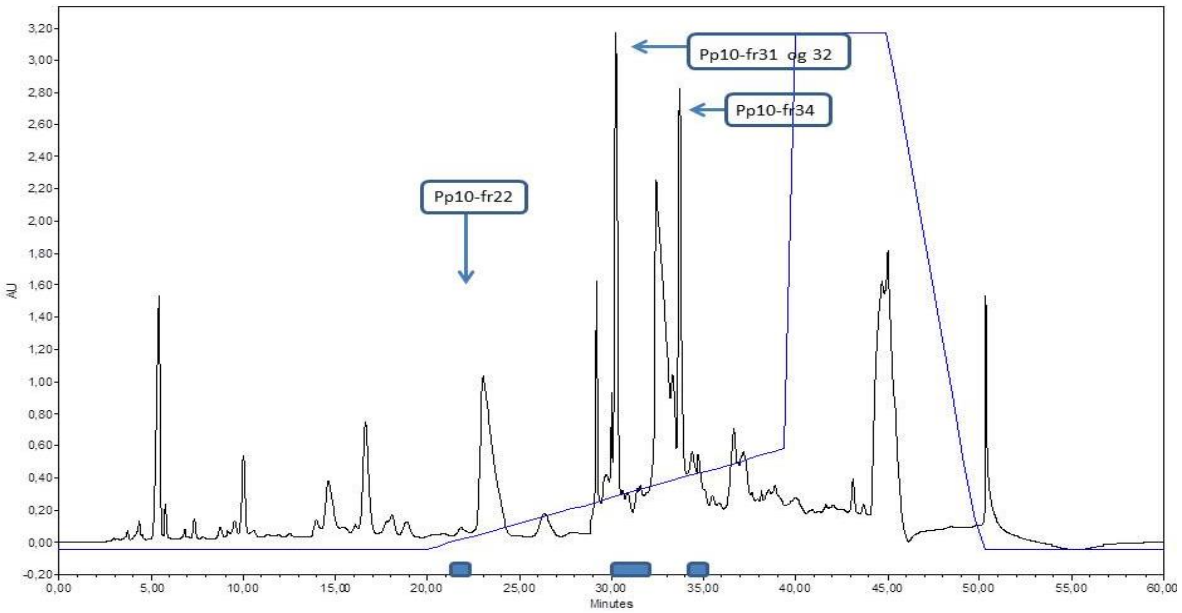
De 7 mest aktive eluatene ble plukket ut (Søl 10, 40 og 80 % SPE, Tarmgrønske 10 og 40 % SPE, Butare 80 % SPE og Båetang 10 % SPE), og fraksjonert ved hjelp av RP-HPLC. Ett-minutters-fraksjoner ble samlet opp, og testet for antimikrobiell aktivitet mot de tre utvalgte bakteriestammene. Det ble ikke detektert aktivitet hos Søl 80 % SPE, Tarmgrønske 40 % SPE og Butare 80 % SPE, men det ble detektert aktivitet i enkelte av fraksjonene til de andre eluatene. Bioaktiviteten hos aktive HPLC fraksjonene er vist i tabell 12.

Tabell 12. Antimikrobiell aktivitet i HPLC fraksjoner fra Søl 10 og 40 % SPE, Tarmgrønske 10 % SPE og Båetang 10 % SPE mot de tre mest sensitive bakteriestammene (*C. glutamicum*- terrestrisk, *C. mobile* – marin og *L. anguillarum* – fiske patogen). +=aktivitet, —= ingen aktivitet.

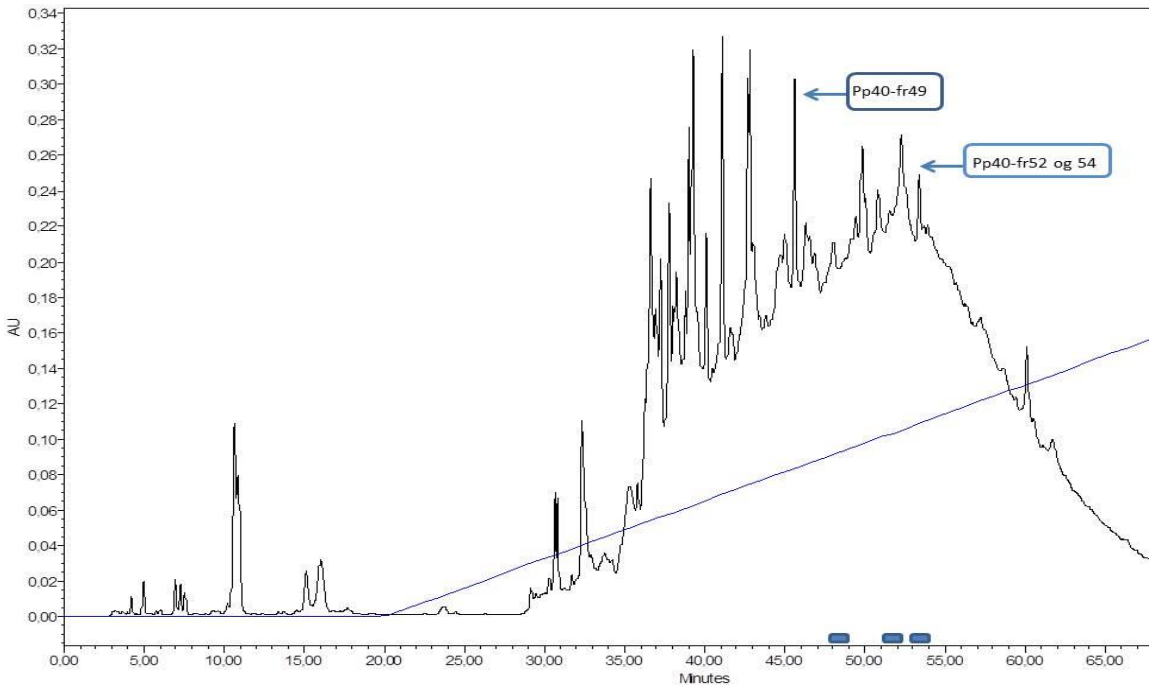
HPLC Fraksjon (minutt)	Navn på fraksjon	*C.g*	*C.mobile*	*L.anguillarum*
Gram		+	+	-
10 % ACN Søl				
22	Pp10-fr22	—	+	—
31	Pp10-fr31	—	+	+
33	Pp10-fr33	+	+	+
34	Pp10-fr34	+	+	+
40 % ACN Søl				
49	Pp40-fr49	—	+	—
52	Pp40-fr52	—	+	—
54	Pp40-fr54	—	+	—
10 % ACN Tarmgrønske				
9	Ei10-fr9	—	+	+
19	Ei10-fr19	—	+	+
35	Ei10-fr35	—	+	+
36	Ei10-fr36	—	+	+
10 % ACN Båetang				
31	Fd10-fr31	—	—	+
32	Fd10-fr32	—	—	+
34	Fd10-fr34	—	—	+
35	Fd10-fr35	—	—	+
36	Fd10-fr36	—	—	+
42	Fd10-fr42	—	—	+

3.2.2.1 Palmaria palmata- Søl

Det var kun HPLC-fraksjoner fra 10 % SPE Søl som var aktive mot alle tre testorganismene, og de eneste fraksjonene som var aktiv mot *C. glutamicum*. Dette betyr at Søl er aktiv ovenfor både Gram-positive og Gram-negative, marine og terrestriske bakterier. Av de andre SPE-eluatene fra Søl var det kun fraksjoner fra SPE 40 % ACN som viste aktivitet, da mot *C. mobile*. Søl 80 % SPE viste ikke aktivitet mot noen av bakteriene. Figur 10 viser HPLC-kromatogrammet av 10 % SPE Søl. Aktivitet ble funnet i fraksjon 21, 32, 33 og 34, og kromatogrammet viste tydelige topper i disse områdene. Figur 11 viser HPLC-kromatogrammet til 40 % SPE Søl. I dette HPLC-kromatogrammet er det ikke noen rene topper. De aktive fraksjonene kommer ut med mange andre forbindelser (mange tette topper).



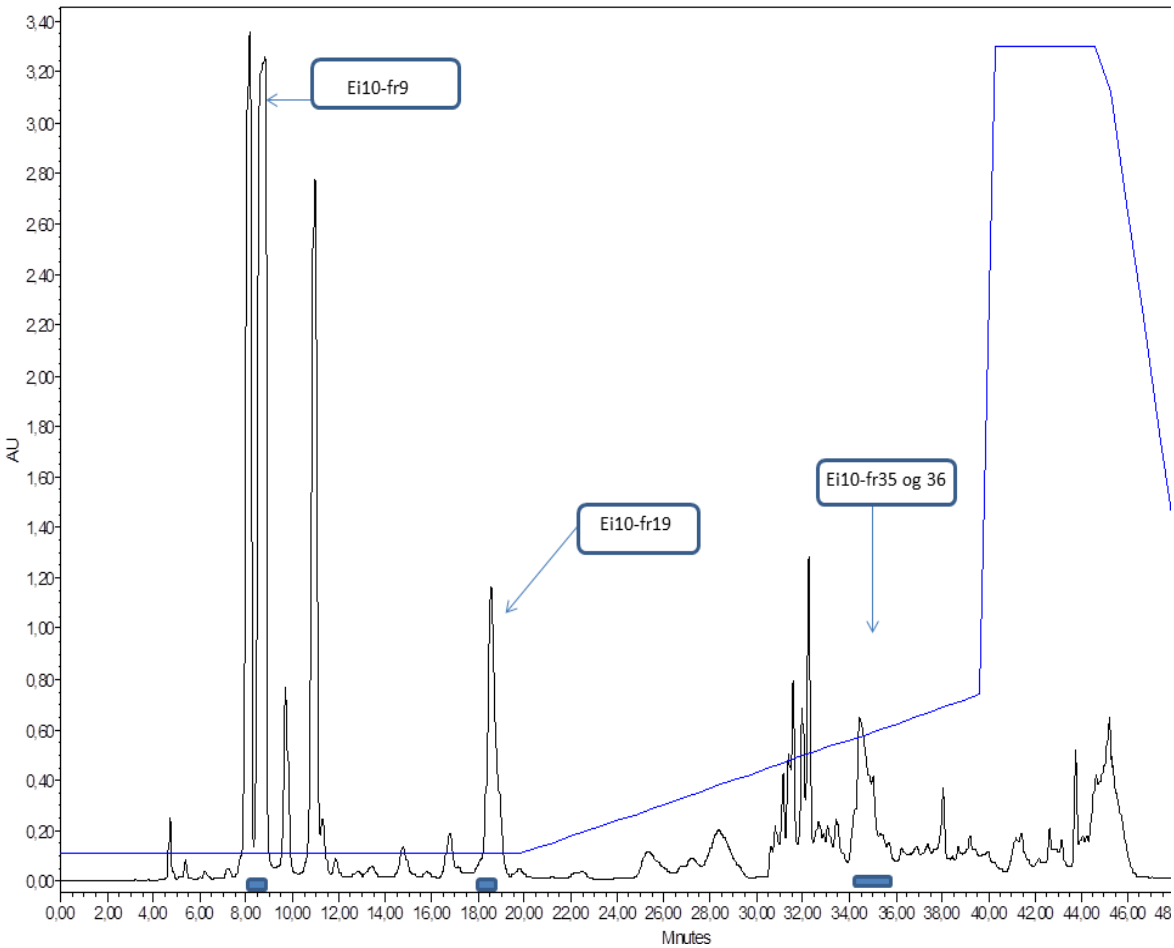
Figur 10. HPLC-Kromatogram ved 220 nm av 10 % SPE-eluatet fra *P. palmata.* Fraksjoner med antimikrobiell aktivitet er indikert i blått under kromatogrammet og med pil. Den blå linjen viser ACN-konsentrasjon i mobilfasen over tid i området der de aktive forbindelsene ble detektert. X-aksen=tid, Y-aksen= Absorbsjon ved 220 nm.



Figur 11. HPLC-Kromatogram ved 220 nm av 40 % SPE-eluatet fra *P. palmata.* Fraksjoner med antimikrobiell aktivitet er indikert i blått under kromatogrammet og med pil. Den blå linjen viser ACN-konsentrasjon i mobilfasen over tid i området der de aktive forbindelsene ble detektert. X-aksen=tid, Y-aksen= Absorbsjon ved 220 nm.

3.2.2.2 *Enteromorpha intestinalis- Tarmgrønske*

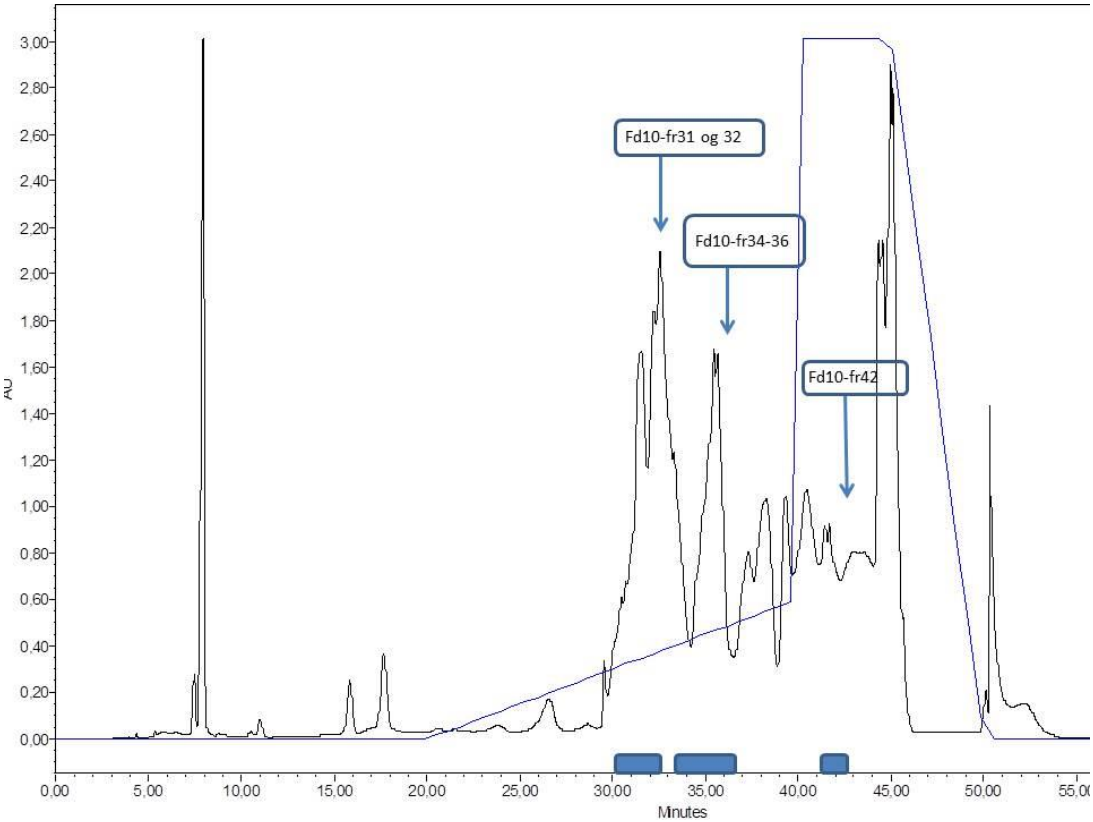
Tarmgrønske viste også aktivitet mot både Gram positive og Gram negative bakterier. Det var HPLC-fraksjonene fra 10 % SPE som var aktive mot begge bakteriestammene, disse er vist i kromatogrammet i figur 12. Aktivitet ble funnet i fraksjon 9, 19,35 og 36, og kromatogrammet viste tydelige topper i disse områdene. Tarmgrønske 40 % SPE viste ikke aktivitet i noen av HPLC fraksjonene.



Figur 12. HPLC-Kromatogram ved 220 nm av 10 % SPE-eluatet fra *E. intestinalis.* Fraksjoner med antimikrobiell aktivitet er indikert i blått under kromatogrammet og med pil. Den blå linjen viser ACN-konsentrasjon i mobilfasen over tid i området der de aktive forbindelsene ble detektert. X-aksen=tid, Y-aksen= Absorbsjon ved 220 nm.

3.2.2.3 *Fucus distichus- Båetang*

Båetang 10 % SPE var kun aktiv mot den Gram negative marine bakterien *L. anguillarum*. Aktiviteten ble funnet i fraksjon 31-32, 34-36 og 42. Aktiviteten er å finne i tre bredere topper i HPLC-kromatogrammet, vist i figur 13.



Figur 13. HPLC-Kromatogram ved 220 nm av 40 % SPE-eluatet fra *F.distichus.* Fraksjoner med antimikrobiell aktivitet er indikert i blått under kromatogrammet og med pil. Den blå linjen viser ACN-konsentrasjon i mobilfasen over tid i området der de aktive forbindelsene ble detektert. X-aksen=tid, Y-aksen= Absorbsjon ved 220 nm.

3.2.2.4 Alaria esculenta- Butare

HPLC- fraksjonene fra Butare 80 % SPE-eluat viste ikke aktivitet mot noen av bakteriestammene.

3.3 Innledende karakterisering

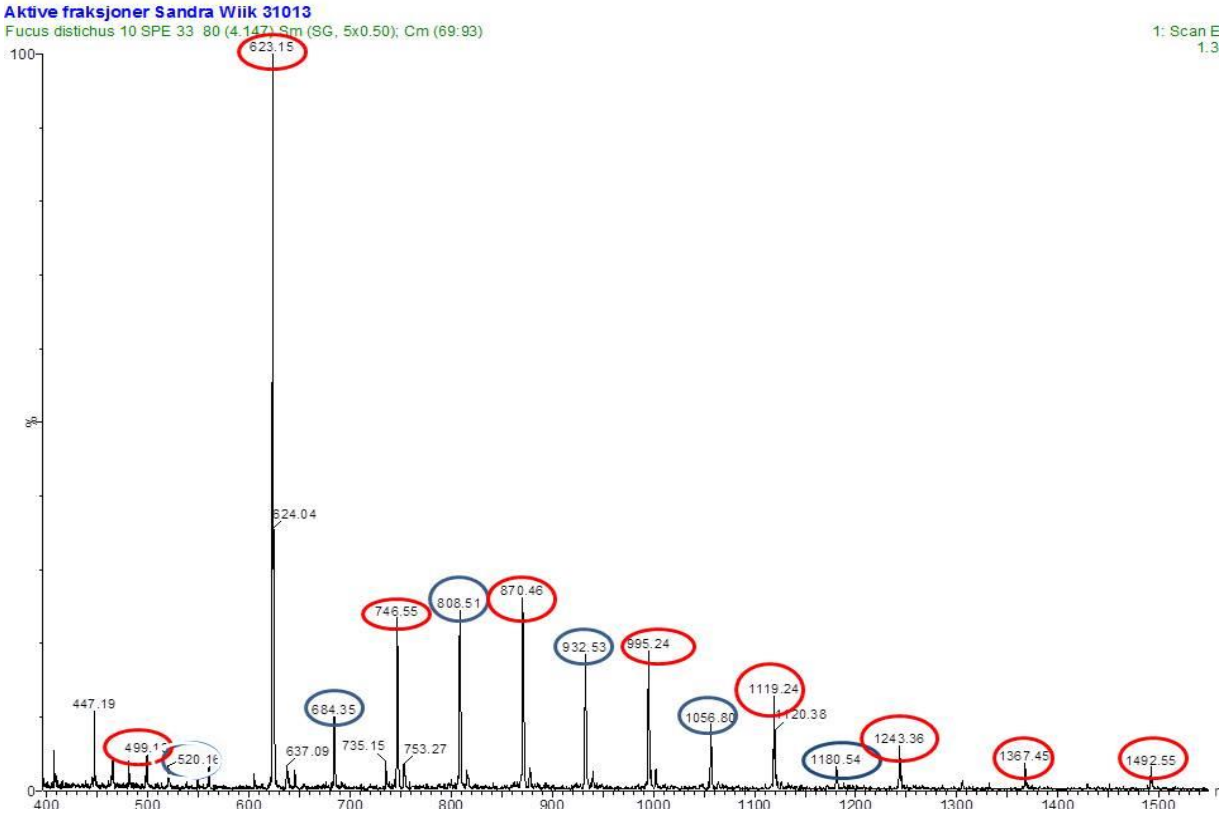
Det ble kjørt LC-MS av alle aktive HPLC-fraksjoner. Enkelte HPLC-fraksjoner var tilstrekkelig rene til å kunne utpeke enkelte komponenter ved hjelp MS-spekteret.

3.3.1 *Fucus distichus*- Båetang

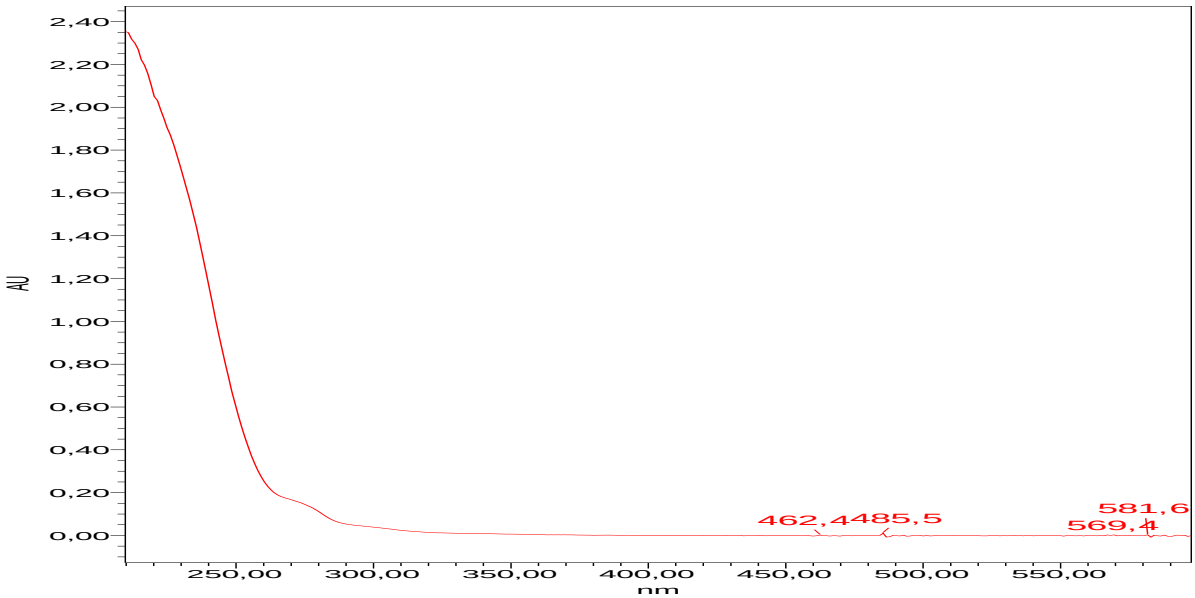
MS-spekteret til Fd10-fr33 i figur 7 viste innhold av en rekke med m/z-verdier (623, 746, 870, 995, 1119, 1243) med en differanse på 124 Da, noe som tyder på tilstedeværelse av phlorotanniner. m/z verdi 623 er derfor sannsynligvis et florethol med 5 floroglucinol ringer, med kjemiskformel $C_{30}H_{22}O_{15}$. Neste m/z verdi har en ekstra floroglucinol ring (+124), etc. Floretholene er markert med røde ringer i figur 14.. I samme spekter ses en annen serie med m/z-ioner, også disse med en differanse på 124 Da (m/z-verdier: 520, 684, 808, 932, 1056, 1181). Disse phlorotanninene skiller seg fra de forutgående med at de ligger ca. 62 Da høyere

i m/z-verdier. Disse er merket med blå ringer i figur 14. Figur 15 viser UV/Vis-spekter til Fd10-fr35 med et klassisk bilde for floroglucinol med en λ_{max} ved rundt 200 nm, og en liten skulder rundt 270 nm.

Fd1-fr32 viste lignende MS-spekter som Fd10-fr33.

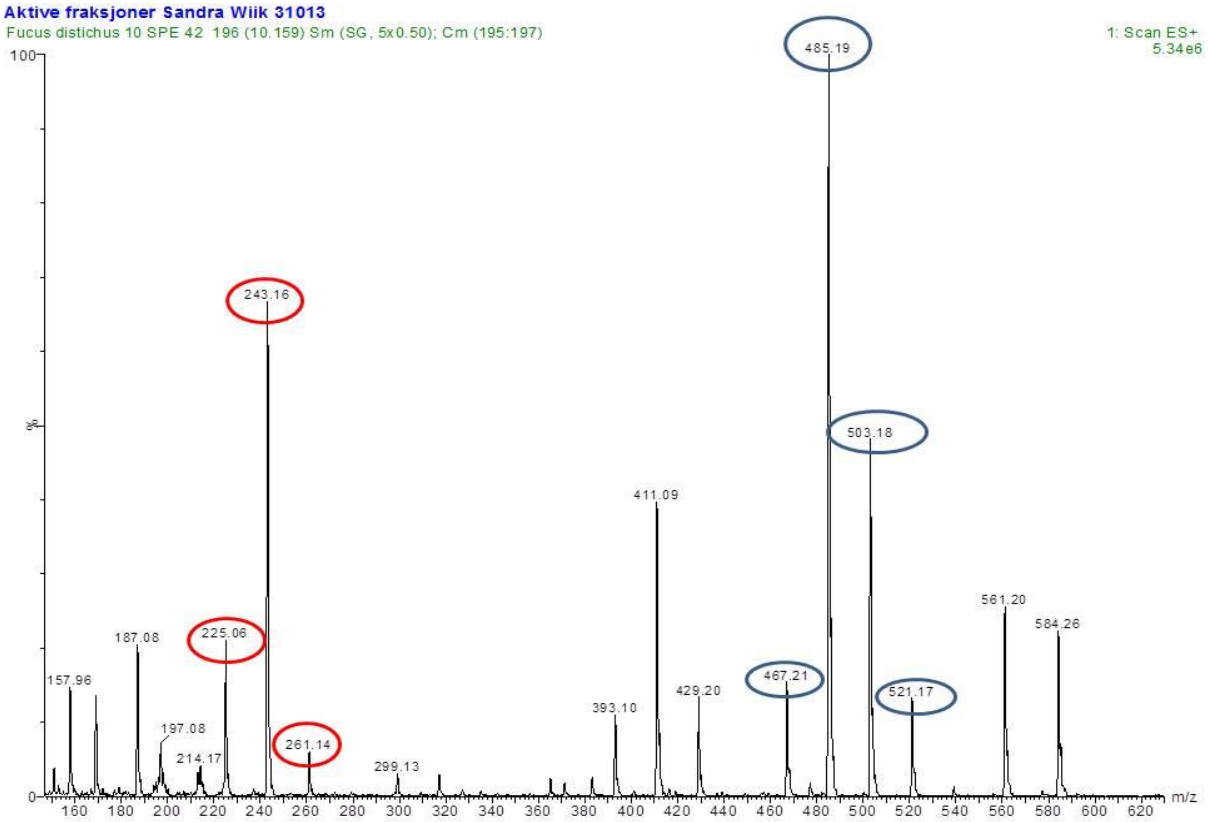


Figur 14. Utsnitt av MS-spekter for Fd10-fr33.



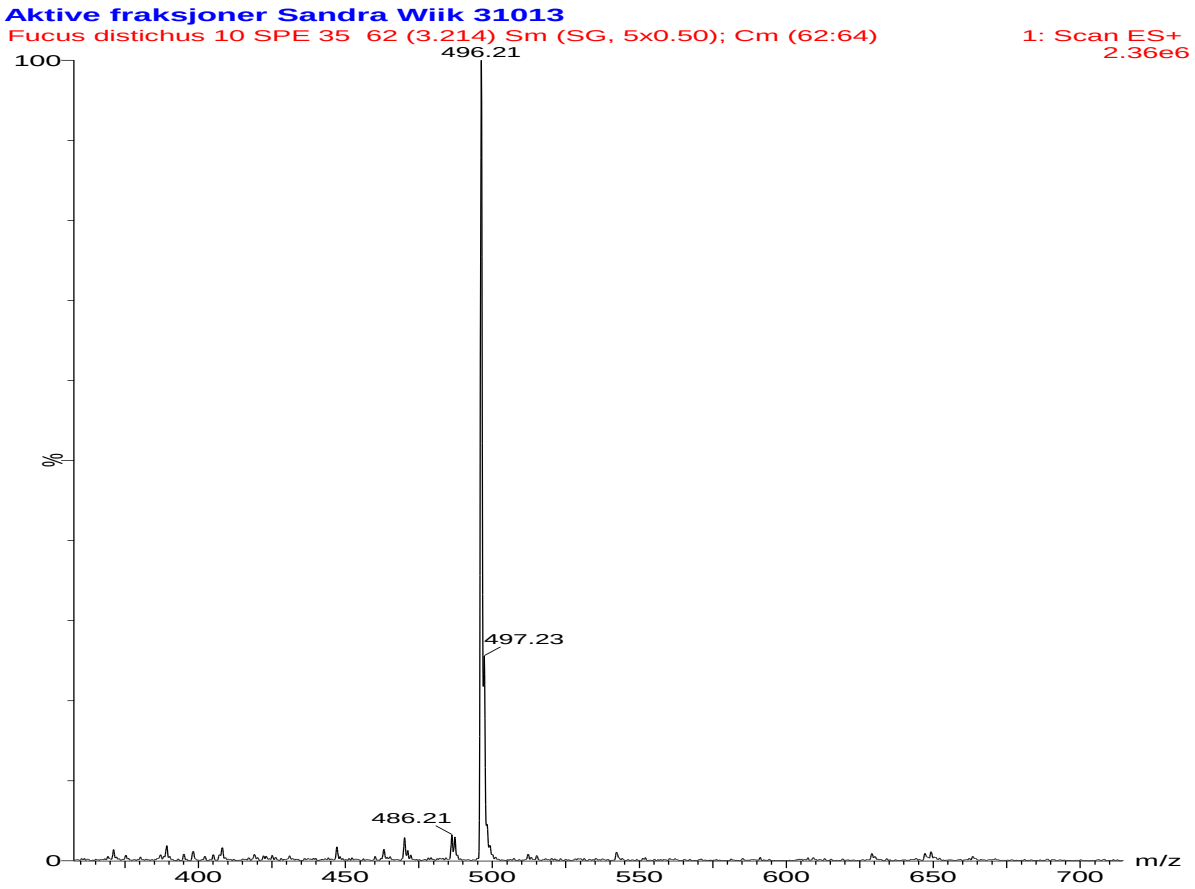
Figur 15. UV/Vis-spekter til Fd10-fr35.

MS-spekteret til Fd10-fr34 i figur 16 viste to ansamlinger med m/z-verdier som hadde Δ18 (H_2O) mellom hver topp. Δ18= H_2O. Første ansamling hadde m/z-verdiene; 225, 243, 261 (markert med rødt). Den andre ansamling hadde m/z-verdiene; 467, 485, 503, 521 (markert i blått).



Figur 16. Utsnitt av MS-spekteret til Fd10-fr34.

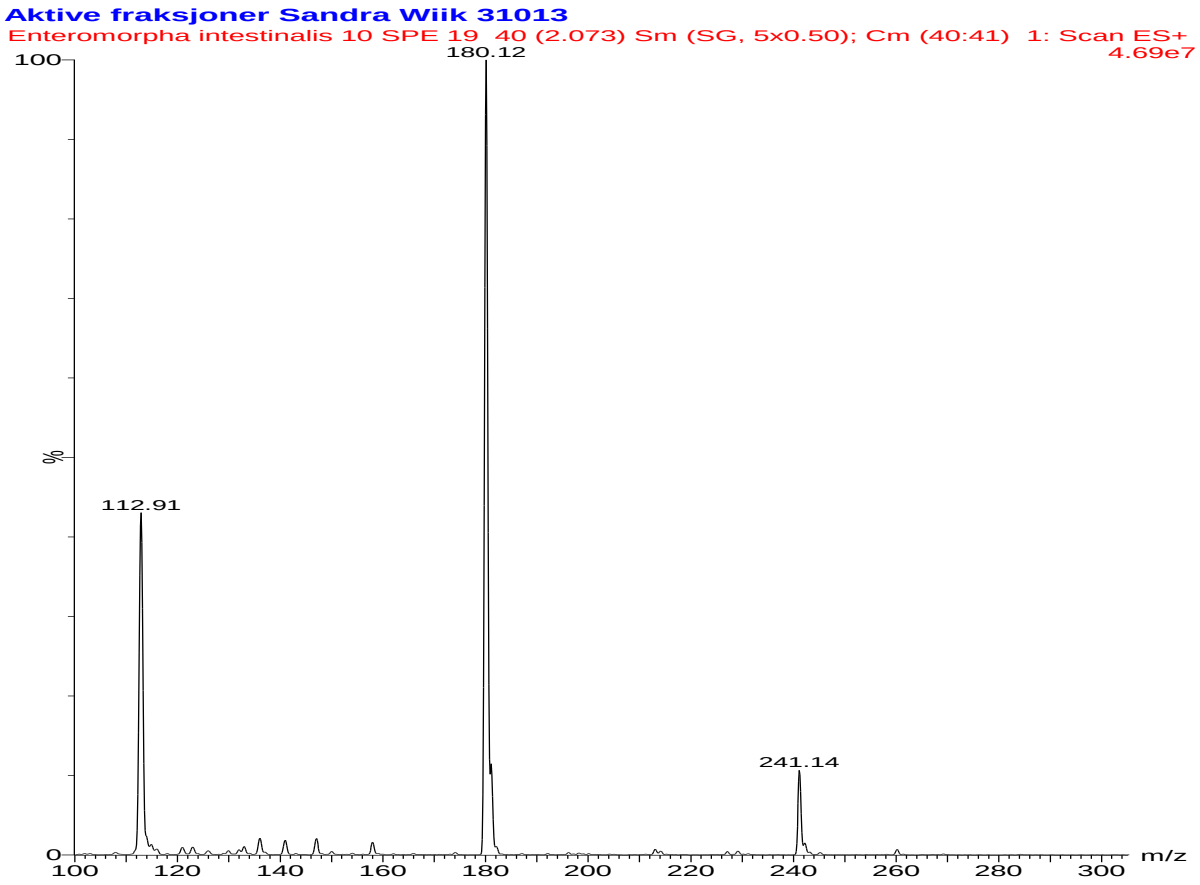
Figur 17 viser utsnitt av MS-spekteret til Fd10-fr35. Her er det en klar topp med m/z-verdi lik 496.



Figur 17. Utsnitt av MS-spekteret til Fd10-fr35.

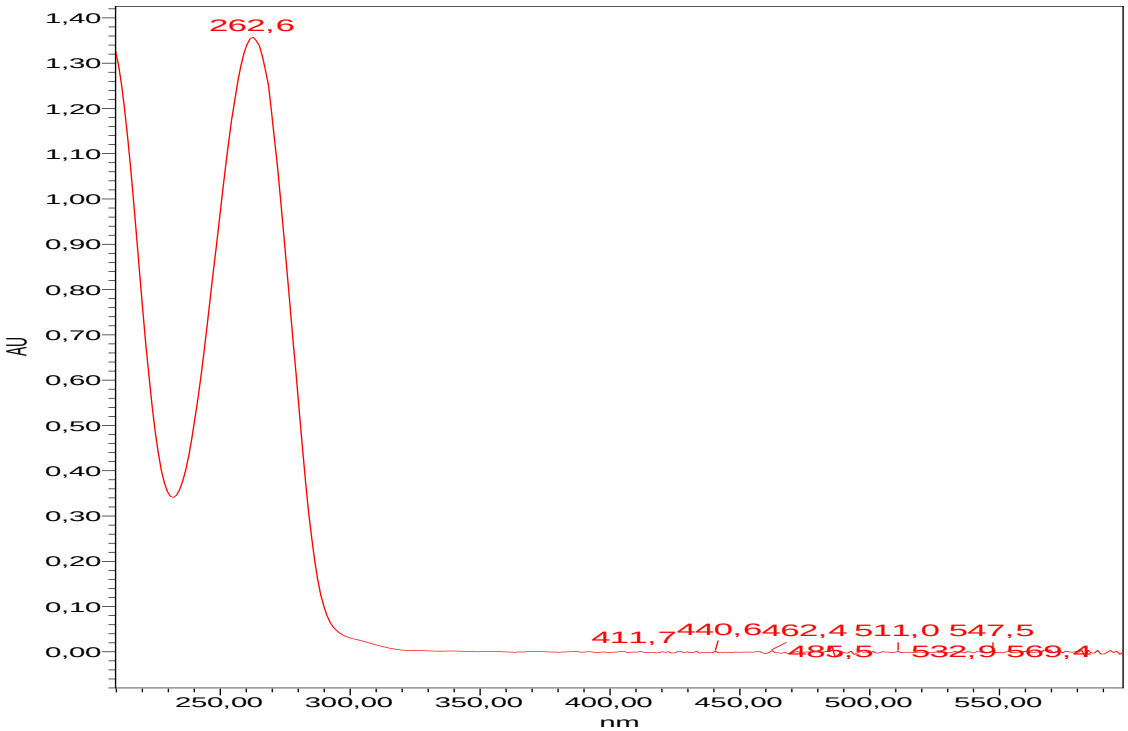
3.3.2 *Enteromorpha intestinalis* - Tarmgrønske

HPLC-fraksjonene til tarmgrønske inneholdt en rekke lavmolekylære forbindelser. MS-spekteret til Ei10-fr19 er vist i figur 18. Det var tre fremtredende m/z-verdier; 112, 180 og 241.



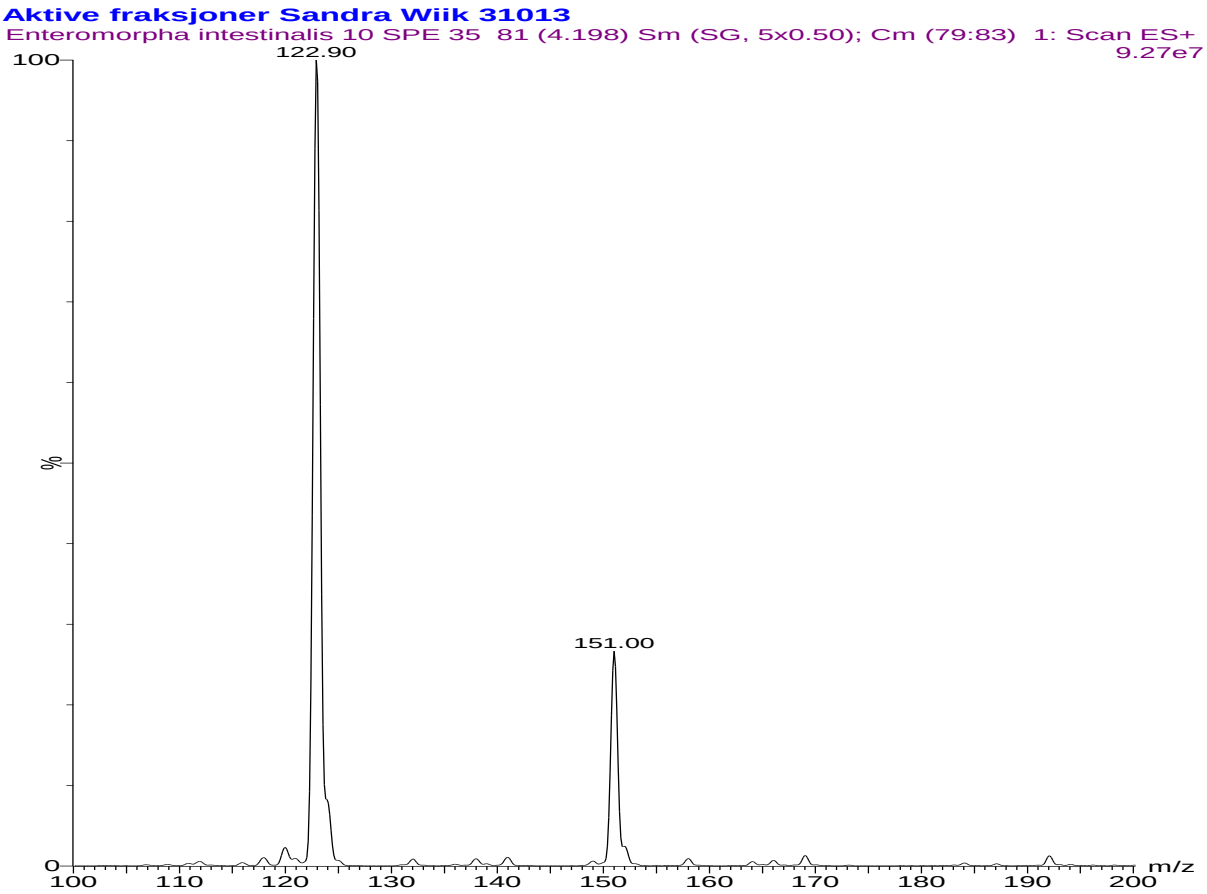
Figur 18. Utsnitt av MS-spekteret til Ei10-fr19.

Figur 19 viser UV/Vis-spekteret til Ei10-fr19, med λ_{max} ved 262,6nm.



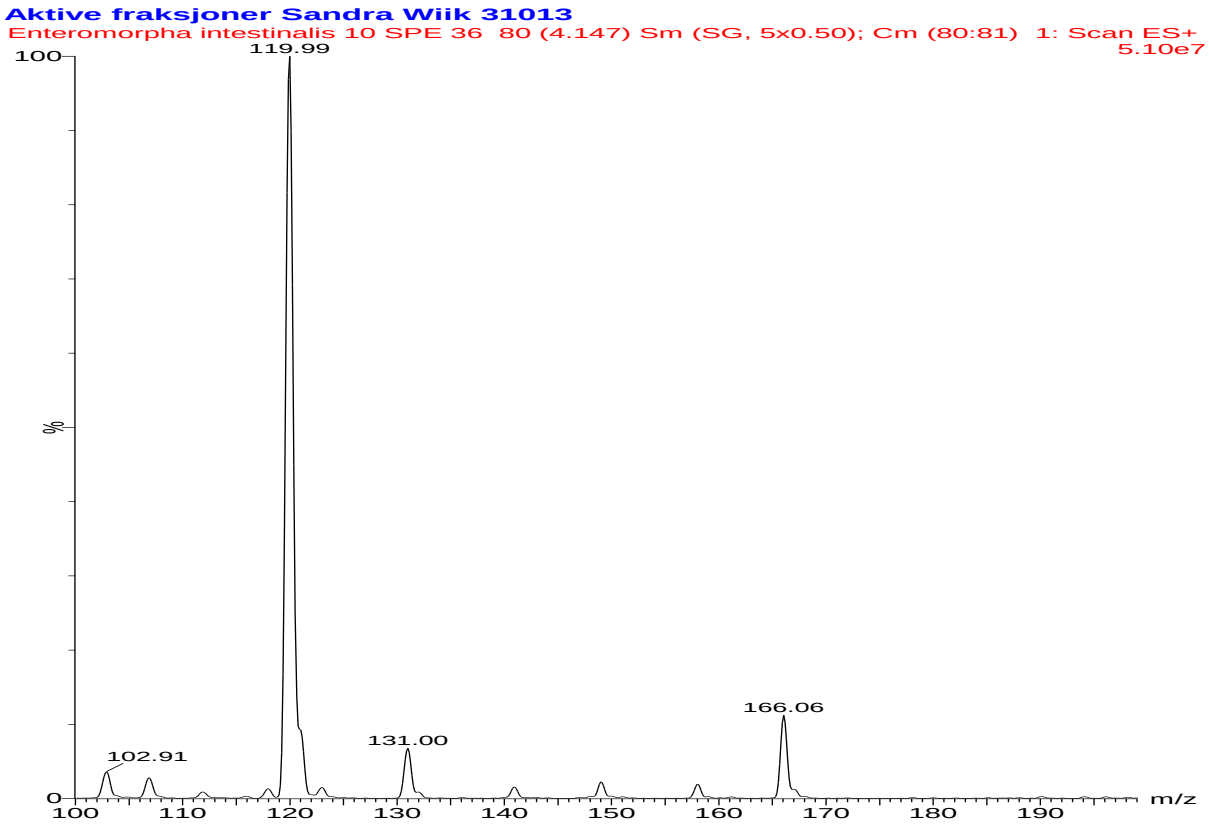
Figur 19. UV/Vis-spekter til Ei10-fr19.

Figur 20 viser MS-spekteret til Ei10-fr35, her var det to fremtredende topper med m/z-verdi 123 og 151.

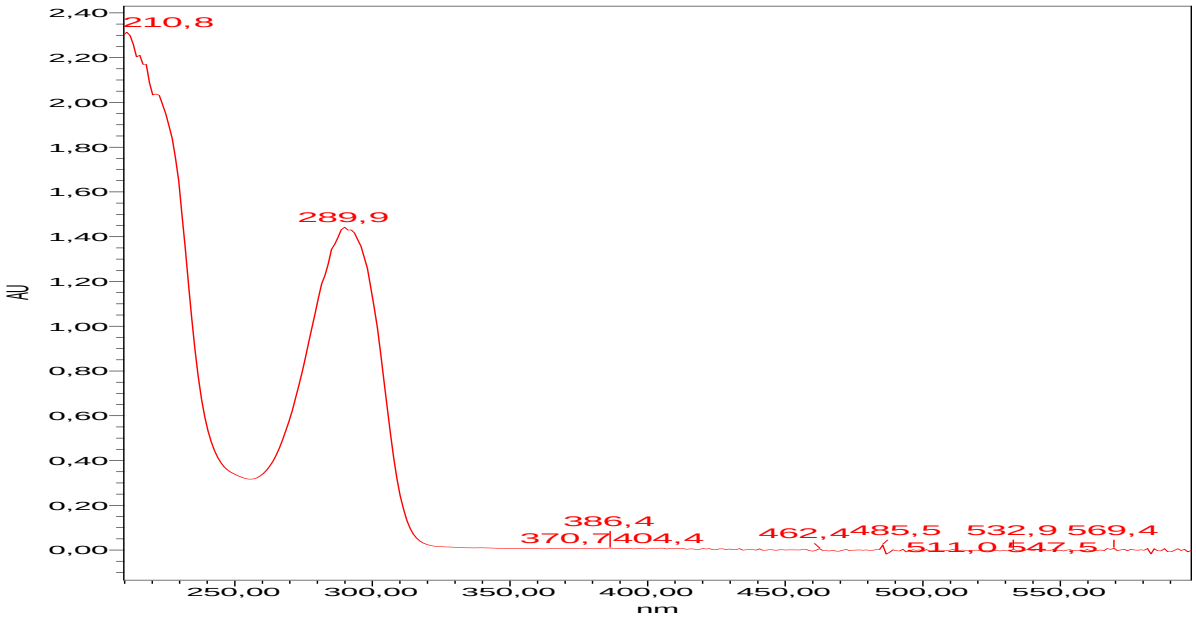


Figur 20. Utsnitt av MS-spekteret til Ei10-fr35.

MS-spekteret til Ei10-fr36 er vist i figur 21. Det var det en fremtredende topp med m/z-verdi 120. UV/Vis-spekteret til Ei10-fr35/36 i figur 22 viser at λ_{max} i Ei10-fr35/36 er ved 210,8 og 289,9nm.



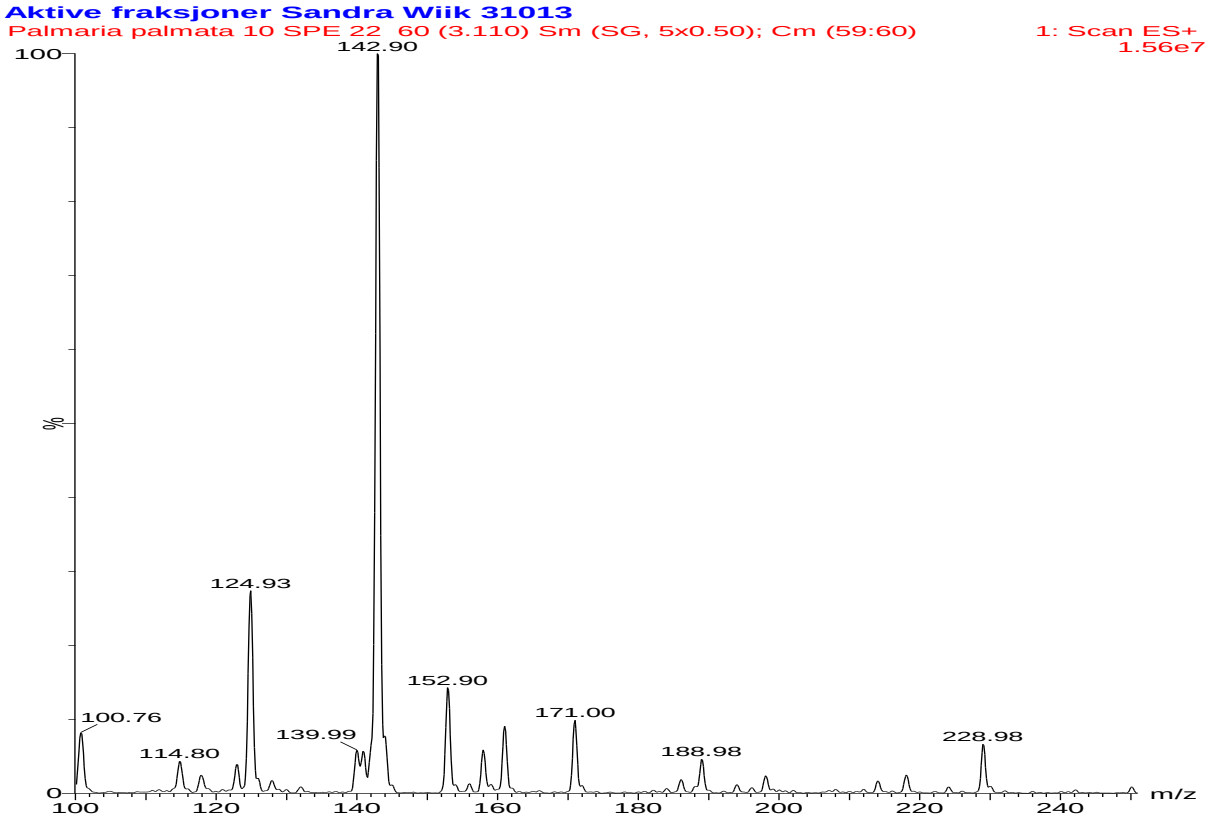
Figur 21. Utsnitt av MS-spekteret til Ei10-fr36.



Figur 22. UV/Vis-spekter til Ei10-fr35/36.

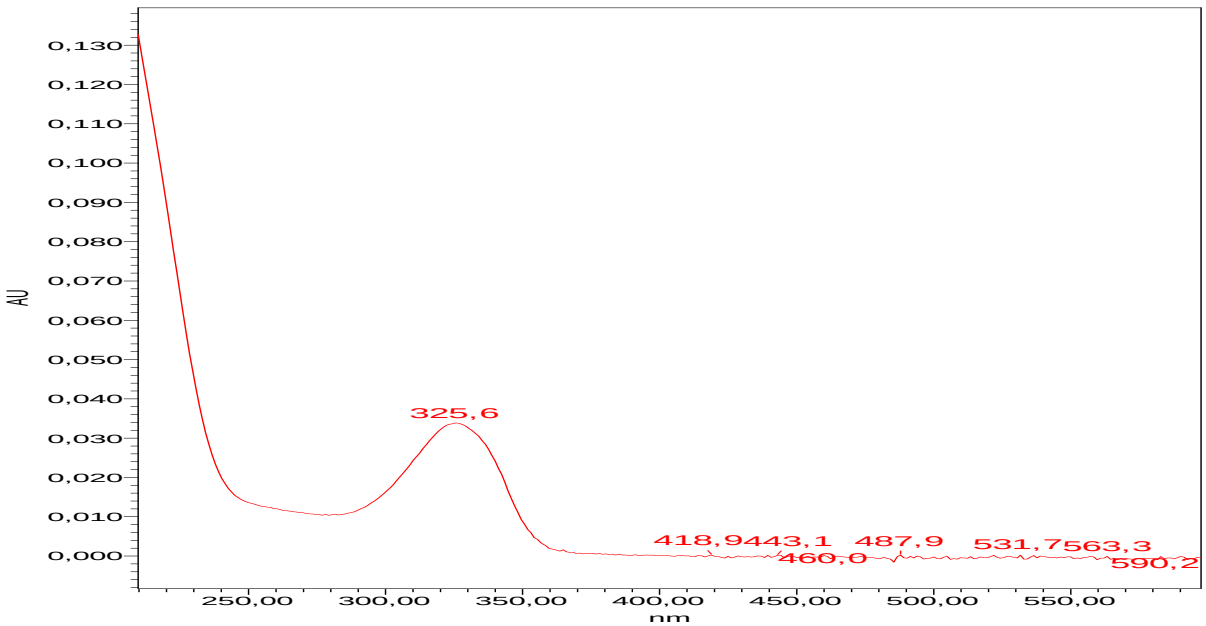
3.3.3 *Palmaria palmata - Søl*

HPLC-fraksjonene til 10 % SPE-eluatet til Søl inneholdt en rekke lavmolekylære forbindelser. MS-spekteret til Pp10-fr22 hadde en topp med m/z-verdi 143, vist i figur 23.



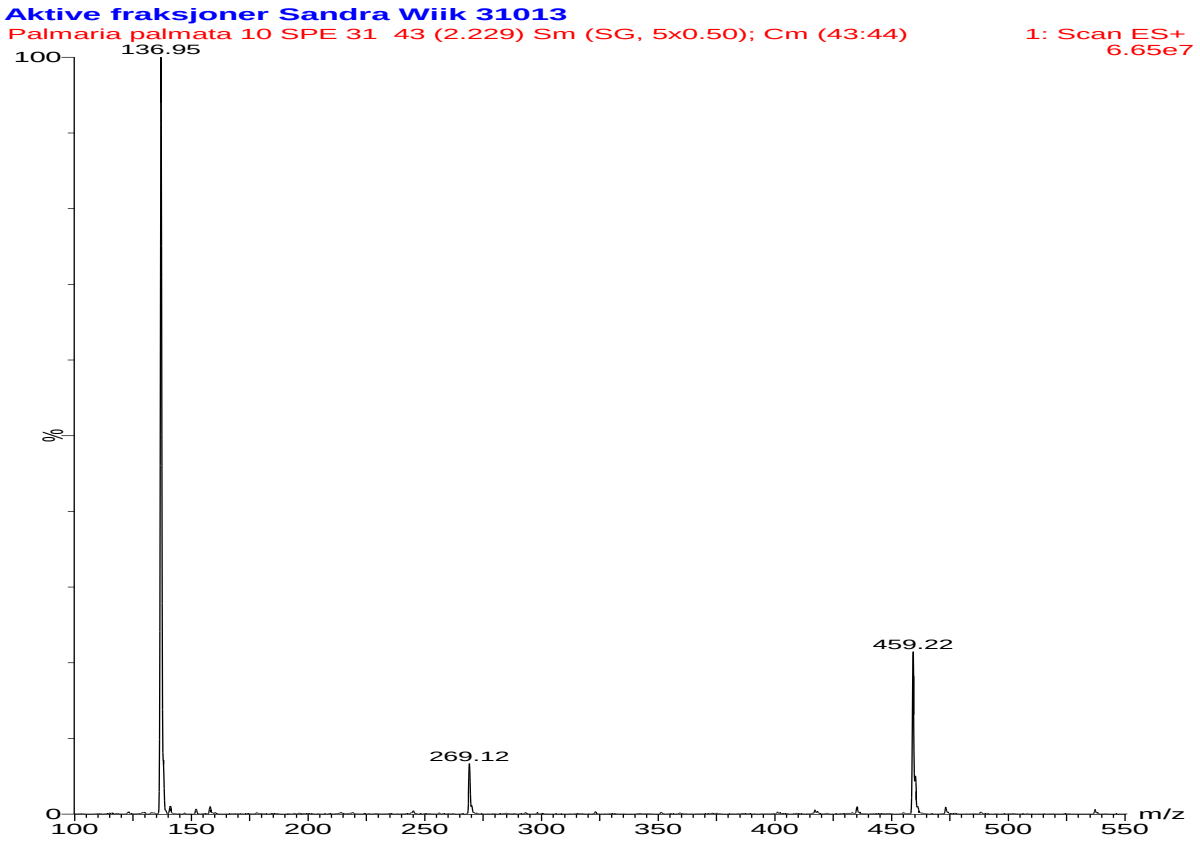
Figur 23. Utsnitt fra MS-spekteret til Pp10-fr22.

UV/Vis-spekteret i figur 24 viser λ_{max} i Pp10-fr22 er ved 325,6nm.

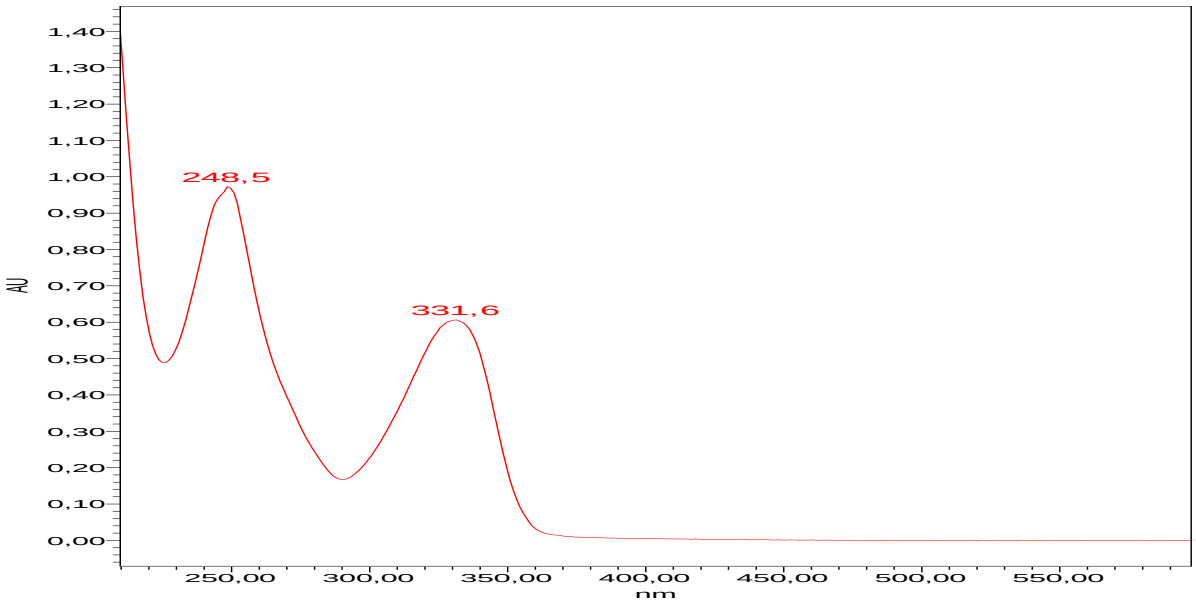


Figur 24. UV/Vis-spekteret til Pp10-fr22.

MS-spekteret til Pp10-fr31 vist i figur 25 hadde to topper med m/z-verdi 137 og 459. Figur 26 viser UV/Vis-spekteret til Pp10-fr31. λ_{max} var ved 248,5nm og 331,6nm.

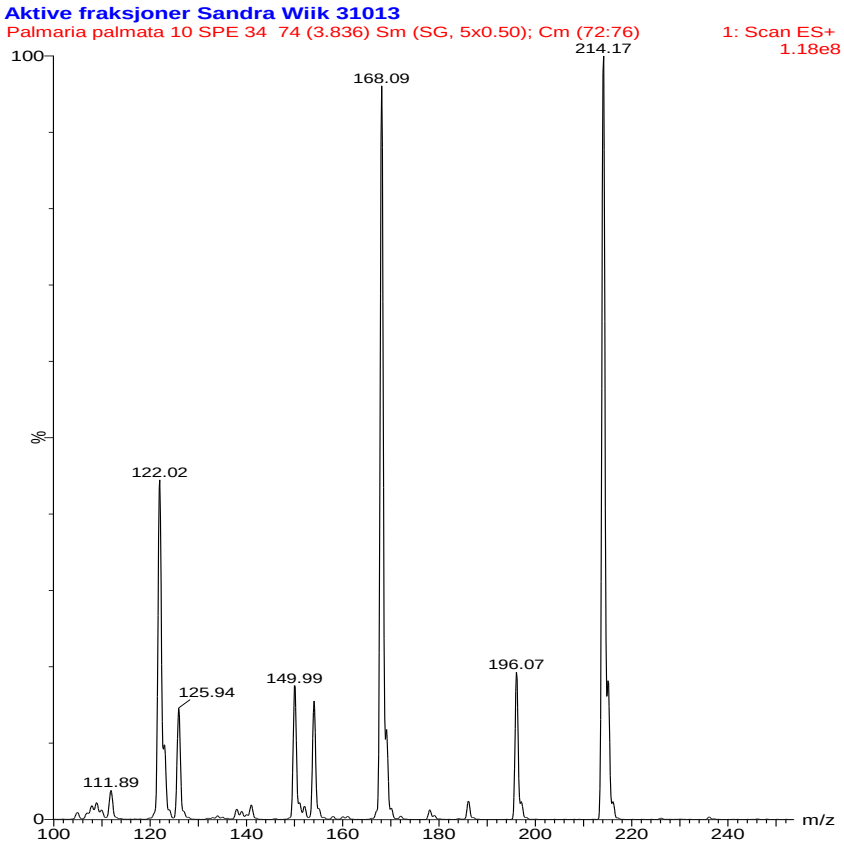


Figur 25. Utsnitt fra MS-spekteret til Pp10-fr31.



Figur 26. UV/Vis- spekteret til Pp10-fr31.

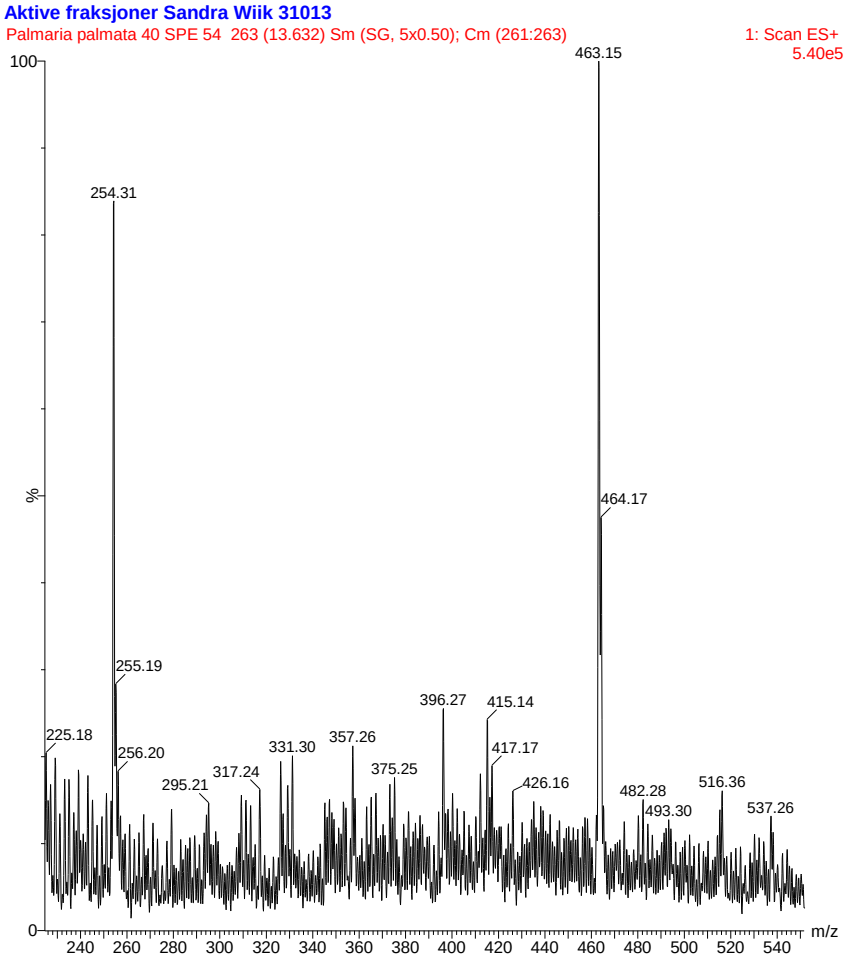
MS-spekteret til Pp10-fr34 hadde tre topper med m/z-verdi 122, 168 og 214, vist i figur 27.



Figur 27. Utsnitt fra MS-spekteret til Pp10-fr34.

HPLC- fraksjonene til 40 % SPE-eluatet til Søl inneholdt mange, men ingen klart dominerende m/z-verdier. Et utsnitt av MS-spekter til Pp40-fr49 er vist i appendiks 4. Her var det to topper som var mer fremtredende enn de andre med m/z-verdi 768,6 og 783,55.

Figur 28 viser MS-spekteret til Pp40-fr54. Her var det to fremtredende topper med m/z-verdi 254,3 og 463.



Figur 28. Utsnitt fra MS-spekteret til Pp40-fr54.

4. DISKUSJON

Før var det vanskelig å få tak i marine organismer som ikke befant seg i fjæresonen. I dag har vi teknologi og en verden av muligheter. Interessen for marin bioprospektering har vokst, og er i dag et viktig forskningsfelt. Selv om vi har teknologien til å hente ut biologisk materiale og å forske på det, er mengden tilgjengelig biologisk materiale et problem. Enkelte av de marine makroalgene brukt i denne oppgaven har stor biomasse, mens andre er små av vekst. Sekundærmetabolitter produseres i små konsentrasjoner i organismene, og det kan være et problem å få nok materiale til å gjennomføre kliniske tester (Seidel, 2012).

I denne oppgaven ble de seks marine makroalgene Vanlig kjærringhår (*Desmarestia aculeata)*, Båetang (*Fucus distichus*), Butare (*Alaria esculenta*), Tarmgrønske (*Enteromorpha intestinalis*), Vanlig tarmgrønske (*Cladophora rupestris*), Søl (*Palmaria palmata*) ekstrahert, og testet for tilstedeværelse av antibakterielle forbindelser. Aktive ekstrakter og fraksjoner ble videre analysert med HPLC og LC-MS for å starte innledende karakterisering av eventuelle antibakterielle forbindelser.

4.1 Ekstraksjonsmetode

Valg av ekstraksjonsmetode på biologisk materiale er av betydning for hvilke stoffer som ekstraheres. Metoden 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 valgte vi en metode for å ekstrahere et bredt spekter av stoffer. Naturstoffene ble ekstrahert med 60 % ACN + 0,1 % TFA, da denne metoden tidligere har vist gode resultater for ekstraksjon av ulike forbindelser fra forskjellige marine organismer (ikke makroalger) (Haug *et al.*, 2002; Haug *et al.*, 2004; Tadesse *et al.*, 2008).

Etter ekstraksjon ble tørrstoffutbyttet for vannfasen og den ACN rike, organiske fasen beregnet. Søl hadde det største utbyttet i vannfasen, 27,5 %, og Tarmgrønske hadde det laveste (7,55 %). Butare, Vanlig kjærringhår, Vanlig grønndusk hadde alle utbytte rundt 20 %, mens Båetang hadde et lavt utbytte på 9,88 %. Utbyttet var ikke veldig godt. Dette kan skyldes at det biologiske materialet ikke var godt nok homogenisert, eller at metoden ikke var ideell.

Etter SPE ble tørrstoffutbyttet av eluatene (10, 40 og 80 % SPE) beregnet. Jevnt over var utbyttet lavt. Alle 80 % ACN eluatene var under 0,25 %, med det laveste utbyttet på 0,04 % hos Vanlig kjærringhår. Det høyeste utbyttet var på 4,9 hos 10 % SPE Vanlig kjærringhår. Søl som hadde det største tørrstoffutbyttet i vannfasen var nå den makroalgen som gav nest lavest utbytte. Forklaringen kan være at Sølen inneholdt en høy konsentrasjon av salter, spesielt NaCl. Saltene kan påvirke antimikrobielle tester, og de må derfor fjernes fra ekstraktene. Dette blir gjort ved hjelp av SPE, og tørrstoffutbyttet blir derfor lavere etter denne prosedyren.

Tørrstoffutbyttet til ACN ekstraktene var lave for alle makroalgene (2,7-5,0 %).

4.2 Antimikrobiell aktivitet

Det ble registrert antibakteriell aktivitet i alle makroalgene.

Alle SPE- eluatene av Tarmgrønske var aktiv mot alle de terrestriske bakteriene. Det mest aktive eluatet var 10 % SPE, med laveste MIC registrert med 1 mg/ml mot *E. coli* og *S.aureus*. Ikke like mange eluaterer viste antibakteriell aktivitet mot de marine bakteriene, men de bakteriene som ble hemmet var mer sensitive enn de terrestriske bakteriene (*L.anguillarum* og *C. mobile*; MIC= 0,25 mg/ml). Hornsey og Hide (1974, 1975) fant ingen aktivitet hos Tarmgrønske og Vanlig grønndusk sanket rundt de Britiske øyer. Det var to forskjellige forsøk. I det første forsøket ble algene sanket hver tredje måned og testet for antimikrobiell aktivitet (Hornsey & Hide, 1974). I det andre forsøket lette de etter aktivitet i

forskjellige stadier i livssyklusen til alger, heller ikke her kunne de påvise antimikrobiell aktivitet i disse (Hornsey & Hide, 1985). Derimot fant de at Vanlig kjærringhår og Butare var aktive mot *S. aureus* og *E. coli* (Hornsey & Hide, 1974), og at Butare hadde forskjellig antimikrobiell aktivitet gjennom sin livssyklus (Hornsey & Hide, 1985). I dette studiet var Butare aktiv mot både terrestriske og spesielt marine bakteriestammer (Gram-positive og -negative). Vanlig kjærringhår var kun aktiv mot Gram positive bakterier. Andre har derimot fått motstridene resultater. Padmakumar og Ayyakkannu (1997) fant antimikrobiell aktivitet hos Tarmgrønske (sanket utenfor Indias sørlige kyst) mot *S. aureus* (Gram-positiv) og en rekke *Vibrio spp*. (Gram-negative) bakteriestammer. De konkluderte med at arten stort sett hadde antimikrobiell aktivitet gjennom hele året, med bare små sesongvariasjoner (Padmakumar & Ayyakkannu, 1997). Hellio *et al*. (2001) testet 30 makroalger for antimikrobiell aktivitet, blant disse var Tarmgrønske, Vanlig grønndusk, Butare og Søl. De ekstraherte med tre ulike løsningsmidler; 95 % etanol, vann og diklormetan. Av til sammen 90 ekstrakter fant de bare 18 aktive ekstrakter, og blant disse var Tarmgrønske, Vanlig grønndusk og Søl. De fant at Vanlig grønndusk og Søl bare var aktive mot Gram-negative bakteriestammer, mens det aktive ekstraktet fra Tarmgrønske var bare aktiv mot Gram-positive bakteriestammer (Hellio *et al.*, 2001). I dette studiet var Tarmgrønske aktiv mot både Gram-positive og Gram-negative bakteriestammer. Den antimikrobielle aktiviteten til Tarmgrønske kan skyldes at den inneholder dimetylsulfid og akrylsyre, som begge har antimikrobiell aktivitet (Bywood & Challenger, 1953; Glombitza, 1970).

De sprikende resultatene kan ha flere årsaker. En er at ulike bestander av de samme tangartene kan akkumulere forskjellige metabolitter (Crews, 1977; Mynderse & Faulkner, 1978). Padmakumar og Ayyakkannu (1997) fant at det kan forekomme geografisk variasjon i antimikrobiell aktivitet (Padmakumar & Ayyakkannu, 1997). Flere arter av marine alger har også sesongvariasjoner i den antimikrobielle aktiviteten (Hornsey & Hide, 1976a). Hornsey og Hide (1976) fant videre at den antimikrobielle aktiviteten kunne være forskjellig fordelt langs algenes kropp (Hornsey & Hide, 1976b). I en senere studie fant de at antimikrobiell aktivitet kunne være forskjellig for de ulike stadiene av algens livssyklus (Hornsey & Hide, 1985). Valg av løsemiddel påvirker hvilke naturstoffer som ekstraheres fra biologisk materiale (Olesen *et al.*, 1964; Seidel, 2012). Videre kan de sprikene resultatene i forsøkene nevnt ovenfor skyldes ulike metoder for bevaring av alger før utvinning, og alderen på prøven (Pratt *et al.*, 1951; Buyske, 1975). Mange alger gjennomgår en enzymatisk nedbrytning når de

fjernes fra havet (Haas, 1935). Ulike bakteriestammer kan ha varierende sensitivitet, noe som vil påvirke resultatene(Padmakumar & Ayyakkannu, 1997).

Alle makroalgene testet i denne oppgaven er aktive mot *C. glutamicum* og *S. aureus*, med MIC så lavt som 0,25 mg/ml for 10 % SPE Søl. Ellers ligger MIC-konsentrasjonene ovenfor de terrestriske bakteriene mellom 2 og 4 mg/ml, utenom 80 % SPE Tarmgrønske som ligger på 1 mg/ml mot *S. aureus*, og 80 % SPE Båetang som er aktiv på 1 mg/ml mot *C. glutamicum*, *S. aureus* og *E. coli*. Av de marine bakteriestammene er *C. mobile* den bakterien som er sensitiv ovenfor flest eluater/ekstrakter, med 12 aktive eluaterer og 2 aktive ACN ekstrakter. Ved MIC ≤ 4 mg/ml var det ikke en betydelig forskjell på antall aktive eluateter/ekstrakter mellom marine og terrestriske bakteriestammer (tabell 10). Det er derimot en forskjell i sensitiviteten mellom marine og terrestriske bakteriestammer når man ser på en lavere konsentrasjon (MIC ≤ 1 mg/ml). Man ser da at de marine bakteriestammene er generelt mer sensitiv. Det var 12 av 23 (51 %) aktive eluater/ekstrakter mot de marine bakteriestammene, men bare 4 av 24 (17 %) aktive eluater mot de terrestriske bakteriestammene. Det er ingen stor forskjell å observere i aktivitet rettet mot Gram-positive og Gram-negative bakteriestammer.

4.2.1 RP-HPLC

Etter antimikrobiell testing ble de sju mest aktive SPE-eluatene (SPE: 80 % Butare, 10 % Båetang, 10, 40 % Tarmgrønske og 10, 40, 80 % Søl) plukket ut til videre seperasjon ved hjelp av RP- HPLC. *C. glutamicum*, *C. mobile* og *L. anguillarum* ble plukket ut som testorganismer, for de var de mest sensitive bakteriestammene. Enten pga. at de viste sensitivitet ovenfor mange SPE-eluater (*C. glutamicum* og *C. mobile*) eller at de hadde høy sensitivitet for flere av eluatene (*C. mobile* og *L. anguillarum*). Det var også et poeng å velge ut minst en Gram-positiv og en Gram-negativ bakterie for å se om det var noen forskjell på aktiviteten i HPLC-fraksjonene.

HPLC-fraksjonene fra Båetang var bare aktive mot den Gram-negative marine bakterien

L. anguillarum. *L. anguillarum* var også sensitiv ovenfor fraksjoner fra 10 % Tarmgrønske og 10 % Søl. *C. mobile* (Gram-positiv, marin) var sensitiv ovenfor flest HPLC-fraksjoner (10, 40 % Søl og 10 % Tarmgrønske). *C. glutamicum* (Gram-positiv, terrestrisk) var kun sensitiv ovenfor HPLC-fraksjoner av 10 % SPE Søl.

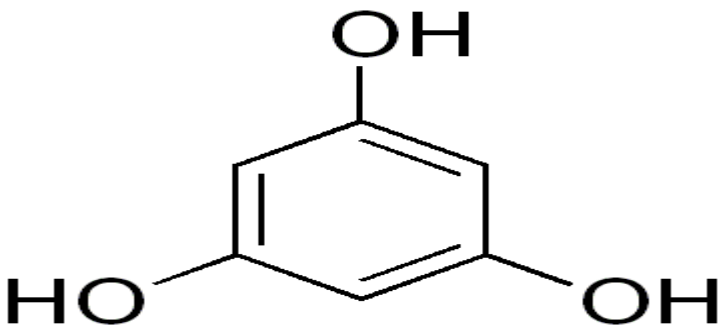
Det ble ikke funnet aktivitet i fraksjoner av 40 % SPE Tarmgrønske, 80 % SPE Søl og 80 % SPE Butare. Aktivitet avhenger av hvilke forbindelser som er til stede, konsentrasjonen av

forbindelsen, mikroorganismen forbindelsen skal hemme, og funksjonen forbindelsen skal forstyrre hos organismen. En grunn til at den antimikrobielle aktiviteten forsvant eller ble lavere etter RP- HPLC kan være at konsentrasjonen av det aktive stoffet ble for lavt. Det kan også være at det var et samspill mellom flere stoffer i SPE-eluatene som nå var blitt skilt fra hverandre slik at synergieffekten forsvant. Det er kjent at ulike antimikrobielle stoffer kan fungere sammen, og dermed forsterker den antimikrobielle effekten (McCafferty *et al.*, 1999; Challis & Hopwood, 2003).

4.3 Innledende karakterisering av aktive forbindelser

4.3.1 Florotanniner

Marine brunalger produserer florotanniner, som er floroglucinol-baserte forbindelser, biosyntetisert i acetat-malonat banen. De er sterkt hydrofil og har et bredt spekter av molekylære størrelser. De er klassifisert i fire hovedgrupper i henhold til bindingene mellom floroglucinol enhetene: fuhaloler og floroetholer (med eterbindinger), fucoler (med en fenyl binding), fucofloroetholer (med eter og fenyl bindinger) og eckoler (med dibenzodioxin binding) (Ferreres *et al.*, 2012; Martinez & Castaneda, 2013). Figur 29 viser molekylær strukturen til floroglukinol.



Figur 29. Kjemisk struktur til Floroglucinol (Wikipedia, 2013e).

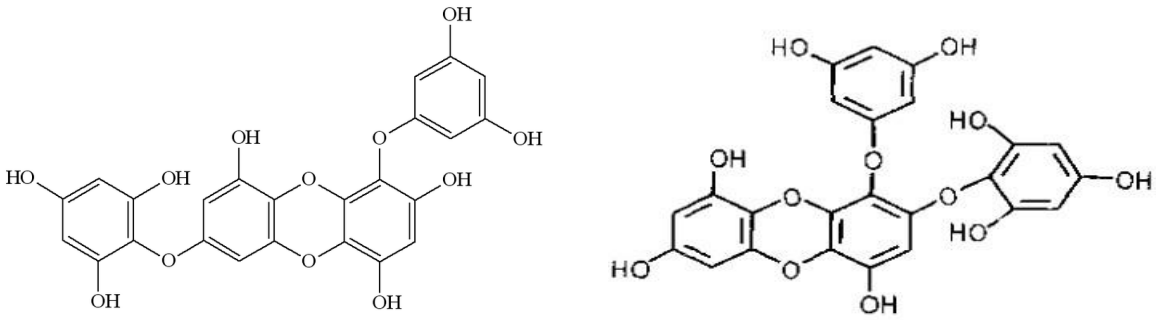
Florotanniner er rapportert å ha anti-HIV, antioksidant, antiallergi, anti-plasmin, anti-inflammatorisk, antidiabetika, antiproliferative, anticytotoksisk og antimikrobiell aktivitet (Li *et al.*, 2011; Eom *et al.*, 2012; Ferreres *et al.*, 2012).Den antimikrobiell aktiviteten til florotanninerer er vell-kjent (Burkholder & Sharma, 1969). Nagayama *et al.* fant at en rekke florotanniner hadde antimikrobiell aktivitet på en rekke terrestriske bakteriestammer, blant annet *E.coli* og *S.aureus*. De fant også at den baktericale effekten til florotanniner hadde en tendens til å øke med polymeriseringen av floroglucinol (Nagayama *et al.*, 2002; Ferreres *et al.*, 2012). Schultz *et al*. har foreslått at den antimikrobielle aktiviteten til florotanniner kommer av deres interaksjon med bakterienes enzymer og proteiner (Schultz *et al.*, 1992).

Seks HPLC-fraksjoner av Båetang viste antimikrobiell aktivitet mot *L. anguillarum*. Ved LC-MS analyse av disse fraksjonene ble det funnet en karakteristiske MS-spekter for en rekke florotanniner. I en av fraksjonene, Fd10-fr33, ble det funnet flere floretholer med 5-9 floroglucinol ringer (m/z-verdier; 623, 746, 870, 995, 1119, 1243), og en rekke nye ukjente florotanniner med samme antall floroglucinol ringer, som serien ovenfor, med sannsynligvis ekstra hydroxylgrupper på floroglucinol-enhetene (m/z-verdier: 684, 808, 932, 1056, 1181). Tabell 13 viser forslag på antall floroglucinol-ringer og kjemiskformel til floretholene. Fd1-fr32 viste lignende MS-spekter som Fd10-fr33.

Tabell 13. m/z-verdier (tilsvarer $[M+H]^{+1}$), antall floroglucinol ringer og kjemiskformel.

m/z-verdi	Floroglucinol ringer	Kjemiskformel	mw
623	4	$C_{30}H_{22}O_{15}$	622,5
747	5	$C_{36}H_{26}O_{18}$	746,6
871	6	$C_{42}H_{30}O_{21}$	870,7
995	7	$C_{48}H_{34}O_{24}$	994,8
1119	8	$C_{54}H_{38}O_{27}$	1118,9
1243	9	$C_{60}H_{42}O_{30}$	1242,9

I en annen fraksjon, Fd10-fr35, var det en klar topp med m/z-verdi 496. Dette er muligens en floroechol med kjemiskformel $C_{24}H_{16}O_{12}$, og kan være 7-Floroeckol eller 2-Floroeckol. 7-Floroeckol er rapportert å ha antimikrobiell aktivitet mot blant annet; MRSA, *S. aureus* og *E. coli* (Eom *et al.*, 2012). Dette er mest sannsynlig et floroechol med kjemiskformel $C_{24}H_{16}O_{12}$ (Beltrán-Lugo *et al.*, 2006). Dette kan være 7- Floroeckol eller 2-Floroeckol, molekylær struktur vist i figur 30.



Figur 30. Molekylær struktur av 7- Floroeckol (venstre) og 2-Floroeckol (høyre) (Plant-expert, 2013; Wikipedia, 2013a)

MS-spekteret til Fd10-fr34 viste to ansamlinger med m/z-verdier som hadde Δ18 mellom hver topp. Første ansamling hadde m/z-verdiene; 225, 243 og 261. Den andre ansamlingen hadde m/z-verdiene; 467, 485, 503 og 521. Det er uvist hvilke stoffer det her dreier seg om . Høyoppløselig MS-analyser vil kunne frembringe forslag på elementsammensetning av isse og identifiere deres natur.

4.3.2 Lavmolekylære forbindelser

De lavmolekylære stoffene som detekteres i Pp10-fr22,31,33 absorberer alle lys ved bølgelengder fra 320-350 nm. Stoffene kan derfor være beslektet med UV-absorberende stoffer som for eksempel Mycosporin-lignende aminosyrer, som er funnet i en rekke marine organismer, inkludert alger (Carreto & Carignan, 2011). Det er imidlertid ikke funnet data i litteraturen (molekylvekt og UV-absorbans-maksima) som tilsvarer de som er funnet i dette studiet. Stoffene synes derfor å være ukjente.

De lavmolykelære stoffene som detekteres i Tarmgrønske fraksjonene har en molekylvekt på under 200Da. I fraksjon 36 er det to topper som muligens lar seg identifisere; m/z 120 er mest sannsynlig aminosyren Threonin, og m/z 166 kan være anatoksin-a (mw165). I Ei10-fr40 er det en topp på MS-kromatorgram med m/z-verdi 180 som kan være homo-anatoksin-a (mw 179). Anatoksin- a og homo-anatoksin-a er nevrotoksiner produsert a cyanobakterier, men det er blitt rapportert at anatoksin-a har en negativ effekt på homostasen til makroalgen *Ceratophyllum demersum* med å utsette den for oksidativt stress(Faassen *et al.*, 2012; Ha & Pflugmacher, 2013). Om det er Tarmgrønsken som inneholder stoffene, eller om det stammer fra cyanobakterier vet vi ikke. Gitt at det er Tarmgrønske som produserer disse sekundærmetabolittene kan det tenkes at de muligens har antimikrobiell aktivitet, eller at de skilles ut for å redusere konkurranse fra andre makroalger i habitatet.

5. KONKLUSJON

Undersøkelsene i dette studiet viser at det finnes antimikrobielle forbindelser i alle de utvalgte marine makroalgene. Det ble påvist forbindelser med potensiell antimikrobiell aktivitet i alle aktive fraksjonene. I HPLC-fraksjonene til Båetang, ble det karakterisert en rekke florotanniner innenfor i alle fall to av hovedgruppene; floroetholer og eckoler.
I HPLC- fraksjoner fra Søl ble det funnet noe som kan tenkes å være mycopsorin-lignende aminosyrer som synes å være ukjente, da de ikke er beskrevet i litteratur.

HPLC- fraksjoner fra Tarmgrønske ser ut til muligens å inneholde nevrotoksinene anatoksin-a og homo-anatoksin-a.

Det hadde vært interessant å analysert prøvene med High-resolution MS som har en høyere nøyaktighet (+/- 0,00xDa) enn MS (+/- 0,5 Da)brukt i dette studiet. Med HR-MS ville vi kunne fått et mer nøyaktig bilde av hva som befinner seg i fraksjonene.

Antimikrobielltesting av SPE-eluatene viste at de marine bakteriestammene var mer sensitiv enn de terrestriske. Etter antimikrobiell testing av HPLC-fraksjonene kunne man se at også her var det de marine bakteriene som var mest sensitive. Sammenlignet man den antimikrobielle aktiviteten mellom de to gram positive bakteriene *C. glutamicum* (terrestrisk) og C*. mobile* (marin), var det den marine bakteriestammen som var sensitiv ovenfor flest fraksjoner, og for flest marine makroalger. Dette enda bakteriestammene syntes å være like sensitive jfr. Tabell 10.

Flere av makroalgene mistet all antimikrobiell aktivitet etter fraksjonering med RP-HPLC. Dette kan skyldes at konsentrasjonen av den antimikrobielle forbindelsen var blitt for lav, eller at det var et samspill mellom flere stoffer i de grovere fraksjonene fra SPE som nå var blitt skilt fra hverandre slik at synergieffekten forsvant.

6. REFERANSER

Baharum, H., Morita, H., Tomitsuka, A., Lee, F. C., Ng, K. Y., Rahim, R. A.*, et al.* (2011) Molecular Cloning, Modeling, and Site-Directed Mutagenesis of Type III Polyketide Synthase from Sargassum binderi (Phaeophyta). *Marine Biotechnology,* **13**(5): 845-856.

Bassetti, M., Merelli, M., Temperoni, C. & Astilean, A. (2013) New antibiotics for bad bugs: where are we? *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials,* **12**(

Beltrán-Lugo, A. I., Maeda-Martínez, A. N., Pacheco-Aguilar, R. & Nolasco-Soria, H. G. (2006) Seasonal variations in chemical, physical, textural, and microstructural properties of adductor muscles of Pacific lions-paw scallop (*Nodipecten subnodosus*). *Aquaculture,* **258**(1–4): 619-632.

Bhakuni, D., S. & Rawat, D., S. (2005) Bioactive Metabolites of Marine Algae, Fungi and Bacteria. *Bioactive Marine Natural Products.* India: Springer Science+Business Media, Inc.

Blunt, J. W., Copp, B. R., Munro, M. H. G., Northcote, P. T. & Prinsep, M. R. (2003) Marine natural products. *Natural Product Reports,* **20**(1): 1-48.

Blunt, J. W., Copp, B. R., Hu, W. P., Munro, M. H. G., Northcote, P. T. & Prinsep, M. R. (2007) Marine natural products. *Natural Product Reports,* **24**(1): 31-86.

Blunt, J. W., Copp, B. R., Keyzers, R. A., Munro, M. H. G. & Prinsep, M. R. (2013) Marine natural products. *Natural Product Reports,* **30**(2): 237-323.

Burkholder, P. R. & Sharma, G. M. (1969) Antimicrobial agents from the sea. *Lloydia,* **32**(4): 466-83.

Buyske, D. A. (1975) Drugs from nature. *Chemtech,* JUN): 361-369.

Bywood, R. & Challenger, F. (1953) The evolution of dimethyl sulphide by Enteromorpha itestinalis-isolation of dimethyl-beta-carboxyethyl sulphonium chloride from the alga. *Biochemical Journal,* **53**(5): R26-R26.

Cardozo, K. H. M., Guaratini, T., Barros, M. P., Falcao, V. R., Tonon, A. P., Lopes, N. P.*, et al.* (2007) Metabolites from algae with economical impact. *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology,* **146**(1-2): 60-78.

Carreto, J. I. & Carignan, M. O. (2011) Mycosporine-Like Amino Acids: Relevant Secondary Metabolites. Chemical and Ecological Aspects. *Marine Drugs,* **9**(3): 387-446.

Challis, G. L. & Hopwood, D. A. (2003) Synergy and contingency as driving forces for the evolution of multiple secondary metabolite production by Streptomyces species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,* **100**(14555-14561.

Chanda, S., Dave, R., Kaneria, M. & Nagani, K. (2010) "Seaweeds: A novel, untapped source of drugs from sea to combat infectious diseases" *In:* Méndez-Vilas, A. (ed.) *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, **1**. Badajoz, Spain: FORMATEX Research Center. 473-480.

Choi, C. Y., Jo, G. H., Lee, J. I., Seo, Y., Han, T., Choi, I. W.*, et al.* (2009) Alaria esculenta Extract Protects against Oxidative Damage by Inducing Heme Oxygenase-1 Expression via Akt and Nrf2. *Molecular & Cellular Toxicology,* **5**(2): 120-125.

Cragg, G. M. & Newman, D. J. (2001) Natural product drug discovery in the next millennium. *Pharmaceutical Biology,* **39**(8-17.

Cragg, G. M. & Newman, D. J. (2013a) Natural products: A continuing source of novel drug leads. *Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects,* **1830**(6): 3670-3695.

Cragg, G. M. & Newman, D. J. (2013b) Natural products: A continuing source of novel drug leads. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects,* **1830**(6): 3670-3695.

Crews, P. (1977) The Breadth of Monoterpene Synthesis by Marine Red Algae: Potential Difficulties in their Application as Taxonomic Markers. *In:* Faulkner, D., J. & Fenical, W., H. (eds.) *Marine Natural Products Chemestry*, **1**. New York: Plenum Press. 211-223.

Darias, J., Rovirosa, J., San Martin, A., Diaz, A. R., Dorta, E. & Cueto, M. (2001) Furoplocamioids A-C, novel polyhalogenated furanoid monoterpenes from Plocamium cartilagineum. *Journal of Natural Products,* **64**(11): 1383-1387.

Dinana, L. (2005) Dereplication and Partial Identification of Compounds. *In:* Saker, S., D., Latif, Z. & Gray, A., I. (eds.) *Natural products isolation*, **20**. Humana press. 297-321.

Dos Santos, M. D., Guaratini, T., Lopes, J. L. C., Colepicolo, P. & Lopes, N. P. (2005) Plant cell and microalgae culture. *Modern Biotechnology in Medicinal Chemistry and Industry*.

Eom, S. H., Kim, Y. M. & Kim, S. K. (2012) Antimicrobial effect of phlorotannins from marine brown algae. *Food and Chemical Toxicology,* **50**(9): 3251-3255.

Faassen, E. J., Harkema, L., Begeman, L. & Lurling, M. (2012) First report of (homo)anatoxin-a and dog neurotoxicosis after ingestion of benthic cyanobacteria in The Netherlands. *Toxicon,* **60**(3): 378-384.

Faulkner, D. J. (2001) Marine natural products. *Natural Product Reports,* **18**(1): 1-49.

Ferreres, F., Lopes, G., Gil-Izquierdo, A., Andrade, P. B., Sousa, C., Mouga, T. & Valentao, P. (2012) Phlorotannin Extracts from Fucales Characterized by HPLC-DAD-ESI-MSn: Approaches to Hyaluronidase Inhibitory Capacity and Antioxidant Properties. *Marine Drugs,* **10**(12): 2766-2781.

Fuller, R. W., Cardellina, J. H., Kato, Y., Brinen, L. S., Clardy, J., Snader, K. M. & Boyd, M. R. (1992) A Pentahalogenated monoterpene from the red alga *Portieria hornemannii* produces a novel cytotoxicity profile againt a diverse panel of human tumor-cell lines. *Journal of Medicinal Chemistry,* **35**(16): 3007-3011.

Glombitza, K., W. (1970) Antimicrobal constituents in algae. 3. Quantitative determination of acrylic acid in sea algae. *Planta Medica,* **18**(4): 281-&.

Glombitza, K. W. (1979) Antibiotics from algae. Berlin: Walter de Gruyter.

Ha, M. H. & Pflugmacher, S. (2013) Phytotoxic effects of the cyanobacterial neurotoxin anatoxin-a: Morphological, physiological and biochemical responses in aquatic macrophyte, Ceratophyllum demersum. *Toxicon,* **70**(1-8.

Haas, P. (1935) The liberation of methyl sulphide by seaweed. *Biochemical Journal,* **29**(1297-1299.

Haug, T., Kjuul, A. K., Stensvag, K., Sandsdalen, E. & Styrvold, O. B. (2002) Antibacterial activity in four marine crustacean decapods. *Fish & Shellfish Immunology,* **12**(5): 371-385.

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**(2): 112-119.

Haug, T. 07.11.13 2013a. *RE: De første marine legemidlene* Type to Wiik, S., D.

Haug, T. 06.05.2013 2013b. *RE: Introduction to High-perfomance liquid chromatography.* Type to Wiik, S., D.

Haug, T. 2013c. *RE: Introduction to mass spectrometry- with focus on ESI-MS.* Type to Wiik, S. D.

Hellio, C., De La Broise, D., Dufosse, L., Le Gal, Y. & Bourgougnon, N. (2001) Inhibition of marine bacteria by extracts of macroalgae: potential use for environmentally friendly antifouling paints. *Marine Environmental Research,* **52**(3): 231-247.

Holmes, J. (2007) *Desmarestia aculeata (Witch's hair)-Desmarestia viridis (Stringy acid kelp or green acid kelp)* [Online]. Available: http://www.beachwatchers.wsu.edu/ezidweb/seaweeds/Desmarestiaaculeata.htm [Accessed 11.11 2013]. USA: Washington State University Island County Extension

Holtebekk, T., Uggerud, E. & Wibetoe, G. (2013) *Massespektrometer* [Online]. Available: http://snl.no/massespektrometer [Accessed 02.10 2013]. http://snl.no/massespektrometer: SNL.no.

Hornsey, I. S. & Hide, D. (1974) The production of antimicrobial compounds by British marine algae I. Antibiotic-producing marine algae. *British Phycological Journal,* **9**(4): 353-361.

Hornsey, I. S. & Hide, D. (1976a) The production of antimicrobial compounds by British marine algae II. Seasonal variation in production of antibiotics. *British Phycological Journal,* **11**(1): 63-67.

Hornsey, I. S. & Hide, D. (1976b) The production of antimicrobial compounds by British marine algae III. Distribution of antimicrobial activity within the algal thallus. *British Phycological Journal,* **11**(2): 175-181.

Hornsey, I. S. & Hide, D. (1985) The production of antimicrobial compounds by British marine- algae. 4. variation of antimikrobial activity with algal generation. *British Phycological Journal,* **20**(1): 21-25.

Jiao, L., Li, X., Li, T., Jiang, P., Zhang, L., Wu, M. & Zhang, L. (2009) Characterization and anti-tumor activity of alkali-extracted polysaccharide from Enteromorpha intestinalis. *International Immunopharmacology,* **9**(3): 324-329.

Klausen, H. Ø. (2002) Antibacterial activity in four marine seaweed from Northern Norway. Tromsø: Norges fiskerihøgskole, Universitetet i Tromsø.

Knott, M. G., Mkwananzi, H., Arendse, C. E., Hendricks, D. T., Bolton, J. J. & Beukes, D. R. (2005) Plocoralides A-C, polyhalogenated monoterpenes from the marine alga Plocamium corallorhiza. *Phytochemistry,* **66**(10): 1108-1112.

Kubanek, J., Jensen, P. R., Keifer, P. A., Sullards, M. C., Collins, D. O. & Fenical, W. (2003) Seaweed resistance to microbial attack: A targeted chemical defense against marine fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,* **100**(12): 6916-6921.

Lawrence, E. (2008) Hendersons`s Dictionary of Biology. *In:* Lawrence, E. (ed.) *Hendersons`s Dictionary of Biology.* 14 ed. Malaysia: Pearson Education Limited.

Li, Y., Qian, Z. J., Kim, M. M. & Kim, S. K. (2011) Cytotoxic activities of phlorethol and fucophlorethol derivates isolated from Laminariaceae *Ecklonia cava*. *Journal of Food Biochemistry,* **35**(2): 357-369.

Lobban, C. S. & Harrison, P. J. (1994) Seaweed Ecology and Physiology. Cambridge: Cambridge University Press.

Madigan, M., Martinko, J., Dunlap, P. & Clark, D. (2009) Brock Biology of microorganisms. San Fransisco, CA.: Pearson Benjamin Cummings.

Martinez, J. H. I. & Castaneda, H. G. T. (2013) Preparation and chromatographic analysis of phlorotannins. *Journal of chromatographic science,* **51**(8): 825-38.

Mayer, A. M. S., Rodríguez, A. D., Berlinck, R. G. S. & Fusetani, N. (2011) Marine pharmacology in 2007–8: Marine compounds with antibacterial, anticoagulant, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiprotozoal, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the immune and nervous system, and other miscellaneous mechanisms of action. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology,* **153**(2): 191-222.

McCafferty, D. G., Cudic, P., Yu, M. K., Behenna, D. C. & Kruger, R. (1999) Synergy and duality in peptide antibiotic mechanisms. *Current Opinion in Chemical Biology,* **3**(6): 672-680.

Mynderse, J. S. & Faulkner, D. J. (1978) Variations in halogenated monoterpene metabolites of Plocamium- cartilagineum and Plocamium- violaceum. *Phytochemistry,* **17**(2): 237-240.

Nagayama, K., Iwamura, Y., Shibata, T., Hirayama, I. & Nakamura, T. (2002) Bactericidal activity of phlorotannins from the brown alga Ecklonia kurome. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy,* **50**(6): 889-893.

Olesen, P., E., Maretzki, A. & Almodovar, L., R. (1964) An investigation of antimicrobial substances from marine algae. *Botanica Marina,* **6**(224-232.

Osvik, R. D. (2013) Antimikrobielle forbindelser i marine diatomeer (Kiselalger). Tromsø: Universitetet i Tromsø.

Padmakumar, K. & Ayyakkannu, K. (1997) Seasonal variation of antibacterial and antifungal activities of the extracts of marine algae from southern coasts of India. *Botanica Marina,* **40**(6): 507-515.

Plant-expert (2013) *2-Phloroeckol* [Online]. Available: http://plant-expert.com/plant-780.html [Accessed 14.11 2013]. www.plant-expert.com: Plant expert.

Pratt, R., Mautner, H., Gardner, G. M., Sha, Y. H. & Dufrenoy, J. (1951) Report on antibiotic activity og seaweed extracts. *Journal of the American Pharmaceutical Association-Scientific Edition,* **40**(11): 575-579.

Rang, H. P., Dale, M. M., Ritter, J. M., Flower, R. J. & Henderson, G. (2012) Rang and Dale`s Pharmacology. Spain: Elsevier Churchill Livingstone.

Rosell, K. G. & Srivastava, L. M. (1987) Fatty-acids as antimicrobial substances in brown-algae. *Hydrobiologia,* **151**(471-475.

Rueness, J. (1998) Alger i farger. Oslo: Almater Forlag AS.

Samuelsson, G. & Bohlin, L. (2009) Drugs of natural origin. Stockholm, Sweden: Swedish pharmaceutical press.
Sarker, S. D., Latif, Z. & Gray, A. I. (2006) Natural products isolation. Totowa, N.J.: Humana Press.
Schultz, J. C., Hunter, M. D. & Appel, H. M. (1992) Antimicrobial activity of polyphenols mediates plant-herbivore interactions. New York: Plenum Press Div Plenum Publishing Corp.
Seidel, V. (2012) Initial and Bulk Extraction of Natural Products Isolation. *In:* Sarker, S., D. & Nahar, L. (eds.) *Natural products isolation*, Methodes in molecular biology, **864**. Humana Press. 27-41.
Selvin, J. & Lipton, A. P. (2004) Biopotentials of secondary metabolites isolated from marine sponges. *Hydrobiologia,* **513**(1-3): 231-238.
Senthilkumar, K., Manivasagan, P., Venkatesan, J. & Kim, S.-K. (2013) Brown seaweed fucoidan: biological activity and apoptosis, growth signaling mechanism in cancer. *International journal of biological macromolecules,* **60**(366-74.
Sepcic, K. (2000) Bioactive alkylpyridinium compounds from marine sponges. *Journal of Toxicology-Toxin Reviews,* **19**(2): 139-160.
Simor, A. E., Rachlis, A., Louie, L., Goodfellow, J. & Louie, M. (1995) Emergence of penicillin-resistant Streptococcus pneumoniae in southern Ontario, 1993-94. *The Canadian journal of infectious diseases = Journal canadien des maladies infectieuses,* **6**(3): 157-60.
SNL (2005-2007) *Butare* [Online]. Available: http://snl.no/butare [Accessed 10.11 2013]. Oslo: Store Norske Leksikon.
Stecher, P. G. (1968) The Merck index : an encyclopedia of chemicals and drugs. Rahway, N. J.: Merck & Co.
Tadesse, M., Gulliksen, B., Strom, 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**(3): 286-293.
Thanki, M. S. (2010) Isolation and characterization of antibacterial compounds from marine organisms. Tromsø: University of Tromsø.
Tringali, C. (1997) Bioactive metabolites from marine algae: Recent results. *Current Organic Chemistry,* **1**(4): 375-394.
Vairappan, C. S., Suzuki, M., Abe, T. & Masuda, M. (2001) Halogenated metabolites with antibacterial activity from the Okinawan Laurencia species. *Phytochemistry,* **58**(3): 517-523.
Vairappan, C. S., Kawamoto, T., Miwa, H. & Suzuki, M. (2004) Potent antibacterial activity of halogenated compounds against antibiotic-resistant bacteria. *Planta Medica,* **70**(11): 1087-1090.
WHO (2013) *Tuberculosis* [Online]. Available: http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/en/ [Accessed 10.11.2013 2013]. WHO.
Wikipedia (2013a) *7-Phlorethol* [Online]. Available: http://en.wikipedia.org/wiki/File:7-Phlorethol.PNG [Accessed 14.11 2013]. www.wikipedia.org: Wikipedia.
Wikipedia (2013b) *High-performance liquid chromatography* [Online]. Available: http://en.wikipedia.org/wiki/HPLC [Accessed 13.11 2013]. Wikipedia.
Wikipedia (2013c) *Kainic acid* [Online]. Available: http://en.wikipedia.org/wiki/Kainic_acid [Accessed 05.10 2013]. Wikipedia.
Wikipedia (2013d) Mass spectrometry.
Wikipedia (2013e) Phloroglucinol [Online]. Available: http://en.wikipedia.org/wiki/File:Phloroglucinol_structure.png [Accessed 14.11 2013]. wikipedia.
Wisespongpand, P. & Kuniyoshi, M. (2003) Bioactive phloroglucinols from the brown alga Zonaria diesingiana. *Journal of Applied Phycology,* **15**(2-3): 225-228.
Xu, X. L., Song, F. H., Wang, S. J., Li, S., Xiao, F., Zhao, J. L.*, et al.* (2004) Dibenzyl bromophenols with diverse dimerization patterns from the brown alga Leathesia nana. *Journal of Natural Products,* **67**(10): 1661-1666.

Yuan, Y. V., Carrington, M. F. & Walsh, N. A. (2005) Extracts from dulse (Palmaria palmata) are effective antioxidants and inhibitors of cell proliferation in vitro. *Food and Chemical Toxicology,* **43**(7): 1073-1081.

7. APPENDIKS

Appendiks 1.

Sammensetning av ingredienser i Mueller- Hinton agar

Tabell 14. Sammensetning av ingredienser i Mueller-Hinton agar.

Mueller- Hinton agarplater	
Innhold	**Mengde**
MilliQ- vann	1000 ml
Mueller- Hinton Broth	121 g
Agar	20 g

Appendiks 2

Sammensetning av ingredienser i Mueller- Hinton dyrkingsmedium.

Tabell 15. Sammensetning av ingredienser i Mueller- Hinton dyrkingsmedium.

Mueller- Hinton dyrkingsmedium	
Innhold	**Mengde**
MilliQ- vann	1000 ml
Mueller- Hinton Broth	21 g

Appendiks 3

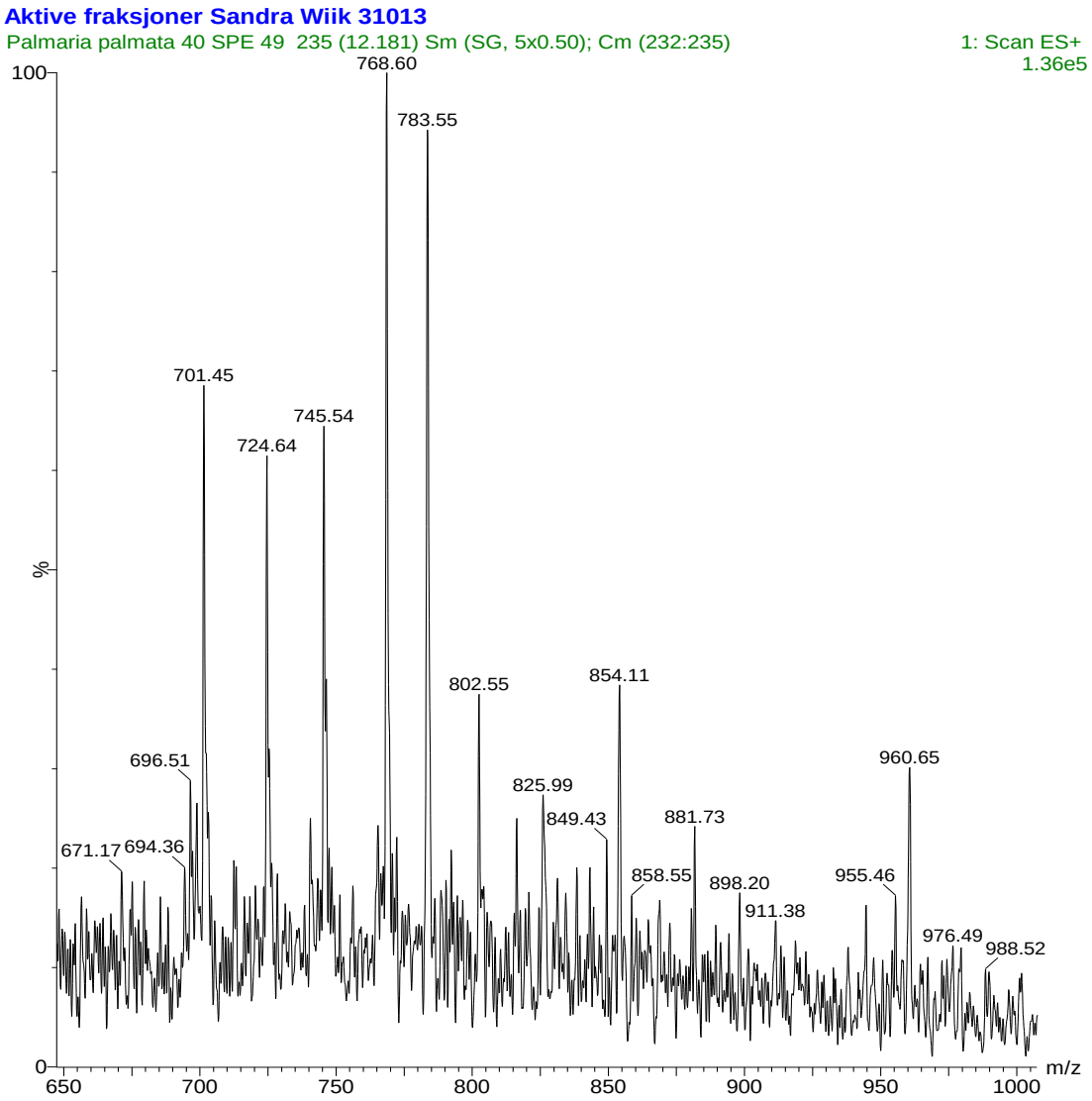
Sammensetningen av ingredienser i TGGA + NaCl dyrkingsmedium.

Tabell 16. Sammensetningen av ingredienser i TGGA + NaCl dyrkingsmedium.

TGGA + NaCl	
Innhold	**Mengde**
Tryptone	5 g
Gjærekstrakst	2,5 g
Glukose	1 g
NaCl	2 %
Agar	20 g
MilliQ- vann	1000 ml

Appendiks 4

MS-kromatogram av Pp40-fr49. Kromatogrammet viser mange tette topper. Fraksjonen var ikke ren nok til å få et klart bilde av hvilke forbindelser som var tilstede.



Figur 31. MS-kromatogrammet til Pp40-fr 49.