



UIT

NORGES  
ARKTISKE  
UNIVERSITET

Norges fiskerihøgskole, Fakultet for biovitenskap, fiskeri og økonomi.

## **Antimikrobielle forbindelser i sjøstjernen *Asterias rubens* og sjøpølsen *Cucumaria frondosa***

**Sebastian Reidar Barriteau Siiri**

*Masteroppgave i Akvamedisin (60 stp)*

*Mai 2019*





## Forord

Denne masteroppgaven i akvamedisin ble utført på Norges fiskerihøgskole (NFH) ved fakultet for biovitenskap, fiskeri og økonomi (BFE), Universitetet i Tromsø, høst 2018 og vår 2019. Hovedveileder har vært førsteamanuensis Tor Haug, med professor Klara Stensvåg, førsteamanuensis Hans- Matti Blencke og overingeniør Aaron John Christian Andersen som biveiledere.

Først og fremst takker jeg Tor for god veiledning før og etter oppgaveskrivingen. Videre ønsker jeg å takke Hans- Matti for veiledning under den antibakterielle aktivitetstesting med maskiner, utstyr og gode råd. Sist men ikke minst ønsker jeg å takke Aaron for å hjelpe meg med bruk og tolkning av data fra HPLC, LC-MS og andre råd og tips til laboratoriearbeidet og til oppgaveskrivingen.

Tromsø, mai 2019

Sebastian Reidar Barriteau Siiri

## Sammendrag

Det er en økende bekymring for at antibiotikaene vi har tilgjengelige i dag ikke vil være effektive mot humane patogener grunnet resistensutvikling. WHO har uttalt at en pre-antibiotika tid der vanlige infeksjoner og mindre skader kan drepe, er en reell virkelighet i det 21. århundre. Havet dekker over 70% av jordoverflaten, og det er estimert at mellom 50 og 80% av alle arter lever i havet. Organismer som lever i havet er konstant utsatt for høye konsentrasjoner av bakterier og virus, slik at organismer som lever der trenger et velfungerende immunsystem. Pigguder er for det meste bentiske organismer, som ikke viser den samme adaptive immunresponsen som vertebrater. De derfor avhengig av å produsere antimikrobielle forbindelser for å forhindre angrep fra patogener, og er derfor et interessant mål for å finne nye antitiotika.

Individer fra sjøpølsen *Cucumaria frondosa* og sjøstjernen *A. rubens* ble delt opp i utvalgte organer/vev som ble frysetørket. Frysetørket materiale ble videre ekstrahert med 60% acetonitril + 2% FA (maursyre), og videre ekstrahert med fast fase ekstraksjon (SPE) på en C<sub>18</sub> kolonne. Disse SPE-eluatene ble testet for antibakteriell aktivitet, og videre fraksjonert med revers fase høytrykks-væskekromatografi (RP- HPLC) på en Pentafluoro-Phenyl (PFP) kolonne. De mest aktive fraksjonene ble nærmere undersøkt med væskektromatografi elektropray ionsering massespektrometri(LC-MS). LC-MS/MS ble så brukt for å se på mulige fragmenteringer av forbindelser og Ultrafiolett- synlig (UV-Vis) spekter ble også undersøkt.

Forbindelsene ble testet mot bakteriestammer av *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* og *Corynebacterium glutamicum*. Det ble funnet aktivitet i flere av SPE-eluatene fra begge artene, særlig i 10 og 40% SPE-eluatene. Videre fraksjonering av de aktive SPE-eluatene ga flere fraksjoner som viste antibakteriell aktivitet. Det ble påvist Flavin Mononukleotid (FMN) i én av fraksjonene, og mulig andre forbindelser i andre fraksjoner.

## Summary

There is a growing concern that the antibiotics we have available today will not be effective against human pathogens due to resistance development. WHO has stated that a pre-antibiotic period in which common infections and minor injuries can kill is a real reality in the 21st century. The sea covers over 70% of the planet's surface, and it is estimated that between 50 and 80% of all species are found in the ocean. Organisms living in the ocean are constantly exposed to high concentrations of bacteria and viruses, so that organisms living there need a well-functioning immune system. Echinoderms are mostly benthic organisms that do not show the same adaptive immune response as vertebrates. They therefore rely on producing antimicrobial compounds to prevent the onset of pathogens and are therefore an interesting target for finding new antibiotics.

Individuals from the sea cucumber *Cucumaria frondosa* and Starfish *A. rubens* were divided into selected organs / tissues which were freeze-dried. Freeze-dried material was further extracted with 60% acetonitrile + 2% FA (formic acid), and further extracted with solid phase extraction (SPE) on a C18 column. These SPE eluates were tested for antibacterial activity and further fractionated by reverse phase high pressure liquid chromatography (RP-HPLC) on a Pentafluoro-Phenyl (PFP) column. The most active fractions were investigated more closely by liquid chromatography electrospraying mass spectrometry (LC-MS). LC-MS/MS was then used to look at possible fragmentations of compounds and ultraviolet-visible (UV-Vis) spectra were also investigated.

The compounds were tested against bacterial strains of *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* and *Corynebacterium glutamicum*. Activity was found in several of the SPE eluates of both species, particularly in the 10 and 40% SPE eluates from the intestine. Further fractionation of the active SPE eluates gave several fractions showing antibacterial activity. Flavin Mononucleotide (FMN) was detected in one of the fractions and possibly other isolated compounds in other fractions.

## Innholdsfortegnelse

Forord .....	i
Sammendrag.....	ii
Summary .....	iii
Forkortelser .....	vi
1 Bakgrunn.....	1
1.1 Naturen som kilde til ny antibiotika .....	2
1.2 Pigghuder (Rekke Echinodermata).....	3
1.2.1 Sjøpølser (Klasse Holothurioidea) .....	4
1.2.2 Sjøstjerner (Klasse Asteroidea) .....	6
1.3 Antimikrobielle stoffer i pigghuder .....	7
1.3.1 Antimikrobielle forbindelser funnet i sjøpølser.....	8
1.3.2 Antimikrobielle forbindelser i sjøstjerne.....	8
1.4 Metodikk i marin bioprospektering .....	9
1.4.1 Kromatografiske separasjonsmetoder .....	9
1.4.2 Ekstrahering, oppdeling og pre-fraksjonering .....	9
1.4.3 Fast-fase ekstraksjon (SPE) .....	9
1.4.4 HPLC (High-performance liquid chromatography).....	10
1.4.5 Ultrafiolett-synlig (UV-vis) spektroskopi .....	10
1.4.6 Massespektrometri (MS) .....	10
1.4.7 Biaktivitetstesting.....	11
1.5 Mål for oppgaven.....	11
2 Materiale og metode .....	12
2.1 Metodeforløp .....	12
2.2 Ekstraksjon av forbindelser .....	13
2.2.1 Væske/væske-ekstraksjon.....	13
2.2.2 Fase-fase ekstraksjon (SPE) .....	13
2.3 Bioaktivitetstesting .....	14
2.3.1 Dyrking av bakterier .....	14
2.3.2 Testing for antibakteriell aktivitet.....	15
2.4 Separasjon og karakterisering av forbindelser .....	15
2.4.1 RP-HPLC.....	15
2.4.2 Massespektrometri .....	16
3 Resultater .....	16
3.1 Utbytte etter ekstraksjon av biologisk materiale .....	16

3.2 Antibakteriell aktivitet .....	21
3.2.1 Antibakteriell aktivitet i SPE- eluater av vannfase fra <i>A. rubens</i> og <i>C. frondosa</i> . .	21
3.2.2 Antibakteriell aktivitet i SPE- eluater av organisk fase fra <i>A. rubens</i> og <i>C. frondosa</i> . .....	22
3.3 Separasjon og karakterisering av aktive forbindelser .....	23
3.4 RP-HPLC av <i>A. rubens</i> vannfase innvoller 10% .....	23
3.5 RP-HPLC av <i>A. rubens</i> vannfase innvoller 40% .....	29
3.6 RP-HPLC av <i>C. frondosa</i> vannfase innvoller 10% .....	29
3.7 RP-HPLC av <i>C. frondosa</i> vannfase innvoller 40% .....	30
3.8 RP-HPLC av <i>C. frondosa</i> organisk fase innvoller 40% .....	38
4 Diskusjon .....	39
4.1 Tørrstoffmengde og utbytte .....	39
4.2 Antibakteriell aktivitet i SPE- eluater fra <i>A. rubens</i> og <i>C. frondosa</i> .....	40
4.3 Separasjon og karakterisering av aktive forbindelser .....	40
4.3.1 <i>A. rubens</i> vannfase innvoller 10% SPE-eluat .....	41
4.3.2 <i>A. rubens</i> vannfase innvoller 40% SPE-eluat .....	43
4.3.3 <i>C. frondosa</i> vannfase innvoller 10% SPE-eluat .....	43
4.3.4 <i>C. frondosa</i> vannfase innvoller 40% SPE-eluat .....	44
4.3.5 <i>C. frondosa</i> organisk fase innvoller 40% .....	45
5 Videre arbeid .....	45
6 Konklusjon .....	46
7 Referanser .....	47

## Forkortelser

<b>ACN</b>	Acetonitril
<b>AMP</b>	Antimicrobial peptides (Antimikrobielle peptider)
<b>DAD</b>	Diode array detector
<b>FA</b>	Formic acid (Maursyre)
<b>HPLC</b>	High performance liquid chromatography (Høytrykks- væskechromatografi)
<b>LC-ESI MS</b>	Liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry (Væskechromatografi elektro spray ionisering massespektrometri)
<b>M/Z</b>	Mass-to-charge (masse-til-ladning)
<b>MH</b>	Mueller Hinton
<b>MIC</b>	Minimal inhibition concentration (minste inhiberende konsentrasjon)
<b>MS</b>	Mass spectrometry (massespektrometri)
<b>OD</b>	Optical density (optisk tetthet)
<b>Q-TOF</b>	Quadrupole time-of-flight
<b>RP-HPLC</b>	Reversed-phase high performance liquid chromatography (revers- fase høytrykks- væskechromatografi)
<b>SPE</b>	Solid phase extraction (fase-fase ekstraksjon)
<b>UV-Vis</b>	Ultraviolet- visible (Ultrafiolett-synlig)
<b>PFP</b>	Pentafluoro-Phenyl
<b>FMN</b>	Flavin Mononukleotid

# 1 Bakgrunn

Før oppdagelsen av penicillin i 1928 av Sir Alexander Fleming, førte infeksjonssykdommer til høy dødelighet over hele verden (Adedeji, 2016). Det ble syntetisert i 1942, og ble tilgjengelig over hele verden etter andre verdenskrig. Det markerte begynnelsen på en periode som kalles for antibiotikaenes gullalder - fordi de fleste klasser vi har av antibiotika i dag ble oppdaget og produsert da. Denne perioden varte fra 1950-1970 (Adedeji, 2016).

Antibiotika er en samlebetegnelse for naturlige eller semi-syntetiske forbindelser fra mikrober som enten hemmer veksten eller dreper bakterier.. Antibiotika blir derfor brukt til å forebygge og behandle bakterielle infeksjoner i mennesker og dyr. Ulike antibiotika har ulike virkningsmekanismer, men de fleste virker ved å inhibere syntese av cellevegg eller proteiner. Det finnes også antibiotika, kalt quinoloner, som påvirker DNA-syntesen og som fører til celledød (Aldred et al., 2014).

I USA gikk ikke-smittsomme sykdommer forbi smittsomme-sykdommer som den ledende dødsårsaken. Infeksiøse sykdommer ble hovedsakelig et problem for eldre og personer som gikk på immundepende medikamenter, som for eksempel kreftpasienter og personer med transplanterte organer (Adedeji, 2016). Overforbruk av antibiotika har ført til at hvert år dør drøyt 33 000 personer i EU grunnet infeksjoner fra resistente bakterier (Cassini et al., 2019).

WHO lanserte i oktober 2015 et overvåkningsprogram for antimikrobiell resistens (GLASS), da økende antimikrobiell resistens (AMR) utgjør en fare for folkehelsen. Analyser av 500 000 bakterieisolater fra 22 land viser at det er *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, og *Salmonella* spp som er de mest rapporterte bakteriene som er resistente (Cidrap). WHO har uttalt at en pre-antibiotika tid der vanlige infeksjoner og mindre skader kan drepe, er en reell virkelighet i det 21. århundre.



## 1.1 Naturen som kilde til ny antibiotika

Mennesker har benyttet seg av naturstoffer med legende egenskaper i lang tid, og er utnyttelsen av naturstoffer er datert helt tilbake fra 2600 f.kr (Newman et al., 2000). Stoffer som produseres naturlig av mikroorganismer, planter og dyr kalles for naturstoffer. Disse produseres av levende celler, og har både kjente og ukjente funksjoner. De deltar også i produksjonen av primære og sekundære metabolitter.

Primære metabolitter brukes i grunnleggende biokjemiske prosesser i en organisme. Disse skiller seg ikke veldig fra organisme til organisme. Dette er i motsetning til de fleste sekundære metabolittene der funksjonen enda ikke er helt kartlagt, men er ikke strengt nødvendig for overlevelsen til organismen (Leal et al., 2012). Med naturstoffer refereres det gjerne til de sekundære metabolittene, som kan være begrenset til en gruppe organismer, eller en enkelt art.

Et naturstoff kan være et godt utgangspunkt for å produsere nye legemidler, men det kan være utfordrende av flere ulike grunner. Naturstoffer kan være vanskelig å jobbe med hvis de er kjemisk ustabile og/eller lite løselig. De kan ha liten eller stor molekylvekt, med komplekse strukturer, som ofte gjør dem vanskelig og dyre å syntetisere. Rent farmakologisk vil store molekyler kunne absorberes dårlig fra tarmen, som kan gi problemer hvis legemidlet skal gis oralt.

Bioprospektering innebærer å samle og undersøke biologisk materiale med et mål om å finne et bioaktivt stoff som kan utnyttes og kommersialiseres. Marin bioprospektering fokuserer derfor på å lete etter naturstoffer i det marine miljø.

Det marine miljø har vist seg å være en rik kilde til nye naturstoffer. Over 70% av jordas overflate er dekket av hav, og viser stor variasjon i miljø og biologisk diversitet. Det er estimert at mellom 50 og 80% av alle livsformer bare eksisterer i havet (Falanga et al., 2016). I én mL sjøvann er det mellom  $10^6$  bakterier og  $10^9$  virus, der flere av disse er patogene (Xue et al., 2015). Det gjør at organismer som lever i det marine miljø i tillegg er avhengig av et godt immunforsvar, og derfor et potensial for nye antimikrobielle stoffer.

Å isolere og kommersialisere nye stoffer fra det marine miljø møter på flere av de samme utfordringene som isolering av naturstoffer. Utgangspunktet er å samle de ønskede organismene, og flere marine organismer kan være vanskelig å identifisere. Feil innsamling

av materiale kan føre til feil antagelse om den kjemiske sammensetningen, som vil gi problemer senere ved ny innsamling av materiale, og den kjemiske sammensetningen endrer seg.

Da det kan være lave konsentrasjoner av det ønskede stoffet, vil det være et behov for å samle inn mye materiale for å kunne identifisere og isolere de ønskede stoffene. Sammen med at biomassen av enkelte arter er lav, kan det ta lang tid og mye innsamling av materiale.

Abiotiske faktorer som lys, temperatur, salinitet og trykk påvirker direkte hvorvidt en organisme kan overleve i et miljø. Som en konsekvens av dette vil distribusjonen av ulike organismer være avhengig av hvor godt det tilpasser seg miljøet de er i, og indirekte antall

Dolastatin 10, et anti-cancer peptid ble isolert fra sjøharen *Dolabella auricularia* etter nesten 15 år og det er estimert at det er rundt 1 mg / 100 kg (Pettit et al., 1987). Det ble senere bestemt at det ble produsert av cyanobakterier som inngår i dietten (Luesch et al., 2001) Det har ført til at flere forbindelser som er isolert fra makroorganismer som svamp, var metabolske produkter fra mikrober assosiert med dem (Piel, 2009).

## 1.2 Pigghuder (Rekke Echinodermata)

Pigghuder er en rekke (fylum) med utelukkende marine dyr som deles inn i 3 underrekker og 5 klasser. Underrekke Crinozoa (sjøliljer), Asterozoa (sjøstjerner og slangestjerne), og Echinozoa (kråkeboller og sjøpølser).

Pigghuder har en femtallsymmetri (både indre og ytre organ) med et skjelett av kalkplater, og mangler leddeling og hode. Pigghuder har et unikt vannkanalsystem (ambulakralsystem) med sugeføttene (ambulakralføtter) som reguleres hydraulisk. Væsken i systemet sørger for bevegelse, transporterer næring/avfallsstoffer, og inneholder coelomocytter (Moen, 2008).

Da pigghuder er hovedsakelig bentiske, er de eksponert for relativt høye konsentrasjoner av bakterier, virus og sopp. Det gjør at disse organismene må ha en effektiv immunrespons for å overleve.

Pigghuder viser samme immunrespons som de fleste multicellulære organismer. De kan gjenkjenne hva som er seg selv, og hva som ikke er det som f.eks. fremmedlegemer som mikroorganismer og/eller patogener. Immunresponsen styres av cellulære og humorale responser med flere homologe og analoge komponenter funnet i vertebrater og andre invertebrater.

Den humorale responsen kommer fra flere ulike forbindelser som inkluderer:

- 1) Lektiner som er proteiner som gjenkjenner spesifikke karbohydrater på celleoverflaten til egne og fremmede celler. Det er identifisert lektiner fra blodævsken i flere pigghuder, og lektiner med spesifikke gjenkjenningsmekanismer er identifisert i sjøpølser og sjøstjerner (Ramírez-Gómez and García-Arrarás, 2010).
- 2) Lipider/ proteiner i form av hemolysiner som interagerer med plasmamembranen til patogener, som danner et hull i membranen. Dette fører til lysis av cellen og dermed celledød (Canicatti, 1991). Det er identifisert hemolysiner i sjøstjerne og sjøpølser (Leonard et al., 1990).
- 3) Agglutiner; Fører til agglutinerings av celler, innkapsler og klotting av fremmedlegemer (Canicatti et al., 1992). Agglutiner er funnet i sjøstjerner og sjøpølser.
- 4) Cytokiner: Har flere ulike roller i immunresponsen til pigghuder. Det er identifisert flere homologe cytokiner i pigghuder (Kerlin et al., 1994).
- 5) Komplementsystemet: Et system av proteiner som bidrar i å fjerne patogener. Det er spekulert at det eksisterer et komplementsystem i pigghuder, men er ikke konkludert (Mogilenko et al., 2010).

Den cellulære aktiviteten kommer fra coelomyttene som styrer den cellulære responsen (Ramírez-Gómez and García-Arrarás, 2010). Coelomytter er en rikholdig og heterogen gruppe «blodceller» med tanke på størrelse, morfologi, funksjon og utbredelse, som gjør det vanskelig å standardisere dem. Det er antatt at det er coelomyttene som hovedsakelig styrer immunfunksjonene i tillegg til antibakteriell aktivitet (Li et al., 2015)

### 1.2.1 Sjøpølser (Klasse Holothurioidea)

Består av 1716 arter, med den største biodiversiteten i stillehavsområdet i Asia. De har lenge blitt brukt som mat og i tradisjonell medisin i asiatiske land. De har potensiale som en kilde til funksjonelle naturstoffer som triterpene glykosider, karotenoider, peptider, vitaminer for å nevne noen. (Pangestuti and Arifin, 2018).

Sjøpølser er karakterisert ved mangelen av armer, og den pølselignende kroppsfasongen. De har den samme femkantet symmetri, men er ikke like synlig som i f.eks. sjøstjerner.

Kalkskelettet er redusert til mikroskopiske kalklegemer som ligger spredt i huden. Sjøpølser er derfor bløtere enn andre pigghuder.

Sjøpølser har en munnåpning på den ene enden av dyret, og har ofte fangarmer. Inne i sjøpølsen er det «vannlunger», forgreinte hule organer som går ut i endetarmen, som tar opp/skiller ut vann og bidrar til gassutveksling (Moen, 2008).

Sjøpølser har et hulrom (coelom) mellom tarm og kroppsvegg, som er fylt med væske. I væsken er det coelomocytter, som er nesten tilsvarende hvite blodceller hos mennesker, og står for den cellulære immuniteten til sjøpølsen. Den humorale immuniteten er basert på sekresjon av ulike immunfaktorer fra coelomocytene inne i den væskefylte kroppshulen (Xue et al., 2015).

### **Brunpølse (*Cucumaria frondosa*)**

Brunpølse (*Cucumaria frondosa*), tilhører orden Dendrochirotida, familie cucumariidae, genus cucumaria. Den har en nordlig utbredelse og er registrert langs hele norskekysten. Den opptrer også sporadisk fra Portugals kyst nord til nordlige deler av De britiske øyer. Den lever på strømeksponerte hardbunnslokaliteter der den fester seg til underlaget med tentaklene sine. Lever fra fjæresonen ned til rundt 200m.

Det er en stor, bløt læraktig sjøpølse som er dekket av kalkplater. Den er nesten svart, med forgreinede, buskaktige fangarmer. Fangarmene er i munnåpningen, og brukes til å skaffe næring fra organisk materiale som flyter forbi. Brunpølse kan bli opp til 50cm i utstrakt tilstand, men kan det har blitt observert at størrelsen har sammenheng med hvilken bunn den lever på (So et al., 2010)



**Figur 1.** *Cucumaria frondosa*. Fotograf: ©Piction B.E



### 1.2.2 Sjøstjerner (Klasse Asteroidea)

Består av rundt 2000 arter, og lever utelukkende i havet, der de oppholder seg for det meste på havbunnen. Sjøstjerner produserer flere ulike sekundære metabolitter som inkluderer lipider, derivater av kolesterol, saponiner etc.

Sjøstjerne lever bare i havet, der de oppholder seg vanligvis på bunnet. De er dekket av et hudlag, med de ytre organene som pigger, gripetenger, åndeblærer og sugeskåler. Skjelettet består for det meste av kalsiumkarbonat. Fordøyelsessystemet til sjøstjerne består av en munn på undersiden, som er koblet til et spiserør og en magesett. Endetarmen til sjøstjerne ligger på oversiden.

I tillegg til å brukes til bevegelse, brukes også sugeføttene til gassutveksling. Hver sugefot er koblet til et vannkanalsystem, som fyller dem med væske. Vannkanalsystemet sine oppgaver er å sørge for bevegelse, transportere nærings- og avfallsstoffer, og gassutveksling. I coelomet til sjøstjerner er det ulike typer coelomocytter, som står for ekskresjon, regenerering av kroppsdeler og sårheling. (Holm et al., 2010)

#### **Vanlig korstroll (*Asterias rubens*)**

Har utbredelse langs hele norskekysten, der den lever på flere bunntyper, fra tidevannssonen ned til 200m. Den lever også i østlige Atlanteren fra Senegal til Kvitsjøen. Den har en middels stor sentralskrive med fem armer og kan være fra oransj/gulbrun, men også mørkegrønne/svarte individer er observert. Kan bli opp til 30cm i diameter som er avhengig av næringstilgangen (Moen, 2008).



**Figur 2** *Asterias rubens*. Fotograf: David Fenwick.

### 1.3 Antimikrobielle stoffer i pigghuder

Mer enn 200 naturprodukter med opphav fra pigghuder ble oppdaget i perioden 2009-2013 (Gomes et al., 2014). Av naturstoffer med biologisk aktivitet funnet i pigghuder finner vi: steroid glykosider, saponiner, peptider, karotenoider, quinoner, spinokromer, pigmenter og alkene sulfater. (Gomes et al., 2014)

#### **Marine saponiner**

Er en metabolitt karakteristisk for sjøpølser og sjøstjerne, men er også blitt identifisert i svamper, koraller og fisk. Egenskapene til disse saponinene har vist å ha bemerkelsesverdige og farmakologisk aktivitet, herunder; antisopp, anti-tumor, anti-inflammatorisk og antibakteriell aktivitet (Andersson et al., 1989), (Zhao et al., 2018).

De fleste marine saponiner kan kategorisert i tre hovedstrukturer, asterosaponiner, polyhydroxysteroid glykosider og holostane glykosider

#### **Antimikrobielle peptider (AMPer)**

Antimikrobielle peptider (AMPer) er viktige forbindelser i invertebrater som pigghuder, da invertebrater mangler den adaptive immunresponsen til vertebrater. Det er beskrevet over 3000 AMPer fra 6 ulike riker (<http://aps.unmc.edu/AP/main.php>) AMPer består av under 100 aminosyrer, og er ofte kationiske. De er i tillegg nesten alltid amfipatiske, som lar dem løse seg i vann, og feste seg til lipofile lag i cellemembraner til bakterier.

Den antimikrobielle aktiviteten til AMPer kommer av en elektrostatisk tiltrekning mellom anioniske molekyler på celleoverflaten, og kationiske aminosyredelene i AMPer. LPS på den ytre delen av cellemembranen til Gram-negative bakterier, og lipoteikoinisyre i celleveggen til Gram-positive bakterier. De endrer derfor membranstrukturen, som fører til f.eks. endring i krumming og fortynning av membranen. Det foregår viktig biosyntese og celledeling, og forstyrrelser i membranen kan derfor ha konsekvens for bakteriecellene som resulterer i celledød. (Haney et al., 2017). Virkningsmekanismen til AMPer er som regel rettet mot cellemembranen til bakterier, men noen AMPer kan også virke intracellulært, på nukleinsyrer og enzymer (Li et al., 2015).

### 1.3.1 Antimikrobielle forbindelser funnet i sjøpølser

#### **Marine saponiner i sjøpølser (Holothuroid)**

Marine Saponiner er sekundære metabolitter, som hos sjøpølser viser en unik kjemisk struktur sammenlignet med terrestriske saponiner. De er triterpende glykosider, som består av en aglykon basert holostane-3 $\beta$ -ol og en karbohydrat kjede. De består av opptil seks sukkermolekyler, inkludert glukose, 3-O-metylglucose, quinovose og xylose. Disse kan enten være sulfatert eller ikke (Caulier et al., 2016). Karbonskjelettet til aglykonet, som består av 30 karbonatomer, og har en molekylær vekt mellom 500 og 1500 Da. I en blanding i vann kan de danne et hvitt skum ved risting (Zhao et al., 2018)

Saponiner fra sjøpølser deles gjerne inn i to ulike typer, holostane og ikke-holostane. Det er basert på ulike plassering av aglykon laktoner, der flesteparten av saponiner fra sjøpølser er i den holostane formen.

Bioaktiviteten stammer fra strukturen, som gir dem amfipatiske/surfakante egenskaper. Det er påvist antibakteriell aktivitet i saponiner fra sjøpølser, og andre som har vist hemolytisk, anti-tumor, anti-inflammatoriske, anti-sopp, anti-viral etc. (Bordbar et al., 2011)

Det er isolert flere ulike antimikrobielle peptider i sjøpølser som viser antimikrobiell aktivitet. I sjøpølseren *C. frondosa* er det blitt indikert tilstedeværelse av AMPer i blodvæsken (Beauregard et al., 2001).

Andre antibakterielle forbindelser funnet er lektiner, som er de viktigste immunmolekylene og det har blitt gjort omfattende undersøkelser av disse. (Xue et al., 2015) og alkene sulfater (La et al., 2012)

### 1.3.2 Antimikrobielle forbindelser i sjøstjerne

I likhet med sjøpølser er det identifisert marine saponiner i sjøstjerner (Asterosaponiner)- De er i motsetning til saponiner i sjøpølser, steroide glykosider med en sulfat-gruppe festet til den aglokylene delen. De har vist antimikrobiell aktivitet, anti-viral (Andersson et al., 1989).

Fra litteraturen er det beskrevet forsøk som viser antibakteriell aktivitet, som proteiner ((Haug et al., 2002), (Kim et al., 2018), (Mogilenko et al., 2010), (Hernroth et al., 2011).

## 1.4 Metodikk i marin bioprospektering

### 1.4.1 Kromatografiske separasjonsmetoder

Kromatografiske separasjonsmetoder separerer som regel stoffer ved bruk av en mobil og en stasjonær fase. Stoffene separeres basert på deres løselighet/affinitet/fordeling i den mobile kontra den stasjonære fasen. Det kan være med bakgrunn i stoffenes ladning, polaritet og/eller isoelektriske punkt. Ved separasjon av naturprodukter er det vanlig å bruke revers-fase væskrokromatografi (RP-LC) og fase-fase ekstraksjon (SPE).

### 1.4.2 Ekstrahering, oppdeling og pre-fraksjonering

Før en kan starte å rense og isolere et naturprodukt, må det ekstraheres fra utgangsmaterialet. Det eksisterer en del ulike ekstraheringsmetoder, og hvilken metode som brukes tar utgangspunktet i opphavet til materialet og de kjemiske egenskapene. Rå ekstraksjoner er ofte komplekse blandinger av ulike syrer, baser, lipofile og amfifile stoffer, der flere av dem ikke passer til farmasøytisk bruk. Dette kan være stoffer som er veldig lipofile som fettsyrer og lipider. Disse vil ikke løse seg særlig i vann, og derfor dårlig egnet.

### 1.4.3 Fast-fase ekstraksjon (SPE)

SPE er en kromatografisk metode som kan brukes for å ekstrahere forbindelser fra en stor bredde av ulike ekstrakter før videre separering på f.eks. HPLC. Den er selektiv og allsidig da det kan benyttes forskjellige absorbanser og elueringsbetingelser for ulike forbindelser. SPE ble utviklet for å oppkonsentrere og rense en prøve før videre analyse. En god SPE-metode defineres av:

- Høy gjenvinning av ønsked(e) forbindelse(r)
- Fører til høy konsentrasjon av ønsked(e) forbindelse(r)
- Reproduserbar med enkel, få steg, kortest mulig ekstraksjonstid med minimal bruk av vask og elueringsvæske.

Den vanligste formen for SPE er en kolonne som stasjonærfase, der ønskede komponenter fester seg til kolonnen, og uønskede vaskes av. Ved å endre elueringsvæsken underveis, kan prøven fraksjoneres, og ekstrahere de ønskede komponentene.

Da metoden fjerner urenheter og fjerner stoffer som ikke er ønskelige (svært polare/ upolare stoffer), brukes den ofte som metode i marin bioprospektering. Marine prøver har ofte salter i seg som kan gi falske positive under aktivitetstesting.



#### 1.4.4 HPLC (High-performance liquid chromatography)

HPLC er en teknikk som brukes for å separere, identifisere og kvantifisere stoffer. Hvilke stoffer som er ønsket kan gå på polaritet, ladning/og eller størrelse. I systemet er det en kolonne fylt med silika- partikler som kan modifiseres for å endre hvilke stoffer som fester seg til kolonnen.

RP-HPLC (reverse phase liquid chromatography) er den vanligste formen for HPLC. Navnet kommer av at den mobile fasen mer polar enn den stasjonære fasen, som gjør at upolare molekyler beveger seg raskere gjennom stasjonærfasen.. Den er lett å bruke, den hydrofobe stasjonærfasen kan bli modifisert med en rekke ulike molekyler og den fungerer bra for de fleste organiske forbindelser som kan blir detektert. En annen fordel er at det gir flere valg for kromatogrammer. Det er en teknikk som ofte brukes på stoffer fra marine organismer.

#### 1.4.5 Ultrafiolett-synlig (UV-vis) spektroskopi

UV-vis spektrofotometrisk detektor er ofte brukt som en detektor for et LC- system da den er lett å bruke og meget sensitiv (Houssen and Jaspars, 2005). Detektoren målet absorpsjonen av ultrafiolett eller synlig lys. Diode array (DAD) detektor er en form for UV-vis detektor som kan kobles til et HPLC system (HPLC-DAD) eller andre LC-MS (LC-MS-DAD) system. Detektoren kan måle absorbansen fra alle bølgelengder mellom 200 og 600 nm, og forbindelser som absorberes i dette området vil kunne detekteres, selv i små mengder. Ved å se på UV- vis spekteret til en forbindelse kan det være mulig å finne si noe om forbindelsen, da enkelte forbindelser har veldig karakteristiske UV- vis spekter.

#### 1.4.6 Massespektrometri (MS)

MS er en veldig sensitiv teknikk som gjør det mulig å identifisere molekylvekten på ukjente komponenter i en prøve. Den kan detektere mikrogram av en forbindelse.

Prøven må være i gass/væskeform for å kunne injiseres, slik at faste stoffer kan ikke brukes. Er prøven i væskeform, vil prøven bli fordampet. Deretter blir den ionisert med en elektropray, som fjerner et elektron og gjør at det dannes et positivt ion. Et sett med negativt ladde plater med et mellomrom mellom dem vil tiltrekke seg de positive ionene, som da går gjennom dem til hovedkammeret i massespektrometriet. Her måles det hvor lang tid det tar for ionene å gå gjennom massespektrometriet. Ionene beveger seg i samme fart, men de

lettere ionene vil bruke kortere tid enn de tyngre. De treffer til slutt en detektor som produserer et elektrisk signal som da blir behandlet og det produseres et kromatogram. Det betyr at komponenter som ikke kan ioniseres heller ikke detekteres.

#### 1.4.7 Biaktivitetstesting

For å vurdere om en forbindelse har aktivitet mot de rettede mikrobenes må de testes. Testene gir en indikasjon på om det er stoffer i et ekstrakt som er verdt å ta med videre. Videre separering, rensing og testing kan vise om en fraksjon videre er aktiv. Ved å gjenta disse stegene kan en til slutt få en fraksjon der det er mulig å identifisere ett eller flere aktive forbindelser. Ved hver testing, rensing og separering er det et tap av stoff/og eller aktivitet, slik at det er viktig å ha nok tilgjengelig materiale gjennom prosessen.

#### 1.5 Mål for oppgaven

Målet med denne oppgaven er å påvise tilstedeværelsen av AMF i sjøstjernen *Asterias rubens* og sjøpølsen *Cucumaria frondosa*, samt å separere og utføre innledende karakteriseringer av de aktive komponentene.

Hypotesen er at disse organismene produserer antibakterielle forbindelser for å beskytte seg mot patogener i miljøet. Da det er to ulike arter, vil de mest sannsynlig inneholde forskjellige typer antimikrobielle forbindelser og ulike aktivitet.

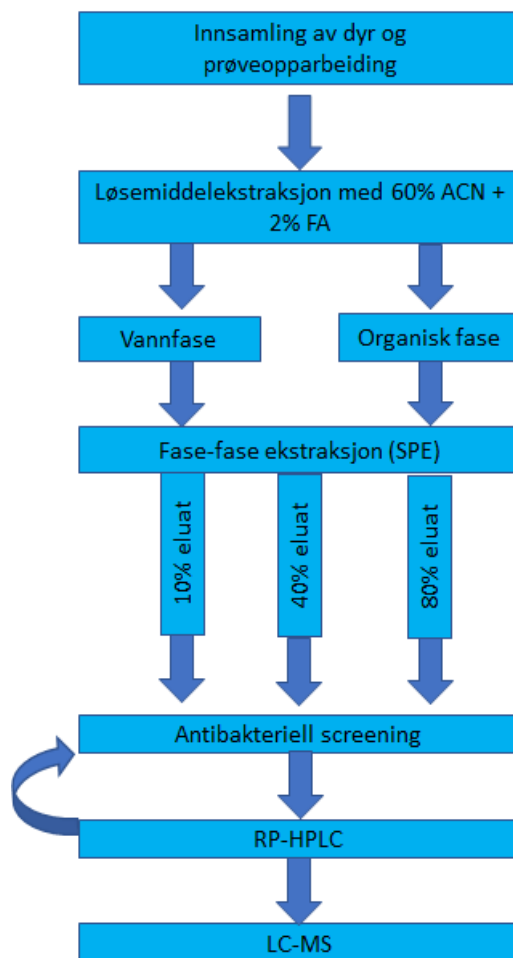
For å teste hypotesen ble følgende delmål formulert:

- 1) Ekstraksjon og grovseparasjon av materiale fra *A. rubens* og *C. frondosa*.
- 2) Screene ekstraktene for antimikrobiell aktivitet.
- 3) Prøve å isolere forbindelser ved bruk av kromatografiske teknikker.
- 4) Karakterisering av de aktive forbindelsene ved bruk av massespektrometri (LC-MS).

## 2 Materiale og metode

### 2.1 Metodeforløp

Metodeforløpet for oppgaven er summert i figur 3. Antibakterielle forbindelser ble ekstrahert fra frysetørket materiale fra *Cucumaria frondosa* og *Asterias rubens*. Aktiviteten til de ulike ekstraktene ble så testet, og de mest aktive ekstraktene ble så videre fraksjonert med HPLC. De mest aktive fraksjonene ble så undersøkt av MS for å få antydning til egenskapene til disse.



**Figur 3** Flytdiagram over metodeforløpet I oppgaven. Nærmere beskrivelse av metodene brukt er omtalt I materiale og metode.

## 2.2 Ekstraksjon av forbindelser

Fem sjøstjerner og ti sjøpølser ble hentet fra tanker med sirkulerende sjøvann. Med en pinsett ble dyrene dissekert, og blodvæske ble tappet av ved å la blodvæsken renne ned i sentrifugerør og lagt på is. Resten av vevet ble separert ut, og oppbevart på is. Blodvæsken ble sentrifugert ved 2000 rpm i 10 minutter på 4 °C, og plasma ble tappet av. De ulike delene ble så frysetørket, og oppbevart på -20 grader-før ekstraksjon.

### 2.2.1 Væske/væske-ekstraksjon

Frysetørket materiale ble malt opp med pestel og morter, og tilsatt et 10x volum (v/w) av ekstraksjonsløsning (60% ACN + 2% FA). Materialet ble så satt til omrøring i 24 timer, supernatant tatt av og oppbevart på 4 °C. Pelleten ble tilsatt samme mengde v/w av samme ekstraksjonsløsning som ved første ekstrahering og satt til omrøring i nye 24 timer. Pellet ble kastet.

Supernatant ble så blandet med supernatanten fra den første ekstraheringen, og satt i fryser i på -80 °C i ca. 2 timer for å få et tydeligere skille mellom vann- og organisk fase. De to fasene ble overført til 50 ml-Nunc rør med pipettering, og tørket med en Scan Speed 40 vakuumsentrifuge utstyrt med en Cooling Trap kjølefelle (Scanvag, Lyngø, Danmark) og en MD 4 membran- vakuumpumpe (Vacuubrand, Wertheim, Tyskland). Mengde tørrstoff ble så bestemt, og tilsatt 1% FA til en konsentrasjon på 100 mg/ ml.

### 2.2.2 Fase-fase ekstraksjon (SPE)

Ble utført med hjelp av en Supelco Visiprep™ SPE Vacuum Manifold (Sigma-Aldrich, Missouri, USA) på vannfasen og den organiske fasen til de ulike ekstraktene. Det ble brukt 10 g Sep-Pak® C<sub>18</sub> kolonner (Waters, Dublin, Irland) som ble først kondisjonert med 30 ml ACN for å deretter ekvilibriert med 30 ml 1% FA. Prøvemateriale ble satt på, og vasket med 50 ml 1% FA. Ikke-retardert materiale og vask ble kastet. Retardert materiale ble så stegvis eluert ut med 30 ml av henholdsvis 10, 40 og 80% ACN tilsatt 1% FA. SPE-ekstraktene ble så overført til 50 ml Falcon-rør og tørket inn vha. vakuumsentrifuge. Frysetørket materiale ble oppbevart på -20 °C fram til antibakteriell testing.



## 2.3 Bioaktivitetstesting

De ulike ekstraktene ble testet mot Gram-negative og Gram-positive bakteriestammer. De Gram-negative bakteriene som ble brukt var *Escherichia coli* (ATCC 25922) og *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853). De gram-positive bakteriene som ble brukt var *Staphylococcus aureus* (ATCC 9144) og *Corynebacterium glutamicum* (ATCC 13032).

### 2.3.1 Dyrking av bakterier

Bakteriene ble hentet fra frysestock som ble oppbevart i 20% glyserol og 80% MH-medium på -80 °C og sådd ut på Mueller Hinton (MH) agarplater og inkubert i 1-2 dager. *E. coli*, *S. aureus* og *P. aeruginosa* ble inkubert ved 37 °C i varmeskap, mens *C. glutamicum* ble inkubert ved romtemperatur. Etterpå ble platene oppbevart på 4 °C i opptil 2 uker.

Fra hver av platene ble en bakteriekoloni overført til et dyrkningsrør med 5 ml MH-medium, og inkubert ved risting ved 1000 rpm over natt ved de samme temperaturene de ble sådd ut på. Et volum på 50 µl bakteriesuspensjon ble overført til et nytt rør med 5 ml MH-medium, og inkubert ved risting i 2 timer. Tettheten (OD) av bakterier ble så målt med et spektrofotometer (BioMate 3, Thermo Spectronic, New York, USA) ved 600 nm. Mengde bakteriesuspensjon som ble overført til 10 ml MH-medium tok utgangspunkt i OD-verdiene i tabell 1.

for å få en bakteriekonsentrasjon som er tilsvarende  $2,5-3,0 \times 10^4$  bakterier per ml.

**Tabell 1.** Forhold mellom  $A_{600}$  og tetthet av bakterier er bestemt ved utplating (koloni formende enheter; CFU), for å gi ca.  $2.5-3.0$  bakterier  $\times 10^4$  ml<sup>-1</sup>.

Tetthet bakteriekultur (OD <sub>600</sub> )	Mengde uttak av kultur til 10 ml MH medium (µl)
0,010 - 0,030	10
0,030 - 0,075	5
0,075 - 0,100	4

### 2.3.2 Testing for antibakteriell aktivitet

Antibakteriell testing ble innledende utført i 384 brønners mikrotitet plater (PerkinElmer, Walham, USA) for SPE-eluatene. Hver brønn ble tilsatt 25 µl prøveløsning og 25 µl bakteriesuspensjon til en konsentrasjon på 1,25-1,5 x 10<sup>4</sup> bakterier / ml i hver brønn. MilliQ H<sub>2</sub>O og MH-medium ble brukt som negative kontroller, og oksytetrasyklin (50 µM), ble brukt som positiv kontroll.

Etter den innledende testingen ble HPLC-fraksjoner testet videre på 96 brønners mikrotiter plater (Thermo Scientific, Roskilde, Danmark). Hver brønn ble da tilsatt 50µl prøveløsning og 50µl bakteriesuspensjon til samme konsentrasjon på 1,25-1,5 x 10<sup>4</sup> bakterier / ml i hver brønn. MilliQ H<sub>2</sub>O og MH-medium ble brukt som negative kontroller, og oksytetrasyklin (50µM), ble brukt som positiv kontroll.

For *E. coli*, *P. aeruginosa* og *S. aureus* ble inkubert ved på 37°C ble de avlest hver halvtime over 24 timer med OD<sub>595</sub> med en Envision 2103 multilabel reader, kontrollert av Wallac Envision manager (PerkinElmer, CT, USA). Prøvene ble automatisk ristet i 10 sekunder ved hver avlesning. For *C. glutamicum* ble inkubert ved romtemperatur og ble avlest hver halvtime over 24 timer med OD<sub>595</sub> med en Synergy H1 Hybrid Reader med programvaren Viability, Gen 5 (BioTek, Vermont, USA). Før avlesning av platene ble de dekket med en pustende forseglingsfilm (DiversifiedBiotech).

## 2.4 Separasjon og karakterisering av forbindelser

### 2.4.1 RP-HPLC

De mest aktive SPE-ekstraktene ble separert ved bruk av Agilent 218 Purification System (Agilent Technologies, California, USA) bestående av en ProStar 410 Autosampler, PrepStar pumpe, 440-LC fraksjonssamler, 1260 Infinity DAD detektor, og databehandlingsprogrammet OPenLAB CDS. En Kinetex F5 Prep PFP (5 µm, 10x250 nm) (Phenomenex, California, USA) kolonne ble brukt. Detektoren registrerte absorbans av lys med bølglengder fra 200-600 nm. De mobile fasene bestod av Milli-Q H<sub>2</sub>O og ACN med begge tilsatt 0,1% FA med en flow på 5 ml/min. Det ble benyttet ulik gradient basert på LC-MS spekter, og antall fraksjoner i tillegg som er beskrevet under figurteksten til HPLC-kromatografene.

## 2.4.2 Massespektrometri

Etter testing ble de mest aktive SPE-ekstraktene og HPLC-fraksjoner analysert med væskektromatografi elektro spray ionisering massespektrometri quadropole time-of-flight (LC-ESI-MS-Q-TOF) som en innledende karakterisering av aktive forbindelser. Det er tilkoblet en DAD detektor, slik at UV-Vis spekteret til forbindelsen detekteres før det går inn i selve systemet (DAD-LC-MS). Systemet er produsert av Agilent Technologies (Agilent Technologies, California, USA) bestående av 1290 Infinity, 6540 UHD Accurate-Mass Q-TOF-LC-MS med en Kinetex® LC kolonne (1,7µm, 150x 2,1 mm) og databehandlingsprogrammet MassHunter. Mobilfasene brukt var LC-MS grad vann (Chromasolv®) og LC-MS grad ACN (Chromasolv®) der begge var tilsatt 0,1% FA. For alle SPE-ekstraktene ble det benyttet et skript med 5-100% ACN over 15 minutter med en flow på 0,3 ml/min med en kolonnetemperatur på 40 °C. Det ble brukt en blank-prøve som inneholdt LC-MS grad vann.

For å kunne utelukke forbindelser fra LC-MS kromatogrammet ble de sammenlignet med fraksjoner som ble eluert ut 1 minutt før eller etter den aktive fraksjonen. Var intensiteten til et ion større i den inaktive enn den aktive, ble den ekskludert. Det ble benyttet ESI + mode for å detektere positive ioner.

## 3 Resultater

### 3.1 Utbytte etter ekstraksjon av biologisk materiale

Frystetørket materiale av ulike utvalgte organer/vev; herunder hud/skinn, innvoller, plasma, slim og coelomocytter) fra sjøpølsen *C. frondosa* ble ekstrahert med 60% ACN tilsatt 2% FA. Tilsvarende ekstraksjon ble utført på utvalgt materiale; herunder hud/skinn, innvoller, gonader, plasma og coelomocytter) fra *A. rubens*.

Etter løsemiddelestraksjon av materialet i 2 x 24 t ble ekstraktene separert i en vannfase og en organisk fase, som ble tørket i en vakuumsentrifuge - før mengde tørrstoff og utbytte fra ekstraksjonen ble beregnet. De ulike ekstraktene ble så videre ekstrahert med SPE (for å fjerne salter og ekstremt fettløselige forbindelser), og eluert fra SPE-kolonnene med henholdsvis 10, 40 og 80% ACN. SPE-eluatene ble tørket og mengde tørrstoff og utbytte fra

SPE ble beregnet. Utbytte og mengde tørrstoff fra utvalgte organ/vev for *A. rubens* og *C. frondosa* er fremstilt i tabell 2.

**Tabell 2. Viser mengde tørrstoff som ble gjenvunnet fra vannfasen og den organisk fase etter løsemiddelekstraksjon av ulike organer/vev fra *A. rubens* og *C. frondosa*.**

Organ/vev	Ekstrakt	<i>Asterias rubens</i>		<i>Cucumaria frondosa</i>	
		Tørrvekt (g)	Utbytte (%)	Tørrvekt (g)	Utbytte (%)
Hud/skinn	Utgangsmateriale	11,71	-	13,50	-
	Vannfase	4,45	38,0	2,94	21,8
	Organisk fase	0,32	2,7	1,27	9,4
Innvoller	Utgangsmateriale	14,98	-	11,43	-
	Vannfase	5,45	36,4	4,82	42,2
	Organisk fase	0,80	5,3	5,36	38,1
Coelomocytter	Utgangsmateriale	13,27	-	14,00	-
	Vannfase	0,32	2,4	0,29	2,1
	Organisk fase	< 0,01	< 0,01	0,24	1,7
Plasma	Utgangsmateriale	5,25	-	14,55	-
	Vannfase	*	*	12,52	86,1
	Organisk fase	0,10	1,9	0,83	5,7
Gonader	Utgangsmateriale	5,32	-		
	Vannfase	1,15	21,6		
	Organisk fase	0,44	8,3		
Slim	Utgangsmateriale			7,91	-
	Vannfase			6,23	78,7
	Organisk fase			0,35	4,3

\* Eluatet av plasma fra vannfasen fra *A. rubens* er ikke med da røret med prøven ble knust før SPE, og er derfor ikke med i tabellen.

Utbyttet fra vannfasen etter løsemiddelekstraksjon var den beste fra alle ekstraktene, der utbyttet varierte fra 2- 38% fra *A. rubens* og 2 – 87% *C. frondosa*. Høyest prosentvist utbytte og mengde tørrstoff kom fra plasma i vannfasen fra *C. frondosa* som tilsvarer et utbytte på



86,1% og 12,52 g med tørrstoff. Det laveste utbyttet kom fra coelomocytterne fra *C. frondosa*, der det var et utbytte på 2,4%, som tilsvarte en tørrvekt på 0,32 g.

Utbyttet fra de organiske fasene var mindre enn fra vannfasen, og utbyttet varierte fra <0,01-9% fra *A. rubens* og 1-39% fra *C. frondosa*. Det høyeste utbyttet var fra innvoller fra *C. frondosa* med et utbytte på 38,1% og størst mengde tørrstoff med 5,36g. Det laveste utbyttet var fra coelomocytterne fra *A. rubens*, der mengde tørrstoff var under 0,01 g.

Tørrstoffet av de ulike ekstraktene fra begge artene ble så videre ekstrahert med SPE, og eluert ut med henholdsvis 10, 40 og 80% ACN. Mengde tørrstoff og utbyttet av SPE for *A. rubens* og *C. frondosa* fra vannfasen er fremstilt i Tabell 3 og for de organiske i tabell 4.

**Tabell 3.** Utbytte og mengde tørrstoff av 10, 40 og 80% eluatene fra vannfasen etter SPE for *A. rubens* og *C. frondosa*.

Organ/vev	SPE- eluat	<i>Asterias rubens</i>		<i>Cucumaria frondosa</i>	
		Tørrvekt (mg)	Utbytte (%)	Tørrvekt (mg)	Utbytte (%)
Hud/skinn	Utgangsmateriale	4450	-	2940	-
	10%	60	1,3	42,40	1,4
	40%	90	2,0	36,60	1,2
	80%	80	1,8	21,90	0,7
Innvoller	Utgangsmateriale	5450	-	4820	-
	10%	228	4,2	103,80	2,2
	40%	268	4,9	128,70	2,7
	80%	58	1,1	50,30	1,0
Coelomocytter	Utgangsmateriale	320	-	290	-
	10%	<1	*	46,42	16,0
	40%	<1	*	21,74	7,5
	80%	<1	*	1,75	0,6
Plasma	Utgangsmateriale			12520	-
	10%			29,40	0,2
	40%			14,50	0,1

	80%			42,20	0,3
Gonader	Utgangsmateriale	1150	-		
	10%	64	5,6		
	40%	111	9,7		
	80%	136	11,8		
Slim	Utgangsmateriale			6227	-
	10%			46,42	0,7
	40%			21,74	0,4
	80%			1,75	0,023

\*Menge stoff var så liten at det ikke lot seg å kvantifisere.

Utbytter fra vannfasen var betydelig redusert sammenlignet med løsemiddelekstraksjonen med ACN. Utbyttet fra SPE-eluatene fra vannfasen fra *A. rubens* varierte fra 1-12%, og for *C. frondosa* 0,02 – 16%. Det høyeste utbyttet var fra 10%- SPE eluatet fra coelomocytterne fra *C. frondosa*, og tilsvarer en tørrvekt på 46,42 mg.

**Tabell 4. Utbytte og mengde tørrstoff av 10, 40 og 80% eluatene fra den organiske fasen etter SPE for *A. rubens* og *C. frondosa*.** Utbytte og mengde tørrstoff av 10, 40 og 80% eluatene fra organiske fasen etter SPE fra *A. rubens*.

Organ/vev	SPE- eluat	<i>Asterias rubens</i>		<i>Cucumaria frondosa</i>	
		Tørrvekt (mg)	Utbytte (%)	Tørrvekt (mg)	Utbytte (%)
Hud/skinn	Utgangsmateriale	320	-	1270	-
	10%	1,65	0,5	9,2	0,7
	40%	13,00	4,1	19,95	1,6
	80%	6,86	2,1	7,79	0,6
Innvoller	Utgangsmateriale	800	-	5360	-
	10%	12,82	1,6	15,41	0,3
	40%	9,62	1,2	86,82	1,6
	80%	10,47	1,3	29,67	5,5
Coelomocytter	Utgangsmateriale	-	-	240	-

	10%	1,37	*	4,53	1,9
	40%	0,85	*	0,93	0,4
	80%	1,17	*	0,39	0,2
Plasma	Utgangsmateriale	100	-	830	-
	10%	0,94	0,9	145,7	17,6
	40%	0,77	0,8	1,63	0,2
	80%	0,4	0,4	0,88	0,1
Gonader	Utgangsmateriale	440	-		
	10%	1,26	0,3		
	40%	7,79	1,8		
	80%	6.86	1,6		
Slim	Utgangsmateriale			350	-
	10%			1,47	0,4
	40%			1,79	0,5
	80%			1,25	0,4

«\*» er at det ikke fikk regnet ut utbytte da utgangsvekten var ukjent.

Utbytter fra den organiske fasen var også betydelig redusert sammenlignet med løsemiddelekstraksjonen med ACN. Utbyttet fra SPE-eluatene fra den organiske fasen fra *A. rubens* varierte fra 0,3-5%, og for *C. frondosa* 0,1 – 18%.

Det høyeste utbyttet var fra 10%- SPE eluatet fra coelomocytterne fra *C. frondosa* på 18%, og tilsvarer en tørrvekt på 145,7 mg.

Utbytter var betydelig redusert i alle SPE-eluatene fra den organiske fasen fra begge artene, som varierte fra 0,1-18,0%. Det høyeste utbyttet var fra 10%- SPE eluatet fra plasma fra *C. frondosa*, og tilsvarer en tørrvekt på 145,7 mg.

### 3.2 Antibakteriell aktivitet

Den minste inhiberende konsentrasjonen (MIC) til SPE-eluatene ble funnet ved å teste eluatene i to-folds fortynningsrekker mot de Gram- negative bakteriene *E. coli* og *P.aeruginosa* og de Gram-positive bakteriene *S.aureus* og *C. glutamicum*. For eluatene fra den organiske fasen ble de kun testet mot *C. glutamicum*. Resultatene av SPE-eluatene fra vannfasen er fremstilt i tabell 5, og tabell 6 fra de organiske fasene.

#### 3.2.1 Antibakteriell aktivitet i SPE- eluater av vannfase fra *A. rubens* og *C. frondosa*.

Det ble registrert aktivitet i alle SPE- eluatene fra den vannløselige fasen fra både *A. rubens* og *C. frondosa*, med unntak av plasma i *C. frondosa* og coelomocytter.

De mest potente SPE eluatene var generelt 10 og 40% eluatene, der det var særlig god aktivitet i eluatene fra innvoller, der 10% eluatet fra vannfasen fra *A.rubens* viste den høyeste aktiviteten med en MIC-verdi på 0,16 mg/ml mot *C. glutamicum*. Eluatene fra 80%-SPE fra vannfasen viste dårlig aktivitet generelt, i motsetning til 80% SPE-eluatene fra den organiske fasen. SPE-eluatene fra gonadene viste den dårligste aktiviteten totalt.

**Tabell 5. Antibakteriell aktivitet i SPE-eluatene fra den vannløselige fasen fra *A. rubens* og *C. frondosa*.** Aktiviteten ble testet i to-folds fortynningsrekker mot de Gram- negative bakteriene *E. coli* og *P. aeruginosa* (*P.aer.*) og de Gram – positive bakteriene *C. glutamicum* (*C.glut.*) og *S. aureus* (*S.aer.*).

Organ/vev	Ekstrakt/ SPE eluat	Antibakteriell aktivitet (MIC)							
		<i>Asterias rubens</i>				<i>Cucumaria frondosa</i>			
		<i>C. glut.</i>	<i>S. aur.</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aer.</i>	<i>C. glut.</i>	<i>S. aur.</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aer.</i>
Hud/skinn	10% SPE	2,5	1,25	5	2,5	1,25	2,5	2,5	2,5
	40% SPE	2,5	5	5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
	80% SPE	5	5	10	2,5	2,5	5	5	2,5
Innvoller	10% SPE	0,31	1,25	2,5	1,25	0,63	1,25	1,25	1,25
	40% SPE	0,16	1,25	2,5	1,25	1,25	2,5	2,5	2,5
	80% SPE	>10	10	10	10	>10	5	10	5
Gonader	10% SPE	2,5	5	5	5				
	40% SPE	>10	>10	>10	>10				

	80% SPE	>10	>10	>10	>10	
--	---------	-----	-----	-----	-----	--

### 3.2.2 Antibakteriell aktivitet i SPE- eluater av organisk fase fra *A. rubens* og *C.froncosa*.

Det ble registrert aktivitet i alle SPE-eluatene fra den organiske fasen av *C. frondosa* og *A. rubens* mot *C. glutamicum med* unntakt av plasma og coelomocytterne i de konsentrasjonene som ble testet. SPE- eluatene fra 40%-SPE fra innvoller var generelt best, der den laveste MIC-verdien på 0,63 mg/ml kom fra 40%-SPE av innvoller fra *C. frondosa*.

**Tabell 6. Antibakteriell aktivitet i SPE-eluatene fra den organiske fasen fra *A. rubens* og *C. frondosa*.** Aktiviteten ble testet i to-folds fortyngningsrekker mot den Gram- positive bakterien *C. glutamicum*.

Organ/vev	SPE-eluat	Antibakteriell aktivitet (MIC)	
		<i>Asterias rubens</i>	<i>Cucumaria frondosa</i>
Hud/skinn	10% SPE	5	>5
	40% SPE	1,25	>5
	80% SPE	2,5	>5
Innvoller	10% SPE	5	1,25
	40% SPE	1,25	0,63
	80% SPE	1,25	>5
Gonader	10% SPE	>5	
	40% SPE	2,5	
	80% SPE	2,5	
Slim	10% SPE		>5
	40% SPE		5
	80% SPE		2,5

Det var 40%- SPE eluater fra *C. frondosa* som viste mest aktivitet av SPE-eluatene mot *C. glutamicum*, og ble derfor tatt med videre for separasjon og karakterisering.

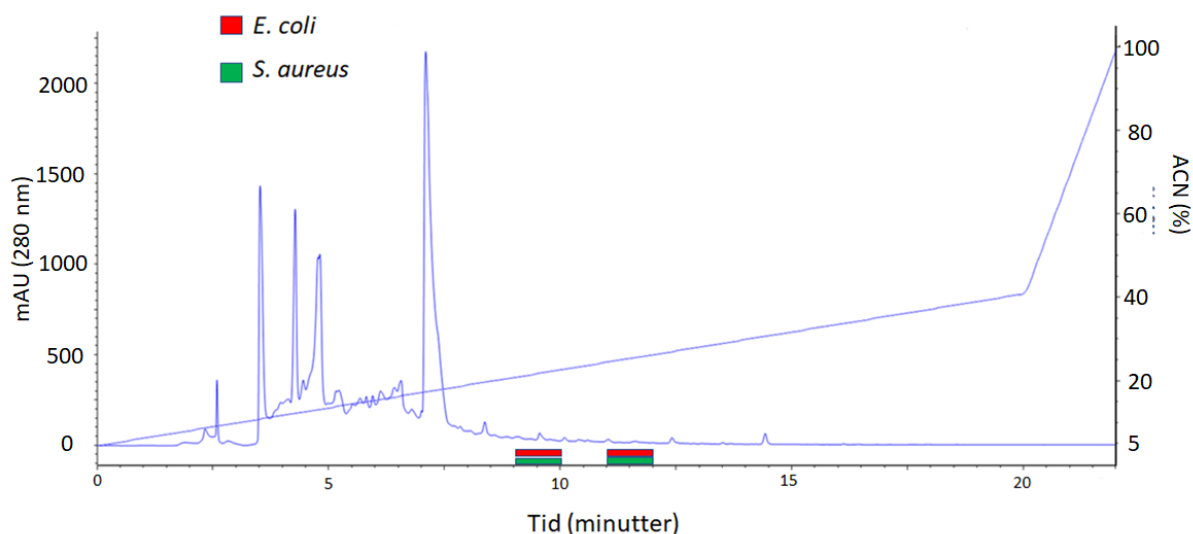
### 3.3 Separasjon og karakterisering av aktive forbindelser

Med utgangspunkt i MIC-verdier ble 10 og 40% SPE-eluatene fra vannfasen av innvoller fra både *A. rubens* og *C. frondosa* 10% valgt ut fra vannfasen. Fra den organiske fasen ble 40% SPE-eluat fra innvoller fra *C. frondosa* valgt ut for å ta med videre testing og karakterisering.

For å prøve å isolere bioaktive forbindelser fra SPE- eluatene først karakterisert på LC-MS før RP-HPLC for å gi en indikasjon på hvilken gradient av ACN og fraksjoneringstid som burde brukes.

### 3.4 RP-HPLC av *A. rubens* vannfase innvoller 10%

SPE-eluatet ble videre fraksjonert på RP-HPLC etter karakterisering på LC-MS. Det ble brukt en lineær gradient med 5-41% ACN over 20 minutter der det ble samlet fraksjoner hvert minutt fra 2-20minutter



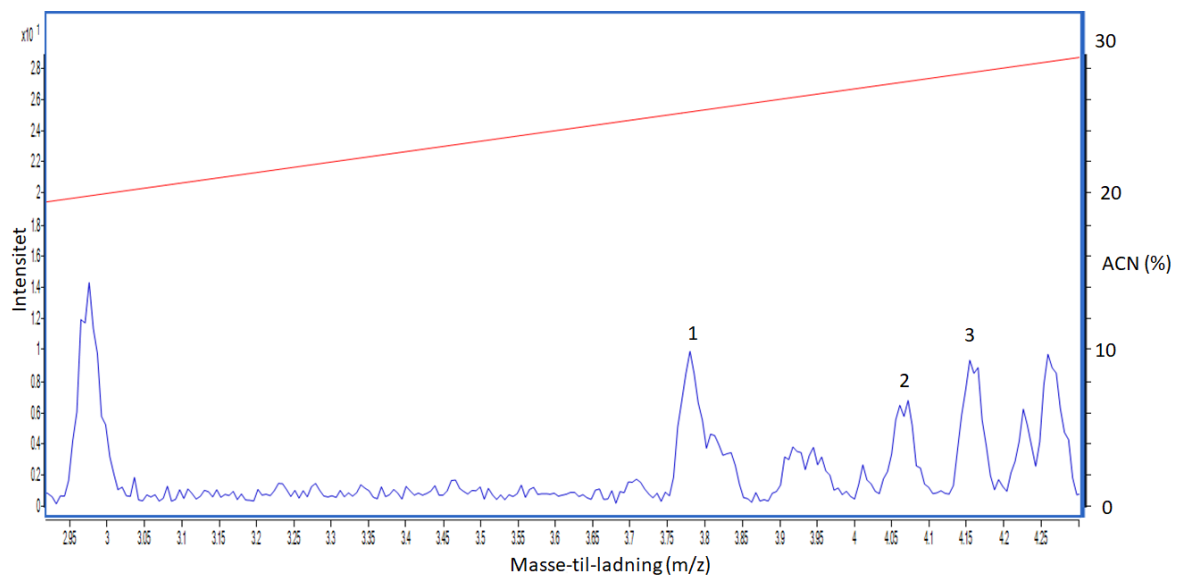
**Figur 4 UV-Vis kromatogram ved 280 nm av *A. rubens* 10% SPE- eluat fra vannfasen av innvoller fra RP-HPLC og hvor antibakteriell aktivitet ble funnet.** Ekstraksjon fra utgangsmaterialet ble gjort på en C<sub>18</sub> kolonne og eluert ut med 10% ACN. På SPE-eluatet ble det benyttet en PFP kolonne med en lineær gradient på 5-41% ACN over 20 minutter med en flow på 5ml/min. HPLC-fraksjoner som viste fullstendig hemming av vekst mot *E. coli* er markert med rødt og *S. aureus* med grønt.



Mesteparten av forbindelsene ble eluert ut ved 9 minutter og rundt 22% ACN. Fraksjon 10 og 12 ble valgt ut på bakgrunn av lavest MIC-verdi, men også siden de viste antibakteriell aktivitet mot en Gram-positiv (*S. aureus*) og en Gram-negativ bakterie (*E. coli*).

### 3.4.1 LC-MS kromatogram av *A. rubens* fraksjon 10 fra vannfase innvoller 10%

Fraksjonen ble videre undersøkt på LC-MS, og på figur 5 er det et utsnitt av de detekterte forbindelsene i fraksjonen.



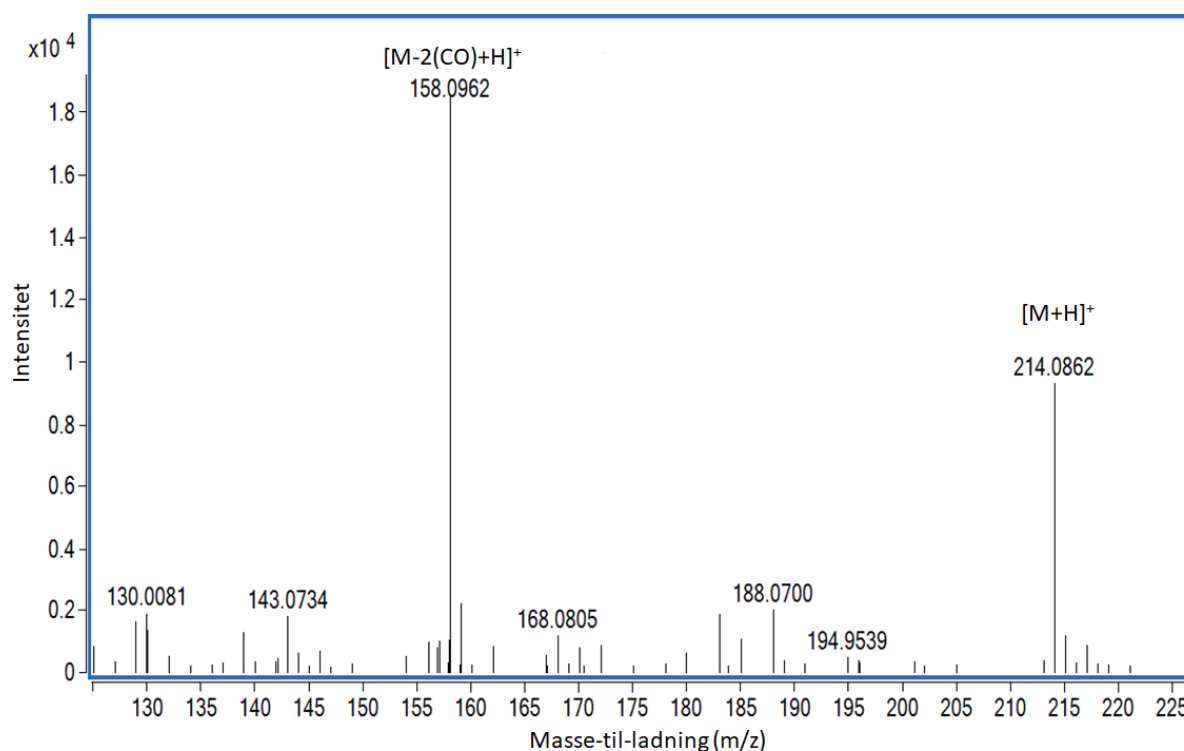
**Figur 5. Utsnitt av LC-MS kromatogram av fraksjon 10 fra vannfase 10% SPE-eluatet innvoller fra *A. rubens*.** Tallene til toppene angir forbindelser i prøven som er antatt gir opphav til den antibakterielle aktiviteten i fraksjonen. Topper som mangler benevning var enten funnet igjen i blankprøven, eller detektert i større mengder i fraksjonen som ble eluert ut 1 minutt før eller etter som ikke viste aktivitet i de konsentrasjonene som ble testet.

Fra LC-MS kromatogrammet ble det detektert 3 potensielt antibakterielle forbindelser som ble eluert ut mellom 2,9-4,4 minutter. Data fra disse forbindelsene er vist i tabell 7.

**Tabell 7. Identifiserte forbindelser i toppene eluert ut mellom 2,9- 4,4 minutter fra *A. rubens* innvoller 10% SPE-eluat.** Forbindelsene som er antatt kan være aktive er nummerert etter rekkefølgen de ble eluert ut i med retensjonstid (min), målt m/z [M+H], foreslått elementsammensetning, teoretisk monoisotopisk ionemasse m/z-verdi [M+H] og feilmargin (ppm).

Topp	RT (min)	Målt m/z [M+H]	Foreslått elementsammensetning	Teoretisk monoisotopisk masse m/z [M+H]	Feilmargin (ppm)
1	3,79	214,0860	C <sub>13</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub>	214,0862	-0,9
2	4,07	758,4175	C <sub>33</sub> H <sub>64</sub> N <sub>3</sub> O <sub>14</sub> P	758,4199	-3,2
3	4,16	316,1756	C <sub>15</sub> H <sub>25</sub> NO <sub>6</sub>	316,1755	0,3

Forbindelsen med topp 1 ble nærmere undersøkt på LC-MS/MS for å se på fragmenteringen til forbindelsen. Identifiserte fragmenter til forbindelsen er vist på LC-MS/MS kromatogrammet på figur 6.



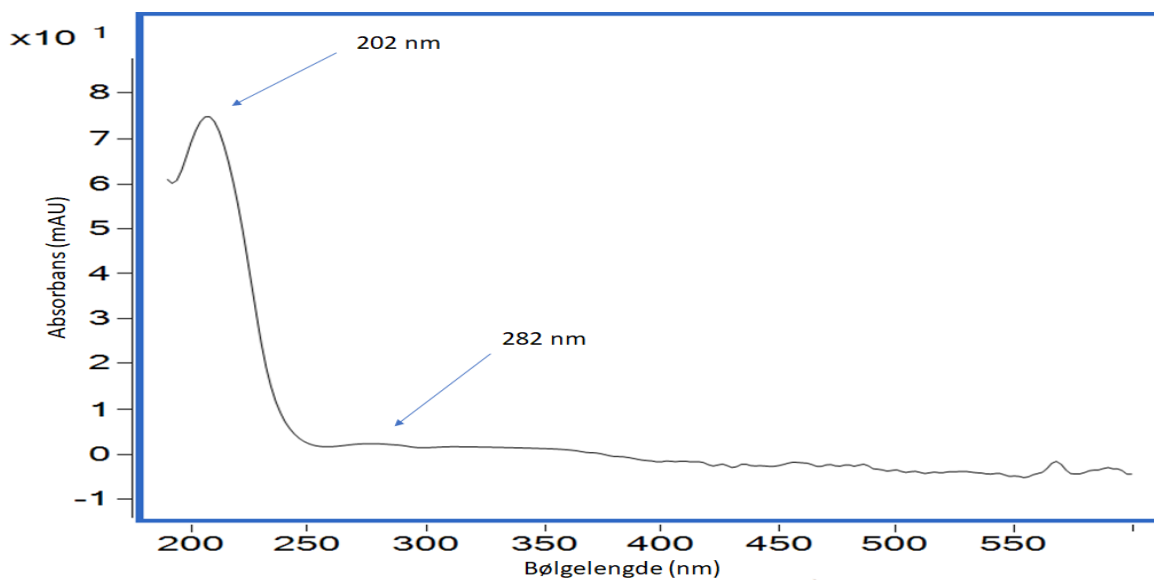
**Figur 6. LC-MS/MS kromatogrammet fra forbindelsen med topp 1.** Forbindelsen har en retensjonstid på 3,79 minutter, en målt m/z-verdi [M+H] på 214,0860 og en foreslått elementsammensetning C<sub>13</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>2</sub>.

Det ble funnet ett fragment fra forbindelsen, som er fremstilt i tabell 8.

**Tabell 8. Målt m/z-verdi [M+H] på 214,0860 fra fraksjonen på HR/MS.** Tabellen angir målt m/z-verdi [M+H] til fragmentene detektert i prøven med målt m/z [M+H], foreslått elementsammensetning, teoretisk monoisotopisk masse m/z [M+H] og feilmargin (ppm).

Målt m/z [M+H]	Foreslått elementsammensetning	Teoretisk monoisotopisk masse m/z [M+H]	Feilmargin (ppm)
214,0860	C <sub>13</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub>	214,0862	-0,9
158,0962	[C <sub>13</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub> ] -2(CO)	158,0964	-1,3

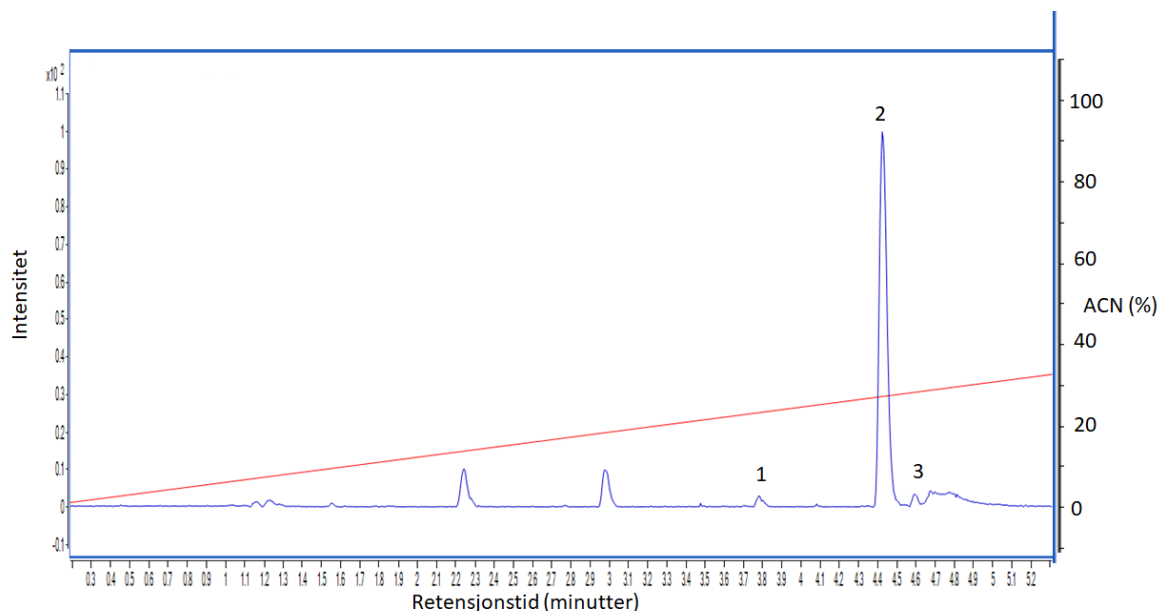
UV- absorbansen til forbindelsen ble nærmere undersøkt, og UV-Vis spekteret til forbindelsen er vist på figur 7.



**Figur 7. UV- Vis spekter av den mest fremtredende forbindelsen i fraksjon 10 fra 10% SPE-eluatet fra innvoller av *A. rubens*.** Pilene angir absorbanstoppene til forbindelsen ved 202 nm og 282nm.

### 3.4.2 *A. rubens* vannfase innvoller 10% fraksjon 12

Fraksjonen ble videre undersøkt på LC-MS, og på figur 8 er det et utsnitt av de detekterte forbindelsene i fraksjonen.



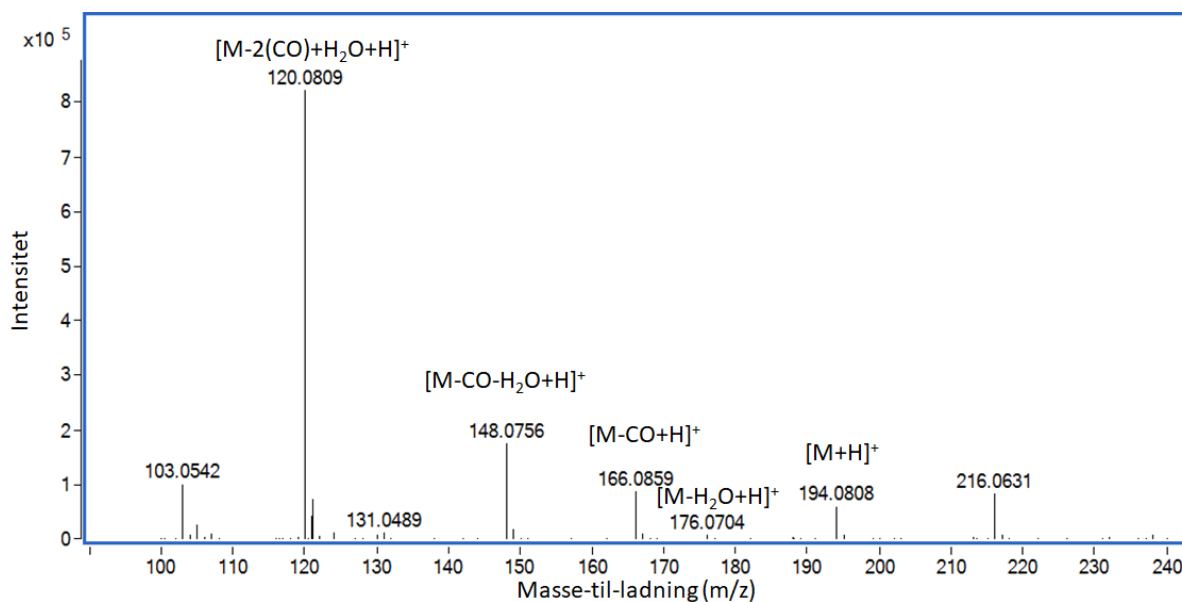
**Figur 8.** Utsnitt av LC-MS kromatogram av fraksjon 12 fra 10% vannfase SPE-eluatet innvoller fra *A. rubens*. Tallene til toppene angir forbindelser i prøven som er antatt gir opphav til den antibakterielle aktiviteten i fraksjonen. Topper som mangler benevnelse var enten funnet igjen i blankprøven, eller detektert i større mengder i fraksjonen som ble eluert ut 1 minutt før eller etter som ikke viste aktivitet i de konsentrasjonene som ble testet.

Fra LC-MS kromatogrammet til fraksjonen ble det detektert 3 potensielt antibakterielle forbindelser som ble eluert ut mellom 3,7- 4,6 minutter, og er vist i tabell 9.

**Tabell 9.** Identifiserte forbindelser i toppene eluert ut mellom 3,7- 4,6 minutter i *A. rubens* innvoller 10% vannfase SPE-eluat fraksjon 12. Forbindelsene som er antatt kan være aktive er nummerert etter rekkefølgen de ble eluert ut i med retensjonstid (min), målt m/z [M+H], foreslått elementsammensetning, teoretisk monoisotopisk masse m/z [M+H] og feilmargin (ppm).

Topp	RT (min)	Målt m/z [M+H]	Foreslått elementsammensetning	Teoretisk monoisotopisk masse m/z [M+H]	Feilmargin (ppm)
1	3,78	229,0971	C <sub>13</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	229,0972	-0,4
2	4,43	194,0810	C <sub>10</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub>	194,0817	-3,6
3	4,59	340,1654	C <sub>19</sub> H <sub>21</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	340,1655	-0,3

Forbindelsen med topp 2 ble nærmere undersøkt på LC-MS/MS for å se på fragmenteringen til forbindelsen. Identifiserte fragmenter til forbindelsen er vist på LC-MS/MS kromatogrammet på figur 10.



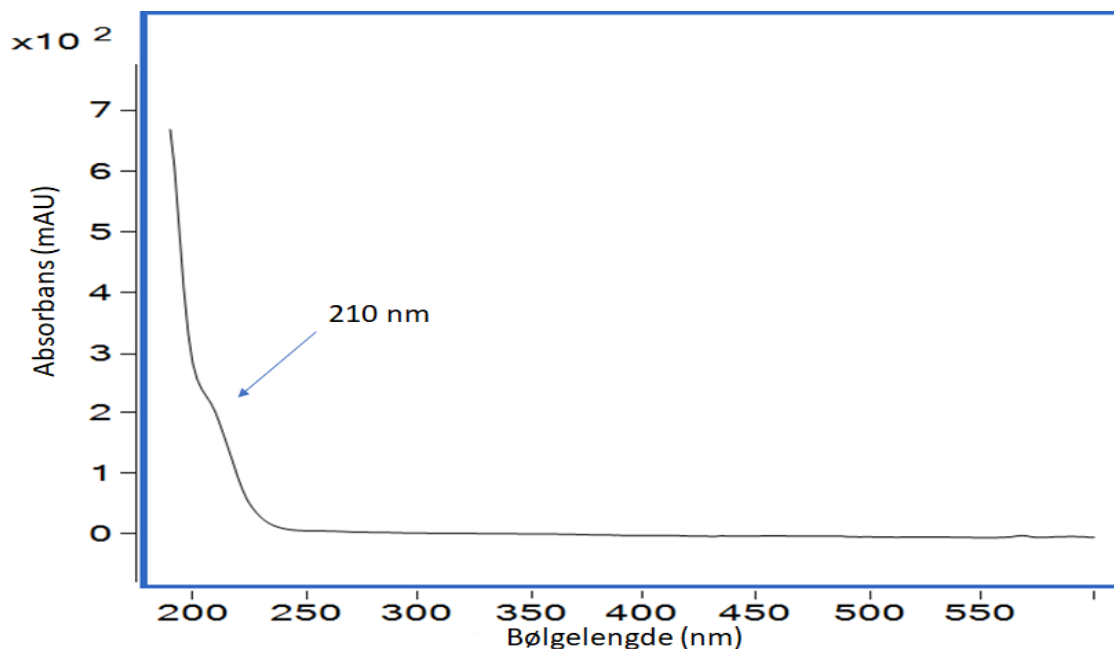
**Figur 9. LC-MS/MS spekter av den mest fremtredende forbindelsen i LC-MS kromatogrammet** Forbindelsen har enretensjonstid på 4,43 minutter, en målt m/z- verdi [M+H] på 194,0810 og en elementsammensetning  $C_{10}H_{11}NO_3$ .

Det ble funnet 4 ulike fragmenter av forbindelsen, som er fremstilt i tabell 10.

**Tabell 10. Fragmentering av forbindelsen med målt m/z-verdi på 194,0810 fra fraksjonen på LC-MS/MS.** Tabellen angir m/z-verdiene til fragmentene detektert i prøven med målt m/z [M+H], foreslått elementsammensetning, teoretisk monoisotopisk masse m/z [M+H] og feilmargin (ppm).

Målt m/z [M+H]	Foreslått elementsammensetning	Teoretisk monoisotopisk masse m/z [M+H]	Feilmargin (ppm)
194,0810	$C_{10}H_{11}NO_3$	194,0817	-3,6
176,0704	$[C_{10}H_{11}NO_3] - H_2O$	176,0706	-1,3
166,0860	$[C_{10}H_{11}NO_3] - CO$	166,0863	-1,8
148,0756	$[C_{10}H_{11}NO_3] - CO - H_2O$	148,0757	-0,7
120,0809	$[C_{10}H_{11}NO_3] - 2(CO) - H_2O$	120,0808	0,8

UV-absorbansen til forbindelsen ble nærmere undersøkt, og UV-Vis spekteret til forbindelsen er vist på figur 10.



**Figur 10** UV-Vis spekter av forbindelsen til den mest fremtredende forbindelsen i fraksjon 12 fra innvoller fra vannfasen av *A. rubens*. Forbindelsen har en en absorbanstopp ved 210 nm.

### 3.5 RP-HPLC av *A. rubens* vannfase innvoller 40%

SPE-eluatet fra utgangsmaterialet ble gjort på en  $C_{18}$  kolonne og eluert ut med 40% ACN. På SPE-eluatet ble det benyttet en PFP kolonne med en lineær gradient på 5-45% ACN over 25 minutter. Det ble ikke registrert noen antimikrobiell aktivitet i fraksjonene fra dette eluatet i de konsentrasjonene som ble testet, og ble derfor ikke tatt med for videre testing og karakterisering.

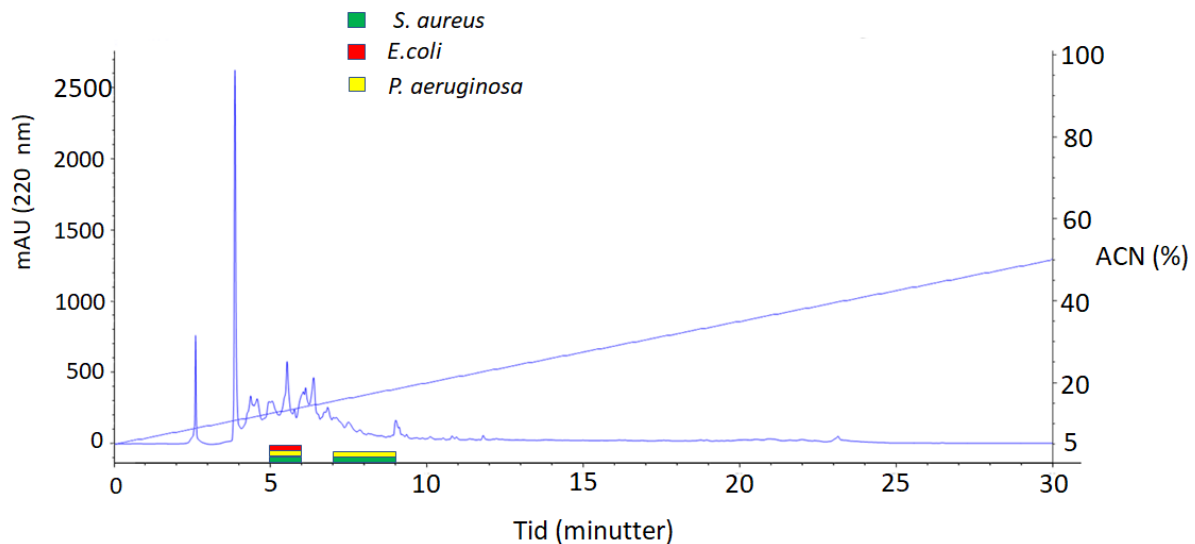
### 3.6 RP-HPLC av *C. frondosa* vannfase innvoller 10%

SPE-eluatet fra utgangsmaterialet ble gjort på en  $C_{18}$  kolonne og eluert ut med 10% ACN. På SPE-eluatet ble det benyttet en PFP kolonne med en lineær gradient på 5-15% ACN over 15 minutter. Det ble ikke registrert noen antibakteriell aktivitet fra fraksjonene i de konsentrasjonene som ble testet, og ble derfor ikke tatt med for videre testing og karakterisering.



### 3.7 RP-HPLC av *C. frondosa* vannfase innvoller 40%

SPE-eluatet fra utgangsmaterialet ble gjort på en C<sub>18</sub> kolonne og eluert ut med 40% ACN. På SPE-eluatet ble det benyttet en PFP kolonne med en lineær gradient på 5-50% ACN over 30 minutter. Flere av fraksjonene viste antibakteriell aktivitet vist på figur 11.

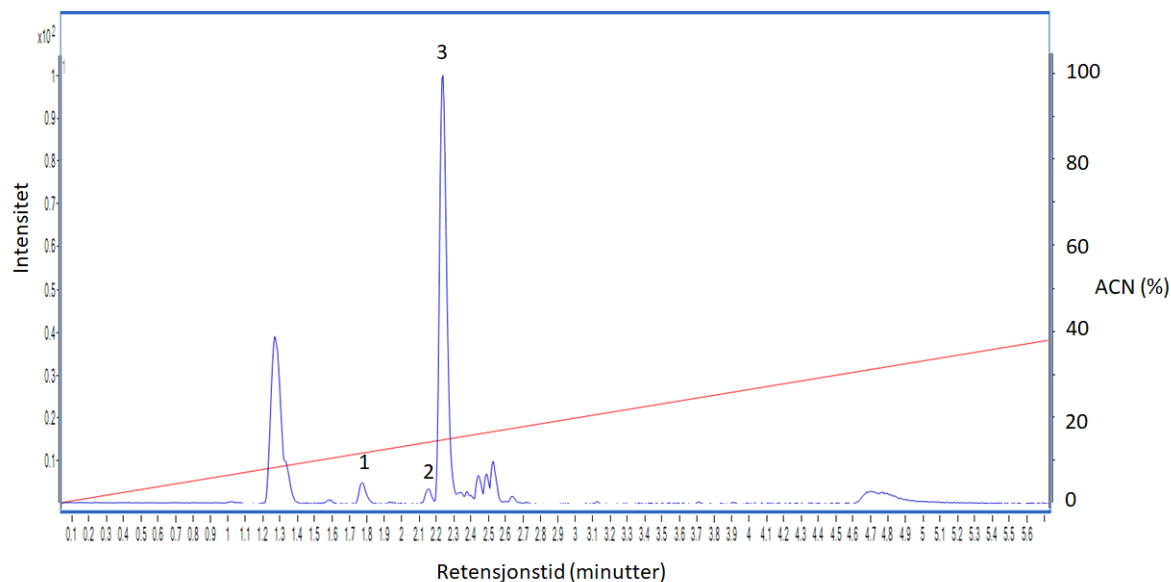


**Figur 11.** UV-Vis kromatogram ved 220 nm av *C. frondosa* 40% SPE-eluat fra vannfasen av innvoller RP-HPLC og hvor antibakteriell aktivitet ble funnet. SPE fra utgangsmaterialet ble gjort på en C<sub>18</sub> kolonne og eluert ut med 40% ACN. På SPE-eluatet ble det benyttet en PFP kolonne med en lineær gradient på 5-50% ACN over 30 min med en flow på 5ml/min. Fraksjoner som viste fullstendig inhibering av vekst mot *E. coli* er markert i rødt, *P. aeruginosa* i gult og *S. aureus* i grønt.

Som vist på kromatogrammet i Figur 11 viser det at det meste av forbindelsene eluert ut etter 12 minutter ved rundt 27% ACN. Fraksjon 6 inhiberte veksten fullstendig for *E. coli*, *P. aeruginosa* og *S. aureus* i de konsentrasjonene som ble testet med, og ble tatt med for videre karakterisering. Fraksjon 8 og 9 inhiberte veksten fullstendig mot *P. aeruginosa* og *S. aureus*, og ble også tatt med for videre karakterisering, da de både viste aktivitet mot en Gram-positiv og en Gram-negativ.

### 3.7.1 *C. frondosa* innvoller fraksjon 6 fra 40% SPE-eluat vannfase

Fraksjonen ble videre undersøkt på LC-MS, og på figur 12 er det et utsnitt av de detekterte forbindelsene i fraksjonen.



**Figur 12. LC-MS kromatogram av fraksjon 6 fra 40% SPE-eluatet innvoller fra *C. frondosa*.** Det ble benyttet en flow på 0,3 ml/min med en gradient på 5-100% ACN over 15 minutter. Tallene til toppene angir forbindelser i prøven som er antatt gir opphav til den antibakterielle aktiviteten i fraksjonen. Topper som mangler benevnelse var enten funnet igjen i blank-prøven, eller detektert i større mengder i fraksjonen som ble eluert ut 1 minutt før eller etter som ikke viste aktivitet i de konsentrasjonene som ble testet.

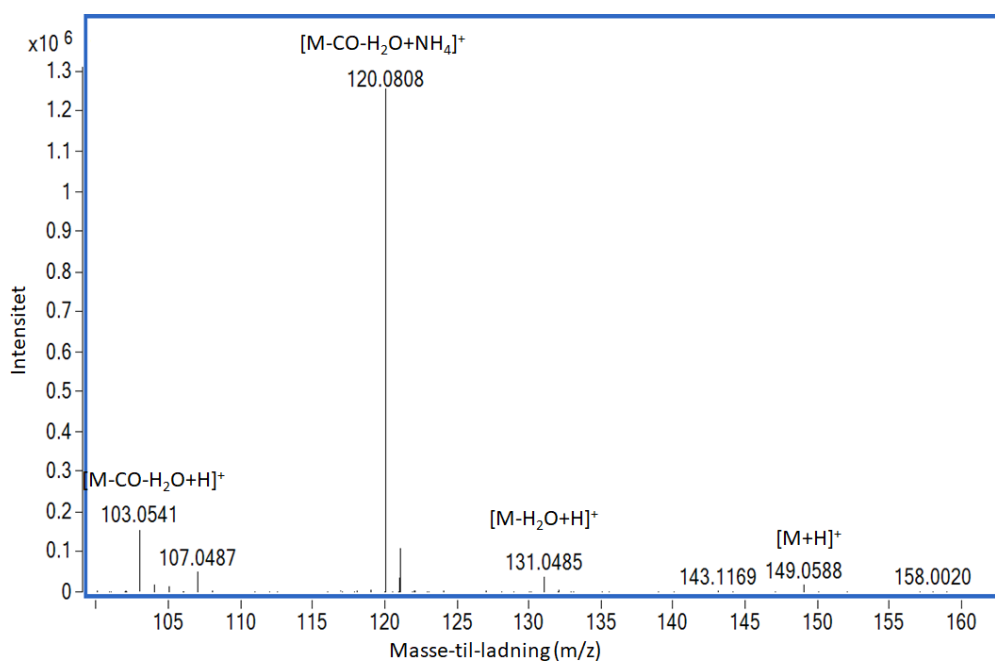
LC-MS kromatogrammet viste at de potensielt aktive forbindelsene ble eluert ut mellom 1,7-2,5 minutter. Topp 3 var den mest fremtredende forbindelsen i fraksjonen og ble videre undersøkt på LC-MS/MS for å se på fragmenteringen, og de fremstilt i tabell 11.

**Tabell 11. Identifiserte forbindelser i toppene eluert ut mellom 1,7- 2,6 minutter i fraksjon 6 fra *C. frondosa* innvoller 40% SPE-eluat.** Forbindelsene som er antatt kan være aktive er nummerert etter rekkefølgen de ble eluert ut i med retensjonstid (min), m/z [M+H], foreslått elementsammensetning, teoretisk monoisotopisk masse m/z [M+H] og feilmargin (ppm).

Topp	RT (min)	Målt m/z [M+H]	Foreslått elementsammensetning	Teoretisk monoisotopisk masse m/z [M+H]	Feilmargin (ppm)
1	1,77	284,1792	C <sub>27</sub> H <sub>46</sub> N <sub>6</sub> O <sub>7</sub>	284,1786	2,1
2	2,15	367,1501	C <sub>17</sub> H <sub>22</sub> N <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	367,1499	0,5

3	2,24	149,0592	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	149,0597	-3,4
4	2,44	759,3519	C <sub>31</sub> H <sub>50</sub> N <sub>8</sub> O <sub>14</sub>	759,3512	-0,3
5	2,53	232,0832	C <sub>10</sub> H <sub>9</sub> N <sub>5</sub> O <sub>2</sub>	232,0829	1,3

Forbindelsen i topp 3 var den mest fremtredende og ble videre undersøkt på LC-MS/MS for å se på fragmenteringen av forbindelsen. LC/MS-MS kromatogram av forbindelsen er vist i figur 13.



**Figur 13.** LC-MS/MS spekter av den mest fremtredende forbindelsen i LC-MS kromatogrammet. Forbindelsen har en retensjonstid på 2,24 minutter, målt m/z verdi 149,0592 og en foreslått elementsammensetning C<sub>9</sub>H<sub>8</sub>O<sub>2</sub>.

Fragmenteringen av forbindelsen viste 3 fragmenter som er angitt i tabell 12.

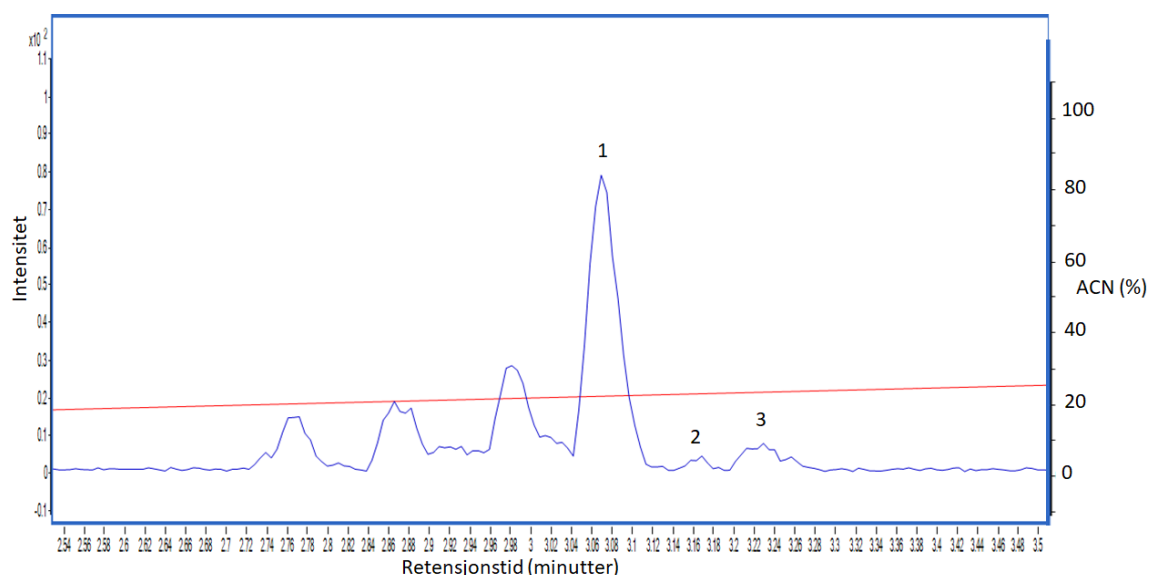
**Tabell 12. Fragmentering av forbindelsen med m/z-verdi 149,0592 fra LC-MS/MS.** Tabellen angir m/z-verdiene til fragmentene detektert i prøven med målt m/z [M+H], foreslått elementsammensetning, teoretisk monoisotopisk masse m/z [M+H] og beregnet feilmargin (ppm).

Målt m/z [M+H]	Foreslått elementsammensetning	Teoretisk monoisotopisk masse m/z [M+H]	Feilmargin (ppm)
149,0592	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	149,0597	-3,4
131,0485	[C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub> ] – H <sub>2</sub> O	131,0491	-4,6
120,0809	[C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub> ] – CO-H <sub>2</sub> O + NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	120,0808	0,8
103,0541	[C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub> ]-CO-H <sub>2</sub> O	103,0542	1,0

Videre ble UV-Vis spekteret til forbindelsen undersøkt. UV-vis spekteret var veldig likt UV-Vis spekteret på Figur 7 og er derfor ikke vist.

### 3.7.2. *C. frondosa* innvoller fraksjon 8 fra 40% SPE-eluat vannfase

Fraksjonene ble videre undersøkt på LC-MS, og på figur 14 er det et utsnitt av de detekterte forbindelsene i fraksjonen.



**Figur 14 Utsnitt av LC-MS kromatogram av fraksjon 8 fra 40% SPE-eluatet innvoller fra vannfasen fra *C. frondosa*.** Tallene til toppene angir forbindelser i prøven som er antatt gir opphav til den antibakterielle aktiviteten i fraksjonen. Topper som mangler benevning var enten funnet igjen i

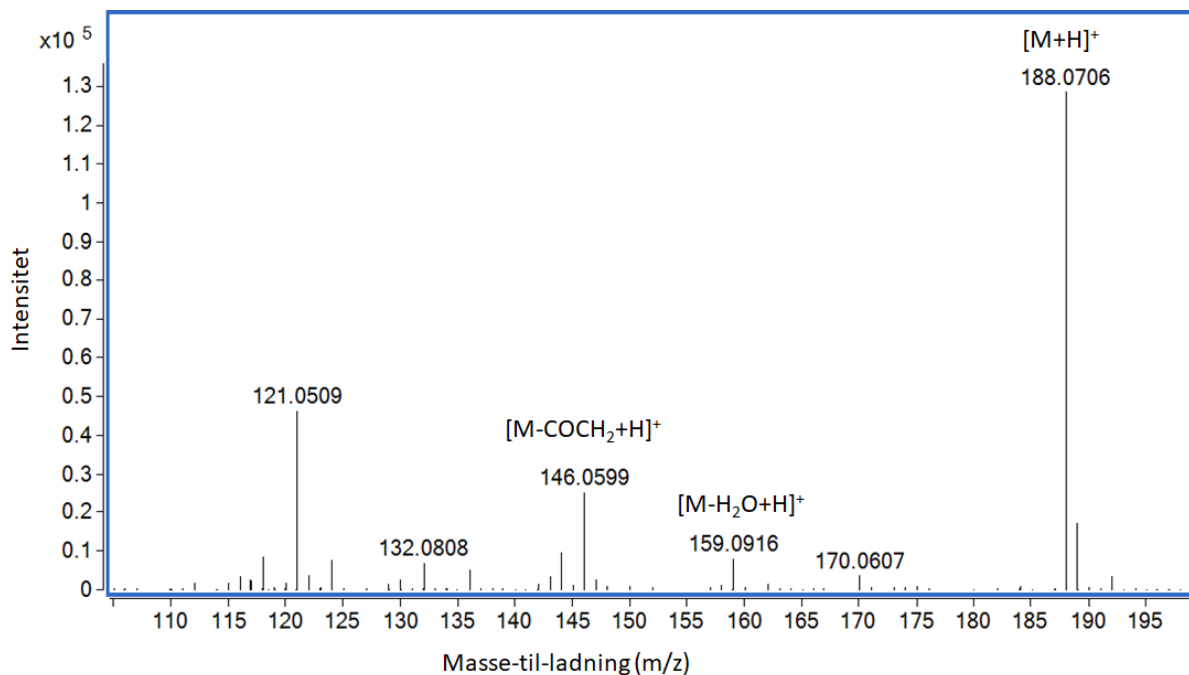
blank-prøven, eller detektert i større mengder i fraksjonen som ble eluert ut 1 minutt før eller etter som ikke viste aktivitet i de konsentrasjonene som ble testet.

LC-MS kromatogrammet av fraksjonen viste at de potensielt aktive forbindelsene ble eluert ut mellom 1,6- 3,3 minutter, og er vist i tabell 13.

**Tabell 13 Identifiserte forbindelser i toppene eluert ut mellom 1,6- 3,3 minutter i fraksjon 8 fra *C. frondosa* innvoller 40% SPE-eluat.** Forbindelsene som er antatt kan være aktive er nummerert etter rekkefølgen de ble eluert ut i med retensjonstid (min), m/z [M+H], foreslått elementsammensetning, teoretisk monoisotopisk masse m/z- verdi [M+H] og feilmargin (ppm).

Topp	RT (min)	Målt m/z [M+H]	Foreslått elementsammensetning	Teoretisk Monoisotopisk masse m/z [M+H]	Feilmargin (ppm)
2	3,07	188,0708	C <sub>11</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>2</sub>	188,0706	1,1
3	3,16	508,7489	C <sub>41</sub> H <sub>73</sub> N <sub>7</sub> O <sub>22</sub>	508,7477	2,4
4	3,22	259,2016	C <sub>13</sub> H <sub>26</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	259,2016	0,0

Forbindelsen med topp 2 ble nærmere undersøkt på LC-MS/MS for å se på fragmenteringen til forbindelsen. Identifiserte fragmenter til forbindelsen er vist i LC-MS/MS kromatogrammet på figur 15



**Figur 15. LC-MS/MS spekter av den mest fremtredende forbindelsen i LC-MS kromatogrammet** Forbindelsen har retensjonstiden 3,07 minutter, målt m/z verdi på 188,0708 og en foreslått elementsammensetning  $C_{11}H_9NO_2$ .

Det ble funnet 3 fragmenter av forbindelsen som er vist i tabell 14.

**Tabell 14. Fragmentering av forbindelsen med m/z-verdi 188,0708 fra LC-MS/MS.** Tabellen angir m/z-verdiene til fragmentene detektert i prøven med målt m/z [M+H], foreslått elementsammensetning, teoretisk monoisotopisk masse m/z [M+H] og beregnet feilmargin (ppm).

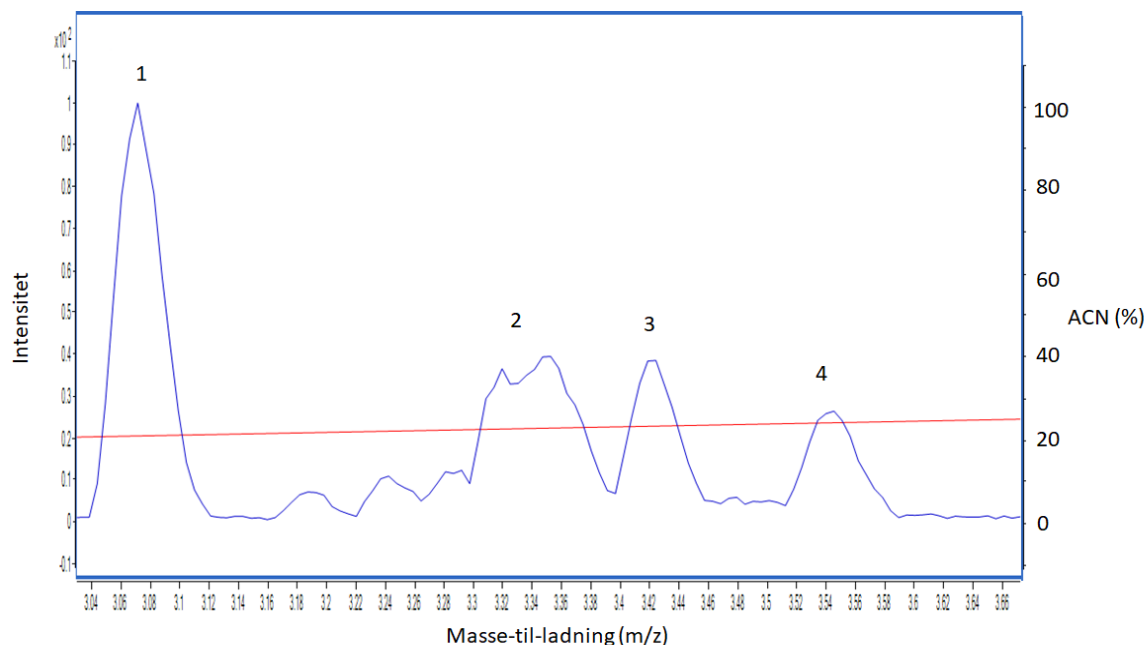
Målt m/z [M+H]	Foreslått elementsammensetning	Teoretisk monoisotopisk masse m/z [M+H]	Feilmargin (ppm)
188,0708	$C_{11}H_9NO_2$	188,0706	1,1
170,0607	$[C_{11}H_9NO_2] - H_2O$	170,0602	3,0
146,0599	$[C_{11}H_9NO_2] - COCH_2$	146,0600	-0,7

UV-absorbansen til forbindelsen ble nærmere undersøkt, men da UV-Vis spekteret også var veldig likt som på figur 7 er den ikke vist.



### 3.7.3 C. frondosa innvoller fraksjon 9 fra 40% SPE-eluat vannfase

Fraksjonen ble videre undersøkt på LC-MS, og på figur 16 er det et utsnitt av de detekterte forbindelsene i fraksjonen.



**Figur 16. Utsnitt av LC-MS kromatogram av fraksjon 9 fra 40% SPE-eluatet innvoller fra C. frondosa.** Tallene til toppene angir forbindelser i prøven som er antatt gir opphav til den antibakterielle aktiviteten i fraksjonen. Topper som mangler benevning var enten funnet igjen i blankprøven, eller detektert i større mengder i fraksjonen som ble eluert ut 1 minutt før eller etter som ikke viste aktivitet i de konsentrasjonene som ble testet.

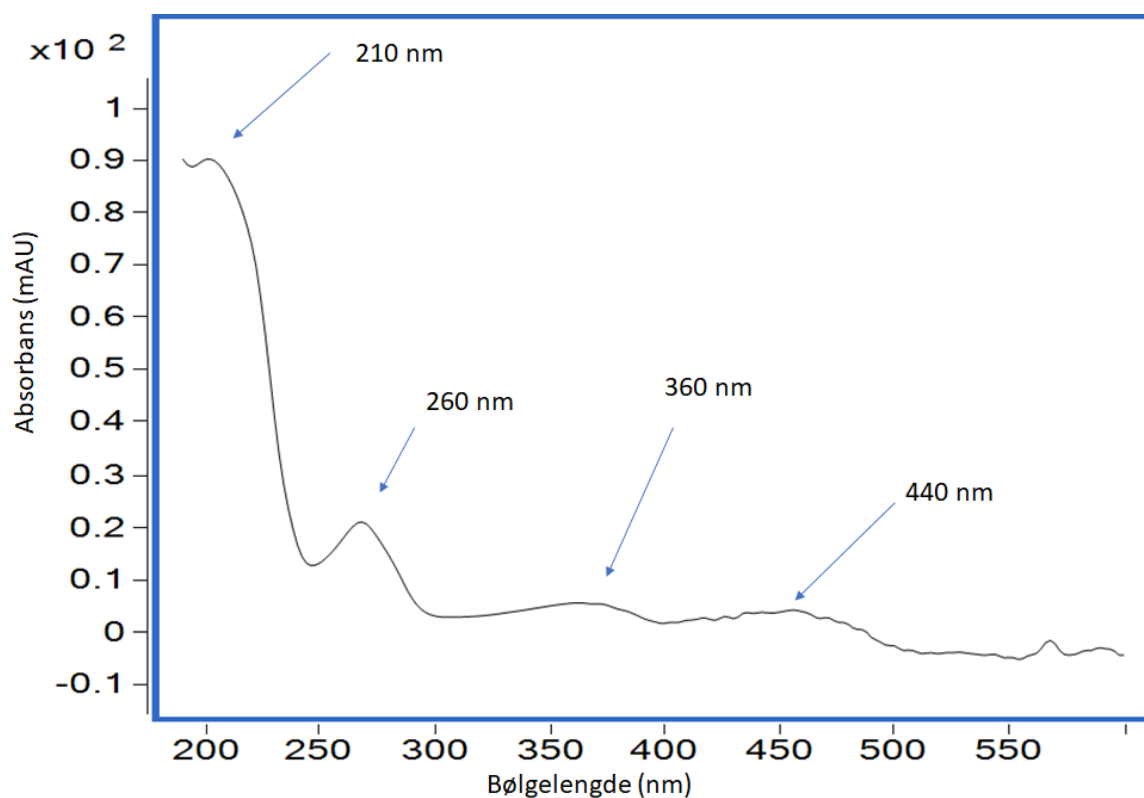
Fra LC-MS kromatogrammet ble det detektert 4 potensielt antibakterielle forbindelser som ble eluert ut mellom 3 og 3,6 minutter og er vist i tabell 15.

**Tabell 15. Identifiserte forbindelser i toppene eluert ut mellom 3- 3,6 minutter i fraksjon 9 fra C. frondosa innvoller 40% SPE-eluat.** Forbindelsene som er antatt kan være aktive er nummerert etter rekkefølgen de ble eluert ut i med retensjonstid (min), m/z [M+H], foreslått elementsammensetning, teoretisk monoisotopisk masse m/z- verdi [M+H] og feilmargin (ppm).

Topp	RT (min)	Målt m/z [M+H]	Foreslått elementsammensetning	Teoretisk monoisotopisk masse m/z [M+H]	Feilmargin (ppm)
1	3,07	188,0720	C <sub>11</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>2</sub>	188,07184	0,53
2	3,35	457,1119	C <sub>17</sub> H <sub>21</sub> N <sub>4</sub> O <sub>9</sub> P	457,1119	0,0

3	3,42	273,1096	$C_{12}H_{12}N_6O_2$	273,1095	0,4
4	3,54	246,1701	$C_{12}H_{23}NO_4$	246,1699	0,8

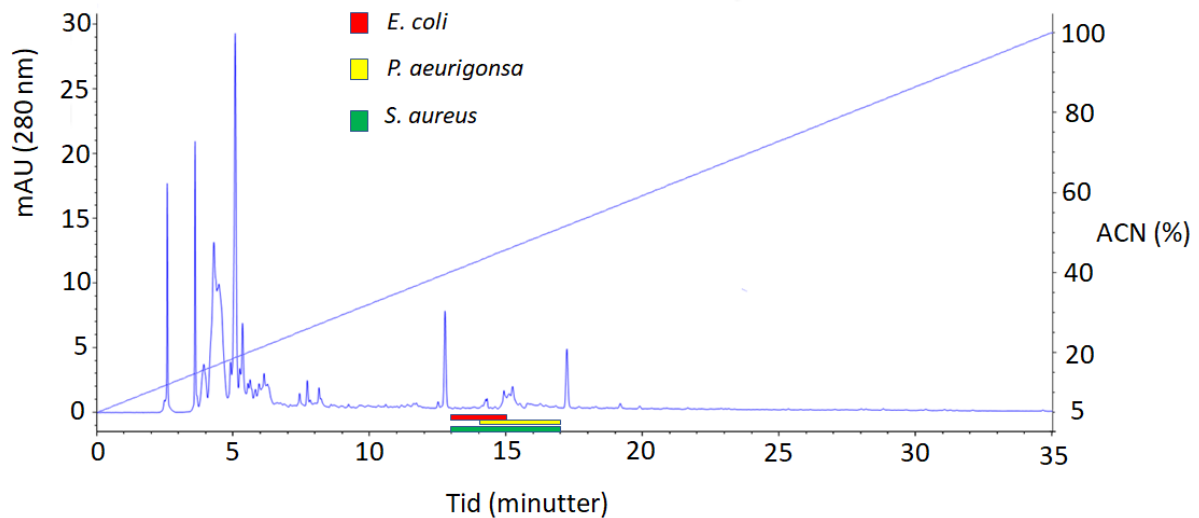
Forbindelsen med topp 2 ble nærmere undersøkt på LC-MS/MS da forbindelsen med topp 1 er karakterisert i forrige fraksjon. Det ble ikke funnet noen fragmentering av forbindelsen med LC-MS/MS kromatogrammet er derfor ikke tatt med. Videre ble UV-vis spekteret til forbindelsen undersøkt, og er fremstilt i figur 17.



**Figur 17.** UV-Vis spekter av forbindelsen med topp 2 fra fraksjon 9 fra innvoller fra vannfasen av *C. frondosa*. Forbindelsen har absorbanstopper ved 210, 260, 360 og 440 nm.

### 3.8 RP-HPLC av *C. frondosa* organisk fase innvoller 40%

SPE-eluatet fra utgangsmaterialet ble gjort på en C<sub>18</sub> kolonne og eluert ut med 40% ACN. På SPE-eluatet ble det benyttet en PFP kolonne med en lineær gradient på 5-100% ACN over 35 minutter. Flere av fraksjonene viste antibakteriell aktivitet vist på figur 18.



**Figur 18. UV-Vis kromatogram ved 220 nm av 40% eluat fra organiskfase av innvoller fra *C. frondosa* fra RP-HPLC og hvor antibakteriell aktivitet ble funnet.** SPE fra utgangsmaterialet ble gjort på en C<sub>18</sub> kolonne og eluert ut med 40% ACN. På SPE-eluatet ble det benyttet en PFP kolonne med en lineær gradient på 5-100% ACN over 35 minutter med en flow på 5ml/min. Fraksjoner som viste fullstendig inhibering av vekst mot *E. coli* er markert i rødt, *P. aeruginosa* i gult, og *S. aureus* i grønt.

Fraksjon 14, 15, 16 og 17 viste fullstendig inhibering av vekst mot *E. coli*, *P. aeruginosa* og *S. aureus*. Mengde stoff som var igjen etter testing i fraksjonene var vanskelig å kvantifisere, slik at konsentrasjonen av stoffet var ikke tilstrekkelig for å få brukbare data fra LC-MS.

## 4 Diskusjon

Sjøpølsen *Cucumaria frondosa* og sjøstjernen *Asterias rubens* ble undersøkt for antibakterielle forbindelser i utvalgte vev/organer. Utvalgte vev/organer ble først ekstrahert med løsemiddel, og separert i en vannfase og en organisk fase. Vannfasen og den organiske fasen ble videre separert med SPE, der de ble stegvis eluert ut med henholdsvis 10, 40 og 80% ACN. SPE-eluatene fra vannfasen ble screenet for antibakteriell aktivitet mot de Gram-negative bakteriene *E. coli* og *P.aeruginosa*, og de Gram – positive bakteriene *S. aureus* og *C. glutamicum*. Eluater fra den organiske fasen ble bare testet mot *C. glutamicum*. SPE-eluater som ble tatt med videre for separering og karakterisering var basert på at det skulle være minst én fra hver fase, og fra begge artene. Disse SPE-eluatene ble separert vha. RP-HPLC, og aktive HPLC-fraksjoner ble karakterisert på LC-MS, UV-Vis spekter og LC-MS/MS.

### 4.1 Tørrstoffmengde og utbytte

Etter løsemiddelekstraksjonen fra utgangsmaterialet var det en del organisk materiale som ikke var løst opp fullstendig, og det gjaldt særlig fra hud/skinn fra både *C. frondosa* og *A.rubens*. Disse lot seg ikke knuse spesielt godt med pestel og morter, og for hud/skinn fra *C. frondosa* ble løsemiddelsktrahert uten at det frysetørkede materialet ble knust. Det gjør at overflatearealet ble mindre enn ønskelig, slik at det kan spekuleres at det ble ekstrahert mindre forbindelser enn det var potensiale for.

Etter frysetørrking var det generelt mindre stoff fra de organiske fasene enn fra vannfasene, med unntak av fra innvoller fra *C. frondosa*.. Ekstraktet lot seg derimot ikke «tørke», slik at det var nok lipider/fettstoffer i røret, i tillegg til karatenoider. SPE av ekstraktet var litt krevende, da mye av stoffet ikke lot seg løse opp, og det var generelt mye partikler i ekstraktet. Etter SPE av ekstraktet var det et lavt utbytte, særlig fra 10% SPE-eluatet.

For *A. rubens* var det 40% eluatet fra både vannfasen og den organiske fasen som generelt ga høyest utbytte. Det lave utbyttet fra den organiske fasen, særlig 10% eluatene kan skyldes at det er flere upolare forbindelser som ikke ble eluert ut ved 80% ACN, og utbytte i et 100% eluat kunne kanskje ha vært høyere. Veldig hydrofobe forbindelser har dårlig løselighet i vann, og er derfor lite egnet og interessante for videre testing og utvikling for legemiddel (Savjani et al., 2012).

## 4.2 Antibakteriell aktivitet i SPE- eluater fra *A. rubens* og *C. frondosa*

Det ble testet for antibakteriell aktivitet i SPE-eluatene fra vannfasen mot alle bakteriestammene i en to-folds fortynningsrekke med en utgangskonsentrasjon på 10 mg/ml med unntak av for plasma og slim fra *C. frondosa*. Coelomocytterne fra begge artene var det for lite tilgjengelig materiale etter SPE for å teste med den utgangskonsentrasjonen.

Fra den organiske fasen ble det detektert antibakteriell i alle SPE- eluatene med unntak av plasma og coelomocytterne i en to-folds fortynningsrekke med en utgangskonsentrasjon på 5 mg/ml mot *C. glutamicum*.

Det var SPE-eluatene fra vannfasen som generelt hadde høyest aktivitet, og fire av fem SPE-eluater som ble tatt med videre for separasjon og karakterisering kom fra vannfasen. Det kan ikke konkluderes med at det ikke var antibakteriell aktivitet i SPE-eluatene fra plasma, slim og coelomocytterne fra vannfasen, da konsentrasjonen kan ha vært for lav.

Enkelte 40% eluater og flere av 80% eluatene, og var tungt løselige i vann, slik at under testingen ikke reelt var den utgangskonsentrasjonene som ble testet. Det kan bety at forbindelsene i eluatene hadde en antibakteriell aktivitet, men konsentrasjonen var kanskje for lav. Nesten alle SPE-eluatene fra den organiske fasen løste seg lett i vann.

Det ble ikke funnet antibakteriell aktivitet fra coelomocytterne fra vannfasen fra eller *C. frondosa*. Det er beskrevet tidligere i litteraturen antibakteriell aktivitet fra coelomocytterne fra *C. frondosa* (Haug et al., 2002), (Beauregard et al., 2001),

De organiske SPE-ekstraktene ble bare testet mot *C. glutamicum* i to-folds fortynningsrekker. *C. glutamicum* har vist seg å være mer sensitiv i antibakteriell testing i tidligere forsøk (Haug et al., 2004), (Tadesse et al., 2008). De fleste organiske SPE-eluatene viste ingen aktivitet i de konsentrasjonene de ble testet i, med unntak av innvoller fra både *C. frondosa* og *A. rubens*.

Det var generelt lite tilgjengelig materiale fra den organiske fasen etter SPE. Ved å bare teste mot *C. glutamicum* kunne det velges ut et av ekstraktene som viste veldig god aktivitet.

## 4.3 Separasjon og karakterisering av aktive forbindelser

Alle SPE-eluatene som ble tatt med videre for separering med RP-HPLC og videre karakterisering kom fra innvollene fra begge artene. Det er påvist at sekundære metabolitter isolert fra en makroorganisme, er produsert av mikrober som lever i/på disse (Piel, 2009). 3 av SPE-eluatene som ble tatt med videre var 40% SPE-eluat, og 2 av dem var 10% SPE-eluat.

For utgangsmaterialet for SPE-eluatene ble det benyttet en C<sub>18</sub> kolonne som stasjonær fase, og for RP-HPLC ble det benyttet en PFP kolonne. Trenden for RP-HPLC var at hovedmengden av forbindelsene ble eluert ut før 10 minutter, uavhengig om det var et 10 eller 40% - SPE eluat.

Som vist på kromatogrammet (figur 4) for et 10% SPE-eluat fra vannfasen av *A. rubens* der de fleste forbindelsene ble eluert ut først ved rundt 22% ACN. Separasjon med 10% ACN i SPE skulle tilsi at det inneholdt forbindelser som ble eluert ut ved ≤10% ACN. Det kan forklares med at det ble benyttet to forskjellige kolonner, en C<sub>18</sub> kolonne for SPE, og en PFP for RP-HPLC. Polare forbindelser vil feste seg sterkere til en PFP kolonne, og vil derfor eluere ut saktere enn på en C<sub>18</sub> kolonne der polare forbindelser ikke er like sterkt bundet til kolonnen.

På et kromatogram vist på figur 11 for RP-HPLC på et 40% SPE-eluat fra *C. frondosa*, ble hovedmengden av forbindelsene eluert ut ved rundt 25% ACN. I 40% SPE-eluatene er det forventet å finne forbindelser som ble eluert ut mellom 10 og 40% ACN. At mesteparten ble eluert ut ved rundt 25% ACN kan skyldes at ekstraktet inneholdt mye forbindelser som ble eluert ut mellom 10 og 25% ACN.

For RP-HPLC for det ene SPE-eluatet fra organisk fase (40% innvaller *C. frondosa*), var mesteparten av forbindelsen eluert ut fra litt over 10% ACN til rundt 30% ACN vist på figur 18.

Mesteparten av forbindelsene ble eluert ut fra litt over 10% ACN, til rundt 30% ACN. Det kan forklares med at mer upolare forbindelser fester seg dårligere til PFP kolonnen, og derfor eluerer ut noe raskere enn forventet. De aktive eluatene ble senere eluert ut mellom 40-55% ACN. I 40% SPE-eluatet er det forventet at det er forbindelser som elueres ut ved mellom 40% og 80% ACN.

#### 4.3.1 *A. rubens* vannfase innvaller 10% SPE-eluat

*A. rubens* vannfase 10% SPE-eluat viste aktivitet mot alle bakteriestammene, med den laveste MIC-vedien på 0,31 mg/ml mot *C. glutamicum*. Av HPLC fraksjonene var det fraksjon 10 og 12 som skilte seg ut, med inhibering av vekst mot den Gram- positive bakterien *S. aureus* og den Gram- negative bakterien *E. coli*.

LC-MS kromatogram av fraksjon 10 viste at det var potensielt 3 aktive forbindelser i fraksjonen som ble eluert ut mellom 3,7 – 4,2 minutter ved rundt 24 % ACN (figur 5). Basert

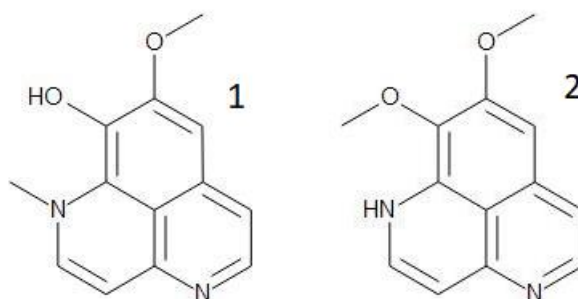


på m/z-verdi ble det foreslått en elementsammensetning på  $C_{13}H_{11}NO_2$  for den mest fremtredende forbindelsen. Det ble ikke funnet forbindelser med den elementsammensetningen fra det marine miljø som er beskrevet tidligere i databasebesøk.

Fra fraksjon 12 ble det detektert antibakteriell aktivitet også mot *S. aureus* og *E. coli*, og ut i fra LC-MS kromatogrammet på figur 8 av forbindelsen ble det detektert 3 potensielt aktive forbindelser som ble eluert ut mellom 3,7- 4,7 minutter. Basert på m/z-verdi ble det foreslått en elementsammensetning på  $C_{10}H_{11}NO_3$  for den mest fremtredende forbindelsen. Nærmere databasesøk viser at det er identifisert ulike bioaktive forbindelser med samme m/z-verdi og elementsammensetning til de detekterte ionene i fraksjonen på LC-MS.

Fra databasesøk er det beskrevet 5 forbindelser med elementsammensetning  $C_{13}H_{12}N_2O_2$  fra som er isolert fra andre marine arter. Aaptamine/ isoaptamine fra en marin svamp ved genus *Xestospongia* med antibakteriell aktivitet mot *S. aureus*, *Vibrio anguillarum* og anti-fungal aktivitet mot *Candida tropicalis* (Calcul et al., 2003).

Av andre forbindelser ble cytotoxiske bipyridiner fra den marine soppen *Neosartorya pseudofischeri* funnet (Liang et al., 2014), den indole alkaloiden caerulomycin K fra den marine bakterien *Actinoalloteichus cyanogriseus* (Fu et al., 2011b) og Aspernigrin fra den marine soppen *Aspergillus niger* (Hiort et al., 2004). Disse viste ingen antibakteriell aktivitet fra aktivitetstesting.



**Figur 19** Strukturen til isoaptamine (1) og aaptamine (2). (Chemspider).

Forbindelse med foreslått elementsammensetning  $C_{10}H_{11}NO_3$  i topp 2 (figur 8) var den mest fremtredende forbindelsen, både på målt antall ioner, men også fra UV-spekteret som viste en topp ved rundt 210 nm. Det er beskrevet 3 forbindelser fra databasebesøk med samme elementsammensetning.

Derivater av 4-Methoxybenzoyl isolert fra sekkedyret *Polycarpa aurata* (Wessels et al., 2001), tyrosine derivatet botryllamide L fra sekkedyret *Aplidium altarium* (Yin et al., 2010) og Nocozoline A isolert fra den marine bakterien *Nocardiopsis dassonville* (Fu et al., 2011a). Det er ikke påvist antibakteriell aktivitet i disse forbindelsene.

Det ble også funnet en indol alkaloid med elementsammensetning  $C_{19}H_{21}N_3O_3$  fra den marine bakterien *Eurotium cristatum* kalt Cristatumin A. Den viste antibakteriell aktivitet mot *E. coli* (Du et al., 2012).

Det kan gi en indikasjon på at det er en eller flere av disse forbindelsene som gir opphav til den antibakterielle aktiviteten som ble detektert i fraksjonen. Det støttes videre av at Cristatumin A har vist antibakteriell aktivitet mot *E. coli* og aaptamine/isoaaptamin mot både *S. aureus* og *E. coli*.

At det ble påvist antibakteriell aktivitet mot både en Gram- negativ og en Gram- positive bakterie kan indikere at forbindelsene angriper ulike strukturer inne eller utenpå plasmamembranen.

#### 4.3.2 *A. rubens* vannfase innvoller 40% SPE-eluat

SPE-eluatet fra innvoller 40% fra vannfase var en av de mest aktive SPE-eluatene fra *A. rubens*, og ble derfor tatt med videre for separering og karakterisering. Etter RP-HPLC av fraksjonen viste ingen av fraksjonene antibakteriell aktivitet i de konsentrasjonene som ble testet mot *E. coli*, *S. aureus* og *P. aeruginosa*. For hvert rensessteg mister man aktivitet i fraksjonen, og det kan spekuleres i om at aktiviteten kom fra flere forbindelser i SPE-eluatet.

Tap av aktivitet kan også skyldes at ett eller flere av forbindelsene i SPE-eluatet hadde synergier, og ved å separere dem mistet man deler av aktiviteten.

#### 4.3.3 *C. frondosa* vannfase innvoller 10% SPE-eluat

SPE-eluatet fra innvoller 10% fra vannfasen var en av de mest aktive SPE-eluatene fra *C. frondosa*, og ble derfor tatt med videre for separering og karakterisering. Etter RP-HPLC av viste ingen av fraksjonene antibakteriell aktivitet i de konsentrasjonene som ble testet mot *E. coli*, *S. aureus* og *P. aeruginosa*. Som for 40% SPE-eluatet fra vannfasen fra *A. rubens* kan man ha mistet aktivitet ved videre rensing, og aktiviteten kommer fra flere forbindelser i SPE-eluatet.

#### 4.3.4 *C. frondosa* vannfase innvoller 40% SPE-eluat.

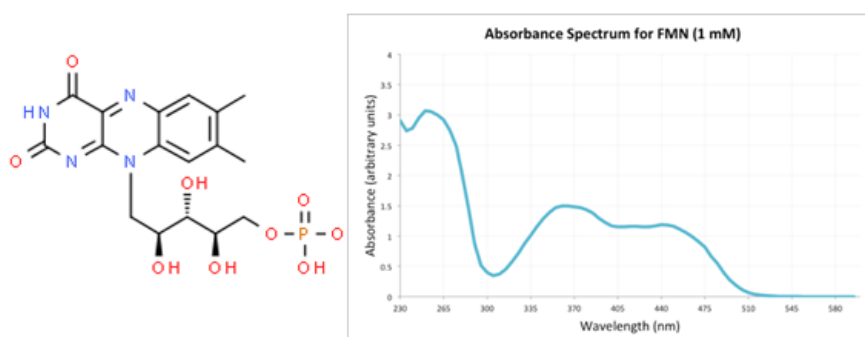
SPE-eluatet fra innvoller 40% fra vannfasen fra *C. frondosa* innvoller 40 var en av de mest aktive SPE-eluatene, og ble derfor tatt med videre for separering og karakterisering. Etter RP-HPLC viste 3 av fraksjonene antibakteriell aktivitet mot *E. coli*, *P. aeruginosa* og *S. aureus*.

I fraksjon 6 ble det detektert 5 forbindelser i fraksjonen som kan antas å gi opphav til den antibakterielle aktiviteten mot *E. coli*, *P. aeruginosa* og *S. aureus*. Forbindelser med samme m/z verdi og/eller elementsammensetning er ikke tidligere beskrevet i marine arter fra databasesøk.

I fraksjon 8 fra *C. frondosa* 40%- SPE eluat vannfase fra innvoller ble det detektert 3 forbindelser i fraksjonen som kan antas å gi opphav til den antibakterielle aktiviteten mot *P. aeruginosa* og *S. aureus*. Forbindelser med samme m/z verdi og/eller elementsammensetning er ikke tidligere beskrevet i marine arter.

Stoffet fra fraksjon 9 fra *C. frondosa* 40%- SPE eluat vannfase fra innvoller var et lysegult stoff som løste seg i vann og fikk en lys gul farge. Det ble detektert 4 forbindelser i fraksjonen som kan antas å gi opphav til den antibakterielle aktiviteten mot *P. aeruginosa* og *S. aureus*. Forbindelsen i topp 2 var også å finne i fraksjon 8, men i større mengder og ble ikke videre karakterisert i denne fraksjonen.

UV- Vis spekteret til forbindelsen med topp 2 viste seg å være veldig interessant fra kromatogrammet på figur 18. Ved å sammenligne m/z verdi og UV-spekter, ble forbindelsen påvist å være Flavin mononukleotid (FMN) med elementsammensetning  $C_{17}H_{21}N_4O_9P$ . Molekylstrukturen og UV-Vis spekteret til FMN er vist på figur 20.



**Figur 20** Molekylstruktur av FMN og UV-Vis spekteret til rent FMN. (Chemspider) (iGEM Parts Registry).

I litteraturen er det beskrevet at FMN har antibakteriell aktivitet mot *E. coli*, *P. aeruginosa* og *S. aureus* (Blount and Breaker, 2006), (Slotnick and Dougherty, 1965).

Da forbindelsen med foreslått elementsammensetning  $C_{11}H_9NO_2$  ble funnet i begge fraksjonene, og begge fraksjonene var aktiv, kan det antyde at forbindelsen har antibakteriell aktivitet. I og med at forbindelsen ble eluert ut over 2 fraksjoner på RP-HPLC, vil en annen gradient/og eller fraksjoneringstid kunne bidra til å samle inn forbindelsen i større mengde i en fraksjon. Det kan være vanskelig for å unngå at for mye stoff elueres ut med én gang, men også ved å ha for lav stigning av ACN over lang tid på RP-HPLC slik at den fordeles over flere topper.

At FMN ble funnet i fraksjonen, kan det gi en indikasjon på at deler eller mesteparten av den antibakterielle aktiviteten mot *P. aeruginosa* og *S. aureus* kommer fra FMN. Forbindelsen med foreslått elementsammensetning  $C_{11}H_9NO_2$  var i fraksjonen 8, men i større mengder. Det gjør at det hverken kan bekrefte at det er denne forbindelsen som nødvendigvis gir antibakteriell aktivitet, og for å videre kunne si noe om det må stoffet isoleres og testes igjen.

#### 4.3.5 *C. frondosa* organisk fase innvolder 40%

I 40% SPE-eluatet fra organisk fase innvolder fra *C. frondosa* ble det detektert best antibakteriell aktivitet mot *C. glutamicum* av de eluatene fra den organiske fasen. Etter fraksjonering på RP- HPLC var det flere av fraksjonene som inhiberte veksten av *E. coli*, *S. aureus* og *P. aeruginosa*. Mengden stoff i prøvene var veldig beskjedent, og enkelte av prøvene under veiing slik at de alle ble løst i 200  $\mu$ l milliQ-  $H_2O$ . Etter testing ble fraksjonene undersøkt på LC-ESI-MS, men selv etter noen runder med å prøve å øke konsentrasjonen, kom det ikke brukbare data fra kromatogrammet.

For å kunne videre karakterisere forbindelsene i fraksjonene må det samles inn mer organisk materiale, og ta en ny ekstraksjon av forbindelsene. Siden man har en indikasjon på fremgangsmåten for å separere disse forbindelsene mest mulig fra de andre, kan en hoppe over å teste fra andre vev/organer, og korte ned tiden fra innsamling til aktivitetstesting.

## 5 Videre arbeid

Det gjenstår enda mye arbeid i å prøve å isolere og karakterisere de potensielt antibakterielle forbindelsene som er karakterisert i denne oppgaven. Flere av detekterte forbindelser er det en målt m/z- verdi og en foreslått elementsammensetning. For enkelte av forbindelsene er det

funnet forbindelser med antibakteriell aktivitet som har samme elementsammensetning, men det kan hverken bekrefte eller avkrefte at det er snakk om samme forbindelse. Da LC-MS systemet brukt bare detekterte positive ioner, vil ikke forbindelser som ikke lar seg ionisere ikke bli detektert og vist på LC-MS kromatogrammet..

I oppgaven er det ikke aktivt blitt lett etter spesifikke forbindelser som f.eks. peptider. Ved å samle inn alle isolerte forbindelser og lage en database, kan man sjekke om forbindelsene karakterisert fra sjøpølsen *C. frondosa* og *A. rubens*. Ved å gjøre det kan man sjekke om karakterisert forbindelser i fraksjonene er isolert før, og kan til en viss grad utelukke andre forbindelser i fraksjonene som kan ha antibakteriell aktivitet.

For å kunne konkludere med om det er de forbindelsene, må det samles opp nok rent stoff av den forbindelsen. Da må det opparbeides mer materiell fra vev fra disse artene. I og med at det er noe info om hvilke SPE-eluat forbindelsen er funnet i, og i videre separering, er det mulig å kunne korte litt ned på tiden for å prøve å isolere den forbindelsen.

## 6 Konklusjon

Ut i fra resultatene fra oppgaven ble konklusjonen at det ble påvist antibakteriell aktivitet i alle vev/organer, med unntak av fra plasma og coelomocytter. Disse viste aktivitet mot de Gram- negative bakteriene *E. coli* og *P. aeruginosa* og de Gram – positive bakteriene *S. aureus* og *C. glutamicum*. Den høyeste antibakterielle aktivitet ble funnet i SPE-eluatere fra innvoller. Innledende karakterisering av de mest aktive SPE-eluatene med massespektrometri indikerte tilstedeværelsen av flere ulike antibakterielle forbindelser, der blant annet Flavin Mononukleotid ble identifisert. Videre studier av de mulige antibakterielle forbindelsene er derfor nødvendig for å bekrefte/avkrefte at mulig isolerte forbindelser stod for aktiviteten, samt prøve å isolere og karakterisere

## 7 Referanser

- Adedeji, W. A. 2016. The Treasure Called Antibiotics. *Annals of Ibadan postgraduate medicine*, 14, 56-57.
- Aldred, K. J., Kerns, R. J. & Osheroff, N. 2014. Mechanism of quinolone action and resistance. *Biochemistry*, 53, 1565-1574.
- Andersson, L., Bohlin, L., Iorizzi, M., Riccio, R., Minale, L. & Moreno-López, W. 1989. Biological activity of saponins and saponin-like compounds from starfish and brittle-stars. *Toxicon*, 27, 179-188.
- Beauregard, K. A., Truong, N. T., Zhang, H., Lin, W. & Beck, G. 2001. The Detection and Isolation of a Novel Antimicrobial Peptide From the Echinoderm *Cucumaria Frondosa*. In: BECK, G., SUGUMARAN, M. & COOPER, E. L. (eds.) *Phylogenetic Perspectives on the Vertebrate Immune System*. Boston, MA: Springer US.
- Blount, K. F. & Breaker, R. R. 2006. Riboswitches as antibacterial drug targets. *Nature Biotechnology*, 24, 1558-1564.
- Bordbar, S., Anwar, F. & Saari, N. 2011. High-Value Components and Bioactives from Sea Cucumbers for Functional Foods—A Review. *Marine Drugs*, 9.
- Calcul, L., Longeon, A., Mourabit, A. A., Guyot, M. & Bourguet-Kondracki, M.-L. 2003. Novel alkaloids of the aaptamine class from an Indonesian marine sponge of the genus *Xestospongia*. *Tetrahedron*, 59, 6539-6544.
- Canicatti, C. 1991. Binding properties of *Paracentrotus lividus* (Echinoidea) hemolysin. *Comparative biochemistry and physiology. A, Comparative physiology*, 98, 463-468.
- Canicatti, C., Pagliara, P. & Stabili, L. 1992. Sea urchin coelomic fluid agglutinin mediates coelomocyte adhesion. *European journal of cell biology*, 58, 291-295.
- Cassini, A., Högberg, L. D., Plachouras, D., Quattrocchi, A., Hoxha, A., Simonsen, G. S., Colomb-Cotinat, M., Kretzschmar, M. E., Devleeschauwer, B., Cecchini, M., Ouakrim, D. A., Oliveira, T. C., Struelens, M. J., Suetens, C., Monnet, D. L., Strauss, R., Mertens, K., Struyf, T., Catry, B., Latour, K., Ivanov, I. N., Dobрева, E. G., Tambic Andrašević, A., Soprek, S., Budimir, A., Paphitou, N., Žemlicková, H., Schytte Olsen, S., Wolff Sönksen, U., Martin, P., Ivanova, M., Lyytikäinen, O., Jalava, J., Coignard, B., Eckmanns, T., Abu Sin, M., Haller, S., Daikos, G. L., Gikas, A., Tsiodras, S., Kontopidou, F., Tóth, Á., Hajdu, Á., Guólaugsson, Ó., Kristinsson, K. G., Murchan, S., Burns, K., Pezzotti, P., Gagliotti, C., Dumpis, U., Liuimiene, A., Perrin, M., Borg, M. A., De Greeff, S. C., Monen, J. C. M., Koek, M. B. G., Elstrøm, P., Zabicka, D., Deptula, A., Hryniewicz, W., Caniça, M., Nogueira, P. J., Fernandes, P. A., Manageiro, V., Popescu, G. A., Serban, R. I., Schréterová, E., Litvová, S., Štefkovicová, M., Kolman, J., Klavs, I., Korošec, A., Aracil, B., Asensio, A., Pérez-Vázquez, M., Billström, H., Larsson, S., Reilly, J. S., Johnson, A. & Hopkins, S. 2019. Attributable deaths and disability-adjusted life-years caused by infections with antibiotic-resistant bacteria in the EU and the European Economic Area in 2015: a population-level modelling analysis. *The Lancet Infectious Diseases*, 19, 56-66.
- Caulier, G., Mezali, K., Soualili, D. L., Decroo, C., Demeyer, M., Eeckhaut, I., Gerbaux, P. & Flammang, P. 2016. Chemical characterization of saponins contained in the body wall and the Cuvierian tubules of the sea cucumber *Holothuria (Platyperona) sanctori* (Delle Chiaje, 1823). *Biochemical Systematics and Ecology*, 68, 119-127.
- Du, F.-Y., Li, X.-M., Li, C.-S., Shang, Z. & Wang, B.-G. 2012. Cristatumins A–D, new indole alkaloids from the marine-derived endophytic fungus *Eurotium cristatum* EN-220. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 22, 4650-4653.
- Falanga, A., Lombardi, L., Franci, G., Vitiello, M., Iovene, M. R., Morelli, G., Galdiero, M. & Galdiero, S. 2016. Marine Antimicrobial Peptides: Nature Provides Templates for the Design of Novel Compounds against Pathogenic Bacteria. *International journal of Molecular Sciences*, 17, 785.

- Fu, P., Liu, P., Qu, H., Wang, Y., Chen, D., Wang, H., Li, J. & Zhu, W. 2011a.  $\alpha$ -Pyrone and Diketopiperazine Derivatives from the Marine-Derived Actinomycete *Nocardioopsis dassonvillei* HR10-5. *Journal of Natural Products*, 74, 2219-2223.
- Fu, P., Wang, S., Hong, K., Li, X., Liu, P., Wang, Y. & Zhu, W. 2011b. Cytotoxic Bipyridines from the Marine-Derived Actinomycete *Actinoalloteichus cyanogriseus* WH1-2216-6. *Journal of Natural Products*, 74, 1751-1756.
- Gomes, A. R., Freitas, A. C., Rocha-Santos, T. a. P. & Duarte, A. C. 2014. Bioactive compounds derived from echinoderms. *RSC Advances*, 4, 29365-29382.
- Haney, E. F., Mansour, S. C. & Hancock, R. E. W. 2017. Antimicrobial Peptides: An Introduction. In: HANSEN, P. R. (ed.) *Antimicrobial Peptides: Methods and Protocols*. New York, NY: Springer New York.
- Haug, T., Kjuul, A. K., Styrvold, O. B., Sandsdalen, E., Olsen, Ø. M. & Stensvåg, K. 2002. Antibacterial activity in *Strongylocentrotus droebachiensis* (Echinoidea), *Cucumaria frondosa* (Holothuroidea), and *Asterias rubens* (Asteroidea). *Journal of Invertebrate Pathology*, 81, 94-102.
- Haug, T., Stensvåg, K., Olsen, Ø. M., Sandsdalen, E. & Styrvold, O. B. 2004. Antibacterial activities in various tissues of the horse mussel, *Modiolus modiolus*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 85, 112-119.
- Hernroth, B., Baden, S., Thorndyke, M. & Dupont, S. 2011. Immune suppression of the echinoderm *Asterias rubens* (L.) following long-term ocean acidification. *Aquat Toxicol*, 103, 222-4.
- Hiort, J., Maksimenka, K., Reichert, M., Perović-Ottstadt, S., Lin, W. H., Wray, V., Steube, K., Schaumann, K., Weber, H., Proksch, P., Ebel, R., Müller, W. E. G. & Bringmann, G. 2004. New Natural Products from the Sponge-Derived Fungus *Aspergillus niger*. *Journal of Natural Products*, 67, 1532-1543.
- Holm, K., Voronkina, I., Sharlaimova, N., Thorndyke, M. & Hernroth, B. 2010. Functional properties of proteins from the coelomic fluid of the wounded sea star *Asterias rubens* (L.). *J Invertebr Pathol*, 105, 197-9.
- Houssen, W. E. & Jaspars, M. 2005. Isolation of Marine Natural Products. In: SARKER, S. D., LATIF, Z. & GRAY, A. I. (eds.) *Natural Products Isolation*. Totowa, NJ: Humana Press.
- Kerlin, R. L., Cebra, J. J., Weinstein, P. D. & Prendergast, R. A. 1994. Sea Star Factor Blocks Development of T-Dependent Antibody Secreting Clones by Preventing Lymphokine Secretion. *Cellular Immunology*, 156, 62-76.
- Kim, C. H., Go, H. J., Oh, H. Y., Park, J. B., Lee, T. K., Seo, J. K., Elphick, M. R. & Park, N. G. 2018. Identification of a novel antimicrobial peptide from the sea star *Patiria pectinifera*. *Dev Comp Immunol*, 86, 203-213.
- La, M.-P., Li, C., Li, L., Sun, P., Tang, H., Liu, B.-S., Gong, W., Han, H., Yi, Y.-H. & Zhang, W. 2012. New Bioactive Sulfated Alkenes from the Sea Cucumber *Apostichopus japonicus*. *Chemistry & Biodiversity*, 9, 1166-1171.
- Leal, M. C., Madeira, C., Brandao, C. A., Puga, J. & Calado, R. 2012. Bioprospecting of Marine Invertebrates for New Natural Products - A Chemical and Zoogeographical Perspective. *Molecules*, 17, 9842-9854.
- Leonard, L. A., Strandberg, J. D. & Winkelstein, J. A. 1990. Complement-like activity in the sea star, *Asterias forbesi*. *Developmental & Comparative Immunology*, 14, 19-30.
- Li, C., Blencke, H.-M., Haug, T. & Stensvåg, K. 2015. Antimicrobial peptides in echinoderm host defense. *Dev. Comp. Immunol.*, 49, 190-197.
- Liang, W.-L., Le, X., Li, H.-J., Yang, X.-L., Chen, J.-X., Xu, J., Liu, H.-L., Wang, L.-Y., Wang, K.-T., Hu, K.-C., Yang, D.-P. & Lan, W.-J. 2014. Exploring the Chemodiversity and Biological Activities of the Secondary Metabolites from the Marine Fungus *Neosartorya pseudofischeri*. *Marine Drugs*, 12.
- Luesch, H., Moore, R. E., Paul, V. J., Mooberry, S. L. & Corbett, T. H. 2001. Isolation of Dolastatin 10 from the Marine Cyanobacterium *Symploca* Species VP642 and Total Stereochemistry and Biological Evaluation of Its Analogue *Symplostatin 1*. *Journal of Natural Products*, 64, 907-910.



- Moen F. A., & Svensen E. 2014. *Dyrelivet i havet, nordeuropisk marin fauna* 6. utgave Kom forlag, Kristiansund.
- Mogilenko, D. A., Kudryavtsev, I. V., Orlov, S. V., Kharasova, A. D. & Polevshchikov, A. V. 2010. Expression of the starfish complement component C3 gene homolog under the influence of bacterial lipopolysaccharide. *Molecular Biology*, 44, 67-76.
- Newman, D. J., Cragg, G. M. & Snader, K. M. 2000. The influence of natural products upon drug discovery. *Natural Product Reports*, 17, 215-234.
- Pangestuti, R. & Arifin, Z. 2018. Medicinal and health benefit effects of functional sea cucumbers. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, 8, 341-351.
- Pettit, G. R., Kamano, Y., Herald, C. L., Tuinman, A. A., Boettner, F. E., Kizu, H., Schmidt, J. M., Baczynskyj, L., Tomer, K. B. & Bontems, R. J. 1987. The isolation and structure of a remarkable marine animal antineoplastic constituent: dolastatin 10. *Journal of the American Chemical Society*, 109, 6883-6885.
- Piel, J. 2009. Metabolites from symbiotic bacteria. *Natural Product Reports*, 26, 338-362.
- Ramírez-Gómez, F. & García-Arrarás, J. E. 2010. Echinoderm immunity. *Invertebrate Survival Journal; Vol 7 No 2 (2010)*.
- Savjani, K. T., Gajjar, A. K. & Savjani, J. K. 2012. Drug Solubility: Importance and Enhancement Techniques. *ISRN Pharmaceutics*, 2012, 10.
- Slotnick, I. J. & Dougherty, M. 1965. Unusual toxicity of riboflavin and flavin mononucleotide for *Cardiobacterium hominis*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 31, 355-360.
- Tadesse, M., Gulliksen, B., Strøm, M. B., Styrvold, O. B. & Haug, T. 2008. Screening for antibacterial and antifungal activities in marine benthic invertebrates from northern Norway. *Journal of Invertebrate Pathology*, 99, 286-293.
- Wessels, M., König, G. M. & Wright, A. D. 2001. New 4-Methoxybenzoyl Derivatives from the Ascidian *Polycarpa aurata*. *Journal of Natural Products*, 64, 1556-1558.
- Xue, Z., Li, H., Wang, X., Li, X., Liu, Y., Sun, J. & Liu, C. 2015. A review of the immune molecules in the sea cucumber. *Fish Shellfish Immunol*, 44, 1-11.
- Yin, S., Cullinane, C., Carroll, A. R., Quinn, R. J. & Davis, R. A. 2010. Botryllamides K and L, new tyrosine derivatives from the Australian ascidian *Aplidium altarium*. *Tetrahedron Letters*, 51, 3403-3405.
- Zhao, Y., Xue, C., Zhang, T. & Wang, Y.-M. 2018. *Saponins from Sea Cucumber and Their Biological Activities*, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.

