



Norges miljø- og  
biovitenskapelige  
universitet

**Masteroppgave 2021 60 stp**

Fakultet for Kjemi, bioteknologi og matvitenskap

# **Analyse av antibakterielle komponenter fra ruccolasalatjuice**

Analysis of antibacterial compounds from rocket  
salad juice

**Helene Røisgård Kirkevold**

Bioteknologi

## Forord

Denne oppgaven er skrevet som en del av en toårig masterutdanning i Bioteknologi, fakultet for Kjemi, bioteknologi og matvitenskap (KBM) ved Norges miljø- og biovitenskapelige universitet (NMBU). Arbeidet i denne masteroppgaven ble utført ved Nofima AS i Ås fra september 2020 til juni 2021. Jeg vil rette en stor takk til ansatte på avdeling for Trygg og holdbar mat, samt avdeling for Råvare og prosess, som har hjulpet meg med det praktiske arbeidet og svart på alle spørsmål jeg har hatt. En spesiell takk til alle på avdeling for Trygg og holdbar mat, jeg har hatt en utrolig fin tid hos dere!

Jeg ønsker å rette en stor takk til veilederne mine på Nofima, Annette Fagerlund, Trond Møretro og Sileshi Gizachew Wubseth, dere har virkelig stilt opp og hjulpet meg, tross korona-relaterte utfordringer. Tusen takk Annette, du har virkelig stilt opp over all forvetning, med utrolig god oppfølging med både forsøk og skriving, til alle døgnetts tider. Jeg setter enormt stor pris på det! Tusen takk til Trond for alt du har lært meg, veldig gode innspill og hjelp gjennom hele perioden, og for gjennomlesing av oppgaven. Jeg vil også takke Sileshi for grundig opplæring av instrumenter, og veldig god oppfølging med den kjemiske delen av oppgaven.

Takk til veileder på NMBU, Dr. Dzung B. Diep.

Jeg vil gjerne få takke familie og mine nærmeste venner, dere har vært forståelsesfulle og en fantastisk støtte for meg. En veldig stor takk til min kjære Lars Martin for all kjærlighet, tålmodighet, støtte og motiverende ord gjennom hele perioden, og ikke minst for korrekturlesing av hele oppgaven.

Ås, 1. juni 2021

Helene Røisgård Kirkevold

Helene R. Kirkevold

## Sammendrag

*Listeria monocytogenes* er en matbåren patogen bakterie som utgjør en stor utfordring for næringsmiddelindustrien, og det søkes stadig etter nye metoder for å unngå forekomst av bakterien i produksjonsmiljø og matvarer. Spiseklare produkter med ferske, vegetabiliske råvarer utgjør en ekstra risiko når det gjelder forekomst av patogene mikroorganismer. Det er viktig med ny kunnskap om faktorer som kan påvirke forekomsten av *L. monocytogenes* og andre patogene bakterier i slike produkter. Prøvetaking av produksjonsmiljøet i en salatfabrikk i en tidligere studie viste ingen forekomst av *L. monocytogenes*, og førte videre til oppdagelse av en interessant antibakteriell aktivitet mot *L. monocytogenes* i ruccolasalatjuice (Fagerlund et al. 2021, PLoS ONE 16:e0250648). Hensikten med denne studien var å videre undersøke den antibakterielle aktiviteten i ruccolajuice mot *L. monocytogenes* og andre bakteriestammer assosiert med vegetabilier, samt å isolere og identifisere de bioaktive komponentene.

Tillaging av ruccolasalatjuice for bruk i arbeidet med oppgaven ble utført. Ruccolajuicen ble frysetørket, og ekstrahert med fem ulike ekstraksjonsmiddel. Revers fase HPLC ble brukt for å separere ruccolaekstraktet i åtte fraksjoner, og fraksjonene som viste bioaktivitet ble analysert i LC-MS/MS for å identifisere de kjemiske bestanddelene. Den hemmende aktiviteten i juice, ekstrakter og fraksjoner fra ruccola ble undersøkt med mikrobiologiske vekstforsøk, ved måling av absorbans og utplating. Fluorescensmikroskopi og utplating ble brukt for å undersøke den bakteriedrepende aktiviteten.

Resultatene viste at ruccolajuice hadde en antibakteriell effekt mot *L. monocytogenes*, i overensstemmelse med funn fra tidligere studie. Ruccolaekstrakt ekstrahert med 100 % metanol hadde høyere veksthemmende antibakteriell aktivitet enn andre ekstrakter mot *L. monocytogenes*. To av de totalt åtte HPLC fraksjonene isolert fra ruccolaekstrakt viste anti-*Listeria* aktivitet, og besto av aminosyrer, nukleosider, en nukleobase og den kvartære ammoniumsforbindelsen kolin. Både ruccolaekstrakt og bioaktive HPLC fraksjoner viste bakteriedrepende aktivitet mot *L. monocytogenes*. De to bioaktive HPLC fraksjonene hemmet også veksten av ni bakteriestammer assosiert med vegetabilier, mens tre av bakteriestammene ikke ble hemmet.

Resultatene indikerer at komponenter fra ruccolasalatjuice har en *in vitro* antibakteriell aktivitet mot *L. monocytogenes* og andre bakteriestammer assosiert med vegetabilier.

Komponenter i fraksjoner fra rucola som viste bioaktivitet ble identifisert, men videre undersøkelser kreves for å finne ut om det er disse komponentene som forårsaker den antibakterielle aktiviteten. Videre arbeid er nødvendig for å undersøke den molekylære mekanismen bak aktiviteten og for å etablere potensielle bruksområder i næringsmiddelindustrien.

## Abstract

*Listeria monocytogenes* is a foodborne pathogenic bacterium that poses a major challenge to the food industry, and new methods are constantly being sought to avoid the occurrence of the bacterium in processing facilities and food products. Ready-to-eat products with fresh ingredients from vegetables pose an additional risk of contamination with pathogenic microorganisms. It is important to gain new knowledge about factors that may affect the presence of *L. monocytogenes* and other pathogenic bacteria in fresh produce. Sampling of a fresh produce processing facility in a previous study failed to detect *L. monocytogenes*, and led to the discovery of an interesting antibacterial activity against *L. monocytogenes* in rocket salad juice (Fagerlund et al. 2021, PLoS ONE 16: e0250648). The purpose of this study was to further investigate the antibacterial activity of rocket salad juice against *L. monocytogenes* and other bacterial strains associated with vegetables, as well as to isolate and identify the bioactive components.

Preparation of rocket salad juice for use in the current study was performed. The rocket salad juice was lyophilized and extracted with five different extractants. Reverse phase HPLC was used to separate the rocket juice extract into eight fractions, and the fractions showing bioactivity were analyzed with LC-MS/MS to identify chemical constituents. The inhibitory activity in rocket salad juice, extracts and fractions was investigated by microbiological growth experiments by measuring absorbance and agar plating methods. Fluorescence microscopy and agar plating methods were used to examine the bactericidal activity.

The results showed that rocket salad juice had an antibacterial effect against *L. monocytogenes*, in accordance with findings from the previous study. Rocket salad extract extracted with 100% methanol had higher growth inhibitory antibacterial activity than other extracts against *L. monocytogenes*. Two of the total number of eight HPLC fractions isolated from rocket juice extract showed anti-*Listeria* activity, and consisted of amino acids, nucleosides, a nucleobase and the quaternary ammonium compound choline. Both rocket juice extract and bioactive HPLC fractions showed bactericidal activity against *L. monocytogenes*. The two bioactive HPLC fractions also inhibited the growth of nine bacterial strains associated with vegetables, while three of the bacterial strains were not inhibited.

The results indicate that components of rocket salad juice have an *in vitro* antibacterial activity against *L. monocytogenes* and other bacterial strains associated with vegetables.

Components in rocket fractions that showed bioactivity were identified, but further investigations are required to determine if these components are responsible for the antibacterial activity. Further work is needed to investigate the molecular mechanism behind the activity and to establish potential uses in the food industry.

## Forkortelser

ANOVA	Variansanalyse
BHI	Brain heart infusion
CFU	Kolonidannende enheter (colony forming units)
DAD	Diode array detector
dH <sub>2</sub> O	Destillert vann (sterilt)
EDTA	Etylendiamintetraeddiksyre
ESI	Elektrosprayionisering
<i>g</i>	Sentrifugeringskraft
g	Gram
HPLC	Væskerkromatografi (high-performance liquid chromatography)
HTM	Hsiang-Ning Tsai medium
L	Liter
LC-MS	Væskerkromatografi massespektrometri (liquid chromatography mass spectrometry)
LC-MS/MS	Væskerkromatografi tandem-massespektrometri
m	Milli (10 <sup>-3</sup> )
M	Molar (mol per liter)
<i>m/z</i>	Masse/ladning (mass-to-charge ratio)
min	Minutt(er)
MM	Mineral medium
MWB	Modified Welshimer's broth
n	Nano (10 <sup>-9</sup> )
OD	Optisk tetthet (optical density)
p	Pico (10 <sup>-12</sup> )
ppm	Deler per million (parts per million)
rpm	Omdreininger per minutt (revolutions per minute)
RT	Retensjonstid
TOF	Time of flight
TSB	Tryptone Soya Broth
UV	Ultrafiolett
Vis	Synlig lys
Å	Ångstrøm (lengdeenhet 10 <sup>-10</sup> m)
μ	Mikro (10 <sup>-6</sup> )

# Innholdsfortegnelse

Forord

Sammendrag

Abstract

Forkortelser

<b>1</b>	<b>Innledning</b>	<b>1</b>
1.1	<i>Listeria monocytogenes</i>	1
1.2	Listeriose	1
1.3	<i>L. monocytogenes</i> i produksjonsmiljø for næringsmidler	2
1.4	<i>L. monocytogenes</i> i spiseklare produkter med ferske, vegetabiliske råvarer	3
1.5	Bruk av naturlige antimikrobielle midler mot <i>L. monocytogenes</i>	4
1.6	Antimikrobielle komponenter fra planter	5
1.7	Brassicaceae familien	6
1.7.1	Glukosinolater	7
1.7.2	Isotiocyanater	7
1.8	Ruccolasalat ( <i>Eruca sativa</i> )	8
1.9	Hensikt og målsetning	10
<b>2</b>	<b>Materialer</b>	<b>11</b>
2.1	Kjemikalier og kit	11
2.2	Teknisk utstyr	12
2.3	Bakteriestammer	13
2.4	Oppskrifter på vekstmedier og løsninger	14
<b>3</b>	<b>Metoder</b>	<b>15</b>
3.1	Tillaging og ekstrahering av ruccolajuice	15
3.1.1	Produksjon av råjuice	15
3.1.2	Frysetørring av juice	15
3.1.3	Ekstrahering av frysetørket juice	15
3.2	HPLC separering av ekstrakter	16
3.2.1	Prøvepreparering til revers fase HPLC	17
3.2.2	Revers fase HPLC av tørreksrakter fra ulike ekstraksjonsmidler	17
3.2.3	Revers fase HPLC med fraksjonering av 100 % metanolekstrakt	18
3.3	Oppbevaring og dyrking av bakterier	19



3.3.1	Frysestokk av <i>L. monocytogenes</i> .....	19
3.3.2	Overnattkultur av <i>L. monocytogenes</i> .....	19
3.3.3	Bestemmelse av bakterietall i overnattkultur .....	19
3.4	Definert medium for <i>L. monocytogenes</i> .....	19
3.5	Undersøkelse av veksthemmende aktivitet ved utplating.....	24
3.6	Undersøkelse av veksthemmende aktivitet i Bioscreen C.....	24
3.6.1	Fremstilling av dose-respons kurver.....	27
3.6.2	Undersøkelse av veksthemming med HPLC fraksjoner mot 12 ulike bakteriestammer .....	27
3.7	Undersøkelse av bakteriedrepende aktivitet ved utplating.....	28
3.8	Undersøkelse av bakteriedrepende aktivitet ved fluorescensmikroskopi .....	29
3.9	LC-MS/MS .....	30
<b>4</b>	<b>Resultater .....</b>	<b>32</b>
4.1	Tillaging av ruccolajuice og innledende test av antibakteriell aktivitet .....	32
4.2	Etablering av et definert vekstmedium for <i>L. monocytogenes</i> .....	34
4.3	Uttesting av ekstraksjonsmidler for frysetørket ruccolajuice.....	39
4.3.1	HPLC-analyse av ekstrakter fra ruccolajuice .....	40
4.3.2	Mikrobiologisk analyse av ekstrakter fra ruccolajuice .....	40
4.4	Isolering av fraksjoner fra ruccolaekstrakt.....	42
4.5	Anti- <i>Listeria</i> aktivitet i fraksjoner fra HPLC .....	44
4.6	Karakterisering av bakteriedrepende aktivitet mot <i>L. monocytogenes</i> .....	46
4.7	Antibakteriell aktivitet i fraksjoner fra HPLC mot 12 bakteriestammer .....	49
4.8	Identifisering av komponenter med LC-MS/MS.....	53
<b>5</b>	<b>Diskusjon.....</b>	<b>56</b>
5.1	Anti- <i>Listeria</i> aktivitet i juice, ekstrakter og fraksjoner fra ruccolasalat.....	56
5.2	Antibakteriell aktivitet mot bakteriestammer assosiert med vegetabilier .....	59
5.3	Identifisering av antibakterielle komponenter i HPLC fraksjoner.....	61
5.4	Ekstrahering og separering av ruccolaekstrakt .....	63
5.5	Potensiell nytteverdi .....	66
<b>6</b>	<b>Konklusjon og videre arbeid.....</b>	<b>68</b>
<b>7</b>	<b>Referanseliste.....</b>	<b>70</b>

## Vedlegg 1-4

# 1 Innledning

*Listeria (L.) monocytogenes* er en patogen bakterie som er vidt utbredt i miljøet, som ofte koloniserer matproduksjonsmiljøer, og videre kan være kilde til kontaminering av næringsmidler. Ferske, vegetabiliske produkter utgjør en ekstra risiko når det gjelder patogene mikroorganismer, da de ikke gjennomgår varmebehandlingsprosess eller lignende elimineringsmetoder for å inaktivere patogene mikroorganismer.

## 1.1 *Listeria monocytogenes*

Slekten *Listeria* består av totalt 20 ulike arter (Nwaiwu, 2020), og inkluderer den humanpatogene arten *L. monocytogenes* (Orsi & Wiedmann, 2016). *L. monocytogenes* er en Gram-positiv, stavformet, bevegelig og ikke-sporedannende bakterie. *L. monocytogenes* er en vidt utbredt bakterie i naturen, og har blant annet blitt isolert fra jord, planterester, fôr, vann, kloakk og avføring fra mennesker og dyr. Det er en robust bakterie som raskt kan respondere på endrede miljøbetingelser (VKM et al., 2018). *L. monocytogenes* kan vokse i temperaturområdet -0,4 til 50 °C, ved høye saltkonsentrasjoner (10 % NaCl) og ved et bredt pH-område (4,7 til 9,2) (Farber & Peterkin, 1991; Ferreira et al., 2014). Den optimale veksttemperaturen er 30-37 °C (Farber & Peterkin, 1991). Bakterien er fakultativt anaerob, som gjør at den kan vokse i matvarer pakket med vakuum og i modifisert atmosfære (VKM et al., 2018). Bakterien er også en av få som kan vokse ved en lav vannaktivitet ( $a_w$ ), fra en verdi på 0,92 og oppover (Yousefi et al., 2020). Den vide tilstedeværelsen og evnen til å tilpasse seg gjør bakterien til en stor utfordring for næringsmiddelindustrien, da den overlever godt i miljøer for matproduksjon og i kjølelagrede matprodukter (VKM et al., 2018).

## 1.2 Listeriose

*L. monocytogenes* forårsaker sykdommen listeriose som kan gi alvorlig sykdom hos spesielle risikogrupper, som gravide og deres fostre, eldre og immunsupprimerte personer (Schuchat et al., 1991). For friske personer er bakterien ikke farlig, og 1-5 % av befolkningen kan til en hver tid være bærer av *L. monocytogenes* (VKM et al., 2018). Innen arten *L. monocytogenes* er det hovedsakelig serotypene 1/2a, 1/2b og 4b som forårsaker sykdom hos mennesker (VKM et al., 2018; Yousefi et al., 2020). Listeriose anses som en alvorlig sykdom med en høy dødsrate (20-30 %) (Swaminathan & Gerner-Smith, 2007). I Norge og mange andre land blir det gitt helseråd til grupper i befolkningen som er spesielt utsatt for sykdommen (VKM et al., 2018).

Bakterien har forårsaket en rekke utbrudd verden over knyttet til ulike næringsmidler. *L. monocytogenes* inaktiveres ved varmebehandling, så utfordringen ligger ofte i produkter som er beregnet å spise uten ytterligere varmebehandling, og hvor bakterien kan oppformeres under lagring (Farber & Peterkin, 1991). Eksempler på kontaminerte produkter som har forårsaket utbrudd er kjøttpålegg, bløte oster, røkt og gravet laks, og i senere tid ferdig oppskåret frukt og grønnsaker, melon og bønnespirer (Ferreira et al., 2014; VKM et al., 2018).

### 1.3 *L. monocytogenes* i produksjonsmiljø for næringsmidler

Forurensing med *L. monocytogenes* i matprodukter skjer oftest gjennom krysskontaminering fra overflater i produksjonsanlegg til matproduktet (Fagerlund, Langsrud, et al., 2021). Siden *L. monocytogenes* er en vidt utbredt bakterie i naturen, kan den komme inn i produksjonsmiljøet gjennom ruter som utstyr, råvarer og menneskelig trafikk. *L. monocytogenes* som har kommet inn i miljøet kan kolonisere prosessanleggets miljø og utstyr, og etablere seg i nisjer i produksjonslokalet. *L. monocytogenes* er ofte tilstedeværende i ulike produksjonsmiljøer for næringsmidler, og enkeltstammer kan overleve i produksjonsmiljøet i årevis (Ferreira et al., 2014; Garner & Katheriou, 2016). Bakterien kan feste seg til ulike overflater, som rustfritt stål, glass og teflon (Ferreira et al., 2014). Dårlig utstyrsdesign, anleggsdesign, akkumulering av fuktighet og slitt eller ødelagt utstyr kan resultere i oppsamlinger og biofilm av *L. monocytogenes*, der tradisjonelle rengjørings- og desinfiseringsprosedyrer ikke alltid er tilstrekkelig (Gray et al., 2018). Etablering av biofilm kan føre til at *L. monocytogenes* blir en del av husfloraen, og bli en varig kilde til kontaminasjon under prosessering, også i produkter som gjennomgår et tidligere varmebehandlingstrinn (VKM et al., 2018). Den øvrige mikrofloraen tilstedeværende i produksjonsanlegg kan påvirke veksten av *L. monocytogenes*. Noen mikroorganismer kan være konkurrerende, og undertrykke veksten til *L. monocytogenes*, mens andre kan øke spredning og overlevelse av bakterien (Fagerlund, Langsrud, et al., 2021). Temperatur er en faktor som gjør *L. monocytogenes* ekstra utfordrende for næringsmiddelindustrien, da den kan overleve og vokse ved kjøletemperaturer i produksjonsmiljøet, og oppformere seg utover i holdbarhetstiden til matproduktet under kjølelagring. I mange studier er lagringstemperatur indikert som viktigste parameter som påvirker lengden av lag-fasen og veksthastigheten til *L. monocytogenes* (VKM et al., 2018).

I mange utbrudd med listeriose har hovedårsaken blitt antatt å være forurensning fra *L. monocytogenes* som har etablert seg i produksjonsanlegget (Ferreira et al., 2014). Forekomsten av *Listeria* i produksjonsmiljøer for matprodukter som utgjør en fare for listeriose, overvåkes nøye ved bruk av ulike kontrollmetoder. Virksomheter som produserer spiseklare produkter må ha gode rutiner for å kontrollere forekomst av *L. monocytogenes* i både produksjonslokaler og på matprodukter. For å sikre at produkter ikke inneholder uakseptable mengder *L. monocytogenes*, er det i Norge flere krav beskrevet i regelverk for virksomheter, blant annet i næringsmiddelhygieneforskriften (Mattilsynet, 2013). Norge, EU og flere andre land har en øvre grense på 100 CFU g<sup>-1</sup> i spiseklare matvarer innenfor holdbarhetstiden, og 0 CFU ml<sup>-1</sup> i produkter beregnet for små barn eller personer med visse medisinske tilstander (Jørgensen et al., 2020). Kravene for produsenter av spiseklare produkter går ut på å vurdere *Listeria* i fareanalysen til bedriften, og ha effektive styringstiltak for å kontrollere tilførsel og vekst av *Listeria* i produktene. Dette innebærer rutiner for å sikre at utstyret er utformet slik at det er mulig å rengjøre og desinfisere, ha egnede renholdsrutiner for utstyret og kontrollere renholdet med kontrollprøver. Det er også krav om å ha en prøvetakingsplan for *Listeria*, slik at korrigerende tiltak kan utføres ved utilfredsstillende resultater, og at resultatene kan overvåkes over tid. Gode rutiner for sporbarhet og tilbaketrekking av produkter er også et viktig krav (Mattilsynet, 2013).

#### 1.4 *L. monocytogenes* i spiseklare produkter med ferske, vegetabilske råvarer

Global produksjon og konsum av ferske, vegetabilske næringsmidler har økt de siste årene. Det er generelt en høy etterspørsel etter spiseklare (RTE, ready-to-eat) produkter av salat, grønnsaker og frukt, da det er praktisk og næringsrik mat (Olaimat & Holley, 2012). I takt med et økt forbruk har matbårne sykdomsutbrudd assosiert med ferske, vegetabilske produkter økt (VKM et al., 2018). Utbrudd og enkelttilfeller med listeriose har vært forårsaket av for eksempel ferdigpakket salatblanding, fryst grønnsaksblanding, tacosalat, fruktsalat, cantaloupe-melon, rå brokkoli og blomkål, og epler med karamelltrekk (Lin et al., 2000; VKM et al., 2018). Utbrudd forårsaket av *L. monocytogenes* er likevel uvanlig sammenlignet med andre næringsmiddelgrupper, som kjøtt- og fiskeprodukter (VKM et al., 2018). *L. monocytogenes* er vidt utbredt i produksjonsmiljø for kjøtt, fisk og meieri (Ferreira et al., 2014). Fra fabrikker med ferske vegetabilske råvarer er det mindre data om forekomsten av *L. monocytogenes* (Smith et al., 2018).

Ulike spiseklare salatprodukter varierer med hensyn til deres evne til å støtte veksten av *L. monocytogenes*. Vegetabiliske råvarer omfatter en stor og variert gruppe produkter med tanke på pH, vannaktivitet, konkurrerende bakterieflora, dyrking, høsting, videre prosessering, holdbarhet, lagringsbetingelser og geografisk opprinnelse. Undersøkelser over forekomsten av *L. monocytogenes* i vegetabilier viser gjennomgående at det er en lav prevalens av *L. monocytogenes* (<1 – 10 %). I enkelte produkter er det funnet høyere verdier (> 20 %), samt en høyere prevalens i oppskårede produkter enn i tilsvarende intakte produkter (VKM et al., 2018).

Prosessering av ferske vegetabiliske varer som salatblandinger, kan omfatte sortering, vasking, voksing, behandling med fungicider og antimikrobielle forbindelser, og tørking (VKM et al., 2018). Vask av ferske råvarer etter innhøsting er en viktig metode for å redusere risikoen for forurensing. Ved prosessering av vegetabilier, som kutting og skrelling, øker risikoen for kontaminering med mikroorganismer (Farber & Peterkin, 1991). Spesielt blanding av ulike typer salat, grønnsaker, frukt og animalske næringsmidler kan gi en økt risiko for krysskontaminering mellom komponentene (VKM et al., 2018). I noen utbrudd har forurensingen av *L. monocytogenes* vist seg å komme fra produksjonsmiljø og utstyr under prosessering (Garner & Katheriou, 2016), men hovedandelen av kontaminasjon kan spores tilbake til før og under innhøsting (VKM et al., 2018). Videre er lagringstemperatur og forekomsten av konkurrerende bakterieflora viktige faktorer som påvirker veksten til *L. monocytogenes* i vegetabiliske produkter (VKM et al., 2018). Alternative teknologier som kan brukes for å unngå patogene mikroorganismer på ferske vegetabiliske råvarer, i tillegg til vasking, er blant annet bestråling, ozon, bruk av bakteriofager, antagonistiske bakterier og en kombinasjon av antagonistiske bakterier og bakteriofager (Olaimat & Holley, 2012).

### 1.5 Bruk av naturlige antimikrobielle midler mot *L. monocytogenes*

Det søkes og utvikles stadig nye metoder for å hindre forekomsten av *L. monocytogenes* i produksjonsmiljø og i matvarer. Bruk av naturlige antimikrobielle stoffer fra planter er et område som har stort potensiale som biokontrollmetode, der bruksområder kan omfatte nye konserveringsmidler eller supplement til de som allerede brukes, nye emballasjemetoder eller som desinfeksjon i produksjonsmiljøet (Ceruso et al., 2020). Noen metoder med potensiale for å hindre biofilmdannelse med *L. monocytogenes* i produksjonsmiljøet er beskrevet av Gray et al. (2018): bakteriofager, bruk av konkurrerende bakteriearter (antagoniststammer), bakteriosiner, endolysiner og forbindelser fra planter (eteriske oljer).

Det er en generell økt interesse for naturlige tilsetningsstoffer i matvarer, drevet av forbrukernes bekymringer om helserelaterte problemer knyttet til bruk av syntetiske antimikrobielle midler (Ceruso et al., 2020; Irkin & Esmer, 2015). Oppdagelse av nye naturlige antimikrobielle midler fra planter har potensiale for å hindre forekomst av *L. monocytogenes* i matvarer. Ceruso et al. (2020) oppdaget 12 nye planteekstrakter som hemmet veksten av *L. monocytogenes*, og en stor mengde planteekstrakter og deres effekt er ennå ikke studert. Eteriske oljer fra planter har vist å ha anti-*Listeria* effekt i blant annet kjøttprodukter (Yousefi et al., 2020). Videre blir nye metoder for emballering undersøkt, enten ved utvikling av sterile emballasjemetoder (Ferreira et al., 2014) eller ved å kombinere antimikrobielle midler med ulike typer emballasjemateriale (Irkin & Esmer, 2015). Biologiske komponenter som bakteriosiner, planteekstrakt, fytokjemikalier og enzymer har vist potensiale for bruk i emballasje (Irkin & Esmer, 2015). Tilsetningsstoffer som er utvunnet fra planter må møte kravene for mattrygghet, samtidig som det ikke har negativ effekt på nærings- eller sensoriske egenskaper ved maten. Identifisering og bruk av naturlige antimikrobielle stoffer, og karakterisering med tanke på sikkerhet, spesifisitet og effekt er sentrale mål for både næringsmiddel- og medisinsk forskning (Pisoschi et al., 2018).

## 1.6 Antimikrobielle komponenter fra planter

Planter har et naturlig forsvarssystem for å beskytte seg mot frie radikaler, virus, bakterier og sopp, samt insekter og planteetere (Barbieri et al., 2017; Cowan, 1999). Forsvaret innebærer alt fra mekanisk beskyttelse, produksjon av antimikrobielle proteiner, peptider (Tam et al., 2015), enzymer eller kjemiske komponenter (Barbieri et al., 2017). I tillegg bruker noen planter fettsyrederivater, aminosyrer og peptider som forsvar, men dette innebærer ikke planter som brukes til mat og fôr (Hyllin, 1969). Antimikrobielle egenskaper i planter skyldes oftest komponenter syntetisert i den sekundære metabolismen (Dahiya & Purkayastha, 2012).

Planter inneholder en rekke kjemiske stoffer som betegnes under samlenavnet sekundære metabolitter (UiO, 2011), også omtalt som fytokjemikalier. Fytokjemikalier kan klassifiseres ut fra kjemisk struktur: alkaloider, svovelholdige fytokjemikalier, terpenoider og polyfenoler (Barbieri et al., 2017; Khameneh et al., 2019). Fytokjemikalier forekommer naturlig i planter, og bidrar ofte til farge, smak, aroma og tekstur (Barbieri et al., 2017; Cowan, 1999). Mange fytokjemikalier har verdifulle nærings-, medisinske- og helsefremmende egenskaper (Melrose, 2019). Det er tre hovedgrupper sekundærmetabolitter knyttet til planters

forsvarssystem: terpenier, fenoler og nitrogenforbindelser. Sistnevnte inkludert blant annet glukosinolater, alkaloider og cyanogene glykosider (UiO, 2011).

Den antimikrobielle aktiviteten til fytokjemikalier er et kjent fenomen (Barbieri et al., 2017). For eksempel har medisinske planter vært viktig i tusenvis av år (Mahady et al., 2008), og diverse planter har også vært viktig for tradisjonell konservering av mat (Melrose, 2019). Forbindelsene forekommer i stor grad i blant annet frukt, grønnsaker, belgfrukter, frø, urter og krydder, samt plantebaserte drikker som te og vin (Barbieri et al., 2017).

Det har blitt foreslått flere mekanismer for bioaktiviteten som er observert for fytokjemikalier fra planter. Stoffene kan forårsake skade på bakteriemembranen, undertrykke virulensfaktorer, inkludert enzymer og toksiner, og inhibere dannelsen av biofilm (Barbieri et al., 2017). Ekstrakter fra medisinske planter har blitt testet opp mot hundrevis av bakteriearter *in vitro*, og mange er aktive mot et bredt spekter av Gram-positive og Gram-negative bakterier (Mahady et al., 2008), der Gram-negative bakterier har vist seg å være mer motstandsdyktige mot sekundære metabolitter fra planter enn Gram-positive bakterier (Bouarab Chibane et al., 2019; Pisoschi et al., 2018).

Ulike metoder, som kaldpressing, tradisjonell destillering og løsemiddelekstraksjon, for ekstrahering og rensing benyttes for å trekke ut eteriske oljer eller andre kjemiske komponenter fra planter (Gray et al., 2018). Ekstrakter og eteriske oljer fra planter inneholder ulike bioaktive forbindelser (Pisoschi et al., 2018). Rundt 300 eteriske oljer er tilgjengelig som tilsetningsstoff i mat, for holdbarhet, farge eller smak. Et vanlig problem med bruk av slike oljer som biokontrollmetode i matvarer, er at det påvirker smaken ved de konsentrasjonene som kreves for antimikrobiell effekt (Gray et al., 2018).

## 1.7 Brassicaceae familien

Brassicaceae (korsblomstfamilien) er en plantefamilie under ordenen Brassicales (korsblomstordenen), og er planter kjent for å inneholde en rekke antimikrobielle stoffer. Brassicaceae er en stor plantefamilie på rundt 375 slekter og 3200 arter som inkluderer kulturplanter, pryddplanter og ugress. Kulturplantene omfatter blant annet raps, kål, blomkål, brokkoli, grønnkål, ulike sennepsplanter og bladgrønnsaker (Ahuja et al., 2011).

### 1.7.1 Glukosinolater

Et karakteristisk trekk med arter innen Brassicaceae familien er produksjonen av glukosinolater, også kalt sennepsoljegykosider, en undergruppe av fytokjemikalier fra planter (Barbieri et al., 2017). Glukosinolatene utgjør en stor gruppe ikke-flyktige og svovelholdige sekundære plantemetabolitter, som spiller en viktig rolle i plantens forsvar mot bakterier, sopp og virus (Ahuja et al., 2011). Disse svovelholdige kjemikaliene gir en karakteristisk sterk smaksprofil til disse grønnsakene, i form av en besk og bitter smak. Glukosinolater er blant annet en av komponentene ansvarlig for den antimikrobielle effekten i sennepsfrø. Sennepsfrø var fundamentalt viktig for å konservere mat i tidligere tider, og blader, frø og røtter har også blitt brukt i tradisjonell medisin i generasjoner (Melrose, 2019).

Glukosinolater blir dannet fra aminosyrer, og blir delt inn i tre grupper basert på hvilken aminosyregruppe de stammer fra: alifatiske, indole, og aromatiske glukosinolater. Glukosinolater blir lagret i konsentrert form i frø, og inngår som komponenter i stilken og bladene til disse plantene (Melrose, 2019). Glukosinolater er stabile og vannløselige forbindelser, men hydrolyseres til andre forbindelser ved kontakt med enzymet myrosinase (Dufour et al., 2015). Blant annet har planteartene rucola, brokkoli, kål, kålrot, hvit og gul sennep, wasabi og pepperrot et høyt innhold av glukosinolater. Rundt 130 glukosinolater er identifisert fra planter, blant annet glukosinolatene singrin og glukorafanin (Melrose, 2019).

Glukosinolat har bruksområder innen biomedisin (antibiotika, soppdrepende og antiviralt middel), men er også lovende for biofilmforebygging i utstyr til produksjonsanlegg, eller som bestanddel i emballasje for å forbedre holdbarheten til matvare (Melrose, 2019).

### 1.7.2 Isotiocyanater

Når plantevev blir skadet, frigjøres glukosinolater, som videre hydrolyseres via enzymet myrosinase til svovel, nitriler, tiocyanater og isotiocyanater (sennepsolje) (Melrose, 2019). Isotiocyanater er flyktige stoffer som har en antibakteriell effekt på en rekke patogene mikroorganismer i lave konsentrasjoner (Barbieri et al., 2017). Hos mennesker er forbindelsen kjent for å ha mange helsemessige fordeler (Melrose, 2019).

Allyl isotiocyanat er et flyktig stoff med begrenset vannløselighet avdampet fra isotiocyanat, som dannes fra glukosinolaten singrin. Stoffet har en potent baktericid aktivitet mot ulike patogene mikroorganismer, inkludert *L. monocytogenes*, også ved bruk på ulike vegetabilske



råvarer (Lin et al., 2000). Bruk av isotiocyanater som antimikrobielt middel er ofte forbundet med flyktighet og sterk lukt, noe som svekker dens bruksområder (Dufour et al., 2015). Bruk av allyl isotiocyanat er godkjent i Japan for konservering av mat, forutsatt at den har en naturlig plantekilde (Dufour et al., 2015; Lin et al., 2000). Kapsler som langsomt frigjør allyl isotiocyanat som gass er utviklet for bruk i industrien som antibakterielt middel, middel for å maskere lukt og som insektmiddel (Lin et al., 2000).

### 1.8 Ruccolasalat (*Eruca sativa*)

Ruccolasalat er en plante innen plantefamilien Brassicaceae, som er kjent for et høyt innhold av antimikrobielle stoffer. Ruccolablader konsumeres ofte rå, som ingrediens i salatblandinger eller som garnityr til ulike matretter. Salaten har en karakteristisk smak som kan beskrives som kraftig, sterk, pepperaktig, bitter og søt. Hovedandelen av artene som kultiveres på verdensbasis heter *Eruca sativa* og *Diplotaxis tenuifolia*. Smak og næringssammensetning kan variere mellom ulike kultiverte varianter (Bell & Wagstaff, 2019). Ruccola har et svært høyt innhold av glukosinolater og flavonoler, som har mange helsefremmende egenskaper (Bell et al., 2015). Ruccola og olje fra ruccolafrø er også mye brukt i tradisjonell medisin, som behandling til ulike tilstander, blant annet som vanndrivende middel og middel mot nyresykdommer (Sarwar Alam et al., 2007).

Ruccolasalat inneholder en rekke fytokjemikalier. Det er blant annet identifisert 13 glukosinolater, 11 flavonolkomponenter og tre isotiocyanater (sulforafan, iberin og erucin) (Bell et al., 2015; Villatoro-Pulido et al., 2013). Forbindelser som er funnet i ekstrakter fra ruccolablader er blant annet steroider, terpenoider, tanniner (garvestoff), diterpener, glykosider, kumarin, polyfenoler, alkaloider, flavonoider og fytosteroler (Sadiq et al., 2014). Flavonoider, alkaloider og terpenoider er kjent for å ha antimikrobiell aktivitet, ved å forårsake forstyrrelse av membranfunksjon og struktur, eller forstyrrelse av DNA/RNA syntese og funksjon (Melrose, 2019).

Studier som har undersøkt *in vitro* antibakteriell aktivitet i ruccolasalat har rapportert varierende resultater. Ekstrakt fra ruccolasalat viste ingen antimikrobiell effekt i Ombra et al. (2017). Ruccolaekstrakt ble her fremstilt fra ruccola ved utgangen av holdbarheten, og ble testet *in vitro* opp mot de patogene artene *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* og *Pseudomonas aeruginosa*. En studie av Doulgeraki et al. (2017) testet effekten av ruccolasalat ekstrakt mot meticillin resistent *Staphylococcus aureus* (MRSA), og det ble

observert en hemmende effekt tidlig i vekstfasen til bakterien. Studien konkluderte likevel med at det ikke var en signifikant antibakteriell effekt. En nylig studie av Fagerlund, Wubshet, et al. (2021) undersøkte effekten av ruccolasalatjuice mot *L. monocytogenes*, og det ble identifisert en antibakteriell aktivitet mot *L. monocytogenes*. Det ble gjenfunnet en signifikant bioaktivitet i ekstrakt fra tørket ruccolasalatjuice, og videre i en kromatografisk fraksjon.

## 1.9 Hensikt og målsetning

Prøvetaking av produksjonsmiljøet i en salatfabrikk, og videre *in vitro* forsøk med salat og *L. monocytogenes*, førte til at Fagerlund, Wubshet, et al. (2021) oppdaget en interessant antibakteriell aktivitet i ruccolasalatjuice.

Den overordnede hensikten med denne oppgaven var videre undersøkelse av antibakteriell aktivitet i ruccolasalatjuice, som tidligere var observert av Fagerlund, Wubshet, et al. (2021). Dette for å få en større forståelse av den antibakterielle aktiviteten til ruccolasalat, med hensyn til både dose-avhengighet, spesifisitet og bakteriedrepende aktivitet, samt hvilke komponenter som forårsaker aktiviteten. Målet var å isolere og identifisere de bioaktive bestanddelene fra ruccolasalatjuicen ved bruk av ekstrahering, HPLC og LC-MS/MS. Den antibakterielle og bakteriedrepende aktiviteten fra bestanddeler av ruccolasalatjuice skulle undersøkes opp mot *L. monocytogenes*. Antibakteriell aktivitet skulle også testet mot andre bakteriestammer assosiert med vegetabilier.

### **Delmålene i denne studien var som følger:**

- Lage ruccolasalatjuice, og undersøke om det er tilsvarende antibakteriell aktivitet som i tidligere arbeid
- Frysetørke ruccolasalatjuice, og finne optimalt ekstraksjonsmiddel med tanke på antibakteriell aktivitet
- Utvikle et definert medium for *L. monocytogenes* som kan brukes i forsøk som undersøker anti-*Listeria* aktivitet
- Isolere fraksjoner av den tørkede ruccolasalatjuicen ved hjelp av HPLC, og identifisere fraksjon(er) som har hemmende aktivitet på *L. monocytogenes* ved hjelp av mikrobiologiske vekstanalyser
- Undersøke om HPLC fraksjoner har antibakteriell aktivitet mot andre bakterier, inkludert både patogene og apatogene arter assosiert med vegetabilier
- Undersøke om komponenten har bakteriedrepende (baktericid) aktivitet mot *L. monocytogenes*
- Identifisere kjemiske bestanddeler ved LC-MS/MS av fraksjoner fra HPLC som viste anti-*Listeria* aktivitet

## 2 Materialer

### 2.1 Kjemikalier og kit

Kjemikalier	Produktnummer	Leverandør
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1.01217.1000	Merck
4-Aminobenzosyre	6930	Fluka analytical
Acetonitril	83640.320	VWR
BHI	CM1135	Oxoid
BHI agar	CM1136	Oxoid
Biotin	B4639-500MG	Sigma
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	239216-100G	Sigma
D-Leucin	855448-10G	Sigma
D-Metionin	M9375-25G	Sigma
D(+)-glukose-monohydrat	1.04074.1000	Merck
dH <sub>2</sub> O		Purelab option ELGA, Bionordica
EDTA	20301.290	VWR
Etanol	600068	Antibac
Etyl acetat	1.09623.2500	Emsure
FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	236489-100G	Sigma
Gjærekstrakt	LP0021	Oxoid
Glycerol		Sigma
HCl		Merck
Isopropanol	600079	Antibac
Jern(III)citrat	283814C	VWR
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.04873.1000	Merck
Kobalamin	V6629-100MG	Sigma
L-Arginin·HCl	11039-100G	Sigma
L-Cystein	C8755-100G	Sigma
L-Glutamin	G8540-25G	Sigma
L-Histidin HCl·H <sub>2</sub> O	H5659-100G	Sigma
L-Isoleucin	W527602-100G	Sigma
L-Tryptofan	T-0254	Sigma
L-Valin	94619-25G	Sigma
Lipoinsyre	T5625-1G	Sigma
LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kit	L13152	Thermo fisher
Maursyre (Formic acid)	94318-250ML-F	Fluka analytical
MEM Amino Acids Solution (50X) liquid	11130051	Gibco
MEM Vitamin Solution (100X) liquid	11120052	Gibco
Metanol	1.06009.1000	Emsure
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1.05886.1000	Emsure
Milli-Q vann		Merck KGaA (rensesystem)
MOPS natriumsalt	M9381-250G	Sigma
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	1.06580.1000	Emsure
NaOH		Merck
NaCl		Merck
Niacin	N0761-100G	Sigma
Pyridoxin	P9755-25G	Sigma
Riboflavin	R4500	Sigma
Tiamin	T4625	Sigma
Trace Metal Mix A5 with Co	92949	Millipore
TSB	CM0129	Oxoid

## 2.2 Teknisk utstyr

Utstyr	Modell	Produsent
96-brønners mikrotiterplate med lokk	#353072	Falcon
Autoklav	Certoclav A-4050 Traun	Certoclav
Bioscreen	Bioscreen C	Oy growth curves
Block heater	SBH130D/3	Stuart
Eppendorfrør 1,5 mL		Eppendorf
Falcon rør 15 mL og 50 mL		Falcon
Flameboy	Flameboy	Integra Biosciences
Fluorescensmikroskop med kamera	DM6000B (mikroskop) DMC 4500 (kamera)	Leica
Frysetørke (liten)	Alpha 1-2 L0 plus	Christ Gamma
Frysetørke (stor)	1-16 LSC plus	Christ Gamma
Gulvsentrifuge	RC5c plus. Rotor SLA 1500	Sorvall
Gulvsentrifuge	Avanti J-26 XP. Rotor JA-14	Beckman Coulter
Honeycomp plate (Bioscreen)	Honeycomb plate 2	Oy growth curves
HPLC instrument	Dionex Ultimate 3000 series	Thermo Scientific
Kolonne HPLC	Thermo Betasil C18, 250 x 10 mm i.d., 10 µm partikkelstørrelse	Thermo Scientific
Kolonne LC-MS/MS	Phenomenex Luna omega C18, 100Å, 250 x 4,6 mm, 3 µm partikkelstørrelse	Phenomenex
Parafilm	Parafilm "M"	Pechiney plastic packaging
pH meter	MeterLab PHM210	Radiometer analytical
Pipetter	Finnpipette	Thermo scientific
Prøvekonsentrator	SBHCONC/1	Stuart
Råsaftsentrifuge		OBH Nordica
Sentrifuge	Heraeus multifuge 4KR. Rotor Sorvall heraeus 75006475.	Thermo Scientific
Sprøytefilter 0,22 µm	Millex-GS, MF-millipore MCE membran	Millipore
Sprøytefilter 0,45 µm	Millex-HV, hydrophilic PVDF	Millipore
Sterilbenk	HERAguard ECO	Thermo scientific
Vakuumsitreringsenhet 0,22 µm med vakuumpumpe	Nalgene rapid flow, 596-4520	Thermo scientific
Mikrovekt	XPR10	Mettler Toledo
Vortexer	Vortex genie 2	Scientific Industries

## 2.3 Bakteriestammer

Bakteriestammen som ble brukt var *Listeria monocytogenes* MF1509 Scott A serotype 4b, som er en klinisk isolert stamme (Briers et al., 2011). Stammen ble isolert fra et listerioseutbrudd med kontaminert melk i Massachusetts, USA, i 1983. Stammen er anskaffet fra International Life Sciences Institute (ILSI) sin stammesamling.

Øvrige bakteriestammer som ble brukt er listet i Tabell 1. Bakteriene ble isolert fra en salatfabrikk i Norge etter prøvetaking som beskrevet i Fagerlund, Wubshet, et al. (2021).

**Tabell 1** Bakteriestammer isolert fra salatfabrikk som beskrevet i Fagerlund, Wubshet, et al. (2021).

Nofima stammenummer (MF)	Stamme
6442	<i>Arthrobacter</i> sp.
6067	<i>Bacillus cereus</i> group sp.
6428	<i>Janthinobacterium</i> sp.
6511	<i>Microbacterium</i> sp.
6514	<i>Micrococcus</i> sp.
6122	<i>Pseudomonas</i> sp.
6124	<i>Pseudomonas</i> sp.
6125	<i>Pseudomonas</i> sp.
6543	<i>Rhodococcus erythropolis</i>
6501	<i>Serratia</i> sp.
6123	<i>Sphingomonas</i> sp.

## 2.4 Oppskrifter på vekstmedier og løsninger

Alle medier nedenfor ble autoklavert ved 121 °C i 15 minutter.

1. **BHI** (Brain Heart Infusion) buljong: 37 g liter<sup>-1</sup>. Mediet ble oppbevart ved 4 °C etter tillaging.
2. **BHI agar** (Brain Heart Infusion agar): 47 g liter<sup>-1</sup>. Blandingen ble temperert til 45 °C før tilsetning i petriskåler i sterilbenk. Skålene ble oppbevart ved 4 °C.
3. **TSB** (Tryptone Soya Broth) buljong: 30 g liter<sup>-1</sup>. Mediet ble oppbevart ved 4 °C etter tillaging.
4. **Peptonvann**: 4 g Bacteriological peptone og 34 g NaCl i 4 liter dH<sub>2</sub>O.
5. **Deionisert vann** (dH<sub>2</sub>O): vann ble filtrert gjennom Purelab Option-R system før autoklaving.

## 3 Metoder

### 3.1 Tillaging og ekstrahering av ruccolajuice

#### 3.1.1 Produksjon av råjuice

Ruccolasalat ble bestilt gjennom kjøkkenet på Nofima i Ås. Ruccolasalaten var uvasket, og pakket 26.08.20 ved Elstøen Gartneri i Røyse for Bama. Totalt 6,8 kg rå ruccolasalat ble kjørt gjennom en råsaftsentrifuge. For å ekstrahere mest mulig juice ut av ruccolabladene, ble alt kjørt gjennom råsaftsentrifugen to ganger. Juicen ble deretter sentrifugert i 200 mL sentrifugerør på 10 000 x g i 20 minutter i en Sorvall gulvsentrifuge. Juicen ble sentrifugert to ganger for å fjerne urenheter og store partikler. Sentrifugeprosessen ble utført på 4 °C, og juicen ble ellers oppbevart på is. En liten del av juicen (ca. 100 ml) ble sterilfiltrert gjennom 0,22 µm vakuumfiltreringsenhet og vakuumpumpe, og deretter oppbevart på -20 °C fram til bruk. Resten av den sentrifugerte juicen ble frysetørket.

#### 3.1.2 Frysetørking av juice

Frysetørking er en metode for å ekstrahere ut væsker fra et frossent produkt. Produktet tørkes ved sublimasjon, som er en direkte overgang fra fast form til gassform, uten at det dannes væske som mellomprodukt. Prosessen starter med at energi i form av varme tilsettes det fryste produktet, og temperaturen stiger i takt med dampen. Isen damper av som gass, og samles i kondensatoren, der det konverteres tilbake til is på grunn av lavere trykk og temperatur enn i selve produktet. I siste steg av tørkeprosessen konverteres rester av vann om til damp ved å senke trykket så lavt som mulig, og ved å øke temperaturen, kalt desorpsjon (*Operating manual freeze-dryer Gamma 1-16 LSC*, 2013).

Ruccolajuice tillaget som beskrevet over, og videre oppbevart på -20 °C, ble frysetørket i Christ Gamma (stor modell). Hylletemperatur i frysetørker var 20 °C, med 0,633 mbar vakuum i iskondensskammer og kondensatortemperatur på -55,5 °C. Juicen ble frysetørket i totalt 11 dager til all væske var sublimert. Frysetørket juice ble knust til et finkornet pulver med morter, og samlet i en stor beholder. Pulveret ble veid, og overført til sterile plastbokser. Pulveret ble deretter oppbevart på -20 °C.

#### 3.1.3 Ekstrahering av frysetørket juice

Ekstrahering er en prosess der et ekstraksjonsmiddel brukes til å trekke ut komponenter fra et fast stoff. Ekstraksjonsmiddelet kan fordampes, slik at man sitter igjen med et tørrekstrakt. Et



ekstrakt inneholder høyere konsentrasjoner av innholdsstoffene fra utgangsmaterialet. Valg av ekstraksjonsmiddel har betydning for hvilke komponenter som trekkes ut. Bruk av vann vil ekstrahere ut polare partikler, mens organiske løsemidler vil ekstrahere varierende grad av polare stoffer avhengig av dets polaritet (Wangensteen, 2021).

2 g frysetørket ruccolajuice ble veid opp i Falconrør (50 mL), og 20 mL av følgende ekstraksjonsmidler ble tilsatt i hvert rør: etyl acetat, etanol, 100 % metanol, 50 % metanol (fortynnet i Milli-Q vann) og kun Milli-Q vann. Prøvene ble ekstrahert i tre timer i mørket, med risting hver halvtime. Prøvene ble sentrifugert i Beckman Coulter gulvsentrifuge i 10 minutter på 4000 x g ved temperatur 25 °C, og supernatantene ble overført til nye Falconrør. Løsningene ble så filtrert gjennom 0,45 µm sprøytefilter. Prøver med organisk løsemiddel ble satt i prøvekonsentrator for avdamping av løsemiddel med nitrogen-gass. Rørene ble dekket med parafilm med hull. Prøvene ble plassert på varmeblokk i vannbad med temperatur på 35 °C, for å unngå nedkjøling under nitrogenbehandling. Nitrogen-gass ble blåst på prøven med et trykk på ca. 1,5 bar gjennom metallspisser, plassert ca. 1 cm over innholdet i hvert rør. Når alt løsemiddel var fordampet ble prøvene fryst (-20 °C). Prøvene ble frysetørket i Christ Gamma (liten modell) etter metode beskrevet over (frysetørring av juice) for å fjerne vann, samt eventuelle rester av andre ekstraksjonsmidler.

Etter uttesting av anti-*Listeria* aktivitet i de ulike tørreksraktene (se resultater kap. 4.3), ble ekstrahering utført i større skala med kun 100 % metanol som ekstraksjonsmiddel, med samme metode som beskrevet over. Ved videre isolering av fraksjoner på HPLC, ble det valgt å ikke frysetørke metanoleksrakt, mens ekstrakt til bruk i mikrobiologiske forsøk ble fortsatt frysetørket (for å sikre at det ikke var rester av metanol). Ekstrakter ble oppbevart ved -20 °C fram til bruk.

### 3.2 HPLC separering av ekstrakter

Kromatografi er en fellesbetegnelse for separasjonsmetoder for å separere, isolere og analysere kjemiske forbindelser. Prinsippet for metoden er forbindelsenes ulike evner til å binde seg til en stasjonærfase (stillestående) og å løse seg i en mobilfase (beveger seg). I høytrykksvæskerkromatografi (HPLC) brukes væske som mobilfase, mens et kolonnemateriale med visse separasjonsegenskaper brukes som stasjonærfase (Wibetoe, 2020).

Et HPLC instrument består vanligvis av mobilfasereservoar, høytrykkspumpe, injektor, separasjonskolonne, detektor og et datasystem. En automatisk fraksjonssamler gir mulighet

for å isolere ut separert prøvemateriale (fraksjoner) fra bestemte tidsintervaller. Preparative og semi-preparative HPLC-kolonner har en stor diameterstørrelse (10-20 mm), som gjør det mulig å isolere og samle opp fraksjoner som eluerer fra kolonnen til videre analyse. Analytiske HPLC-kolonner er mindre (2-5 mm), og brukes til å bestemme kvalitativ eller kvantitativ informasjon om en prøve (Toma, 2010; Wibetoe, 2020).

Kromatografi blir delt inn i ulike kategorier basert på separasjonen som skjer. I denne oppgaven benyttes revers fase HPLC, som er en metode som separerer prøver basert på polaritet, ved hjelp av uspesifikke hydrofobe interaksjoner i kolonnen. Innsiden av kolonnen (stasjonærfase) består av silikapartikler med C18 alkankjeder kovalent bundet til seg. Mobilfase, som ofte er en blanding av polar væske og organisk løsemiddel, eluerer prøven med en jevn hastighet gjennom kolonnen, og forbindelser separeres på grunnlag av deres polaritet. Forbindelser med høy polaritet vil oppnå lavest retensjonstid, mens upolare forbindelser vil få en høyere retensjonstid (holdes lenger i kolonnen). Optimalisering av metode med stasjonærfase, mobilfase, kolonne, trykk, temperatur, injeksjonsvolum, mobilfasens hastighet gjennom kolonnen og elueringsgradient er viktig for å oppnå en god separering (Sarker et al., 2006; Wibetoe, 2020).

I denne studien ble semi-preparativ revers fase HPLC brukt innledningsvis til å analysere sammensetningen av stoffer som ble ekstrahert med ulike ekstraksjonsmidler fra tørket ruccolajuice. På bakgrunn av resultatene ble 100 % metanol valgt som ekstraksjonsmiddel til videre bruk (se resultater kap. 4.3), og det ble samlet opp fraksjoner fra 100 % metanolekstraktet (heretter referert til som ruccolækstrakt).

### 3.2.1 Prøvepreparering til revers fase HPLC

Prøvemateriale (tørrekstrakt) ble veid opp på mikrovækt, og blandet ut til konsentrasjon 100 mg mL<sup>-1</sup> med 50 % metanol. Løsningen ble deretter filtrert gjennom 0,45 µm sprøytefilter, over i 4 mL HPLC hetteglass.

### 3.2.2 Revers fase HPLC av tørrekstrakter fra ulike ekstraksjonsmidler

HPLC av tørrekstrakter (løst i 50 % metanol) fra ekstrahering med 100 % metanol, 50 % metanol og vann (Milli-Q) ble utført for å undersøke sammensetningen av stoffer. Det ble ikke utført fraksjonsoppsamling, men kromatogrammer fra HPLC ble undersøkt. Analysen ble utført med instrumentet Dionex Ultimate 3000 series, utstyrt med en kvartær pumpe, en

automatisert prøvetaker, en RS variert bølgelengde UV-Vis detektor og en automatisert fraksjonssamler. Separering av prøven ble gjort gjennom en Thermo Betasil C18 kolonne, med et injeksjonsvolum på 20 µL prøvemateriale. Den mobile fasen besto av fase A (vann/acetonitril 95:5 v/v) og fase B (vann/acetonitril 5:95 v/v), begge tilsatt 0,1 % maursyre. En lineær gradienteluering ble utført etter følgende metode: 0 min, 0 % B; 10 min, 4 % B; 40 min, 100 % B; 50 min, 100 % B; 52 min, 0 % B; 65 min, 0 % B. Mobilfasens hastighet ble holdt på 4 mL min<sup>-1</sup>. Separeringen ble målt ved bølgelengdene 214 nm, 227 nm og 254 nm. Data fra UV-målinger ble bearbeidet i Microsoft Excel.

### 3.2.3 Revers fase HPLC med fraksjonering av 100 % metanolekstrakt

HPLC av 100 % metanolekstrakt med fraksjonsoppsamling ble utført etter valg av ekstraksjonsmiddel (se resultater kap. 4.3). Metode for separering ble optimalisert for fraksjonering, og programmet ble utført gjentatte ganger for å samle tilstrekkelig mengde fraksjoner til videre analyser. I hver kjøring ble 50 µL av metanolekstraktet i konsentrasjon 100 mg mL<sup>-1</sup> injisert i HPLC. Instrument, kolonne og mobilfaser som ble brukt var samme som beskrevet tidligere (Revers fase HPLC av tørrestrakter). En lineær gradienteluering ble utført etter følgende metode: 0 min, 0 % B; 10 min, 4 % B; 25 min, 100 % B; 35 min, 100 % B; 37 min, 0 % B; 50 min, 0 % B. Mobilfasens hastighet ble holdt på 4 mL min<sup>-1</sup>. Separeringen ble målt på 214 nm, 227 nm og 254 nm.

Fra 1 minutt til 25 minutter ble det samlet en ny fraksjon hvert 30. sekund. Dette utgjorde totalt 48 kolonnefraksjoner. Hver injisering i HPLC instrumentet ga ca. 2 mL væske til hvert av 48 rør. Fraksjoner med lik elueringstid fra flere runder med injisering ble kombinert. For å fjerne acetonitril ble prøvene satt i vannbad på varmeblokk med temperatur på ca. 35 °C, og prøvekonsensator ble brukt til å blåse nitrogengass over prøvene. Hver prøve sto under nitrogen i ca. 4 timer, med litt variasjon i tid grunnet ulikt innhold av acetonitril. De originalt 48 kolonnefraksjonene fra HPLC ble samlet til totalt åtte fraksjoner. Hvilke kolonnefraksjoner som ble kombinert, ble bestemt på grunnlag av tidligere resultater i Fagerlund, Wubshet, et al. (2021), og ved å studere absorbanstoppene i kromatogrammet. Fraksjonene ble overført til sterile plastbokser, og plassert på -20 °C i et døgn. Alle fraksjonene ble så frysetørket under vakuum i Christ gamma (stor modell) i ca. fem døgn. Prøver med tilstrekkelig mengde tørrstoff ble veid på mikrovækt. Prøvemateriale ble deretter oppbevart på -20 °C. Ved videre forsøk med tørrestrakter og fraksjoner forventes det ingen spor av løsemidler i prøvene (fra ekstrahering og kromatografisk fraksjonering).

### 3.3 Oppbevaring og dyrking av bakterier

Forsøk med *L. monocytogenes* ble utført på klasse III patogent laboratorium ved Nofima AS, Ås. Generelle vekstmedier og løsninger til bruk ved dyrking av bakterier i denne studien er beskrevet i kapittel 2.4.

#### 3.3.1 Frysestokk av *L. monocytogenes*

*L. monocytogenes* (Kap. 2.3) ble strøket ut på en BHI agarskål, og inkubert over natt på 37 °C. Fra BHI agarskålen ble det plukket tre enkeltkolonier, som ble podet i 5 mL BHI buljong i et glassrør. Rør ble inkubert i ca. 17 timer ved 20 °C uten risting. 800 µL bakteriesuspensjon ble tilsatt 200 µL steril (autoklavert) 100 % glycerol, og oppbevart ved -20 °C. Heretter refereres dette til som frysestokk av *L. monocytogenes*.

#### 3.3.2 Overnattkultur av *L. monocytogenes*

*L. monocytogenes* fra frysestokk ble strøket på BHI agarskål. Skålen ble inkubert på 37 °C i et døgn eller 20 °C i 3 døgn. Fra skålen ble det plukket tre enkeltkolonier, som ble podet i 5 mL BHI buljong. Rør ble inkubert på 37 °C i ca. 17 timer. Bakteriekulturen omtales videre som overnattkultur.

#### 3.3.3 Bestemmelse av bakterietall i overnattkultur

Bakterietall i overnattkultur ble sjekket ved å lage en ti-folds fortynningsrekke i peptonvann, og plate disse ut på BHI agarskåler. Det ble platet ut  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$  og  $10^{-8}$  fortynninger på skåler. Skålene ble inkubert på 37 °C i et døgn eller 20 °C i tre døgn, og bakterietall (colony forming units; CFU) per mL ble bestemt ved å telle antall kolonier.

### 3.4 Definert medium for *L. monocytogenes*

Bakterier har forskjellige vekstkrav, og hvilke vekstmedium som brukes må derfor tilpasses både bakterieart og formål for forsøket. Bakterier dyrkes vanligvis i komplekse vekstmedier som inneholder ekstrakt fra planter, gjær eller dyrevev, samt sukker (glukose) som energikilde. *Listeria* dyrkes gjerne i medier som TSB og BHI, grunnet den enkle tillagingen og at det er billige produkter. Den eksakte sammensetningen i et komplekst vekstmedium er varierende, og ikke definert. Et definert vekstmedium inneholder derimot eksakte mengder av enkle kjemiske forbindelser som bakterien trenger for å vokse. Et definert vekstmedium består hovedsakelig av et enkelt sukker som karbon- og energikilde, en uorganisk

nitrogenkilde og mineralsalter. I tillegg kreves det i varierende grad andre vekstfaktorer for ulike bakterier, som vitaminer, aminosyrer og sporstoffer. Buffer tilsettes for å unngå rask pH-endring i mediet (Jarvis et al., 2016).

I en tidligere studie (Fagerlund, Wubshet, et al., 2021) med ekstrakter fra ruccola, ble antimikrobiell effekt redusert ved dyrkning av *L. monocytogenes* i et komplekst vekstmedium. Det var derfor et mål å kunne dyrke *L. monocytogenes* på et definert medium i denne studien. Det eksisterer foreløpig ingen universelle definerte medier for *L. monocytogenes*. I flere studier har det blitt observert at *L. monocytogenes* ikke har vokst i tidligere publiserte definerte medier, og som en konsekvens har det blitt utviklet mange ulike versjoner av definerte medier (Jarvis et al., 2016). Dette indikerer at det kan være store variasjoner i vekstkrav mellom ulike stammer av *L. monocytogenes*.

For utarbeidelse av et definert medium for *L. monocytogenes* i denne studien ble det tatt utgangspunkt i tre medier: Modified Welshimer's broth (MWB) (Premaratne et al., 1991), Hsiang-Ning Tsai medium (HTM) (Tsai & Hodgson, 2003) og Mineral Medium (MM) (Schneebeli & Egli, 2013). Mediene MWB og HTM ble tillaget etter ingredienser og mengder i artiklene, som beskrevet i Tabell 1. For å spare arbeid, ble modifiserte varianter av MWB og HTM ble laget ved å bytte ut aminosyrer og vitaminer med ferdigblandede løsninger, videre referert til som MWB-F og HTM-F. MM ble tillaget som en modifisert variant, der aminosyrer, vitaminer og sporstoffer ble tilsatt som ferdigløsninger. I tillegg ble noen av ingrediensene kuttet ut eller erstattet med tilsvarende komponenter sammenlignet med de som var oppført i de publiserte oppskriftene. MM ble laget med og uten bufferen EDTA, referert til som henholdsvis MM-F1 og MM-F2. HTM og MM ble også laget som varianter med og uten gjærekstrakt (GE) i to konsentrasjoner: 0,1 og 0,6 g L<sup>-1</sup>. Disse er referert til som HTM-F+1GE, HTM-F+6GE, MM-F2+1GE og MM-F2+6GE.

**Tabell 2** Konsentrasjon av komponenter i de definerte mediene MWB, MWB-F, HTM, HTM-F, MM-F1 og MM-F2.

Stoffkategori (benevning)	Ingredienser	MWB	MWB-F	HTM	HTM-F	MM-F1/F2 <sup>a</sup>
Karbonkilde (mM)	Glukose	55	55	55	55	13,9
Sporstoffer Metallioner (mM)	Jern(III)citrat	0,36	0,36			
	MgSO <sub>4</sub>	1,7	1,7	1,7	1,7	6,29
	FeCl <sub>3</sub>					0,14
	CaCl <sub>2</sub>					0,4
	EDTA					5 <sup>a</sup>
Buffer (mM)	MOPS natriumsalt			100	100	100
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>			4,54	4,54	53,5
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	115,5	115,5	11,55	11,55	128
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	48,2	48,2	4,82	4,82	4,82
Vitaminer (µM)	Tiamin	2,96		2,96		
	Riboflavin	1,33		1,33		
	Biotin	2,05	2,05	2,05	2,05	81,86 pM
	Lipoinsyre	24 pM	24 pM	24 pM	24 pM	242,24 pM
	Pyridoxin					591,09 pM
	Niacin					406,14 pM
	Kobalamin					36,89 pM
	4-Aminobenzosyre					364,6pM
Aminosyrer (g L <sup>-1</sup> )	Tryptofan	0,1				
	Leucin	0,1				
	Isoleucin	0,1				
	Valin	0,1				
	Arginin	0,1				
	Metionin	0,1		0,1		
	Glutamin	0,6	0,6			0,6
	Histidin	0,1				
	Cystein	0,1		0,1		
Ferdigløsninger (% av totalvolum)	Vitaminløsning <sup>b</sup>		1		1	1
	Aminosyreløsning <sup>c</sup>		2		2	2
	Sporstoffløsning <sup>d</sup>					1
Ekstrakt (g L <sup>-1</sup> )	Gjærekstrakt				e	f

<sup>a</sup> MM-F1 ble laget med EDTA, og MM-F2 ble laget uten EDTA

<sup>b</sup> Vitaminløsning inneholder: 0,1 g L<sup>-1</sup> kolinklorid, kalsium D-pantotenat, folinsyre, nikotinamid, pyridoksal hydroklorid og tiamin hydroklorid; 0,2 g L<sup>-1</sup> i-inositol; 0,01 g L<sup>-1</sup> riboflavin; 8,5 g L<sup>-1</sup> NaCl

<sup>c</sup> Aminosyreløsning inneholder: 6,32 g L<sup>-1</sup> L-Arginin hydroklorid, 1,2 g L<sup>-1</sup> L-cystein, 2,1 g L<sup>-1</sup> L-Histidin hydroklorid-H<sub>2</sub>O, 2,62 g L<sup>-1</sup> L-Isoleucin, 2,62 g L<sup>-1</sup> L-leucin, 3,625 g L<sup>-1</sup> L-Lysin hydrokloid, 0,755 g L<sup>-1</sup> L-Metionin, 1,65 g L<sup>-1</sup> L-Fenylalanin, 2,38 g L<sup>-1</sup> L-Treonin, 0,51 g L<sup>-1</sup> L-Tryptofan, 1,8 g L<sup>-1</sup> L-Tyrosin, 2,34 g L<sup>-1</sup> L-Valin.

<sup>d</sup> Sporstoffløsning inneholder: 1,81 g L<sup>-1</sup> MnCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 0,08 g L<sup>-1</sup> CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 0,05 g L<sup>-1</sup> Co(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 0,22 g L<sup>-1</sup> ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 2,86 g L<sup>-1</sup> H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 0,39 g L<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O.

<sup>e</sup> HTM-F ble tilsatt 0,1 g L<sup>-1</sup> gjærekstrakt (HTM-F+1GE) og 0,6 g L<sup>-1</sup> gjærekstrakt (HTM-F+6GE)

<sup>f</sup> MM-F2 ble tilsatt 0,1 g L<sup>-1</sup> gjærekstrakt (MM-F2+1GE) og 0,6 g L<sup>-1</sup> gjærekstrakt (MM-F2+6GE)

Det ble laget stokkløsninger (forhåndsblandinger) av alle ingredienser (Tabell 3). Ingredienser ble veid opp i begerglass på vekt, og justert til oppgitt totalvolum ved bruk av dH<sub>2</sub>O. Det ble brukt magnetrører for å løse opp innholdet. For lite løselige ingredienser er metode beskrevet i fotnoter i Tabell 2. Alle stokkløsninger bortsett fra for Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (se fotnote i Tabell 3) ble sterilisert med sprøytefilter 0,22 µm, og overført til sterile Falconrør. Stokkløsninger og ferdigløsninger med aminosyrer, vitaminer og sporstoffer ble oppbevart som beskrevet i Tabell 3.

Medier ble laget ved å blande stokkløsninger i mengder som ga sluttkonsentrasjon som angitt i Tabell 2. Det ble tilsatt en liten mengde dH<sub>2</sub>O i et begerglass før tilsetning av ingredienser, og til slutt ble det justert til riktig sluttvolum ved bruk av dH<sub>2</sub>O. Medieløsningen ble rørt med magnetrører, og ved bruk av 5 M HCl og 5 M NaOH ble pH justert til 7,1-7,2. Medieblandingen ble sterilisert med sprøytefilter 0,22 µm til sterile Falconrør. Mediene ble oppbevart kjølig (4 °C), og brukt innen 2 dager etter tillaging.

**Tabell 3** Stokkløsninger brukt ved tillaging av de definerte mediene etter oppskrift i Tabell 2.

Komponent	Stokk konsentrasjon (g L <sup>-1</sup> )	Mengdeforhold	Oppbevaring
D(+)-glukose-monohydrat	220	4,4 g/0,02 L	Kjølig
Jern(III)citrat <sup>a</sup>	9,5	0,19 g/0,02 L	Kjølig
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	375	7,5 g/0,02 L	Kjølig
FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	38,7	0,77 g/0,02 L	Kjølig
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	80	1,6 g/0,02 L	Kjølig
EDTA <sup>b</sup>	146,12	2,9 g/0,02 L	Kjølig
MOPS natriumsalt	232	11,6 g/0,05 L	Kjølig
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	60	1,2 g/0,02 L	Kjølig
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O <sup>c</sup>	205	41 g/0,2 L	Romtemperatur
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	50	1 g/0,02 L	Kjølig
Tiamin	1	20 mg/0,02 L	Kjølig og mørkt.
Riboflavin	0,1	2 mg/0,02 L	Kjølig og mørkt
Biotin	0,0315	0,63 mg/0,02 L	Kjølig og mørkt
Lipoinsyre	3,24·10 <sup>-3</sup> <sup>d</sup>	0,16 mg/0,05 L	Kjølig og mørkt
Pyridoxin	0,1	2 mg/0,02 L	Kjølig
Niacin	0,05	1 mg/0,02 L	Kjølig
Kobalamin	0,05	1 mg/0,02 L	Kjølig
4-Aminobenzosyre	0,05	1 mg/0,02 L	Kjølig
L-Tryptofan	5	0,1 g/0,02 L	Kjølig
D-Leucin	12	0,24 g/0,02 L	Kjølig
L-Isoleucin	10	0,2 g/0,02 L	Kjølig
L-Valin	6	0,12 g/0,02 L	Kjølig
L-Arginin·HCl	10	0,2 g/0,02 L	Kjølig
D-Metionin	25	0,5 g/0,02 L	Kjølig og mørkt
L-Glutamin <sup>e</sup>	30	0,6 g/0,02 L	Kjølig
L-Histidin HCl·H <sub>2</sub> O	50	1 g/0,02 L	Kjølig
L-Cystein <sup>f</sup>	10	200 mg/0,02 L	Kjølig
Vitaminløsning	100x konsentrert	1 % (400 µL/40 mL)	Fryst og mørkt
Aminosyreløsning	50x konsentrert	2 % (800 µL/40 mL)	Kjølig
Sporstoffløsning	100x konsentrert	1 % (400 µL/40 mL)	Kjølig
Gjærekstrakt	200	4 g/0,02 L	Kjølig

<sup>a</sup> Løst opp ved lett varmebehandling og gradvis tilsetning av 1M HCl

<sup>b</sup> Løst opp ved gradvis tilsetning av 10M NaOH

<sup>c</sup> Autoklavert 15 min ved 121 °C. Varmet opp før tilsetning i medium (alle andre stokkløsninger ble sterilisert med sprøytefilter 0,22 µm).

<sup>d</sup> Stokk med 1:1000 fortynning ble også tillaget, til konsentrasjon på 3,24·10<sup>-6</sup> g L<sup>-1</sup>

<sup>e</sup> Løst opp ved gradvis tilsetning av 1M HCl

<sup>f</sup> Stokk laget rett før tilsetning i medium. Løst opp ved tilsetning av 1M HCl (ca. 20 dråper)



### 3.5 Undersøkelse av veksthemmende aktivitet ved utplating

Tilstedeværelse av veksthemmende antibakteriell aktivitet i ruccolajuice ble undersøkt i vekstforsøk der *L. monocytogenes* ble dyrket i nærvær av varierende mengder juice.

Hensikten var å se i hvilken grad nærvær av juice påvirket veksten av bakterien.

Vekstforsøk ble utført i en 96-brønners mikrotiterplate med lokk, og ble utført i nærvær av to ulike vekstmedier: TSB og BHI. Det ble laget overnattkultur av *L. monocytogenes*, og startkonsentrasjonen ble kontrollert ved utplating som beskrevet i kapittel 3.3. Det ble tatt sterilkontroll av BHI, TSB og ruccolajuice ved å plate ut 100 µl direkte på en BHI skål.

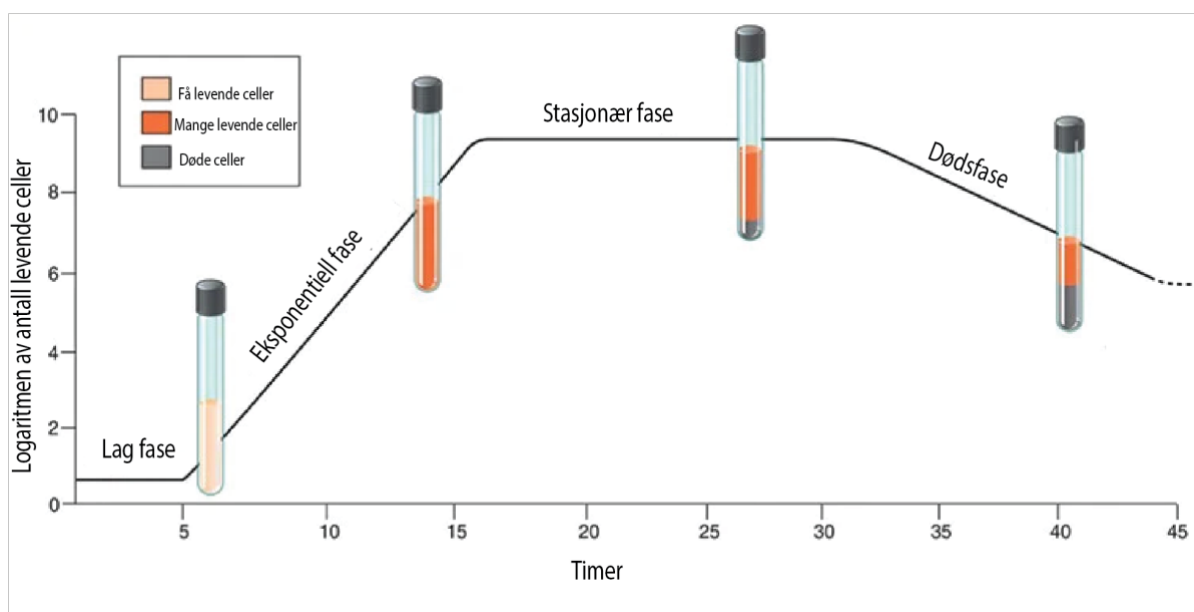
Sterilfiltrert ruccolajuice (Kap. 3.1) ble blandet til ulike konsentrasjoner (80 %, 40 %, 10 %, 5 % og 0 %) i 24 brønner på en mikrotiterplate. BHI- og TSB medier ble blandet til ulike konsentrasjoner (10 %, 5 % og 0 %) i brønner som supplerende næring for bakterien. I brønner uten tilsatt medium eller ruccolajuice ble dH<sub>2</sub>O brukt som erstatning for tilsvarende komponent. *L. monocytogenes* ble tilsatt brønner slik at konsentrasjonen i hver brønn ved start var ca. 10<sup>4</sup> CFU mL<sup>-1</sup>. Totalvolum i hver brønn var 200 µl. Platen ble inkubert på 12 °C i en lukket boks i to døgn. Innholdet i hver brønn ble så fortynnet i peptonvann til passende konsentrasjoner, og platet ut på BHI agar skåler, som videre ble inkubert på 37 °C i et døgn. Antall kolonier på platene ble lest av fra plater med mellom 30 og 300 kolonier, og konsentrasjonen (CFU mL<sup>-1</sup>) av *L. monocytogenes* i hver prøve ble bestemt.

### 3.6 Undersøkelse av veksthemmende aktivitet i Bioscreen C

Som et alternativ til å følge vekst av en bakteriekultur ved å plate ut prøver på agarskåler og telle kolonier (som beskrevet i kap. 3.5), kan man følge vekst i en kultur kontinuerlig ved å måle OD (optical density; optisk tetthet). OD ved 600 nm brukes vanligvis ved overvåkning av vekst i bakteriekultur. I OD<sub>600nm</sub> måles lysspredning i absorbans, og alt materiale tilstedeværende i prøven (levende celler, døde celler og andre partikler) vil påvirke målingen. Vekst av bakterieceller i løsningen vil øke turbiditeten i prøven (økt OD<sub>600nm</sub> absorbans), og opp til >3 OD-verdi vil mengde lys som passerer prøven være direkte proporsjonalt med turbiditeten (uklarheten) i prøven (Pusterla, 2018). Bakterievekst foregår i flere faser, der det starter med en lagfase eller nølefase, som går videre til eksponentiell fase, stasjonærfase og dødsfase, som illustrert i Figur 1. Fordelen med å måle bakterievekst ved målinger av absorbans (sammenlignet med utplatinger) er at man kan observere vekstkurven til bakterien

sammenhengende over tid, og beregne veksthastigheten i eksponentiell vekstfase, også med begrenset tilgjengelig prøvemateriale. Ulemper med metoden er at man ikke kan observere om bakteriekonsentrasjonen går ned, og man kan ikke bestemme konsentrasjonen av levende bakterier (CFU mL<sup>-1</sup>) i prøven (Implen.no, 2021).

Vekstforsøk med OD-målinger ble i denne oppgaven utført i et Bioscreen C instrument. Bioscreen C er et instrument som inkuberer, rister og måler OD<sub>600nm</sub> automatisk. Prøvene ble dyrket i 100-brønners Bioscreen C honeycomb brett med 200 µL prøvevolum i hver brønn. Hver brønn ble inokulert med *L. monocytogenes* fra overnattekultur fortynnet i peptonvann, slik at konsentrasjonen ved start var ca. 10<sup>4</sup> CFU mL<sup>-1</sup>. Resterende innhold i hver prøve ble variert i henhold til hvilke analyser som skulle utføres. Blanke prøver inneholdt samme konsentrasjoner av prøvemateriale som i de korresponderende test-prøvene, men bakterievolumet ble erstattet med peptonvann eller dH<sub>2</sub>O. OD-målinger i Bioscreen ble



**Figur 1** Grafisk fremstilt vekstkurve for bakterier, inkludert illustrasjon av andel levende og døde celler av den totale populasjonen. Figur utarbeidet fra Aryal (2018).

foretatt hvert 15. minutt, med risting i 10 sekunder etterfulgt av pause i 5 sekunder før hver måling. Temperaturen var 25 °C og kulturer ble fulgt i 48 timer. To parallelle brønner (duplikater) ble satt opp for hver test-prøve dersom annet ikke er spesifisert. Gjennomsnitt av verdier fra absorpsjonsmåling av duplikater ble beregnet, og verdier fra blank prøve (korresponderende prøve uten bakterier tilsatt) ble trukket fra for å oppnå faktisk absorpsjonsmåling.

Grunnet manglende vekst i definert vekstmedium for *L. monocytogenes* (Resultater fra kap. 4.2), ble isbergjuice brukt som supplerende næring i Bioscreen vekstforsøk dersom annet ikke er spesifisert. Det ble brukt steril juice av isbergsalat (*Lactuca sativa*), laget 20.10.2016 som beskrevet i Fagerlund, Wubshet, et al. (2021). Juicen var lagret ved -80 °C, og fra september 2020 ble den oppbevart ved -20 °C. Det ble tilsatt 20 µL isbergjuice til hver brønn i Bioscreenbrett, med totalvolum på 200 µL i hver brønn (10 % isbergjuice).

For å undersøke om definerte medier ga vekst av *L. monocytogenes*, ble 180 µL test-medium tilsatt i Bioscreenbrett, og brønner med 180 µL BHI medium ble brukt som kontroll. Videre ble det testet med tilsetning av ruccolaekstrakt i definert medium. Ruccolaekstrakt ble fortynnet i dH<sub>2</sub>O til konsentrasjonene 1, 3 og 5 mg mL<sup>-1</sup>. Definert medium ble oppkonsentrert 2,5X, 80 µL medium ble tilsatt i brønn, og isbergjuice brukt som kontroll. Overnattekulturer ble dyrket i BHI medium som beskrevet i kapittel 3.3, eller i samme definerte medium som ble brukt i vekstforsøket, som beskrevet i resultater kapittel 4.2.

For å lage dose-respons kurver for tørrekstrakt fra ekstrahering med 100 % metanol, 50 % metanol og vann (Kap. 3.1), ble tørrekstraktene løst og fortynnet i dH<sub>2</sub>O før tilsetning i brønner på Bioscreenbrett. To uavhengige gjentak ble gjennomført med konsentrasjonene 20, 5, 2 og 0 mg mL<sup>-1</sup> for alle tre tørrekstraktene. I tillegg ble tørrekstrakter fra ekstrahering med ekstraksjonsmidlene 50 % metanol og vann, testet en gang med konsentrasjonene 80, 60, og 40 mg mL<sup>-1</sup>, mens tørrekstrakt ekstrahert med 100 % metanol ble testet en gang med konsentrasjonene 10, 8, 6, 4, 1 og 0,5 mg mL<sup>-1</sup>. Basert på veksthastigheten til *L. monocytogenes*, ble dose-respons kurve utarbeidet etter metode beskrevet nedenfor (Kap. 3.6.1).

For utarbeidelse av vekstkurve for *L. monocytogenes*, tilsatt frysetørkede fraksjoner fra HPLC (Kap. 3.2), ble hver av de åtte fraksjonene løst i 1 mL dH<sub>2</sub>O. 1, 3, 10 og 30 µL av løsningene ble tilsatt i hver brønn. 1 og 30 µL fortynninger ble ikke satt opp med duplikate brønner. Forsøket ble utført en gang for 1, 3 og 30 µL fortynning, og i tre uavhengige gjentak for 10 µL fortynning. Vekstkurve ble utarbeidet fra gjennomsnittet av de tre forsøksreplikatene for 10 µL.

Dose-respons kurver for de bioaktive HPLC fraksjonene ble laget ved å tilsette dH<sub>2</sub>O til de frysetørkede fraksjonene, og fortynne til følgende sluttkonsentrasjoner i brønn: 0.2, 0.175, 0.15, 0.125, 0.1, 0.075, 0.05 og 0.025 mg mL<sup>-1</sup>. Hver konsentrasjon ble testet i tre (for 0.2,

0.1, 0.05, 0.025 mg mL<sup>-1</sup>) eller to (resterende konsentrasjoner) uavhengige forsøk for fraksjon 2. Fraksjon 4 ble testet i fire uavhengige forsøk med konsentrasjonene 0.025, 0.05, 0.1 og 0.2 mg mL<sup>-1</sup>, og øvrige konsentrasjoner en gang (0.175, 0.15, 0.125 og 0.075 mg mL<sup>-1</sup>). Basert på veksthastigheten til *L. monocytogenes*, ble dose-respons kurve utarbeidet etter metode beskrevet nedenfor (Kap. 3.6.1).

### 3.6.1 Fremstilling av dose-respons kurver

Dose-respons kurver ble laget for å undersøke hvordan økende mengder ekstrakt (dose) påvirket effekten av bakterievekst hos *L. monocytogenes* (respons). I disse forsøkene ble responsen på ulike mengder av ekstrakt eller fraksjon undersøkt i Bioscreen C instrumentet (som beskrevet over), og virkningen av ulike doser ble kvantitert som effekten på vekstraten for *L. monocytogenes* i eksponentiell vekstfase. For å bestemme denne vekstraten ble vekstkurver fra Bioscreen forsøk plottet som logaritmen (log<sub>10</sub>) til OD<sub>600nm</sub> på y-aksen opp mot tid på x-aksen. Den eksponentielle vekstfasen til bakterien vises som en lineær linje, se eksponentiell fase i Figur 1. Det ble tilpasset en eksponentiell kurve  $y = ae^{bt}$ , der  $t$  er tid (timer) og  $b$  er den spesifikke vekstraten (time<sup>-1</sup>) for hver prøve. Den inhiberende effekten av forbindelsene som ble testet ble definert ut i fra evnen til å redusere verdien av  $b$  for bakteriestammen som ble brukt i forsøket. Den laveste konsentrasjonen som ikke viste vekst etter 48 timer ble definert som MIC. Relativ vekstrate ble beregnet som spesifikk vekstrate delt på den spesifikke vekstraten for kontrollprøven som ble dyrket i fravær av antimikrobielle komponenter (Fagerlund, Wubshet, et al., 2021; King & Krogstad, 1983).

Statistisk analyse for dose-respons kurver ble utført ved bruk av verdier for spesifikk vekstrate ved hver konsentrasjon. Hvert gjentak regnes som uavhengige datapunkter. Den anvendte testen var en enveis ANOVA med følgende nullhypotese: Spesifikk vekstrate (veksthastighet) er identisk for alle testede konsentrasjoner av ekstrakt eller fraksjon. Etter forkastning av nullhypotesen ( $p < 0,05$ ), ble Tukey's *post hoc* test for parvise sammenligninger utført for å identifisere konsentrasjoner av ekstrakt eller fraksjon der vekstraten var signifikant forskjellige ( $p < 0,05$ ). Minitab ble benyttet som programvare.

### 3.6.2 Undersøkelse av veksthemming med HPLC fraksjoner mot 12 ulike bakteriestammer

For utarbeidelse av vekstkurver for ulike bakterier fra salatfabrikk-miljø i nærvær av de bioaktive HPLC fraksjonene, ble en stamme hver fra slektene *Arthrobacter*, *Janthinobacterium*, *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Sphingomonas* og *Serratia*, en stamme fra

*Bacillus cereus* gruppen, en stamme fra arten *Rhodococcus erythropolis*, og tre stammer fra slekten *Pseudomonas* (Tabell 1) dyrket overnatt i glassrør med 5 mL BHI. *Sphingomonas* sp. ble dyrket ved 20 °C uten risting, de andre ble dyrket ved 30 °C med risting. *L. monocytogenes* ble dyrket og platet ut som beskrevet i kapittel 3.3. Alle overnattekulturer ble fortynnet til  $10^{-4}$  fortynning i peptonvann, og 20  $\mu$ L ble tilsatt på Bioscreenbrett. Vekstforsøk med *Janthinobacterium* sp. og *Sphingomonas* sp. ble utført en gang, resterende bakterier ble testet i to uavhengige gjentak. Fraksjon 2 ble testet med konsentrasjonene 0.05, 0.125, 0.2 og 0.5 mg mL<sup>-1</sup>, og fraksjon 4 med 0.05, 0.125, 0.2 mg mL<sup>-1</sup>. For fraksjon 2 ble konsentrasjonene 0,05 og 0,5 mg mL<sup>-1</sup> testet en gang. Resterende konsentrasjoner for begge fraksjoner ble testet i to uavhengige gjentak. Som kontroll ble prøve uten fraksjon testet i alle replikater (0 mg mL<sup>-1</sup>). OD-verdier relativ til hver negativkontroll ble beregnet for hver bakteriestamme. Den laveste fraksjon-konsentrasjonen hvor OD-verdien var mindre enn 20 % av OD-verdien i kontrollprøven i løpet av 48 timer, ble definert som minimum inhiberende konsentrasjon (MIC).

### 3.7 Undersøkelse av bakteriedrepende aktivitet ved utplating

I tillegg til å teste bakterieveksthemmende aktivitet (som beskrevet i kapitler 3.5 og 3.6), kan det utføres tester for å undersøke om et stoff har bakteriedrepende effekt. Dette kan gjøres i en suspensjonstest hvor man tilsetter stoffet som skal undersøkes til en prøve med relativt høy konsentrasjon av bakterieceller. Ved å plate ut prøvene på skåler, kan man undersøke hvor mange log<sub>10</sub> CFU lavere bakteriekonsentrasjonen i prøven er etter en viss tid, sammenlignet med i en kontrollprøve uten tilsatt testsubstans. Testen kan utføres som en såkalt «time-kill test», som undersøker tidsavhengig eller konsentrasjonsavhengig antibakteriell effekt. Prøver med flere konsentrasjoner av testsubstansen og en kontrollprøve kan inkuberes over et visst tidsintervall. Antall døde celler beregnes relativt til kontrollen ved å bestemme antall levende celler (CFU mL<sup>-1</sup>) for hver prøve ved platetelling (Balouiri et al., 2016).

Suspensjonstester i denne studien ble utført for undersøkelse av bakteriedrepende aktivitet for ruccolajuice og ruccolaekstrakt (testsubstans) i ulike konsentrasjoner i tidsintervallet 0 minutter, 30 minutter og 24 timer. Testsubstans, dH<sub>2</sub>O og fortynningsvann ble temperert til 25 °C. Overnattekultur av *L. monocytogenes* ble tillaget som beskrevet i kapittel 3.3, og spunnet ned i eppendorfsentrifuge i 2 minutter på 13 300 x g. Cellene ble resuspendert i testsubstans eller fortynnet videre i peptonvann, avhengig av hvilken inokulumskonsentrasjon som ble benyttet. Prøvene med bakterier og testsubstans ble fortynnet i peptonvann, og platet ut på

BHI agarskåler umiddelbart etter inokulering (0 minutter). Prøvene ble videre inkubert på 25 °C med risting (300 rpm). Det ble på tilsvarende måte som ved 0 minutter, platet ut prøver 30 minutter og 24 timer. Skålene ble inkubert på 37 °C i et døgn. Konsentrasjon (CFU mL<sup>-1</sup>) ble bestemt ved telling av kolonier på skålene, og log<sub>10</sub>-reduksjon i CFU for hvert inokulum ble beregnet ved å subtrahere log<sub>10</sub> (CFU prøve) fra log<sub>10</sub> (CFU kontroll) ved de ulike tidsintervallene.

For testsubstans ruccolajuice ble *L. monocytogenes* fortynnet til 10<sup>7</sup>, 10<sup>6</sup>, 10<sup>4</sup> og 10<sup>2</sup> CFU mL<sup>-1</sup> i ruccolajuice og dH<sub>2</sub>O (kontroll).

Testsubstans ruccolaekstrakt (tørket ruccolajuice ekstrahert med 100 % metanol) ble blandet til konsentrasjonene 10 og 50 mg mL<sup>-1</sup>, og dH<sub>2</sub>O ble brukt som kontroll. *L. monocytogenes* fortynnet i peptonvann ble inokulert i de tre konsentrasjonene til en startkonsentrasjon på 10<sup>7</sup> CFU mL<sup>-1</sup>, og ble utført i fem uavhengige gjentak.

Statistisk analyse av resultat fra suspensjonstest ble utført ved en to-sidig parett t-test for å undersøke om det var en signifikant forskjell mellom kontrollprøven og prøve med testsubstans. Veksten ble regnet som signifikant forskjellig dersom p<0,05. Microsoft Excel ble benyttet som programvare.

### 3.8 Undersøkelse av bakteriedrepende aktivitet ved fluorescensmikroskopi

I et fluorescensmikroskop kan man studere levende og døde celler ved hjelp av farging med fluorescerende fargestoffer. Dette gjøres ved hjelp av et fluorescensmikroskop der en lyskilde sender ut lys (ultrafiolett stråling, fiolett og til dels blått lys), og gir fotoluminescens til testsubstansen. Fargestoffet man bruker på prøven inneholder fluorescerende stoffer (fluorokromer) som vil binde til ønskede cellulære parametere i prøven, og avgi fluorescens med forskjellige fluorescensfarger (Roald, 2020).

LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kit benytter seg av blanding av fargestoffet SYTO 9 som vil vises som grønn fluorescens, og fargestoffet propidiumjodid som vil vises som rød fluorescens. SYTO 9 vil trenge inn i alle bakterier i en prøve, både de intakte og de med skadede membraner. Propidiumjodid trenger kun inn i bakterier med skadede membraner, og reduserer fluorescensen til SYTO 9. I en blanding med fargestoffene vil skadede celler observeres som farget med rød fluorescens, mens levende celler vil observeres som farget med grønn fluorescens (Molecular Probes, 2004).

Live/dead cellefarging ble i denne studien brukt for å studere effekten av behandling med fraksjoner isolert fra ruccola på *L. monocytogenes* (til dette forsøket ble det brukt kit L13152). Fraksjon 2 og 4 fra HPLC fraksjonering ble blandet til konsentrasjonene 2 og 20 mg mL<sup>-1</sup> i dH<sub>2</sub>O. Disse prøvene, samt en kontrollprøve (dH<sub>2</sub>O), ble inokulert med 10<sup>9</sup> CFU mL<sup>-1</sup> *L. monocytogenes* fra overnattkultur, og videre inkubert på 25 °C med risting (300 rpm) i 24 timer. Etter 24 timers inkubering ble det tatt ut 5 µL av hver prøve, som videre ble fortynnet i peptonvann, og platet ut på BHI agarskåler. Skålene ble inkubert på 37 °C i 24 timer. CFU mL<sup>-1</sup> ble bestemt ved å telle antall kolonier, og log<sub>10</sub>-reduksjon i vekst ble bestemt. Resterende innhold i prøvene spunnet ned på en eppendorfsentrifuge på 10 000 x g i 2 minutter. Alle prøvene ble tilsatt 0,9 % NaCl i samme volum som prøvene hadde før sentrifugering (45 µL for 20 mg mL<sup>-1</sup> prøvene, 95 µL for resterende prøver).

Det ble laget kontroll med levende og døde celler. Dødkontroll ble laget ved å spinne ned 1,25 mL overnattkultur av *L. monocytogenes* på eppendorfsentrifuge på 10 000 x g i 2 minutter. Dødkontroll ble tilsatt 100 µL 0,9 % NaCl, og deretter 1 mL 70 % isopropanol. Prøven ble inkubert i en time, med risting hvert 15. minutt, og spunnet ned på 10 000 x g i 2 minutter. Videre ble prøven vasket en gang i 1 mL 0,9 % NaCl, og resuspendert i 500 µL 0,9 % NaCl. For levendekontroll ble 100 µL overnattkultur spunnet ned, og direkte resuspendert i 100 µL 0,9 % NaCl.

2X stokkløsning av SYTO 9 og propidiumjodid ble laget etter instruksjoner i manual (Molecular Probes, 2004). Prøvene med fraksjon, kontroll, levendekontroll og dødkontroll ble alle tilsatt 2X stokkløsning av fargestoff i samme volum som prøven. Prøvene ble inkubert i mørket i 15 minutter i romtemperatur. 5 µL løsning med fargede bakterier ble tilsatt på objektglass, og dekket med 18 mm dekkglass. Prøvene ble observert i fluorescensmikroskop med filterkube BGR (begge fra Leica), og det ble tatt bilder med programvaren Las V4.13 med kamera DMC 4500 fra Leica.

### 3.9 LC-MS/MS

Væskekromatografi-massespektrometri (LC-MS, eng: Liquid Chromatography-Mass Spectrometry) er en metode for å separere og identifisere komponenter i en sammensatt prøve. Analytter i prøven blir ionisert til positive og/eller negative ioner ( $[M+H]^+/[M-H]^-$ ) ved elektroprayionisering (ESI). En Time-of-flight (TOF) analysator akselererer ionene ved hjelp av et elektrisk felt. Hastigheten til ionene, og dermed tiden det tar før de når detektoren,

avhenger av deres masse over ladning-verdier ( $m/z$ ), som fører til at ionene separeres. TOF-analysator har en høy massenøyaktighet, som gjør det mulig å bestemme molekulære formler for små molekyler (Pitt, 2009). Tandem MS (MS/MS) splitter ioner med bestemt  $m/z$  fra MS nr. 1 til mindre fragmenter, som blir sendt gjennom et nytt MS-system (MS nr. 2), som igjen skiller komponentene etter deres  $m/z$ . Dette fragmenteringstrinnet gjør det mulig å identifisere og skille ioner som har veldig like  $m/z$  verdier i vanlig MS (Mittal, 2015).

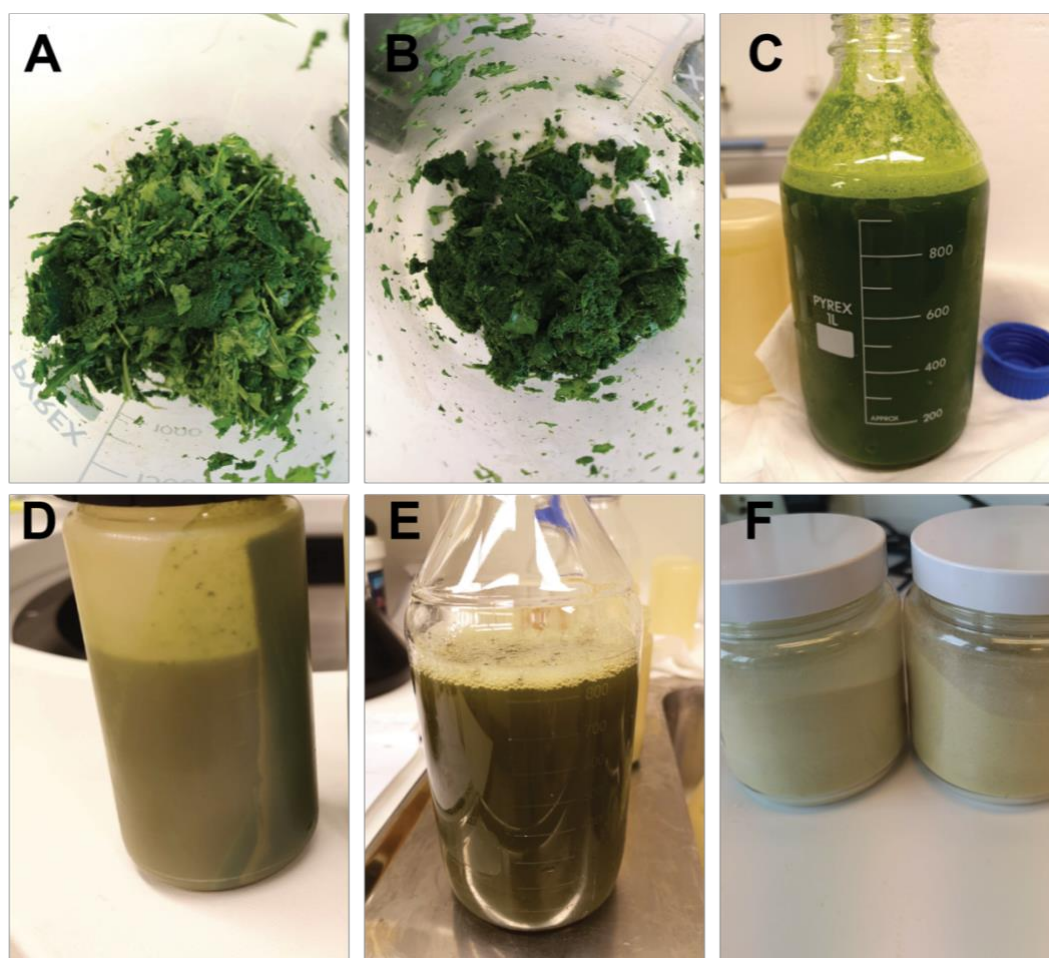
Fraksjoner isolert fra semi-preparativ kromatografisk fraksjonering som viste anti-*Listeria* aktivitet (se resultater kap. 4.5), ble videre analysert ved LC-MS/MS. De to frysetørkede fraksjonene, fraksjon 2 og 4, ble løst i Milli-Q vann til en konsentrasjon på 2,8 mg mL<sup>-1</sup>. Prøvene ble analysert i et LC-qTOF system bestående av 1260 HPLC utstyrt med en fotodiode-array detektor (DAD). Dette systemet er koblet til et G6520A Q-TOF massespektrometer med elektroprayonisering (ESI) som ionkilde. Instrumentet ble styrt med programvaren MassHunter versjon B.07.00. Stasjonærfasen besto av en revers fase Luna Omega C18 kolonne. Injeksjonsvolum for prøvene ble satt til 10 µL, og mobilfasehastigheten til 0,5 mL min<sup>-1</sup>. Det ble kjørt følgende elueringsgradient av mobilfase A (Milli-Q vann, 0,1 % maursyre) og mobilfase B (Acetonitril, 0,1% maursyre): 0 min, 5 % B; 15 min, 5 % B; 20 min, 95 % B; 30 min, 95 % B; 31 min, 5 % B; 50 min, 5 % B. Temperatur i kolonne var 25 °C. DAD detekterte bølgelengdene 214 nm, 227 nm, 254 nm og 330 nm. MS-spekter i området  $m/z=60$  til  $m/z=1000$  ble anskaffet i positiv ionemodus ved bruk av en temperatur på 365 °C, et forstøvertrykk på 2,0 bar, og en tørkegass-strøm på 13 L min<sup>-1</sup>. Massedata ble automatisk korrigert internt opp mot en referansemasseløsning. MS/MS-spekter i området  $m/z=20$  til  $m/z=700$  ble anskaffet med de samme kromatografiske og spektrometriske innstillingene, med fragmenteringsenergier satt til konsensus 10 V, 20 V og 40 V for å muliggjøre sammenligning med offentlige databaser. Komponenter ble identifisert ved hjelp av programvaren Masshunter, sammenligning av molekylmasse og fragmentmasse med databasen DrugBank, samt sammenligning opp mot resultat fra et tidligere studie med ruccola (Fagerlund, Wubshet, et al., 2021).



## 4 Resultater

### 4.1 Tillaging av ruccolajuice og innledende test av antibakteriell aktivitet

Den overordnede hensikten med denne oppgaven var videre karakterisering av antibakteriell aktivitet i ruccolasalatjuice, som tidligere var observert i en studie av Fagerlund, Wubshet, et al. (2021). Det første som ble gjort var å lage en ny porsjon av ruccolajuice til bruk i denne oppgaven. Juicen ble produsert i en saftsentrifuge og deretter sentrifugert og frysetørket som beskrevet i kapittel 3.1. Figur 2 viser bilder fra prosessen fra ruccolasalat til frysetørket ruccolajuice.

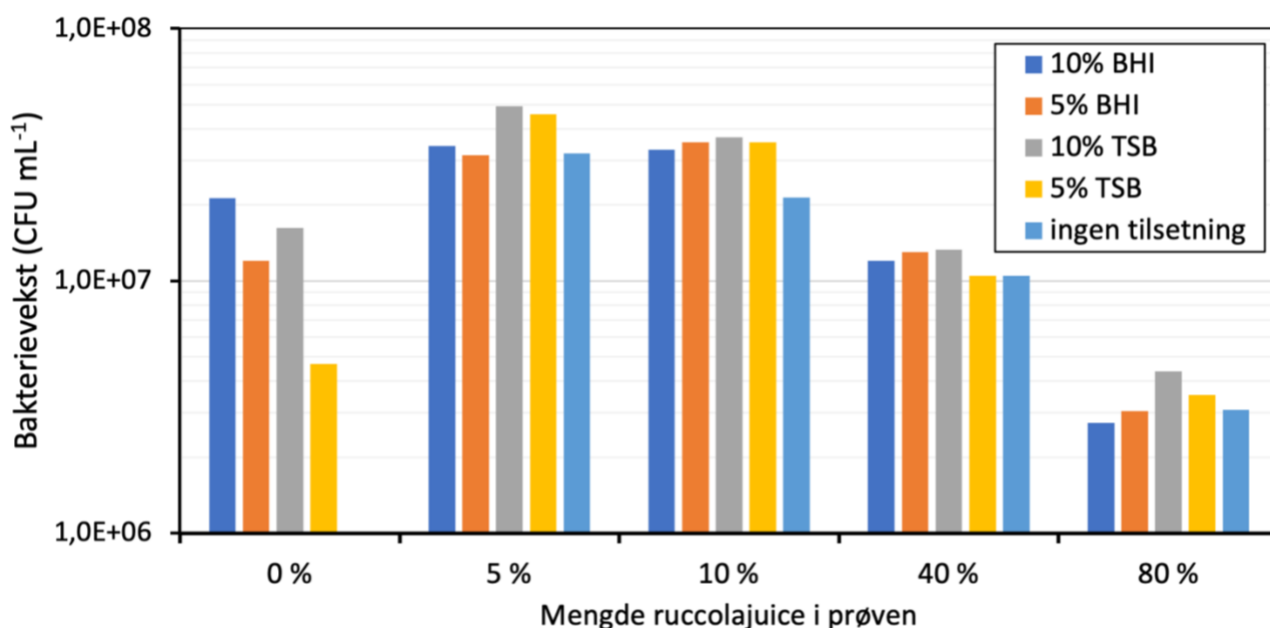


**Figur 2** Produksjon av ruccolasalatjuice. **A)** Ruccolablader etter første kjøring gjennom saftsentrifugen. **B)** Ruccolablader etter andre kjøring gjennom saftsentrifugen. **C)** Råjuice. **D)** Etter første sentrifugering. **E)** Ferdig sentrifugert juice. **F)** Frysetørket ruccolajuice.

Totalt 6,8 kg rå ruccolasalat ble prosessert, og utbyttet ble ca. 4 liter ruccolajuice. En liten del (ca. 100 ml) av ruccolajuicen ble sterilfiltrert, til direkte bruk i mikrobiologiske analyser. Til sammen 3,3 kg ruccolajuice ble frysetørket, og utbyttet etter frysetørking ble 170,62 gram. Dette gir et tørrstoffinnhold på ca. 5 % (19,5X konsentrert fra originalt volum).

For å bekrefte at den produserte porsjonen med ruccolajuice inneholdt tilsvarende anti-listeriell bioaktivitet som tidligere beskrevet (Fagerlund, Wubshet, et al., 2021), ble det utført innledende vekstforsøk med *L. monocytogenes* i nærvær av ulike konsentrasjoner sterilfiltrert ruccolajuice.

Siden ruccolajuice i seg selv er næring for bakterier, og hensikten var å teste forskjell i antibakteriell aktivitet, ikke mengde næring i hver prøve, var det ønskelig å tilsette ekstra næringsstoffer i form av vanlig vekstmedium for bakteriedyrking. Siden det er kjent at forskjellige tilsetninger kan påvirke antibakteriell aktivitet ulikt, ble det besluttet å teste tilsetning av to forskjellige komplekse vekstmedier; BHI og TSB. Begge ble testet ved tilsetning til 5 % og 10 % volum (Figur 3).



**Figur 3** Vekst av *L. monocytogenes* i nærvær av 5 %, 10 %, 40 % og 80 % sterilfiltrert ruccolajuice. Vekst ble testet i prøver tilsatt 5 % og 10 % BHI og TSB, og uten tilsatt ekstra næringsmedium (kun ruccolajuice). Forsøket ble utført ved 12 °C i mikrotiterbrett, og bakteriene ble dyrket i 48 timer før bakteriekonsentrasjon ble bestemt ved utplating. Startkonsentrasjon av *L. monocytogenes* var  $6,7 \times 10^3$  cfu mL<sup>-1</sup>. Forsøket ble utført en gang.

Resultatene som er vist i Figur 3 indikerer at veksten av *L. monocytogenes* ble hemmet ved 80 % ruccolajuice, der veksten var ca. 1 log<sub>10</sub> lavere enn i 5 % ruccolajuice. I prøver med 5 % og 10 % ruccolajuice var det mer vekst enn kontrollene uten tilsatt ruccolajuice, mens 40 % var på omtrent likt nivå. Dette antyder at ved lavere konsentrasjoner av juice er ikke effekten av det inhiberende stoffet i juicen stor nok for å påvirke veksten av *L. monocytogenes*. Den positive effekten av næringen fra juicen kom isteden frem, ved at veksten ved 5 % og 10 % ruccolajuice var større enn for kontrollen. Det så ikke ut til å være en observerbar forskjell i antibakteriell effekt mellom de to mediene BHI og TSB, eller mellom 5 og 10 % tilsatt vekstmedium.

Forsøket bekreftet at ruccolajuicen inneholdt komponenter av antibakteriell aktivitet, overensstemmende med det som tidligere ble observert av Fagerlund, Wubshet, et al. (2021). Hemmende aktivitet mot *L. monocytogenes* ble observert ved konsentrasjon 80 % ruccolajuice.

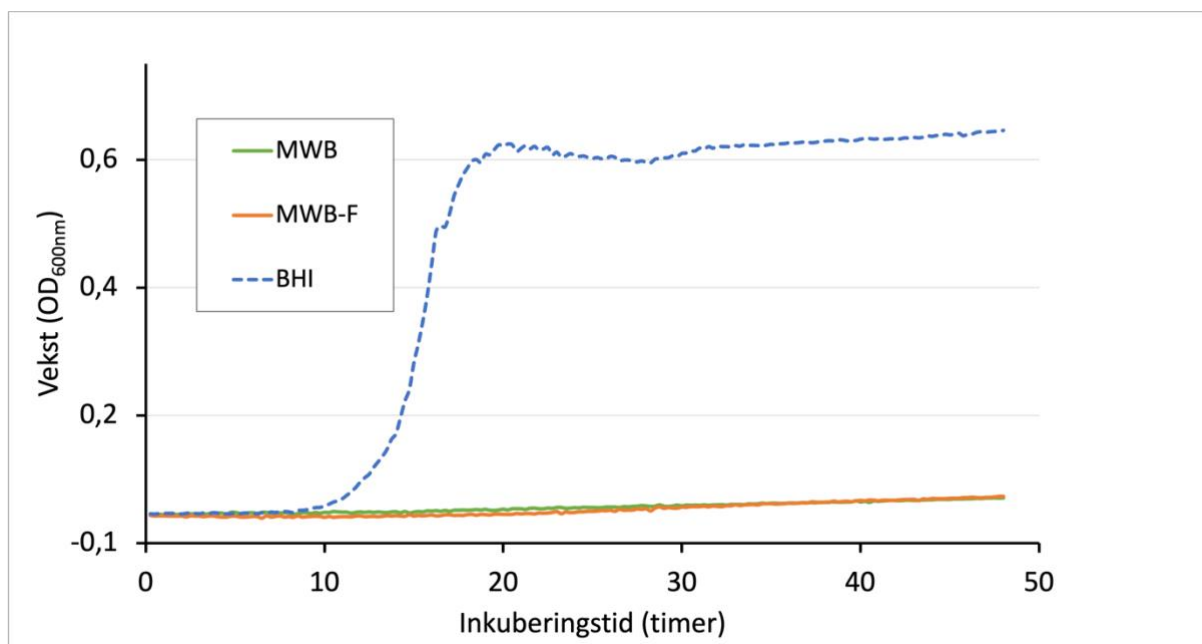
## 4.2 Etablering av et definert vekstmedium for *L. monocytogenes*

Denne oppgaven hadde som mål å studere antibakteriell effekt mot *L. monocytogenes* i juice, ekstrakt og fraksjoner fra ruccolasalat. Tidligere resultater fra lignende forsøk viste at det var nødvendig å tilsette supplerende næringsmedium i vekstforsøk (Fagerlund, Wubshet, et al., 2021). I de tidligere forsøkene ble det brukt BHI og isbergsalatjuice, som begge er vekstmedier med ukjent og varierende næringssammensetning, som ikke er optimalt i antibakterielle forsøk. Et av delmålene i denne oppgaven var derfor å lage et definert vekstmedium med en kjent næringssammensetning. Det ble tatt utgangspunkt i ulike oppskrifter på definerte medium som i tidligere studier hadde støttet vekst av *L.*

*monocytogenes* Scott A. Ulike modifiseringer av de tre definerte mediene Modified Welshimer's broth (MWB) (Premaratne et al., 1991), Hsiang-Ning Tsai medium (HTM) (Tsai & Hodgson, 2003) og mineral medium (MM) (Schneebeli & Egli, 2013) ble utført som beskrevet i kapittel 3.4. Veksten av *L. monocytogenes* i de ulike definerte mediene ble undersøkt i et Bioscreen C instrument etter metode beskrevet i kapittel 3.6.

Mediene MWB og HTM ble begge tillaget etter originale oppskrifter (Premaratne et al., 1991; Tsai & Hodgson, 2003), og som modifiserte varianter kalt MWB-F og HTM-F (Tabell 2), med ferdigblandede løsninger av aminosyrer og vitaminer. MWB ga ingen vekst av *L.*

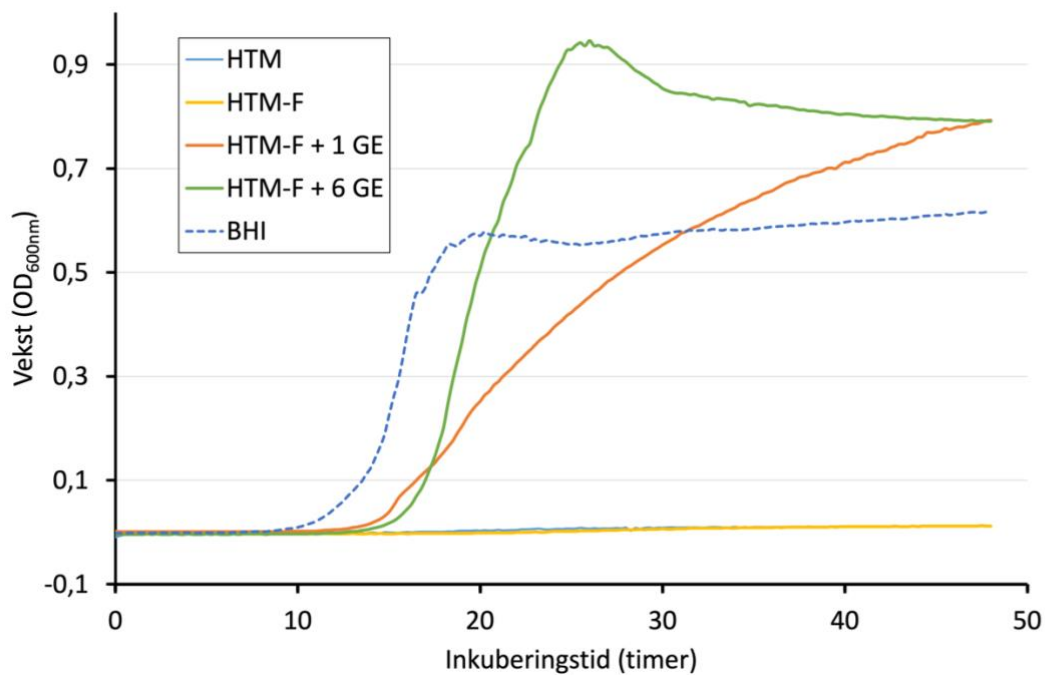
*monocytogenes*, verken i original versjon (MWB) eller versjon med ferdigløsninger (MWB-F) (Figur 4). HTM viste tilsvarende resultat (Figur 5).



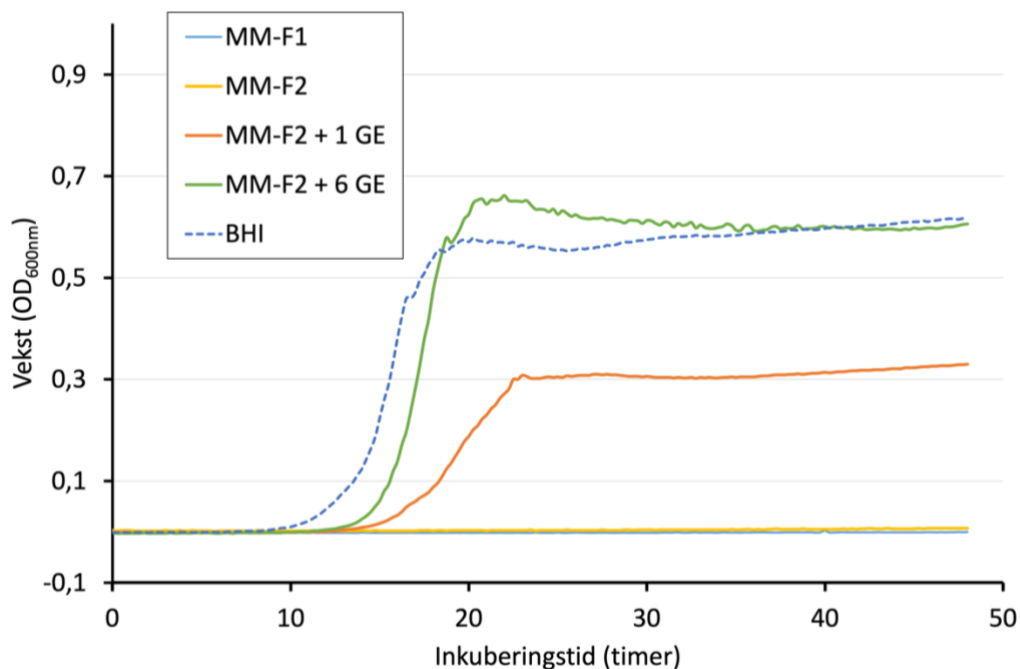
**Figur 4** Vekst av *L. monocytogenes* i MWB, MWB-F og BHI (kontroll) i Bioscreen C ved 25 °C. 180 µl medium ble inokulert med 20 µl 10<sup>-4</sup> fortynning av overnattekultur.

Schneebeli og Egli (2013), beskriver at mediene MWB og HTM ikke støttet vekst av *L. monocytogenes* Scott A, og de utviklet derfor et nytt medium kalt mineral medium (MM). Dette mediet inneholdt mindre mengde glukose enn MWB og HTM, og flere ekstra vitaminer som ofte er nødvendige for bakterievekst. Det er også lagt til en kombinasjon av sporstoffer og MOPS som buffer. Fosfatkonsentrasjonen var redusert til 1/10 av det opprinnelige innholdet i MWB. I denne oppgaven ble det laget en variant av mediet MM, kalt MM-F, der spormetaller, vitaminer og aminosyrer ble tilsatt fra ferdigløsninger. Mediet ble testet med og uten tilsetning av EDTA, referert til som henholdsvis MM-F1 og MM-F2. Resultatene, som er vist i Figur 6, viste at MM-F1 og MM-F2 ikke ga vekst av *L. monocytogenes*.

Det ble tilsatt gjærekstrakt til to av de definerte mediene for å undersøke om det ville gi vekst av *L. monocytogenes*. Det ble forsøkt med to konsentrasjoner av gjærekstrakt: 1 og 6 g L<sup>-1</sup> (heretter 1 GE og 6 GE). Resultatet viste vekst av *L. monocytogenes* i alle mediene som var tilsatt gjærekstrakt. For HTM-F og MM-F var det forskjell i veksthastighet for 1 GE og 6 GE (Figur 5). For HTM-F oppnådde GE-konsentrasjonene samme OD<sub>600nm</sub>, mens i MM-F (Figur 6) avsluttet med lavere OD<sub>600nm</sub> for 1 GE.



**Figur 5** Vekst av *L. monocytogenes* i HTM, HTM-F, HTM-F med 1 og 6 g L<sup>-1</sup> gjærekstrakt (GE) og BHI (kontroll) i Bioscreen C ved 25 °C, 180 µl medium ble inokulert med 20 µl 10<sup>-4</sup> fortynning av overnattkultur.



**Figur 6** Vekst av *L. monocytogenes* i medium MM-F1, MM-F2, MM-F2 med 1 og 6 g L<sup>-1</sup> gjærekstrakt (GE), og BHI som kontroll i Bioscreen C ved 25 °C, 180 µl medium ble inokulert med 20 µl 10<sup>-4</sup> fortynning av overnattkultur.

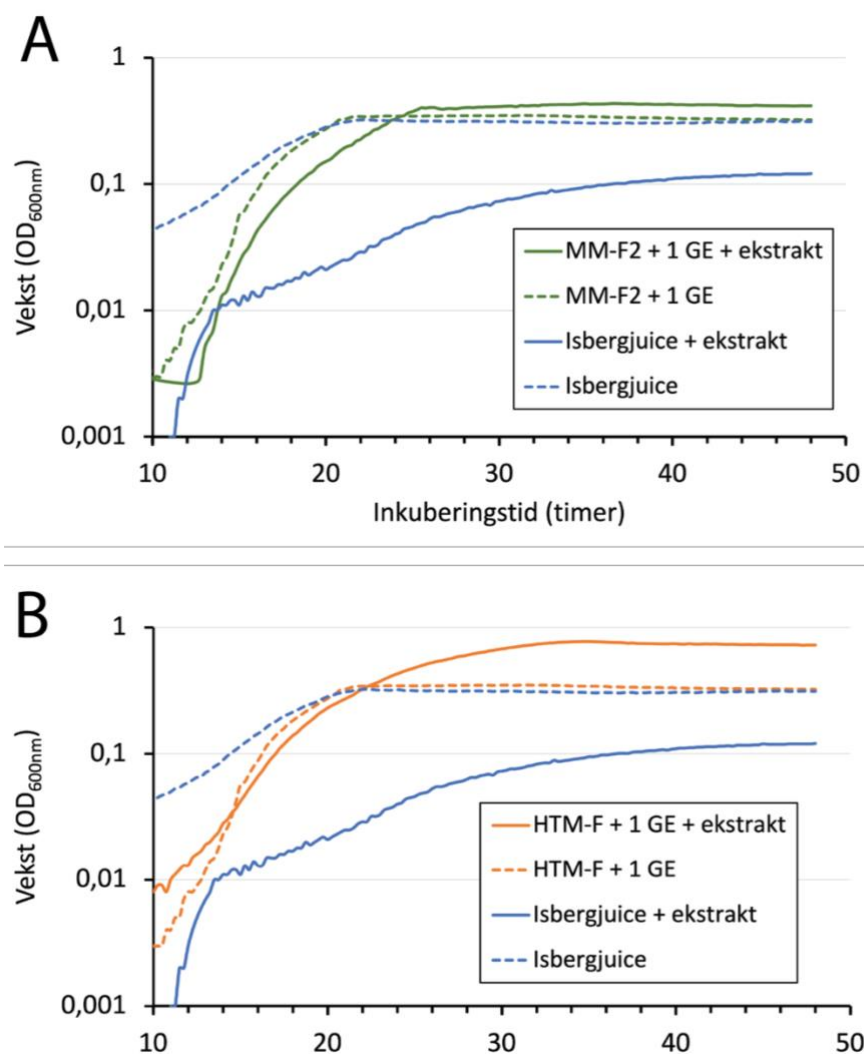
For å oppnå vekst i mediene ble det forsøkt å tilpasse *L. monocytogenes* til det definerte mediet, ved å dyrke cellene i mediet før tilsetning i Bioscreen. Mediene MWB-F, HTM-F og MM-F2, samt HTM-F og MM-F2 med 1 og 6 GE ble testet. Dette ble utført på samme måte som standard overnattkultur i BHI, der BHI ble erstattet av det definerte mediet som skulle inokuleres i Bioscreen. Alle overnattkulturene oppnådde et celletall mellom  $10^8$  og  $10^{10}$  CFU mL<sup>-1</sup> etter både ett og to døgn inkubering. Brønner i Bioscreenbrett med definert medium inokulert med definert medium-overnattkultur, viste ingen åpenbar forskjell i vekst fra brønner inokulert med *L. monocytogenes* dyrket i BHI (vanlig overnattkultur) (resultater ikke vist). Dette indikerte at det ikke var noe effekt av å dyrke *L. monocytogenes* i definert medium før inokulering i Bioscreenbrettet.

Arbeidet med definert medium ble utført parallelt med ekstrahering av ruccola (se neste kapittel). For å undersøke om mediene som ble fremstilt kunne bli brukt i forsøk der antibakteriell aktivitet i stoffer fra ruccola skulle undersøkes, uten at mediene i seg selv forstyrret den antibakterielle aktiviteten, ble det utført et forsøk der mediene ble brukt i dyrkningsforsøk med tilsatt ruccolaekstrakt (tørket ruccolajuce ekstrahert med 100 % metanol).

De definerte mediene HTM-F og MM-F2, med og uten 1 GE, ble testet sammen med ruccolaekstrakt for å undersøke om det ble vist en antibakteriell effekt på *L. monocytogenes*. Det ble tilsatt 5, 3 og 1 mg mL<sup>-1</sup> ruccolaekstrakt i prøvene (resultat ikke vist for 3 og 1 mg mL<sup>-1</sup>). Mediene ble tilsatt i ulik konsentrasjon, 20 µl og 80 µl til 200 µl, samt 80 µl med oppkonsentrert medium, slik at konsentrasjonen av komponentene ble tilsvarende ufortynnet medium (sluttkonsentrasjon i brønn ble dermed 100 %). I brønner med 20 og 80 µl medium vokste ikke *L. monocytogenes* i kontrollen (0 mg mL<sup>-1</sup>). I oppkonsentrert medium ble det vekst i mediene der gjærekstrakt var tilsatt (Figur 7).

For å sammenligne resultatene fra definert medium, ble forsøksoppsett for anti-*Listeria* aktivitet tilsvarende som i Fagerlund, Wubshet, et al. (2021) satt opp. 20 µl isbergjuice ble tilsatt i totalvolum på 200 µl som kontroll opp mot definert medium. Resultatene viste ingen tydelig hemmingseffekt av ruccolaekstraktet mot *L. monocytogenes* i definert medium. Med isbergjuice var det en tydelig hemming av veksten til *L. monocytogenes* ved tilsatt ruccolaekstrakt. Figur 7 viser resultatet for 5 mg mL<sup>-1</sup> ruccolaekstrakt for isbergjuice og definert medium (HTM-F og MM-F2, 1 GE).

Ut fra resultatene fra vekstforsøk med de ulike definerte mediene, også ved tilstedeværelse av ruccolaekstrakt, ble det bestemt at mediene ikke passet til bruk i vekstforsøk for undersøkelse av antibakteriell aktivitet. Dette grunnet mangel på vekst uten gjærekstrakt tilsatt, og den høye konsentrasjonen som krevdes av mediet for å oppnå vekst. Det ble besluttet å bruke isbergsalatjuice som næringsmedium i videre forsøk, som ble brukt i tidligere forsøk med antibakteriell aktivitet i ruccola (Fagerlund, Wubshet, et al., 2021).



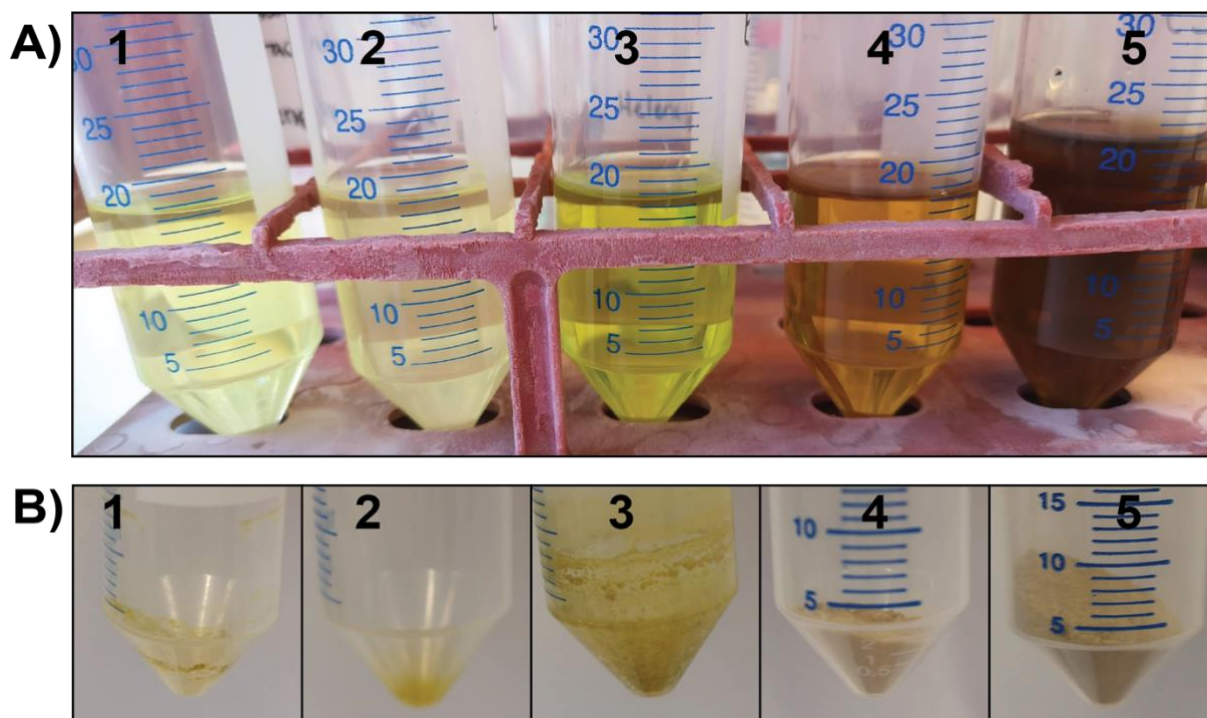
**Figur 7 A)** Vekst av *L. monocytogenes* i medium MM-F2 med 1 g L<sup>-1</sup> gjærekstrakt (1 GE) **B)** Vekst av *L. monocytogenes* i medium HTM-F med 1 g L<sup>-1</sup> gjærekstrakt (1 GE). I A og B er 20 µl isbergjuice brukt som kontroll. Prøvene ble tilsatt 5 mg mL<sup>-1</sup> ruccolaekstrakt. Prøvene er inkubert i Bioscreen C ved 25 °C i 48 timer.



### 4.3 Uttesting av ekstraksjonsmidler for frysetørket ruccolajuice

For å best mulig isolere den bioaktive komponenten i ruccolajuice, ble det besluttet å undersøke effekten av ulike ekstraksjonsmidler. Ved tidligere forsøk (Fagerlund, Wubshet, et al., 2021) ble ruccolajuice ekstrahert med 50 % metanol. Det var ønskelig å finne ut om et annet løsemiddel kunne ekstrahere ut mer av den bioaktive komponenten. Det ble valgt ut fem ekstraksjonsmidler: etanol, etyl acetat, 100 % metanol, 50 % metanol (blandet med MilliQ-vann) og kun MilliQ-vann (Figur 8).

Utbyttet etter ekstrahering av frysetørket ruccolajuice med 100 % metanol var på 4,65 % (93,8 mg fra 2 g materiale). Ekstrahering med 50 % metanol ga et utbytte på 34,6 % (692 mg fra 2 g materiale). Ekstrahering med vann ga et utbytte på 82 % (1,641 g fra 2 g materiale). Etanol og etyl acetat ble ikke veid ut grunnet lite utbytte, og det ble derfor besluttet å ikke jobbe videre med disse. Ekstraktene fra ekstrahering med 100 % metanol, 50 % metanol og vann ble injisert i HPLC, og i tillegg ble ekstraktene undersøkt i vekstforsøk med *L. monocytogenes*.

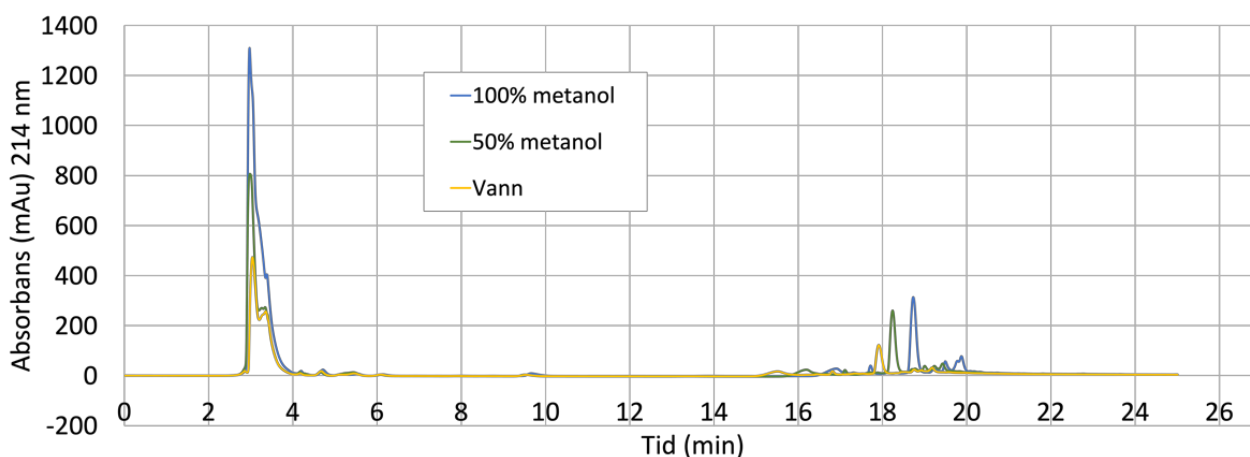


**Figur 8** Bildene viser frysetørket ruccolajuice ekstrahert med **1)** Etanol **2)** Etyl acetat **3)** 100 % metanol **4)** 50 % metanol og **5)** MilliQ-vann. **A)** Prøver med ekstraksjonsmiddel. **B)** Prøver etter ekstrahering, avdampning og frysetørrking.



#### 4.3.1 HPLC-analyse av ekstrakter fra ruccolajuice

Bestanddelene av de tre tørrekstraktene fra ekstrahering med 100 % metanol, 50 % metanol og vann (Figur 8: 3, 4, 5) ble undersøkt ved å injisere prøvene i en revers fase HPLC-kolonne. Figur 9 viser kromatogram fra HPLC for de tre ekstraktene ved absorbans 214 nm fra 0-25 minutter elueringstid. Alle de tre tørrekstraktene viste en stor topp etter ca. 2 minutter, og videre noen små topper etter 16 minutter. Tidligere resultater (Fagerlund, Wubshet, et al., 2021) viste at det var antibakteriell effekt i HPLC fraksjoner isolert fra tilsvarende topp, fra starten av elueringen. Prøven som viste høyeste absorbans i dette området var den som hadde blitt ekstrahert med 100 % metanol, sammenlignet med 50 % metanol og vann. Resultatene indikerte at de tre ekstraktene inneholdt lignende komponenter, men i ulik mengde, da toppene lå på samme sted på kromatogrammet.



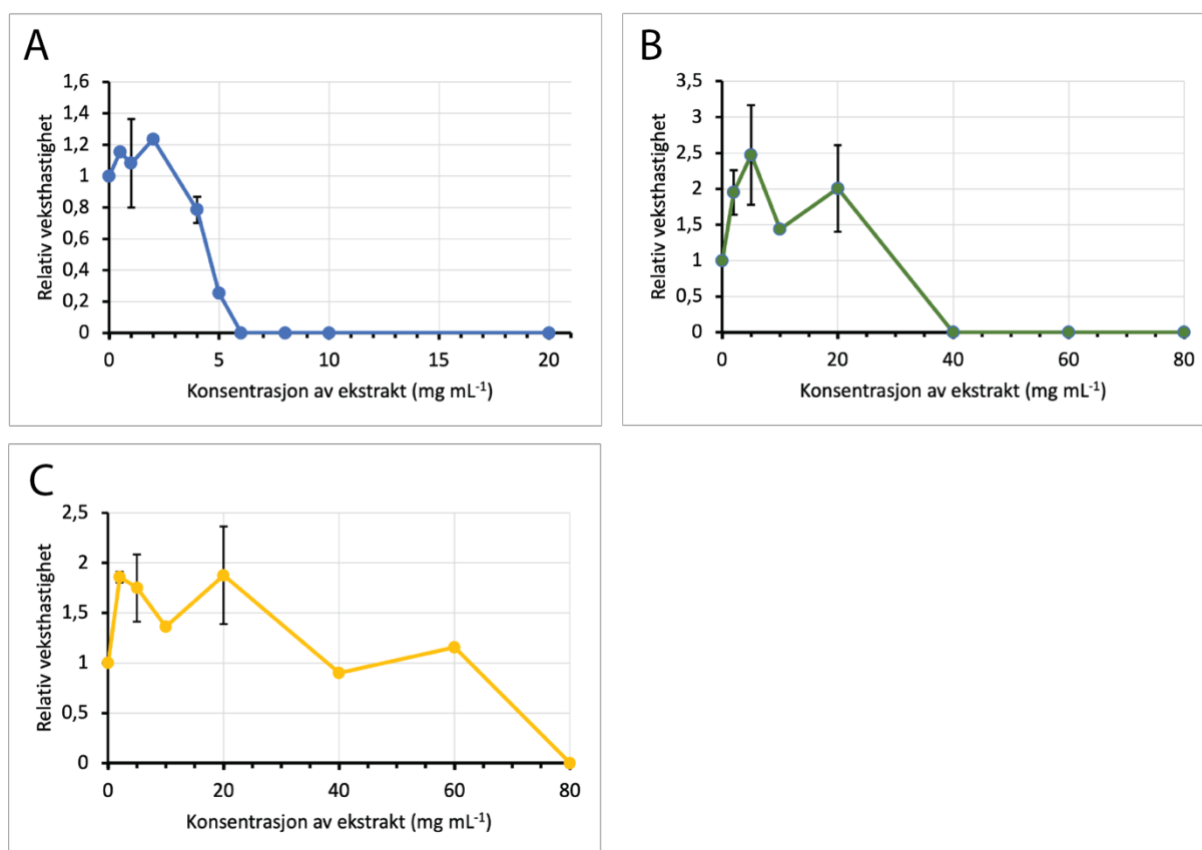
**Figur 9** Revers fase HPLC med tørket ruccolajuice ekstrahert med 100 % metanol, 50 % metanol og vann (Milli-Q vann). Injisert 20  $\mu\text{L}$  i HPLC med konsentrasjon 100  $\text{mg mL}^{-1}$  av ekstraktene, løst opp i 50% metanol. Målt absorbans (mAU) for bølgelengde 214 nm fra 0-25 minutter.

#### 4.3.2 Mikrobiologisk analyse av ekstrakter fra ruccolajuice

Effekten av ekstraktene på veksthastigheten til *L. monocytogenes* ble undersøkt i Bioscreen C, og det ble utarbeidet en dose-respons kurve (Figur 10). Resultatet viste at alle ekstraktene hemmet vekst av *L. monocytogenes*, og at aktiviteten var avhengig av hvilken metanolkonsentrasjon som var brukt ved ekstrahering, og konsentrasjonen til tørrekstraktet. Full hemming av vekst ble oppnådd ved ulike konsentrasjoner for de tre tørrekstraktene, der den laveste konsentrasjonen for hemming ble oppnådd med 100 % metanol som ekstraksjonsmiddel. Full veksthemming (MIC) for 100 % metanolekstrakt ble observert ved 6  $\text{mg mL}^{-1}$ , 50 % metanol hemmet ved 40  $\text{mg mL}^{-1}$ , og vann ved 80  $\text{mg mL}^{-1}$ . Dette resultatet

indikerte at 100 % metanol som ekstraksjonsmiddel oppnådde den høyeste konsentrasjonen av de bioaktive komponentene. Dette stemmer overens med resultatene fra HPLC, der 100 % metanolekstrakt viste høyest absorbans i området det tidligere var vist bioaktivitet. På grunnlag av resultatene ble det valgt å gå videre med 100 % metanol som ekstraksjonsmiddel ved ekstrahering av ruccola, referert til som ruccolaekstrakt.

For ekstrakt ekstrahert med 50 % metanol og 100 % metanol var veksthastigheten av *L. monocytogenes* signifikant forskjellig for konsentrasjonene testet ( $p=0,015$  og  $p=0,024$ ), men ved parvise sammenligninger (Tukey's test) var ingen prøver signifikant forskjellige fra nullprøven. For ekstrakt med vann var det ikke signifikante forskjeller i vekstrate ( $p=0,26$ ).



**Figur 10** Dose-respons kurve som viser relativ veksthastighet (beregnet fra  $OD_{600nm}$  verdier) til *L. monocytogenes* i ulike konsentrasjoner av tørreksrakt, ekstrahert med henholdsvis **A)** 100 % metanol, **B)** 50 % metanol og **C)** vann (MilliQ-vann). Inkubert i Bioscreen C på 25 °C i 48 timer. Feilfelt viser standardfeil av gjennomsnittet.

#### 4.4 Isolering av fraksjoner fra ruccolaekstrakt

For å undersøke nærmere hvilke komponenter fra ruccola som hemmet vekst av *L. monocytogenes*, ble ruccolaekstrakt separert til åtte fraksjoner ved bruk av en semi-preparativ revers fase HPLC-kolonne.

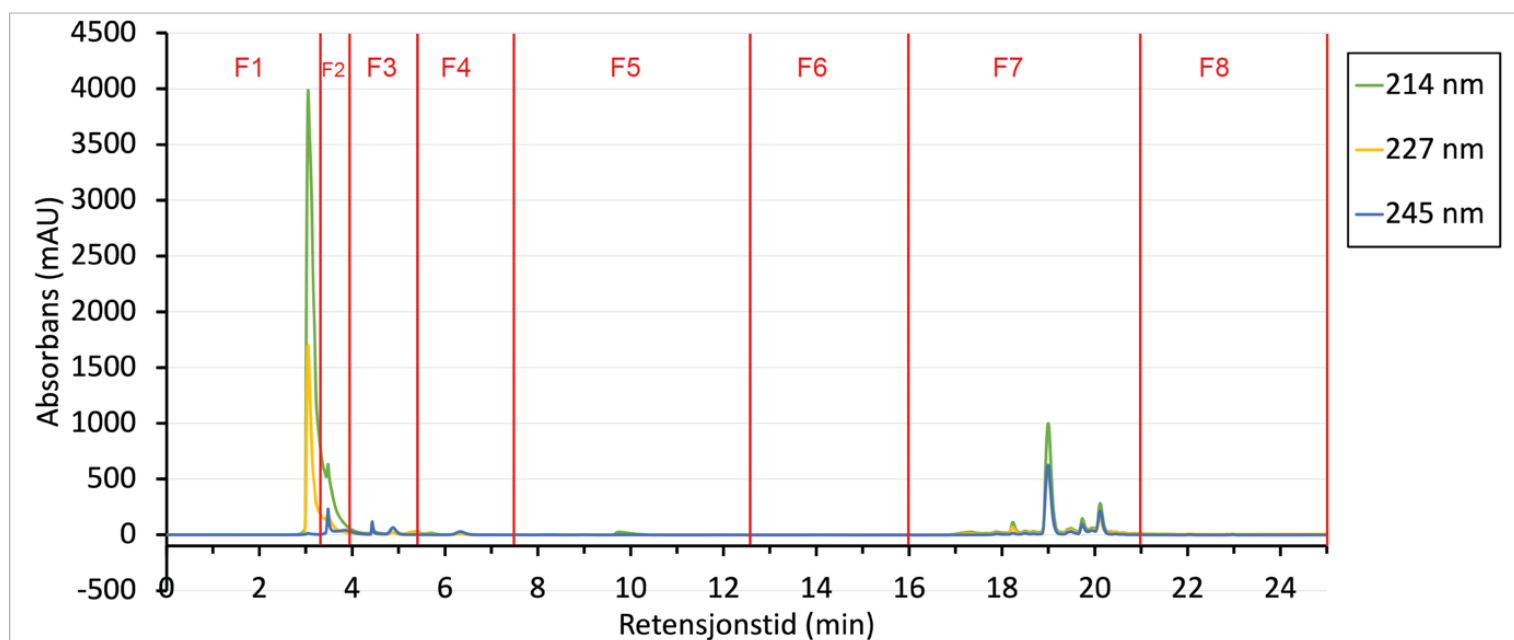
Mobilfasegradienten i HPLC ble optimalisert for best mulig separasjon av prøven. Den totale analysetiden ble kortet ned. Andel mobilfase A (dvs. vandig løsemiddel) ved start var lav for å få mest mulig separasjon i starten av elueringen, og programmet ble kjørt i flere omganger med lavt injeksjonsvolum (50 µL). Analyse av absorbanstoppene i kromatogrammet fra en testinjeksjon ga utgangspunkt for hvilke kolonnefraksjoner som skulle samles. Første topp (fra 2 til 4 minutter) ble splittet opp i to fraksjoner, da resultater fra tidligere studie (Fagerlund, Wubshet, et al., 2021) viste antibakteriell aktivitet i komponenter samlet fra denne toppen.

Fra HPLC ble det samlet prøve fra hvert 30. sekund i retensjonstiden på 25 minutter, som resulterte i 48 kolonnefraksjoner. Kolonnefraksjonene ble samlet til totalt åtte samlefraksjoner (heretter fraksjoner), som oppgitt i Tabell 4. Det ble utført totalt 18 injiseringer på HPLC-kolonnen med oppsamling av alle fraksjoner, Figur 11 viser kromatogram fra en av de 18 injiseringene. Tre av fraksjonene ble veid etter frysetørking, der fraksjon 1 fikk et utbytte på 45,4 mg, fraksjon 3 på 0,7 mg og fraksjon 7 på 10,3 mg. Resterende fraksjoner hadde lite prøvemateriale, og ble derfor ikke veid, i fare for å miste materiale i utveiingsprosessen. Totalt utbytte av fraksjonene som ble veid var 56,4 mg. 18 injeksjoner utgjør teoretisk sett 90 mg prøvemateriale injisert inn i HPLC.

Etter uttesting av anti-*Listeria* aktivitet i fraksjoner (se neste kapittel), ble HPLC utført i flere runder med oppsamling av fraksjoner som viste anti-*Listeria* aktivitet. Kromatogram fra en av rundene med HPLC (21 injiseringer) er vist i Vedlegg 1, der kun fraksjon 2 og 4 ble tatt vare på for videre bruk. Det ble totalt utført 118 injiseringer i HPLC med oppsamling av fraksjon 2 og 4, som ga et totalt utbytte på 8,1 g av fraksjon 2 og 17,9 mg av fraksjon 4.

**Tabell 4** Oppsamling av fraksjoner fra HPLC. 48 kolonnefraksjoner ble samlet til 8 samlefraksjoner (fraksjoner) F1-F8. Antall kolonnefraksjoner som ble samlet for hver fraksjon, og tidsintervallet fra 1-25 minutter der fraksjonen ble samlet er oppgitt.

Samlefraksjon	Kolonnefraksjoner	Antall kolonnefraksjoner som ble samlet	Tidsintervall (min) der fraksjon ble samlet
F1	1, 2, 3, 4, 5	5	1-3,5
F2	6	1	3,5-4
F3	7, 8, 9	3	4-5,5
F4	10, 11, 12, 13	4	5,5-7,5
F5	14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23	10	7,5-12,5
F6	24, 25, 26, 27, 28, 29, 30	7	12,5-16
F7	31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40	10	16-21
F8	41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48	8	21-25



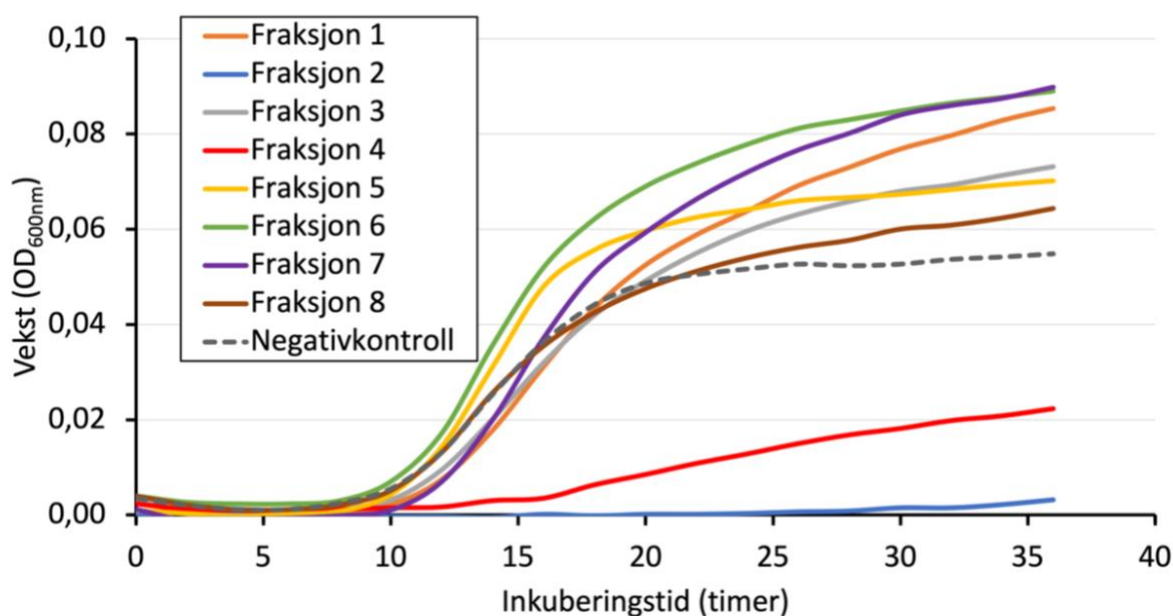
**Figur 11** Semi-preparativ revers fase HPLC fraksjonering med ruccolaekstrakt. 50  $\mu$ L injisering med ruccolaekstrakt løst i 50 % metanol til konsentrasjon 100 mg mL<sup>-1</sup>. Fraksjoner 1-8 er markert med F1-F8 i figur. Kromatogrammet viset målt absorbans (mAU) for bølgelengde 214 nm, 227 nm og 254 nm, fra 0-25 minutter retensjonstid i HPLC.

#### 4.5 Anti-*Listeria* aktivitet i fraksjoner fra HPLC

Ruccolaekstrakt ble separert ved semi-preparativ kromatografisk fraksjonering til totalt åtte fraksjoner. Disse prøvene ble tørket og deretter testet for antibakteriell aktivitet mot *L. monocytogenes* i et Bioscreen C instrument. Dette ble gjort for å finne ut om den antibakterielle aktiviteten funnet i ruccolaekstrakt, ble gjenfunnet i større eller mindre grad i noen av fraksjonene.

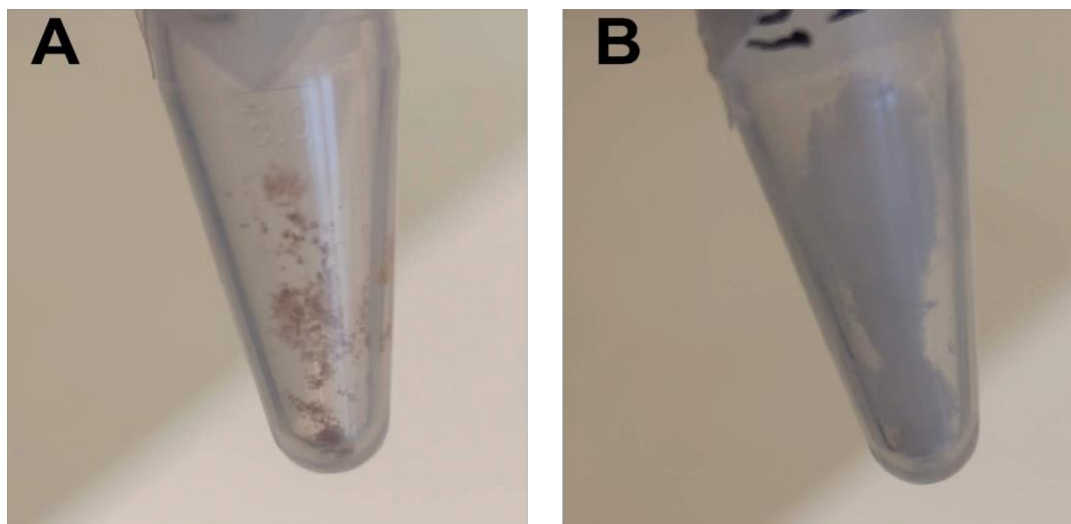
Hver av de åtte frysetørkede fraksjonene ble resuspendert i 1 mL dH<sub>2</sub>O, og deretter fortynnet ved tilsetning i Bioscreenbrett. Til et totalvolum på 200 µl i hver brønn i Bioscreenbrett ble det tilsatt 1, 3, 10 og 30 µl av hver av de åtte fraksjonene. Resultat for tilsetning av 10 µl av fraksjon er vist i Figur 12, mens resterende fortynninger er vist i Vedlegg 2. Fem av prøvene ble analysert med ukjent konsentrasjon (fraksjon nr. 2, 4, 5, 6, 8), og tre av prøvene med kjent konsentrasjon (fraksjon nr. 1, 3, 7 ble veid opp). Sluttkonsentrasjonene i forsøk hvor 10 µl av fraksjonene ble tilsatt for prøve 1, 3 og 7 ble henholdsvis 2.27, 0.035 og 0.515 mg mL<sup>-1</sup>.

Resultatet viste hemming av veksten til *L. monocytogenes* i fraksjon 2 og 4 ved 10 og 30 µl fortynning, mens 1 og 3 µl fortynning viste lik vekst for alle fraksjoner. Resultatet indikerte at anti-*Listeria* aktiviteten var tilstedeværende i to av fraksjonene: fraksjon 2 og 4.



**Figur 12** Vekst av *L. monocytogenes* inkubert i Bioscreen C på 25 °C i 36 timer, ved tilstedeværelse av HPLC fraksjon 1-8. 10 µl fraksjon (i blanding med dH<sub>2</sub>O) ble tilsatt i Bioscreen brett, og tilsatt 10 % isbergsalatjuice. Vekstkurvene er et gjennomsnitt fra tre replikater.

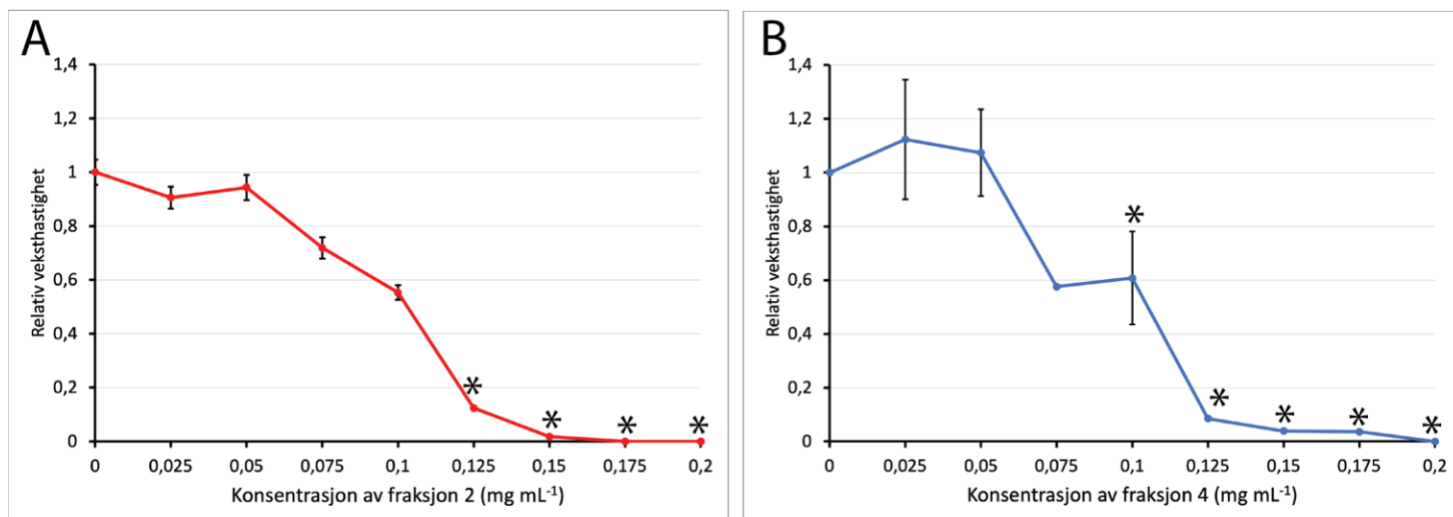
Den antibakterielle aktiviteten som ble indikert av forsøket som vises i Figur 12, ble nærmere undersøkt ved å isolere mer av fraksjon 2 og 4 fra HPLC. Fraksjonene ble veid opp, slik at det ble mulig å undersøke dose-respons-sammenheng for de to fraksjonene. Figur 13 viser bilde av de to fraksjonene.



**Figur 13** Bildene viser eppendorfrør inneholdende: **A)** Fraksjon 2. **B)** Fraksjon 4.

Dose-respons kurven (Figur 14) viser inhiberingen av vekst for *L. monocytogenes* målt som relativ veksthastighet ved bruk av vekstforsøk i Bioscreen C. Økende konsentrasjoner av fraksjon viser økende hemming av veksthastigheten for begge fraksjoner, noe som bekreftet indikasjonen fra Figur 12 (forsøk med alle fraksjoner). Resultatet viste at anti-*Listeria* aktiviteten var dose-avhengig, og fraksjon 2 og 4 hadde forsterket aktivitet sammenlignet med ruccolaekstraktet (Figur 10 A). MIC-verdi for fraksjon 2 var  $0,175 \text{ mg mL}^{-1}$  og fraksjon 4  $0,2 \text{ mg mL}^{-1}$ .

Analyse av variansen viste at vekstraten (veksthastigheten) ble signifikant redusert ved økende konsentrasjon av fraksjon. Fraksjon 2 og 4 viste signifikante forskjeller i vekstrate med  $p < 0,05$  ( $p = 0,000$ ). Parvise sammenligninger viste at vekstraten for prøver som inneholdt  $0,125 \text{ mg mL}^{-1}$  og mer av fraksjon 2 var signifikant forskjellige fra nullprøven ( $p < 0,05$ ). På samme måte var vekstraten for prøver med konsentrasjon fra  $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$  og oppover av fraksjon 4 signifikant forskjellige fra nullprøven ( $p < 0,05$ ).



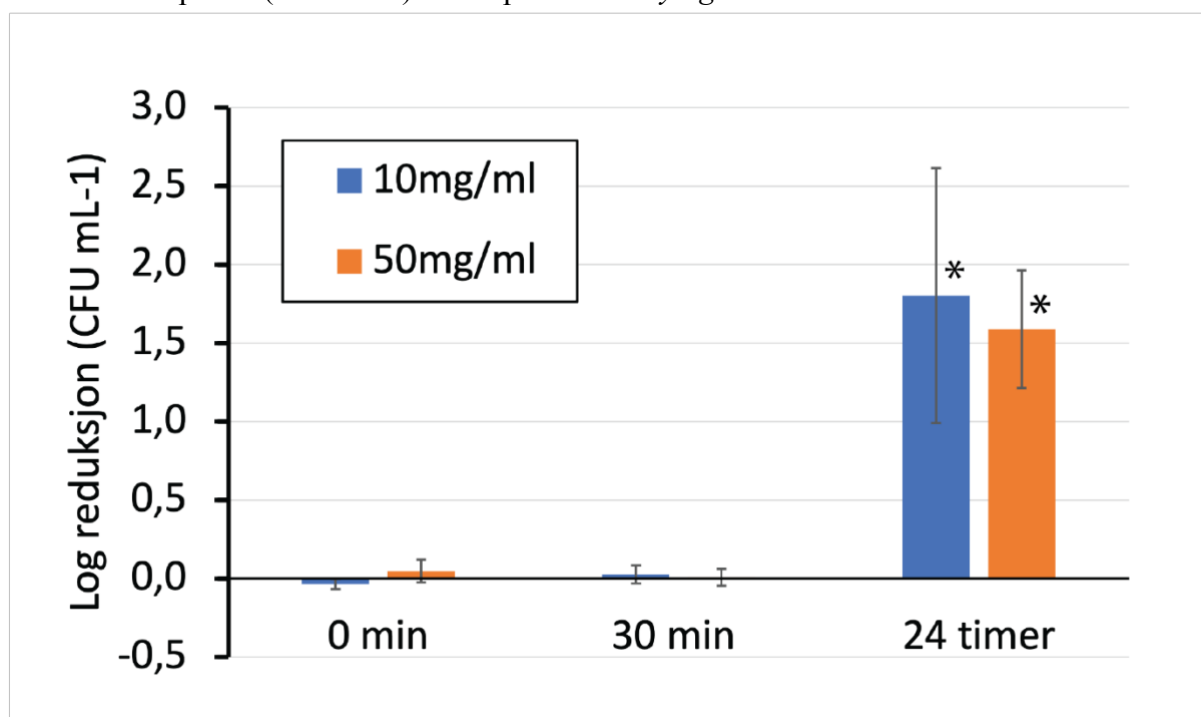
**Figur 14** Dose-respons kurver som viser relativ veksthastighet av *L. monocytogenes* som respons av økende konsentrasjon av: **A)** fraksjon 2, **B)** fraksjon 4. Feilfelt viser standardfeil av gjennomsnittet. Stjerne markerer konsentrasjoner signifikante forskjeller i vekstrate ved parvis sammenligning med nullprøven ( $p < 0,05$ ).

#### 4.6 Karakterisering av bakteriedrepende aktivitet mot *L. monocytogenes*

Resultater fra forsøk i denne oppgaven viste at komponenter i ruccolajuice, som videre ble funnet igjen i ekstrakt fra tørket ruccolajuice, virket veksthemmende på *L. monocytogenes*. Det var videre et poeng å undersøke om denne antibakterielle aktiviteten fra ruccolajuice og ruccolaekstrakt også virket bakteriedrepende (baktericid). Reduksjon i CFU mL<sup>-1</sup> av *L. monocytogenes* sammenlignet med kontroll (dH<sub>2</sub>O) indikerte bakteriedrepende aktivitet. Det ble videre undersøkt om den bakteriedrepende effekten også kunne observeres i fraksjoner som viste anti-*Listeria* effekt på vekst. Dette ble studert i fluorescensmikroskop med live/dead farging av cellene.

For å undersøke om ruccolajuicen, som antydte å ha en anti-*Listeria* effekt (Figur 3), også hadde bakteriedrepende effekt, ble det utført en suspensjonstest som beskrevet i kapittel 3.7. *L. monocytogenes* ble inokulert i ulike konsentrasjoner i juicen, for å ta høyde for eventuell påvirkning av inokulumskonsentrasjon på resultatet. Resultatet fra forsøk (Vedlegg 3) indikerte at juicen ikke virket bakteriedrepende på *L. monocytogenes* etter 24 timer ved 25 °C. Veksten til *L. monocytogenes* ble på det meste økt med 9 log<sub>10</sub>-enheter etter 24 timer.

For å undersøke om ruccolaekstrakt, som tidligere har vist å ha en anti-*Listeria* effekt (Figur 10), hadde bakteriedrepende effekt, ble det utført en suspensjonstest som beskrevet i kapittel 3.7. *L. monocytogenes* ble inokulert i ruccolaekstrakt med  $10^7$  CFU mL<sup>-1</sup>. Figur 15 viser resultat fra inokulum med  $10^7$  CFU mL<sup>-1</sup> *L. monocytogenes* med ruccolaekstrakt i konsentrasjon 10 og 50 mg mL<sup>-1</sup> for fem uavhengige gjentak. Etter 24 timer inkubering ble antall dyrkbare *L. monocytogenes* signifikant redusert ( $p=0,046$  for 10 mg mL<sup>-1</sup>,  $p=0,029$  for 50 mg mL<sup>-1</sup>), sammenlignet med kontrollprøven. Det var en reduksjon på ca. 1,5 log<sub>10</sub>-enhet i begge konsentrasjonene av ekstrakt. Resultatet indikerte at ruccolaekstraktet hadde en bakteriedrepende (baktericid) effekt på *L. monocytogenes*.

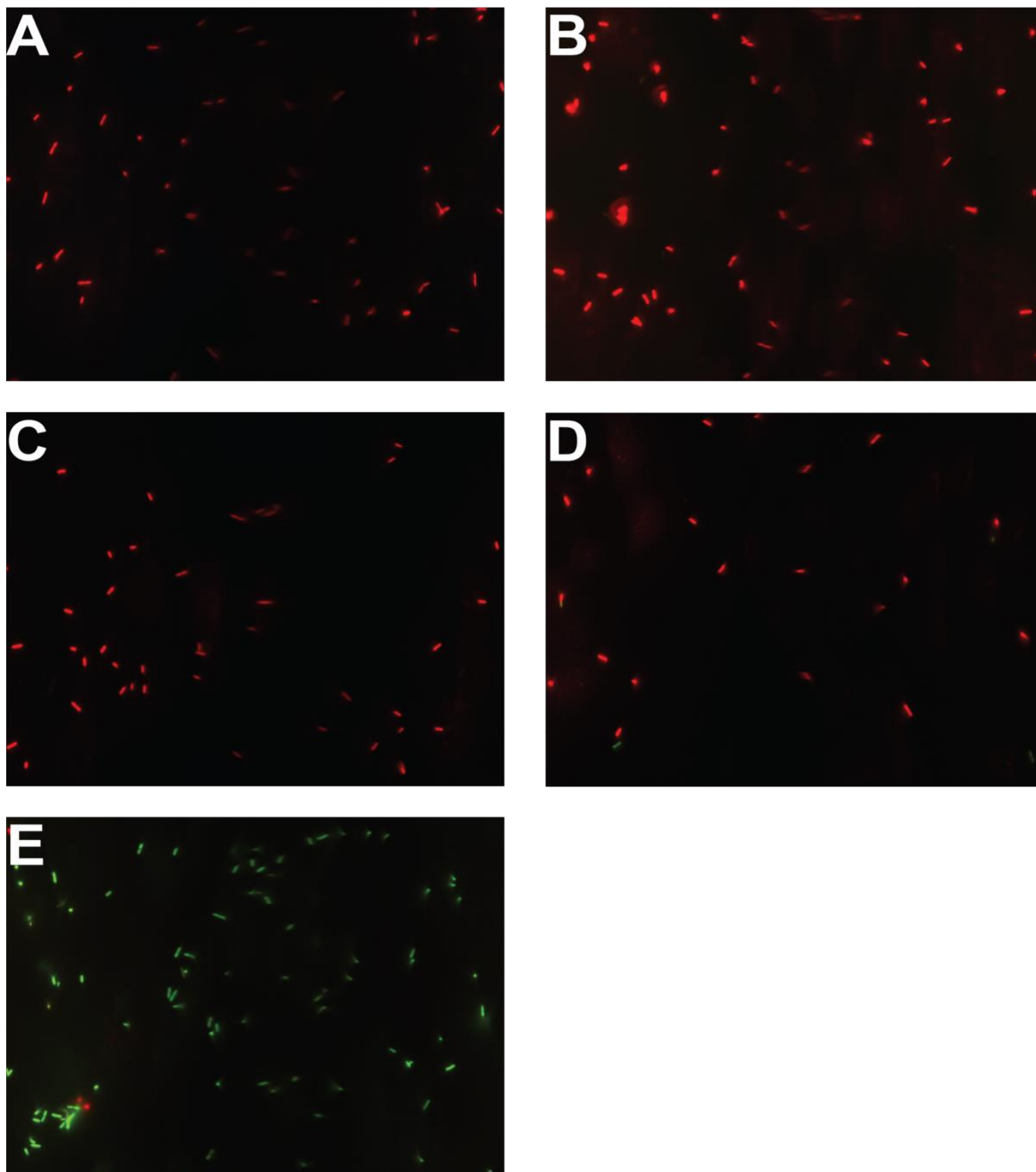


**Figur 15** Log<sub>10</sub> reduksjon (CFU mL<sup>-1</sup>) av *L. monocytogenes* behandlet med 10 mg mL<sup>-1</sup> og 50 mg mL<sup>-1</sup> ruccolaekstrakt etter 0 minutter, 30 minutter og 24 timer inkubering. Feilfelt viser standardfeil fra gjennomsnitt av fem replikater. Stjerne viser signifikant forskjell mellom den markerte prøven og kontrollprøve ( $p<0,05$ ).

Fraksjoner fra HPLC, isolert fra ruccolaekstrakt, ble undersøkt for bakteriedrepende aktivitet mot *L. monocytogenes*. De to fraksjonene som viste anti-*Listeria* effekt i vekstforsøk i Bioscreen C (Kap 4.5), fraksjon 2 og 4, ble testet i dette forsøket. Live/dead kit ble brukt for å farge cellene etter 24 timers behandling med de to fraksjonene, og cellene ble studert i fluorescensmikroskop. I tillegg ble prøvene platet på agarskåler etter 24 timer for å estimere konsentrasjonen (CFU mL<sup>-1</sup>) av celler.

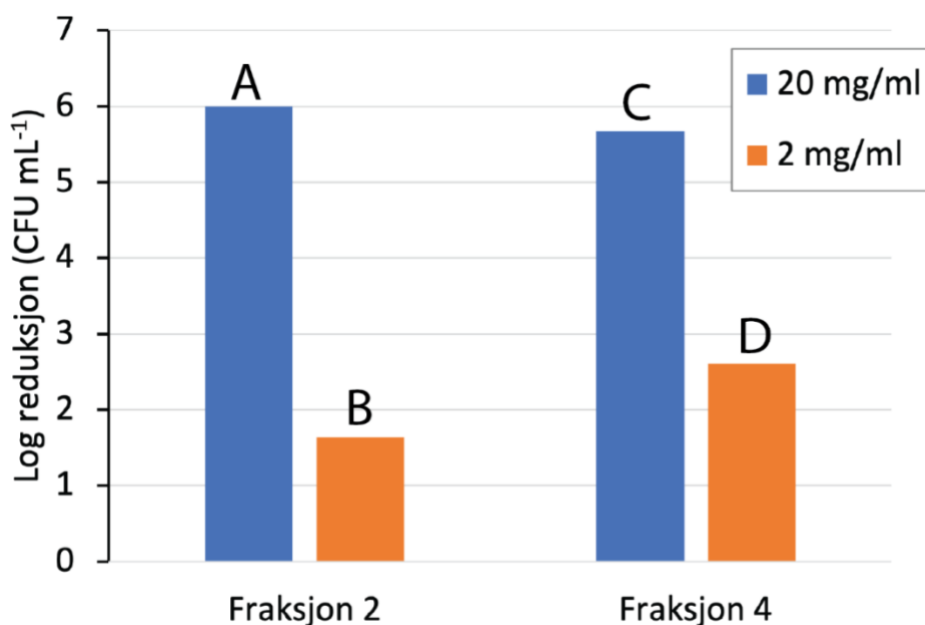


Bildene fra mikroskoperingen (Figur 16) viser at alle cellene i prøver med 20 mg mL<sup>-1</sup> konsentrasjon av fraksjon 2 (A) og 4 (B) er døde (rød farge). I prøvene med 2 mg mL<sup>-1</sup> fraksjon ble det kun observert noen få levende celler (B og D), resten var døde. I kontrollprøven uten fraksjon (E) ble det observert et stort flertall av levende celler. Kontrollprøver med kun levende og døde celler (resultat ikke vist) viste rød fluorescens for cellene behandlet med isopropanol, og grønn fluorescens for ubehandlede celler.



**Figur 16** Fluorescensmikroskopering av *L. monocytogenes* etter 24 timer inkubering. Bildene er representative for hvert parameter. **A)** 20 mg mL<sup>-1</sup> fraksjon 2, **B)** 2 mg mL<sup>-1</sup> fraksjon 2, **C)** 20 mg mL<sup>-1</sup> fraksjon 4, **D)** 2 mg mL<sup>-1</sup> fraksjon 4 og **E)** 0 mg mL<sup>-1</sup> (negativkontroll).

Resultatene fra utplating på agarskåler (Figur 17) støtter observasjonene fra mikroskoperingen. Med både fraksjon 2 og 4 var det en tydelig  $\log_{10}$ -reduksjon av *L. monocytogenes* sammenlignet med kontrollen. 20 mg  $\text{mL}^{-1}$  med fraksjon 2 ga en  $\log_{10}$ -reduksjon på 6  $\log_{10}$ -enheter, og med fraksjon 4 en  $\log_{10}$ -reduksjon på 5,7  $\log_{10}$ -enheter. For 2 mg  $\text{mL}^{-1}$  var reduksjonen 1,6 og 2,6  $\log_{10}$ -enheter i henholdsvis fraksjon 2 og 4. Resultatene viser at både fraksjon 2 og 4 har bakteriedrepende aktivitet mot *L. monocytogenes*, i konsentrasjon 2 og 20 mg  $\text{mL}^{-1}$ .



**Figur 17**  $\log_{10}$  reduksjon ( $\text{CFU mL}^{-1}$ ) av *L. monocytogenes* etter 24 timers inkubering med henholdsvis fraksjon 2 og fraksjon 4. Markeringene A-D er overensstemmende med forrige figur (Figur 16).

#### 4.7 Antibakteriell aktivitet i fraksjoner fra HPLC mot 12 bakteriestammer

12 bakteriestammer assosiert med vegetabilier, isolert fra en salatfabrikk (Kap. 2.3), ble valgt ut for å testes opp mot fraksjoner fra ruccola med anti-*Listeria* aktivitet. Dette for å undersøke om den antibakterielle aktiviteten var spesifikk mot *L. monocytogenes*, eller om det også påvirket andre arter. Bakteriene ble testet mot fraksjon 2 og 4, som var isolert fra ruccolaekstrakt ved bruk av HPLC.

Resultatet fra forsøket (Tabell 5) er vist som minimum inhiberende konsentrasjon (MIC) for hver bakterie etter 48 timer i Bioscreen. Den laveste fraksjon-konsentrasjonen hvor OD-verdien var mindre enn 20 % av OD-verdien i kontrollprøven i løpet av 48 timer, ble definert som MIC. Flertallet av bakteriestammene (9 av 12) som ble undersøkt mot fraksjoner fra ruccola, ble hemmet ved konsentrasjonene som ble testet. Konsentrasjonene som ble testet for

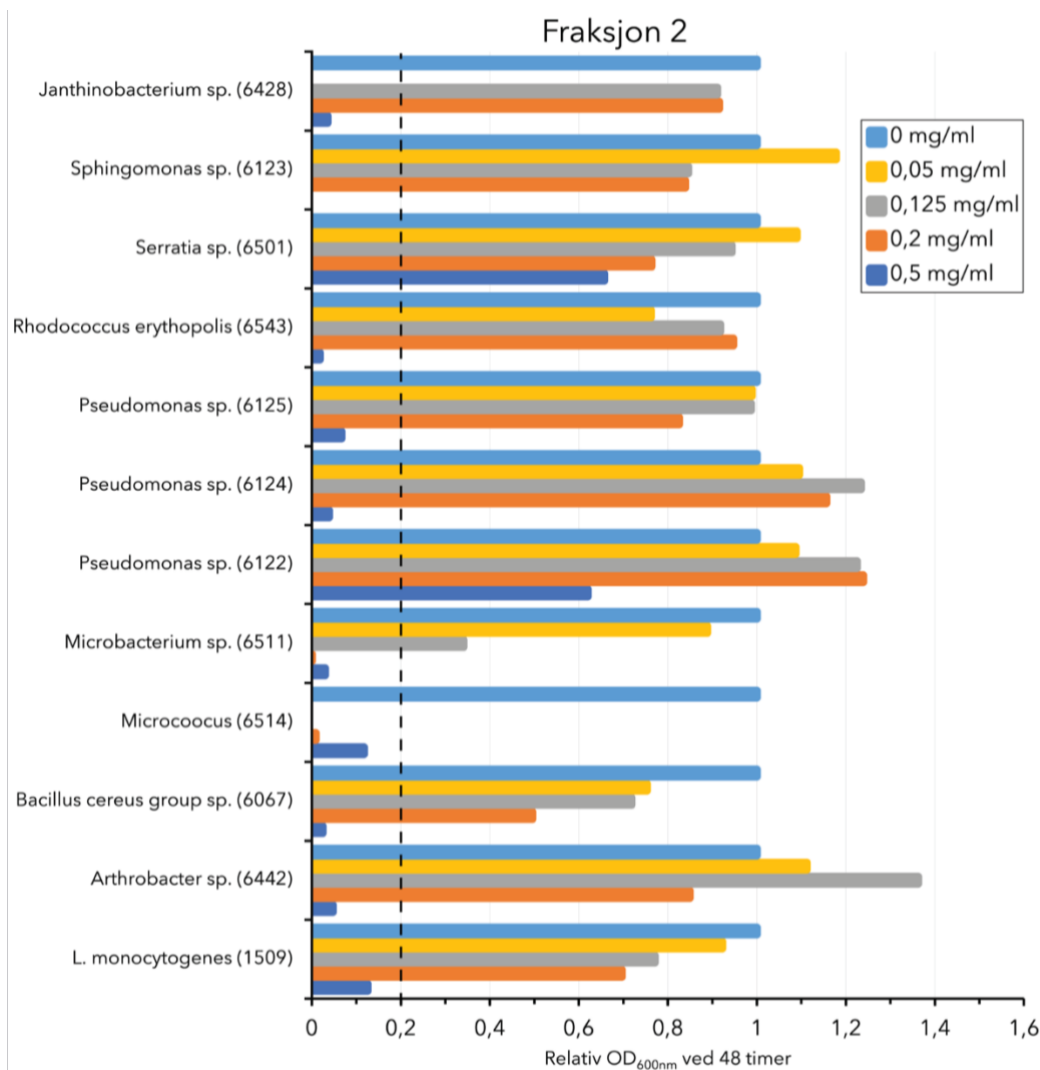
fraksjon 2 var 0, 0.05, 0.125, 0.2 og 0.5 mg mL<sup>-1</sup>, og fraksjon 4 var 0, 0.05, 0.125, 0.2 mg mL<sup>-1</sup>. *Micrococcus* sp. ble hemmet ved alle konsentrasjoner testet av både fraksjon 2 og 4. *Pseudomonas* sp. (MF06122), *Serratia* sp. og *Sphingomonas* sp. ble ikke inhibert ved tilstedeværelse av fraksjon 2 eller 4 ved de konsentrasjonene som ble testet. *Pseudomonas* sp. (MF6124) ble ikke inhibert ved tilstedeværelse av fraksjon 4, men ble hemmet ved 0,5 mg mL<sup>-1</sup> av fraksjon 2. Resten av bakteriene ble hemmet ved den høyeste eller nest høyeste konsentrasjonen testet av fraksjon 2 og 4.

Relativ OD<sub>600nm</sub> (relativ til hver kontroll) etter 48 timer i Bioscreen for 12 bakteriestammer med fraksjon 2 er vist i Figur 18. Konsentrasjon 0,5 mg mL<sup>-1</sup> fraksjon 2 hemmet veksten av alle bakterier utenom *Serratia* sp.. *Micrococcus* sp. vokste ikke ved fraksjon 2 tilsatt.

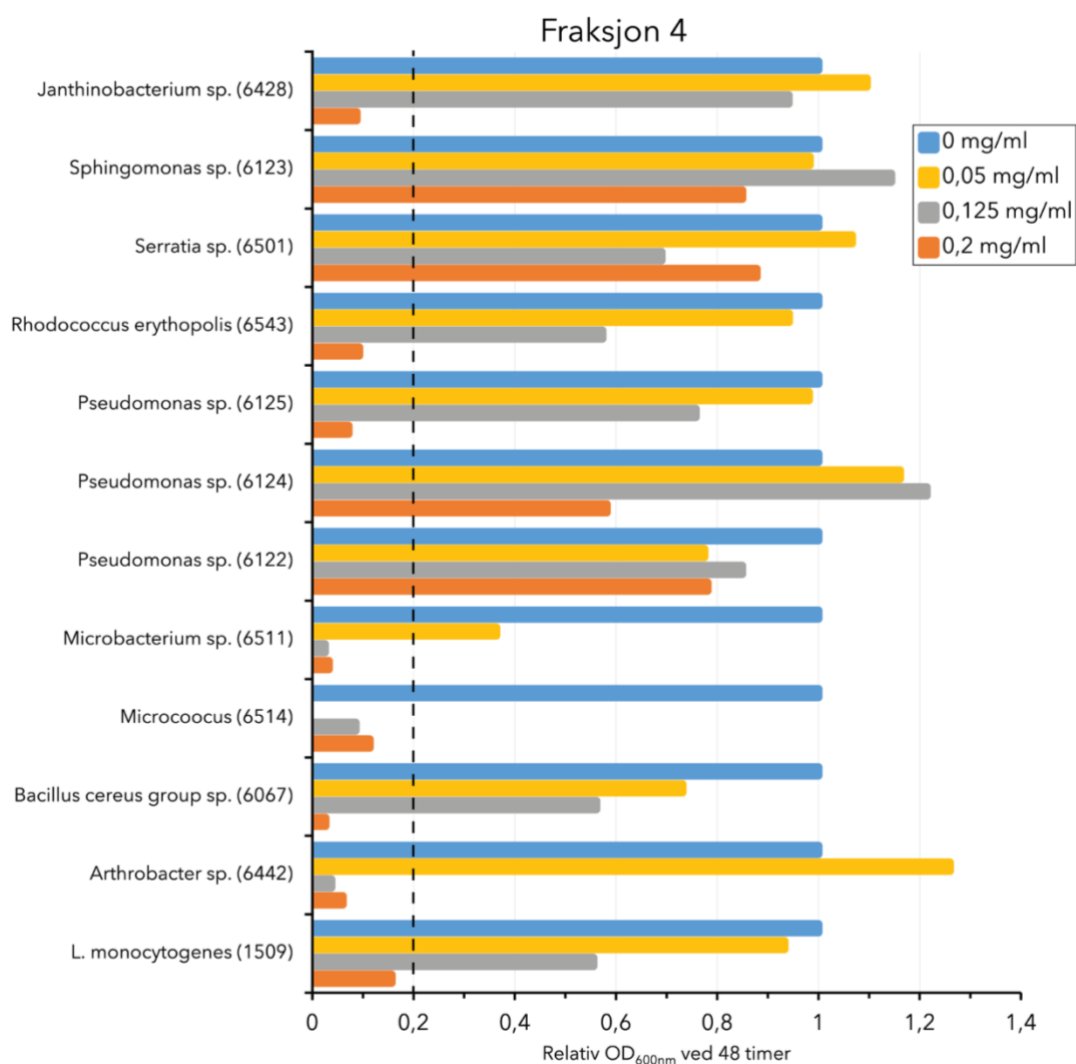
Relativ OD<sub>600nm</sub> (relativ til kontroll for hver bakterie) etter 48 timer i Bioscreen for 12 bakteriestammer med fraksjon 4 er vist i Figur 19. Konsentrasjon 0,2 mg mL<sup>-1</sup> fraksjon 4 hemmet veksten av alle bakterier utenom *Serratia* sp., *Sphingomonas* sp. og *Pseudomonas* sp. (MF6122 og MF6124). *Micrococcus* sp. vokste ikke ved fraksjon 4 tilsatt. *Microbacterium* sp. oppnådde vekst ved konsentrasjon 0,05 mg mL<sup>-1</sup> fraksjon 4.

**Tabell 5** Minimum inhiberende konsentrasjon (MIC) i mg mL<sup>-1</sup> etter 48 timer inkubering i Bioscreen C ved 25 °C for 12 bakteriestammer.

Stammenummer	Art	MIC (mg mL <sup>-1</sup> )	
		Fraksjon 2	Fraksjon 4
MF1509	<i>L. monocytogenes</i>	0,5	0,2
MF6442	<i>Arthrobacter</i> sp.	0,5	0,125
MF6067	<i>Bacillus cereus</i>	0,5	0,2
MF6428	<i>Janthinobacterium</i> sp.	0,5	0,2
MF6511	<i>Microbacterium</i> sp.	0,2	0,125
MF6514	<i>Micrococcus</i> sp.	≤0,05	≤0,05
MF6122	<i>Pseudomonas</i> sp.	>0,5	>0,2
MF6124	<i>Pseudomonas</i> sp.	0,5	>0,2
MF6125	<i>Pseudomonas</i> sp.	0,5	0,2
MF6543	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	0,5	0,2
MF6501	<i>Serratia</i> sp.	>0,5	>0,2
MF6123	<i>Sphingomonas</i> sp.	>0,5	>0,2



**Figur 18** Relativ OD<sub>600nm</sub> for 12 bakteriestammer etter 48 timer i Bioscreen på 25 °C, tilsatt 10 % isbergjuice. Fraksjon 2 fra HPLC ble tilsatt hver bakterie i konsentrasjonene 0, 0.05, 0.125, 0.2 og 0.5 mg mL<sup>-1</sup>. Vekstforsøk med *Janthinobacterium sp.* og *Sphingomonas sp.* ble utført en gang. For resterende bakterier er konsentrasjonene 0.05 og 0.5 mg mL<sup>-1</sup> utført en gang, og konsentrasjonene 0, 0.125 og 0.2 mg mL<sup>-1</sup> er et gjennomsnitt fra to replikater. Verdier til venstre for stiplet linje regnes som ikke vekst etter 48 timer.



**Figur 19** Relativ OD<sub>600nm</sub> for 12 bakteriestammer etter 48 timer i Bioscreen på 25 °C, tilsatt 10 % isbergjuice. Fraksjon 4 fra HPLC ble tilsatt hver bakterie i konsentrasjonene 0, 0.05, 0.125 og 0.2 mg mL<sup>-1</sup>. Vekstforsøk med *Janthinobacterium* sp. og *Sphingomonas* sp. ble utført en gang. For resterende bakterier er konsentrasjonene et gjennomsnitt fra to replikater. Verdier til venstre for stiple linje regnes som ikke vekst etter 48 timer.

#### 4.8 Identifisering av komponenter med LC-MS/MS

Kjemisk analyse av ekstrakt fra ruccolajuice er en viktig del av studiens målsetning om å undersøke hva som forårsaker antibakteriell aktivitet. Fra ruccolaekstrakt var det isolert åtte fraksjoner ved semi-preparativ revers fase HPLC, og fraksjonene ble videre testet i vekstforsøk for aktivitet mot *L. monocytogenes*. Fraksjonene som viste anti-*Listeria* effekt (fraksjon 2 og 4), ble injisert i et LC-qTOF system. LC-MS/MS (væskekromatografi tandem-massespektrometri) ble brukt for å karakterisere komponenter i de to fraksjonene. Analyse av base peak kromatogram fra LC-MS/MS viste fire ulike topper for både fraksjon 2 og 4 (Figur 20). Karakterisering av komponenter er presentert i Tabell 6, der retensjonstid (RT), masse, molekylformel, forbindelse og error (ppm) for hver komponent er oppgitt, samt hvilke referanser som er brukt for bekreftelse av komponent. Analyse av toppene fra base peak kromatogrammet til fraksjon 2 og 4 viste flere metabolske forbindelser som aminosyrer, en nukelobase og nukleosider.

LC-MS/MS data fra denne studien ble sammenlignet med tidligere resultater fra Fagerlund, Wubshet, et al. (2021). Komponenter i Tabell 2 i Fagerlund, Wubshet, et al. (2021) var bekreftet ved analyse av rene standarder som referanser for hver komponent i samme LC-MS/MS system. Dette kunne derfor sammenlignes med resultater fra LC-MS/MS i nåværende studie, og alle forbindelsene som ble funnet var tidligere bekreftet med en ren standard: adenin, kolin klorid, cytidin, guanosin, isoleucin, leucin, tyrosin og valin.

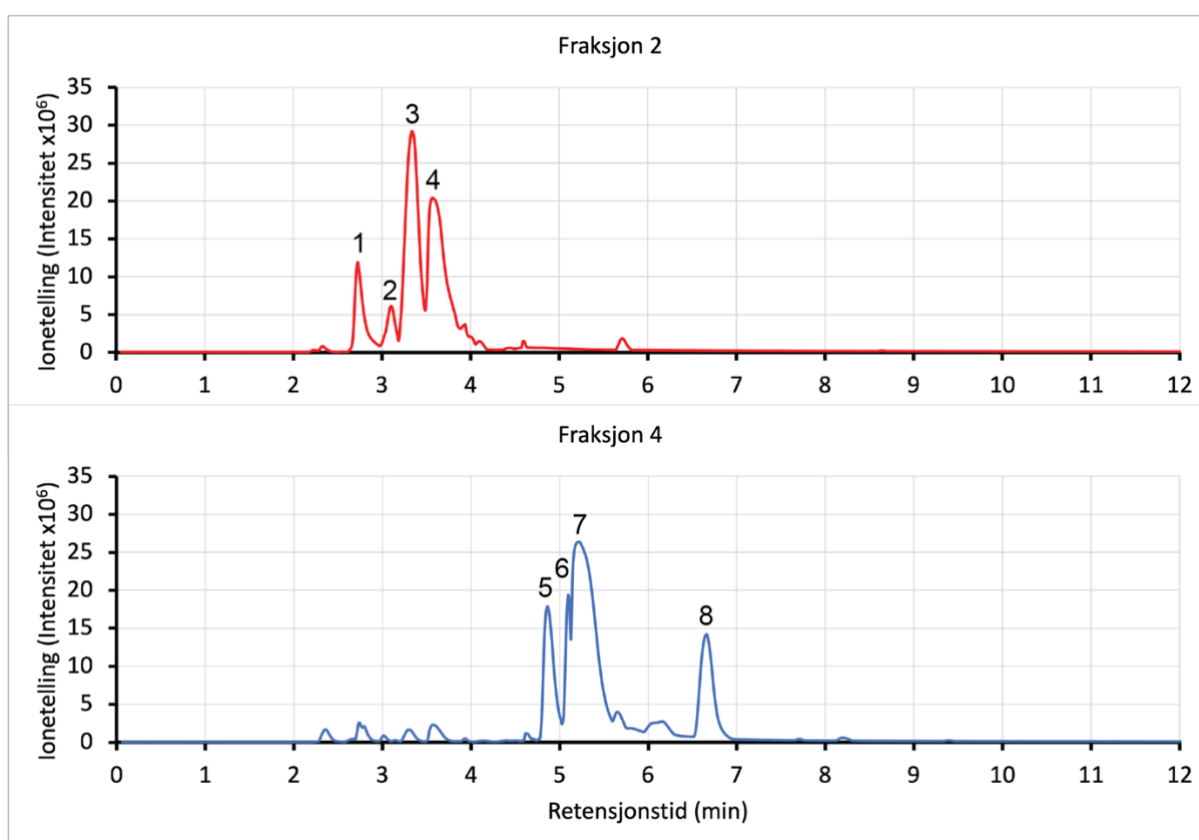
Komponent nr. 1 ble identifisert som forbindelsen kolin. Molekylær ion topp var på  $m/z=104,1097 [M+H]^+$ , der massen korresponderte til molekylformelen  $C_5H_{13}NO$ . Forbindelsen ble videre bekreftet med databasesøk og resultater fra Fagerlund, Wubshet, et al. (2021)

Komponent nr. 2 hadde en molekylær ion topp på  $m/z=244,0981 [M+H]^+$ , og ble identifisert som nukleosiden cytidin ved sammenligning med tidligere resultater og spektrum i drugbank.

Komponent nr. 3, med molekylær ion topp på  $m/z=136,0613 [M+H]^+$ , ble identifisert som nukleobasen adenin. Komponent nr. 4 ble identifisert som aminosyren valin, med molekylær ion topp på  $m/z=118,0869 [M+H]^+$ . Både adenin og valin ble fragmentert (MS/MS) (Vedlegg 4, Figur 1 A og B), og videre bekreftet ved sammenligning med Drugbank spektrum og resultatene fra Fagerlund, Wubshet, et al. (2021).

Fragmentering fra negativ ion mode (resultat ikke vist) og MS spektrum (Vedlegg 4, Figur 2 A) for komponent nr. 5, og i positiv ion mode for komponent nr. 7 (Vedlegg 4, Figur 2 C), viste at begge hadde en  $m/z = 132,1062 [M+H]^+$ . Sammenligning med spektrum fra Drugbank og resultater fra Fagerlund, Wubshet, et al. (2021) bekreftet at komponentene var aminosyrene leucin og isoleucin. Komponentene leucin og isoleucin har identisk molekylformel  $C_6H_{13}NO_2$ , og hadde dermed også lik  $m/z$ -verdi. Retensjonstiden er derimot ulik, og er det som skilte disse to komponentene fra hverandre. Ut fra resultater fra tidligere studier ble det klart at isoleucin er komponenten som vil ha kortest retensjonstid fra HPLC-kolonnen (Armstrong et al., 2007; Tcherkas et al., 2001). Komponent nr. 5 ble dermed bestemt til å være isoleucin, og nr. 7 til å være leucin.

Massene til komponent nr. 6 og 8 (henholdsvis  $m/z = 182,0878 [M+H]^+$  og  $m/z = 284,1072 [M+H]^+$ ) var i samsvar med molekylformlene  $C_9H_{11}NO_3$  og  $C_{10}H_{13}N_5O_5$ . Verdiene for  $m/z$  stemte også overens med resultater fra Fagerlund, Wubshet, et al. (2021) og spektrum fra Drugbank. Vedlegg 4, Figur 2 (B og D) viser MS spektrum for de to komponentene. Komponentene ble identifisert som aminosyren tyrosin og nukleosiden guanosin.



**Figur 20** Base peak kromatogram etter LC-MS separering av fraksjon 2 og fraksjon 4. LC-MS/MS data for markerte toppene (komponent nr. 1-8) er beskrevet nærmere i Tabell 6.

**Tabell 6** LC-MS/MS data fra hver komponent (nr. 1-8) som markert i base peak kromatogram (Figur 5).

Fraksjon	Komponent nr.	RT (min)	Forbindelse	$m/z$ positiv molekyl ion $[M+H]^+$	Tildelt molekyl-formel <sup>a</sup>	Error (ppm)	Referanse
2	1	2,735	Kolin	104,1097	C <sub>5</sub> H <sub>13</sub> NO	-36,51	Fagerlund, Wubshet, et al. (2021), Drugbank (2021c)
	2	3,103	Cytidin	244,0981	C <sub>9</sub> H <sub>13</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub>	-21,81	Fagerlund, Wubshet, et al. (2021), Drugbank (2021d)
	3	3,338	Adenin	136,0613	C <sub>5</sub> H <sub>5</sub> N <sub>5</sub>	1,84	Fagerlund, Wubshet, et al. (2021), Drugbank (2021a), MS/MS spektrum
	4	3,602	Valin	118,0869	C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub>	-6,15	Fagerlund, Wubshet, et al. (2021), Drugbank (2021i) MS/MS
4	5	4,871	Isoleucin	132,1062	C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>2</sub> <sup>b</sup>	-32,76	Neg. Ion mode MSMS + Drugbank (2021g)
	6	5,098	Tyrosin	182,0878	C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub>	-32,75	Fagerlund, Wubshet, et al. (2021), Drugbank (2021h)
	7	5,253	Leucin	132,1062	C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>2</sub> <sup>b</sup>	-32,76	MSMS spektrum + Drugbank (2021f)
	8	6,395	Guanosin	284,1072	C <sub>10</sub> H <sub>13</sub> N <sub>5</sub> O <sub>5</sub>	-29,16	Fagerlund, Wubshet, et al. (2021), Drugbank (2021e)

<sup>a</sup>Molekylformler tildelt via programvaren Masshunter

<sup>b</sup>Molekylformel funnet via MS/MS fragmentering og sammenligning med databasen Drugbank



## 5 Diskusjon

### 5.1 Anti-*Listeria* aktivitet i juice, ekstrakter og fraksjoner fra ruccolasalat

I denne masteroppgaven ble en antibakteriell komponent i ruccolajuice, tidligere observert i Fagerlund, Wubshet, et al. (2021), videre karakterisert med hensyn på aktivitet og innhold. Den antibakterielle aktiviteten mot *L. monocytogenes* ble påvist i ruccolasalatjuicen som ble laget. Tørket ruccolasalatjuice ekstrahert med 100 % metanol viste bioaktivitet mot *L. monocytogenes*, og dette tørreksraktet ble videre separert til åtte fraksjoner ved kromatografisk fraksjonering på HPLC. Av de totalt åtte fraksjonene, viste to (fraksjon 2 og 4) anti-*Listeria* aktivitet. De to fraksjonene viste seg å inneholde aminosyrer, nukleosider, en nukleobase og en kvartær ammoniumforbindelse.

I denne oppgaven ble det funnet at ruccolasalatjuice hadde hemmende effekt på *L. monocytogenes* ved en konsentrasjon på 80 %. Dette antydte at det var antibakterielle komponenter til stede i ruccolasalatjuice, tilsvarende resultater fra tidligere arbeid med ruccolasalatjuice i Fagerlund, Wubshet, et al. (2021). Forsøket med ruccolajuice ble utført ved 12 °C over to døgn, før utplating på skåler. Høstingstidspunkt og temperatur for forsøk med bakteriehemming kan påvirke resultatet. For noen antibakterielle stoffer kan tilsetning av en moderat konsentrasjon av hemmestoff, resultere i at veksthastigheten til bakterien går saktere i eksponentiell fase, men at det oppnås en cellekonsentrasjon tilsvarende for kontrollen når bakterien kommer til stasjonærfasen. Dette ble observert i resultater fra Fagerlund, Wubshet, et al. (2021), der alle prøver oppnår samme maksimale konsentrasjon av *L. monocytogenes* etter 6 dager inkubering. Lignende resultater er beskrevet av Doulgeraki et al. (2017), som viste at ruccolaekstrakt hadde hemmende effekt på meticillinresistent *Staphylococcus aureus* (MRSA) i tidlig eksponentiell fase, men oppnådde vekst på samme nivå som kontrollen etter 7 dager. I denne oppgavens forsøk med ruccolajuice ble bakteriecellene sannsynligvis høstet tidlig i eksponentiell fase, noe som var gunstig med henhold til å påvise antibakteriell effekt fra ruccolajuicen.

I motsetning til resultat fra det innledende forsøket med 80 % ruccolajuice utført ved 12 °C, ble det ved undersøkelse av drapeseffekt i ruccolajuice, ikke observert verken drapeseffekt eller hemming. Det ble oppnådd en økning i cellekonsentrasjoner for *L. monocytogenes* etter et døgn inkubering, ved 25 °C i med risting. Dette er et godt eksempel på at faktorer som inokulumskonsentrasjon, temperatur, tid, inkubasjonsforhold og høstingstidspunkt kan påvirke resultatene, og som gjør det vanskelig å sammenligne resultater som går på

antibakteriell effekt, som blant annet Balouiri et al. (2016) tar for seg. Antagelig nådde *L. monocytogenes* stasjonærfasen ved inkubasjonsparameterne som ble brukt, og hadde dermed overkommet den antibakterielle effekten av ruccolasalatjuicen i tidligere vekstfaser, som ble observert i det innledende forsøket. Det ble også observert en tydelig variasjon i vekst avhengig av hvilken inokulumskonsentrasjon som ble brukt, der det ved lav inokulumskonsentrasjon ble høyere vekstøkning, enn ved høy inokulumskonsentrasjon. Dette var et uventet resultat, da det ofte observeres en motsatt effekt ved undersøkelser av antimikrobielle midler (inokulumseffekten), som blant annet observert i Lin et al. (2000); Silva-Angulo et al. (2015). Dette viser at inokulumsstørrelsen kan påvirke veksten av *L. monocytogenes*, og videre ha innflytelse på resultat av antibakteriell effekt. Det er derfor viktig å ta inokulumskonsentrasjonen i betraktning ved undersøkelse av antibakteriell effekt, noe som ble gjort ved blant annet undersøkelse av drapeseffekt med ruccolaekstrakt. Videre forsøk med drapeseffekt i juice med andre forsøksbetingelser, som for eksempel endret inkubasjonstid og temperatur, vil være interessant.

Resultatene fra denne oppgaven, samt studien av Fagerlund, Wubshet, et al. (2021), indikerer at ruccolajuice ikke støtter veksten av *L. monocytogenes* ved 12 °C. Lokerse et al. (2016) observerte lignende tendens for ferske ruccolablader inokulert med *L. monocytogenes*, der bakterien fikk en maksimal relativ økning på  $<1 \log_{10} \text{CFU g}^{-1}$ , i løpet av 10 dager ved 7 °C. Andre ferske vegetabilier viste også lav veksthastighet for *L. monocytogenes* i studien. Det har tidligere skjedd tilbaketrekkninger av ruccolasalat grunnet forekomst av *L. monocytogenes* (RASFF., 2020), men utbrudd av listeriose forårsaket av kontaminert ruccolasalat har ikke vært funnet rapportert, etter gjennomgang av flere studier (Garner & Katheriou, 2016; Lianou & Sofos, 2007; VKM et al., 2018). Et utbrudd med listeriose i 2016 i USA skyldtes ulike varianter av ferdigpakkede salater, men det ble ikke spesifisert om ruccolasalat var en ingrediens (Self et al., 2019). Utbrudd med andre patogene bakterier har derimot forekommet, som for eksempel med et blandingsprodukt med ruccolasalat der det ble identifisert Shigatoksin-produserende *Escherichia coli* (STEC) (Kinnula et al., 2018). Ofte har det vært andre faktorer som spiller inn enn et enkelt produkts evne til å støtte vekst av *L. monocytogenes* ved utbrudd med listeriose, som at produktet har blitt kuttet opp og blandet med andre produkter eller blitt oppbevart ved feil temperatur (VKM et al., 2018). Om den lave forekomsten av *L. monocytogenes* i ruccolasalat har en sammenheng med den antibakterielle aktiviteten som ble observert *in vitro* i denne oppgaven krever videre undersøkelser for å avklare.

Det ble observert en drapeseffekt mot *L. monocytogenes* fra både ruccolaekstrakt, og fra to HPLC fraksjoner som viste anti-listeriell effekt. Generelt har antibakterielle forbindelser fra planter også vist bakteriedrepende aktivitet (Khameneh et al., 2019), men det er ikke funnet litteratur som angår ruccolaekstrakt. Forbindelser som finnes i ruccola, som for eksempel isotiocyanat, har vist bakteriedrepende aktivitet mot flere patogene bakterier (Lin et al., 2000). Resultatet fra denne oppgaven viste at fraksjoner fra HPLC hadde en høyere drapeseffekt enn ruccolaekstrakt, da en fem ganger høyere konsentrasjon av ekstrakt ga ca. samme  $\log_{10}$ -reduksjon som for fraksjoner. En 3  $\log_{10}$ -reduksjon av levende celler defineres vanligvis som drap (korresponderer til 99,9 % drap) (Raheem & Straus, 2019). Behandling med ruccolaekstrakt viste en signifikant reduksjon av *L. monocytogenes* ( $p < 0,05$ ), med ca. 1,5  $\log_{10}$ -reduksjon (2  $\log_{10}$ -reduksjon tilsvarer  $>99$  % reduksjon). Ved behandling med fraksjon 2 og 4, i konsentrasjon  $20 \text{ mg mL}^{-1}$ , ble cellene observert som døde i fluorescensmikroskop, og dette ble ytterligere bekreftet ved at det ble oppnådd 6  $\log_{10}$ -reduksjon av *L. monocytogenes*, en betraktelig reduksjon ( $>99,9999$  % reduksjon).

Ved vekstforsøk for undersøkelse av antibakteriell aktivitet og drapeseffekt fra ruccolaekstrakt og HPLC fraksjoner, mot *L. monocytogenes* og øvrige bakteriestammer (Tabell 1), fungerte isbergjuice godt som ekstra næringsmedium. Gjentatte forsøk på å utarbeide et definert medium til bruk ved undersøkelse av bioaktivitet førte ikke frem, da det ikke ble oppnådd tilstrekkelig vekst av *L. monocytogenes*. Bakgrunnen for ønsket om å bruke et definert medium, var at det i tidligere arbeid (Fagerlund, Wubshet, et al., 2021) ble observert at det var nødvendig å tilsette ekstra næring til *L. monocytogenes* i vekstforsøk med blant annet fraksjoner fra HPLC, for å oppnå vekst i negativkontroll og i prøver med lave konsentrasjoner av fraksjon. Fagerlund, Wubshet, et al. (2021) observerte at tilsetting av BHI viste seg å kamuflere den antibakterielle aktiviteten, og valgte derfor å bruke isbergsalatjuice. Flere andre studier har også observert at den antimikrobielle effekten på veksten til ulike bakterier ble redusert i komplekse vekstmedier (De Leersnyder et al., 2018; Sanders et al., 2018; Xu et al., 2018). I forsøk der vekstforløp studeres *in vitro*, er det også ønskelig med et vekstmedium med kjent sammensetning for å sikre reproducerbare forhold (Jarvis et al., 2016). Kun ved tilsetting av moderate mengder gjærekstrakt til definert medium, ble det i denne oppgaven oppnådd vekst av *L. monocytogenes*. Grunnet den komplekse næringssammensetningen i gjærekstrakt, ble ikke mediet lenger regnet som et definert medium. Isbergsalatjuice som vekstmedium, sammenlignet med medium med gjærekstrakt, viste seg å gi tilstrekkelig mengde ekstra næring til bakterien ved tilsetting i lave mengder (10 %), samtidig som den

antibakterielle effekten av ruccolaekstrakt var tydelig. På grunnlag av dette ble isbergjuice brukt som næringsmedium i forsøk i denne masteroppgaven. Isbergjuice representerer et utdrag av næringen *L. monocytogenes* ville hatt tilgjengelig i en salatfabrikk, og vurderes derfor som et godt alternativ til et definert medium.

## 5.2 Antibakteriell aktivitet mot bakteriestammer assosiert med vegetabilier

Fraksjonene med anti-*Listeria* aktivitet viste antibakteriell aktivitet mot flere andre bakteriestammer assosiert med vegetabilier. Resultatene antyder at det er ulik sensitivitet mot antibakterielle komponenter fra ruccola for bakteriestammene ved konsentrasjonene som ble testet, der *Micrococcus* sp. skilte seg ut som mest sensitiv, mens *Pseudomonas* sp. (MF6122), *Serratia* sp. og *Sphingomonas* sp. var mest motstandsdyktige. Resultatet viste at fraksjoner fra ruccola kan hemme flere ulike bakteriestammer i tillegg til *L. monocytogenes*, og både Gram-positive og Gram-negative stammer ble hemmet. Av de totalt 12 bakteriestammene som ble testet, var halvparten Gram-negative (slektene *Janthinobacterium*, *Pseudomonas*, *Serratia* og *Sphingomonas*), og resten Gram-positive (slektene *Arthrobacter*, *Microbacterium*, *Micrococcus*, stammen fra *Bacillus cereus* gruppen, og artene *L. monocytogenes* og *Rhodococcus erythropolis*).

De tre bakteriestammene som ikke ble hemmet var Gram-negative bakterier. Det er utført mange studier med ulike forbindelser ekstrahert fra planter som viser antibakteriell aktivitet mot flere forskjellige bakteriestammer (Quinto et al., 2019). Flere studier viser at ekstrakter, eteriske oljer og ulike sekundære metabolitter fra planter viser generelt bedre inhibering av Gram-positive enn Gram-negative bakterier (Bouarab Chibane et al., 2019; Dahiya & Purkayastha, 2012; Pisoschi et al., 2018; Quinto et al., 2019). Gram-negative bakterier har en cellevegg bestående av en membran med lipopolysakkarider og poriner, som blant annet gir hydrofile egenskaper som begrenser diffusjonen av hydrofobe forbindelser (Gyawali et al., 2015). Dette kan forårsake økt resistens mot forbindelser som antibiotika og planteekstrakter. *Pseudomonas* spp. har tidligere vist resistens mot mange eteriske oljer, planteekstrakter, samt flere kjente antimikrobielle stoffer og antibiotika. Dette grunnet en veldig restriktiv ytre membran bestående av blant annet lipopolysakkarider (Rahman & Kang, 2009). *Serratia* spp. har lignende egenskaper, som en Gram-negativ bakteriestamme. *Sphingomonas* spp. har en ytre membran bestående av glycosphingolipider, med lignende egenskaper som lipopolysakkarider, men som gir en mer hydrofob celleoverflate enn andre Gram-negative bakterier (Kawahara et al., 1999). Resultatene samsvarer med litteraturen, med tanke på at det

var de Gram-negative bakteriestammene som var mest motstandsdyktige. Den Gram-negative stammen fra slekten *Janthinobacterium*, og de to andre stammene fra slekten *Pseudomonas* ble imidlertid hemmet av fraksjoner fra ruccola, og det understreker at det kan være variasjoner innenfor slektene eller andre egenskaper ved bakteriene enn dem nevnt over som forårsaket motstandsdyktigheten.

Alle de Gram-positive stammene som ble undersøkt i denne studien ble hemmet ved tilstedeværelse av HPLC fraksjoner. Stammen fra slekten *Micococcus* skilte seg ut som mest sensitiv, men *Micrococcus* spp. er ikke rapportert å være spesielt sensitive mot antibakterielle midler sammenlignet med andre Gram-positive bakterier. *Micrococcus* sp. har på samme måte som andre Gram-positive bakterier en cellevegg bestående av peptidoglykan, en celleoverflate som gjør dem relativt utsatt for antibiotika og andre antimikrobielle midler (Breijyeh et al., 2020). Rahman og Kang (2009) fant at de Gram-positive bakteriene var mer sensitive for ulike løsemiddelekstrakter fra en medisinsk plante (japankaprifol), sammenlignet med Gram-negative bakterier. I denne studien ble lignende resultater funnet, ved at alle de Gram-positive bakteriene tydelig ble hemmet av fraksjoner fra ruccola.

Det er en interessant observasjon at flertallet av bakteriestammene ble hemmet av fraksjoner fra ruccola *in vitro*, på samme måte som *L. monocytogenes*. Bakteriestammene som ble brukt i denne studien (utenom *L. monocytogenes*) var isolert fra produksjonsmiljøet i en salatfabrikk i studien Fagerlund, Wubshet, et al. (2021). Prøvetaking med fokus på forekomst av *L. monocytogenes* etter rengjøring og desinfeksjon, ga ingen funn. Slektene som dominerte i miljøet var *Pseudomonas*, *Bacillus* og *Micrococcus*. Den dominerende tilstedeværelsen av *Pseudomonas* i produksjonsmiljøet og på produktprøver, stemmer med observasjonen i denne oppgaven av at *Pseudomonas* sp. (MF6122) vokste godt selv ved tilstedeværelse av ruccolafraaksjoner. *Micrococcus* sp. hadde sannsynligvis vekstbetingelser i produksjonsmiljøet som støttet veksten bedre, enn det som var tilfelle i *in vitro* undersøkelser i denne oppgaven. Det er mange faktorer som spiller inn på bakterievekst i et produksjonsmiljø, som for eksempel temperatur, næringstilgang, biofilmdannelse og bakgrunnsflora, som gjør at resultater fra *in vitro* undersøkelser ikke er direkte sammenlignbare med vekst i produksjonsmiljø. Det vil likevel være interessant å studere aktiviteten og spesifisiteten til den antibakterielle komponenten fra ruccolasalat videre, og undersøke om tilstedeværelse av ruccolasalat i produksjonsmiljøet påvirker mikrofloraen.

### 5.3 Identifisering av antibakterielle komponenter i HPLC fraksjoner

Fraksjonene som viste anti-*Listeria* aktivitet (fraksjon 2 og 4) inneholdt komponenter som aminosyrer, nukleosider, en nukleobase og en kvartær ammoniumforbindelse. Fraksjon 2 og 4 ble eluert fra HPLC-kolonnen i løpet av de første 7,5 minuttene, der fraksjon 2 eluerte ut først. Det kan dermed antas at fraksjonene har en relativt høy polaritet, noe som er en forutsetning for at den antibakterielle komponenten i ruccolasalat skal ha effekt mot *L. monocytogenes* i det fuktige miljøet i en salattfabrikk. Som diskutert i Fagerlund, Wubshet, et al. (2021), har ikke frie aminosyrer vært rapportert å vise bioaktivitet mot *L. monocytogenes*. Tilgang til ulike aminosyrer er som regel noe som kreves av bakterier for å oppnå vekst. I denne oppgaven var mange av komponentene som ble identifisert aminosyrer, henholdsvis valin, isoleucin, leucin og tyrosin. Det er mest sannsynlig ikke disse forbindelsene som forårsaker antibakteriell aktivitet.

Kolin, identifisert i fraksjon 2 (komponent nr.1 i Tabell 6), er et molekyl med vitaminlignende effekt i planter og dyr, og anses å være et essensielt vitamin for mennesker. Det forekommer fritt og som del av større molekyler. Forbindelsen tilhører klassen koliner, som er organiske forbindelser som inneholder et N,N,N-trimetyletanolammonium-kation, og inngår i en familie av vannløselige kvartære ammoniumforbindelser (Drugbank, 2021b). Kvartære ammoniumforbindelser er mye brukt som antimikrobielt middel og som et overflateaktivt stoff i produkter innen kosmetikk-, husholdning-, industri- og helsesektoren (Buffet-Bataillon et al., 2012). Bioaktiviteten til kvartære ammoniumforbindelser er en tilnærmet parabolisk funksjon av forbindelsenens lipofilisitet (fettløselighet), som vil si *n*-alkylkjedelengde. Forbindelser med *n*-alkylkjedelengder <4 eller >18 er praktisk talt inaktive (Gilbert & Moore, 2005). Dette tilsier at kolin, som har *n*-alkylkjedelengde under 4, ikke er bioaktivt. Som diskutert i Fagerlund, Wubshet, et al. (2021), anses det som lite trolig at det er denne komponenten som forårsaker bioaktiviteten observert i ruccolasalatjuice, men videre testing av den antibakterielle aktiviteten til kolin er nødvendig for å konstatere dette.

To nukleosider, cytidin og guanosin, og en nukleobase, adenin, ble identifisert som komponenter i fraksjon 2 og 4 (komponent nr. 2 og 8 i Tabell 6). Nukleobaser er forbindelser som kan danne nukleosider, som er en strukturell underenhet av nukleinsyrer (DNA og RNA). Nukleosider og nukleobaser dannes vanligvis ved kjemisk eller enzymatisk nedbrytning av nukleinsyrer (Britannica, 2014), og kan forekomme i fri tilstand i planter og andre organismer (SNL, 2021). Nukleosidanaloger er en klasse medikamenter som er viktige fra et klinisk

perspektiv, og brukes mye som anti-kreft og anti-virale midler (Thomson & Lamont, 2019). Medikamentene kan også hemme bakterievekst og overlevelse, og bruk av medikamentene som antibakterielle midler har et stort potensiale (Yssel et al., 2017). Bakterievekst hemmes ved å hindre peptidoglukansyntese i celleveggen, eller ved inkorporering i DNA, som fører til en avslutning i DNA-syntesen (Thomson & Lamont, 2019; Yssel et al., 2017). Om det skjer en lignende aktivitet for frie nukleosider og nukleobaser er usikkert. Som diskutert i Fagerlund, Wubshet, et al. (2021), vil de mest sannsynlig bli transportert inn i bakterieceller, for deretter å konverteres til nukleotider gjennom en reaksjonsvei som baserer seg på gjenvinning av nukleosider (kalt purin og pyrimidin salvage metabolisme). Her fosforyleres nukleosider til nukleosidmonofosfater av kinaser (Witte & Herde, 2020). De kan også brytes ned for å videre å bli kilde til karbon og energi. Doulgeraki et al. (2017) studerte effekten av ruccolaekstrakt på vekst og proteomet til bakterien meticillinresistent *Staphylococcus aureus* (MRSA), og nukleosid-difosfat kinase (NDK) var blant proteiner som ble uttrykt etter behandling med ruccolaekstrakt. Dette er et protein som er viktig for regulering av konsentrasjoner av cellulær nukleosid-trifosfat, og har en sentral rolle under purin- og pyrimidin salvage metabolisme (Doulgeraki et al., 2017). Tilstedeværelsen av nukleosider og nukleobaser i fraksjonene som viste antibakteriell aktivitet kan tyde på at disse komponentene kan påvirke nukleosidmetabolismen i noen bakterier, og dermed gi en hemmende effekt. Videre undersøkelser er nødvendige for å finne ut om nukleosider kan være det som forårsaker den antibakterielle effekten fra ruccolasalat.

De kjemiske bestanddelene i HPLC fraksjonene som beskrevet over, var ikke typiske komponenter assosiert med antibakteriell aktivitet i ruccolasalat. Ruccolasalat er en del av plantefamilien Brassicaceae, som er kjent for å inneholde en rekke fytokjemikalier med antibakterielle egenskaper. Ruccolaplanten inneholder mye glukosinolater, som videre omdannes til blant annet isotiocyanater ved mekanisk skade på plantevevet (Melrose, 2019). Spesielt glukosinolaten glucoerucin er funnet i høye nivåer, som danner isotiocyanaten euricin (Dufour et al., 2015). Isotiocyanat isolert fra planter har vist antibakteriell aktivitet mot mange bakterier *in vitro*, blant annet *Bacillus cereus*, *Serratia grimesii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* og *L. monocytogenes* (Melrose, 2019). Andre fytokjemikalier som polyfenoler, terpenoider, saponiner og flavonoler er også funnet i ruccola (Sadiq et al., 2014; Villatoro-Pulido et al., 2013), og er komponenter som kan ha antibakterielle egenskaper. I denne oppgaven ble bioaktive fraksjoner fra ruccolaekstrakt, som ga høy aktivitet mot *L. monocytogenes*, undersøkt for kjemiske bestanddeler. Hvis noen av komponentene nevnt over

ble ekstrahert i lave konsentrasjoner eller er en mindre metabolitt av ruccola, vil de ikke nødvendigvis bli detektert i analysen. Det utelukkes derfor ikke at slike forbindelser kan være tilstedeværende i ruccolaekstraktet.

#### 5.4 Ekstrahering og separering av ruccolaekstrakt

I denne studien ble flere trinn i prosessen med å identifisere kjemiske komponenter i HPLC fraksjoner forbedret, med utgangspunkt i arbeidet til Fagerlund, Wubshet, et al. (2021). Av fem ulike ekstraksjonsmidler, ble det gjenfunnet antibakteriell aktivitet i tørrekstrakter ekstrahert med 100 % metanol, 50 % metanol og vann, der 100 % metanol-ekstrakt viste den høyeste aktiviteten. Ekstrahering av plantemateriale er en prosess som utføres etter mange ulike metoder i studier som analyserer antimikrobiell effekt (Cowan, 1999). Valg av ekstraksjonsmiddel påvirker hvilke aktive og ikke-aktive molekyler som trekkes ut (Dahiya & Purkayastha, 2012), der vann er det mest polare ekstraksjonsmiddelet, etterfulgt av metanol og etanol, og videre etyl acetat som er relativt upolart (Abubakar & Haque, 2020). En studie med ekstrakter fra medisinske planter viste at bruk av vann som ekstraksjonsmiddel, ikke førte til hemming av veksten av bakterier i behandling med ekstraktet (Dahiya & Purkayastha, 2012). Etanol- og metanolekstrakter var mer potente, og hadde signifikant hemmende aktivitet mot flertallet av bakteriene som ble undersøkt. I denne studien viste 100 % metanolekstrakt mest effektiv hemming (lavest MIC-verdi), og vannekstrakt minst effektiv hemming (høyest MIC-verdi), noe som stemmer overens med observasjonene til Dahiya og Purkayastha (2012). Det er mulig ekstrahering med etanol også ville vist antibakteriell aktivitet, men ekstraksjonen resulterte i lite tørrstoffutbytte i denne oppgaven. Dette var også resultatet for etyl acetat som ekstraksjonsmiddel, som antagelig ekstraherte ut mer upolare stoffer fra ruccola. Gjennom arbeidet har den bioaktive komponenten i ruccola vist seg å ha relativt polare egenskaper. Resultatene viste at ekstraksjonsmidler med polare egenskaper, som metanol, egner seg godt til å ekstrahere ut bioaktive komponenter fra ruccola, mens ved bruk av vann vil andelen ikke-bioaktive komponenter bli så høy at det overgår de aktive komponentene.

Ekstrahering med 100 % metanol ga tørrekstrakt med den mest potente anti-*Listeria* aktiviteten, med minimum inhiberende konsentrasjon (MIC) verdi på 6 mg mL<sup>-1</sup>, sammenlignet med vann og 50 % metanol som ekstraksjonsmidler. I studien til Ceruso et al. (2020) ble antimikrobiell aktivitet i 800 planteekstrakt undersøkt mot *L. monocytogenes*. Resultatene viste at 12 av planteekstraktene hadde *in vitro* inhiberende aktivitet mot *L.*



*monocytogenes*, med MIC fra 2,5 til 10 mg mL<sup>-1</sup>. Resultater fra denne oppgaven viste MIC innenfor tilsvarende område som Ceruso et al. (2020) for ruccolaekstrakt mot *L.*

*monocytogenes*. Det understrekes at det er mange faktorer som kan påvirke MIC-verdier, som inokulumskonsentrasjonen, type vekstmedium og inkubasjonstid (Balouiri et al., 2016).

Resultatet gir likevel indikasjoner på at ruccolaekstrakt har lignende aktivitet som andre anti-listerielle planteekstrakter, og har potensiale for å hindre forekomst av *L. monocytogenes*.

I tidligere arbeid (Fagerlund, Wubshet, et al., 2021) ble det oppnådd en MIC-verdi for tørrekstrakt på 5 mg mL<sup>-1</sup> i vekstforsøk med *L. monocytogenes*, ved bruk av 50 % metanol som ekstraksjonsmiddel. Ved tilsvarende betingelser i denne oppgaven ble MIC-verdien 40 mg mL<sup>-1</sup>. Forskjellen i MIC-verdi kan forklares med ulikt utgangsmateriale i ruccolajuice før frysetørking. Planteekstrakter inneholder en blanding av aktive og ikke-aktive komponenter (Ceruso et al., 2020), der de ikke-aktive komponentene kan bestå av frie næringsstoffer som enkelt kan utnyttes som næring for bakterier. En stor andel ikke-aktive komponenter kan også gi en lav konsentrasjon av antibakterielle forbindelser. I Fagerlund, Wubshet, et al. (2021) ble det brukt saftpresse til å presse juice ut av ruccola, mens i denne oppgaven ble det brukt råsaftsentrifuge. Ved bruk av råsaftsentrifuge blir bladene most og kuttet opp i større grad under prosessering, og juicen vil muligens bestå av mer tørrstoff, og dermed flere ikke-aktive komponenter, enn ved kun å presse ut saften fra bladene. En større andel ikke-aktive komponenter vil resultere i en høyere MIC-verdi for antibakteriell aktivitet, noe som sannsynligvis var tilfellet ved bruk av 50 % metanol og vann som ekstraksjonsmiddel i denne oppgaven. I tillegg er det mange andre faktorer som kan føre til varierende resultater, optimalt bør plantene høstes fra samme tid i livssyklus, i samme sesong og fra samme lokasjon hvis forsøk skal sammenlignes (Borris, 1996). Dette gjelder generelt studier som undersøker antimikrobiell aktivitet fra planter, at det er store variasjoner, og vanskelig å standardisere metode for å kunne sammenligne resultater (Balouiri et al., 2016).

Kromatografisk fraksjonering med et lavt injeksjonsvolum av ruccolaekstrakt over flere omganger resulterte i en god separering av ruccolaekstraktet. Fagerlund, Wubshet, et al. (2021) identifiserte totalt 19 komponenter fra en HPLC fraksjon som viste bioaktivitet mot *L. monocytogenes*. Denne fraksjonen var isolert fra hele løsemiddelfronten (stor topp i kromatogram), og injisert kun en gang i HPLC. I denne oppgaven ble løsemiddelfronten splittet i to fraksjoner (Fraksjon 1 og fraksjon 2), der den bakerste delen (fraksjon 2) viste seg å være den delen som forårsaket anti-*Listeria* aktivitet. I fraksjon 2 ble det identifisert fire

ulike komponenter, der alle fire også var bestanddeler i HPLC fraksjonen analysert i Fagerlund, Wubshet, et al. (2021). Ved å splitte løsemiddelfronten i to deler, ble det isolert en renere fraksjon med mer potent aktivitet sammenlignet med fraksjonen fra hele løsemiddelfronten. Dette vises ved at antibakteriell aktivitet mot *L. monocytogenes* fra fraksjon 2 hadde lavere MIC-verdi, enn det som ble observert i Fagerlund, Wubshet, et al. (2021) (MIC-verdi 3 mg mL<sup>-1</sup>). Komponentene som ble identifisert i fraksjon 4, var også komponenter som tidligere hadde blitt identifisert i HPLC fraksjonen analysert i Fagerlund, Wubshet, et al. (2021). Fraksjon 4 viste kun noen små absorbanstopper i kromatogrammet, og ble samlet over et lenger tidsintervall enn fraksjon 2. Muligens besto prøvemateriale til fraksjon 4 av komponenter som absorberer svakt ved UV-lys, som gjør at komponentene ikke ble detektert, og dermed ikke vises tydelig i kromatogrammet.

I denne oppgaven ble det brukt gradienteluering i HPLC for separering av ruccolaekstrakt til fraksjoner, som vil si at den mobile fasen endret seg kontinuerlig under analysen. Ved en slik gradienteluering er systemet sensitivt for små endringer, og små forskyvninger i kromatogrammet skjer, som vist i kromatogram fra en batch (Vedlegg 1). Dette førte til at hver batch med fraksjoner fra HPLC hadde litt ulik sammensetning og variasjon i tørrstoffutbytte, da fraksjonene alltid ble samlet inn fra samme tidsintervall i analysetiden. Ideelt sett ville man fått renere fraksjoner om man ikke slo sammen fraksjoner fra ulike kjøring, men det var behov for å slå de sammen for å få nok materiale til videre uttesting. Fraksjon 2 ble isolert fra en liten del av den første eluerte toppen i HPLC, som betegnes som løsemiddelfronten, som vanligvis ikke undersøkes i detalj. Denne toppen er sammensatt av en rekke ulike komponenter, og isolering av nøyaktig samme komponenter fra hver injisering er ikke sannsynlig grunnet gradientforskyvningen. Dette førte til noe varierende MIC-verdi for fraksjonene, for eksempel var MIC-verdi for fraksjon 2 mot *L. monocytogenes* ulik i dose-respons kurve (Figur 14 A) og i forsøk med flere bakteriestammer (Figur 18 A), henholdsvis 0,175 og 0,5 mg mL<sup>-1</sup>. Fraksjon 4 varierte ikke like mye i MIC-verdi som fraksjon 2, trolig fordi den ble samlet inn utenfor løsemiddelfronten, og over et lenger tidsintervall i HPLC. Dette viser, som også nevnt tidligere, at små faktorer fører til varierende MIC-verdier. For å oppnå renere fraksjoner kunne de bioaktive fraksjonene blitt separert på nytt i annen en kolonne med mindre partikkelstørrelse (refraksjonering), for så å vurdere bioaktiviteten på nytt. Denne teknikken er vanlig ved isolering av nye legemidler fra planteekstrakter, og gjør at man kan ende opp med en ren, aktiv komponent. Dette kalles bioaktivitet-styrt fraksjonering (bioassay guided fractionation) (Weller, 2012).

## 5.5 Potensiell nytteverdi

Denne oppgaven har vist at ekstrakter og fraksjoner fra ruccola i ulik grad har en antibakteriell effekt på *L. monocytogenes*, samt andre bakteriestammer assosiert med vegetabilier, *in vitro*. Det er mange mulige bruksområder for forbindelser fra planter som viser antibakteriell aktivitet. Nye metoder og tilsetningsstoffer for å kontrollere tilstedeværelsen av *L. monocytogenes* i produksjonsmiljøet og i matprodukter etterspørres og utvikles stadig, da bakterien er en stor utfordring for matindustrien. Trolig er det mange uoppdagede ekstrakter fra planter som har antibakteriell effekt på patogene bakterier som *L. monocytogenes* (Ceruso et al., 2020).

Et potensielt bruksområde for antibakterielle komponenter fra ruccola kan være bruk som konserveringsmiddel i matvarer for å hindre vekst av patogene bakterier, som et alternativ til syntetiske tilsetningsstoffer. Blant annet beskriver Pisoschi et al. (2018) at naturlige antimikrobielle forbindelser kan brukes som konserveringsmiddel i matprodukter, eller som et supplement til konserveringsmidler som allerede er i bruk, for å skape en synergieffekt. Ceruso et al. (2020) beskrev samme potensielle anvendelser for planteekstrakter med aktivitet mot *L. monocytogenes*. Allyl isotiocyanat er et eksempel på et antibakterielt stoff funnet i plantefamilien Brassicaceae, som er godkjent som konserveringsmiddel i matvarer i Japan (Dufour et al., 2015). Et aspekt ved å gå fra *in vitro* aktivitet til bruk i et matprodukt, er at den antibakterielle aktiviteten fra planteekstrakter i matprodukter kan bli svakere enn aktiviteten observert *in vitro*. Dette grunnet interaksjon med ulike komponenter i matproduktet, på samme måte som tidligere beskrevet ved bruk av et komplekst vekstmedium (Kap. 5.1). Konsentrasjonen av det antimikrobielle stoffet må derfor ofte økes i matvarer for å oppnå samme nivå av inhibering (Yousefi et al., 2020). Flere studier har vist at forbindelser fra planter som har antibakteriell aktivitet *in vitro*, også kan ha en bioaktivitet ved direkte bruk på et matprodukt. Aktiviteten til den eteriske oljen kanelaldehyd har vist antibakteriell aktivitet mot *L. monocytogenes* og andre patogene bakterier, både *in vitro* og i mange ulike matvarer inokulert med bakterien (Friedman, 2017). Yousefi et al. (2020) beskriver at flere ulike eteriske oljer er vist å hemme vekst av *L. monocytogenes* på kjøtt og kjøttprodukter, der potensiell bruk av disse er som erstatning for syntetiske tilsetningsstoffer. Et bruksområde for antibakterielle komponenter fra ruccola kan altså være bruk som tilsetningsstoff i matvarer, men det understrekes at resultatene fra denne studien ikke er testet opp mot matprodukter, og det er ikke sikkert at den antibakterielle aktiviteten fra ruccola vil fungere til dette formålet. Hvis ruccolaekstrakt eller aktive komponenter skal brukes som konserveringsmiddel, kan

musemodeller brukes for å finne en trygg dose, og i tillegg bør cytotoxisitet, mutagenisitet og genotoksisitet undersøkes, som diskutert av Ceruso et al. (2020).

Bruk rettet mot kontroll av *L. monocytogenes* eller andre patogene bakterier som desinfeksjon i produksjonsmiljø eller som en del av emballasje kan også være aktuelt. Ceruso et al. (2020) beskriver bruk av planteekstrakter som antimikrobielle midler i produksjonsmiljøet, og Gray et al. (2018) fokuserte på eteriske oljer for å hindre dannelse av biofilm med *L. monocytogenes*. Det er også foreslått å bruke planteekstrakter som en del av vaskeprosessen for dekontaminering av overflaten til ulike vegetabilier (Gyawali et al., 2015). Ny emballasjeteknologi med en kombinasjon av antimikrobielle midler fra biologiske komponenter (planteflyktige stoffer og planteekstrakt) og emballasjemateriale foreslås som potensiell bruk av Irkin og Esmer (2015). Khameneh et al. (2019) beskriver antimikrobielle midler fra planter som potensielle som en erstatning eller tilleggsbehandling for antibiotika i bekjempelsen mot resistente bakterier. Videre undersøkelser og identifisering av de antibakterielle komponentene i ruccolasalat må gjennomføres for å karakterisere mulige bruksområder.

## 6 Konklusjon og videre arbeid

Ruccolasalatjuice som ble laget til dette arbeidet, viste antibakteriell aktivitet mot *L. monocytogenes*, tilsvarende tidligere observasjoner av Fagerlund, Wubshet, et al. (2021). Ruccolaekstrakt ekstrahert med 100 % metanol viste mest effektiv hemming av *L. monocytogenes*, sammenlignet med bruk av 50 % metanol, vann, etanol og etyl acetat som ekstraksjonsmiddel. To HPLC fraksjoner isolert fra ruccolaekstraktet viste en anti-*Listeria* aktivitet, og inhiberte veksten til ni av de totalt 12 utvalgte bakteriestammene assosiert med vegetabilier. De Gram-negative bakteriene *Pseudomonas* sp. (MF6122), *Serratia* sp. og *Sphingomonas* sp. ble ikke hemmet ved konsentrasjonene som ble testet, mens *Micrococcus* sp. ble hemmet ved alle konsentrasjonene, og skilte seg dermed ut som sensitiv. Ekstrakt og fraksjoner viste i tillegg til veksthemmende aktivitet, også bakteriedrepende aktivitet mot *L. monocytogenes*. De to fraksjonene fra ruccolaekstrakt som viste anti-*Listeria* aktivitet, besto av aminosyrer, nukleosider, en nukleobase og den kvartære ammoniumsforbindelsen kolin. Arbeid med å utarbeide et definert medium til bruk ved undersøkelse av bioaktivitet førte ikke frem, da det ikke ble oppnådd tilstrekkelig vekst av *L. monocytogenes*.

Med utgangspunkt i arbeidet til Fagerlund, Wubshet, et al. (2021) har antibakteriell aktivitet i ruccolasalat blitt analysert, og metoder for ekstrahering og separering har blitt forbedret. Fagerlund, Wubshet, et al. (2021) fant i alt 19 komponenter i fraksjonen som viste bioaktivitet, mens det i denne oppgaven ble det begrenset til fire komponenter fra hver av to fraksjoner. Metode for ekstrahering av aktive komponenter fra ruccolajuice bør undersøkes videre, for å oppnå et høyt tørrstoffutbytte og samtidig høy aktivitet. Ytterligere undersøkelser av ekstraksjonsmidler, og flere gjentak av forsøk med anti-*Listeria* aktivitet fra ekstrakter bør utføres.

Videre arbeid for å karakterisere den bakteriedrepende aktiviteten til ruccolajuice, ruccolaekstrakt og HPLC fraksjoner, samt finne minimum bakteriedrepende konsentrasjon vil være interessant. Dette kan gi informasjon om egenskapene til den hemmende aktiviteten som er observert, med tanke på å konstatere om den er bakteriedrepende eller bakteriostatisk, tidsavhengig eller konsentrasjonsavhengig, samt hva slags type skade som påføres bakteriene.

Den antibakterielle aktiviteten fra komponenter fra ruccola bør undersøkes videre for å bestemme hva som forårsaker den hemmende aktiviteten, og den molekylære mekanismen som ligger til grunn. Dette kan innebære undersøkelser av antibakteriell aktivitet fra hver av

komponentene som ble identifisert. En ny runde med separering av fraksjoner (refraksjonering) med videre undersøkelse av bioaktivitet og identifisering av komponenter kan være aktuelt, for å begrense antall komponenter ytterligere. Metoder for å undersøke den molekylære mekanismen kan innebære teknikker som mikroskopering, transkripsjonsanalyser (RNA-seq) og undersøkelser av effekt av proteinekspressjon (proteomikk).

## 7 Referansliste

- Abubakar, A. R. & Haque, M. (2020). Preparation of Medicinal Plants: Basic Extraction and Fractionation Procedures for Experimental Purposes. *Journal of pharmacy & bioallied sciences*, 12(1), 1-10. [https://doi.org/10.4103/jpbs.JPBS\\_175\\_19](https://doi.org/10.4103/jpbs.JPBS_175_19)
- Ahuja, I., Rohloff, J. & Bones, A. M. (2011). Defence Mechanisms of Brassicaceae: Implications for Plant-Insect Interactions and Potential for Integrated Pest Management. I E. Lichtfouse, M. Hamelin, M. Navarrete & P. Debaeke (Red.), *Sustainable Agriculture Volume 2* (s. 623-670). Springer Netherlands. [https://doi.org/10.1007/978-94-007-0394-0\\_28](https://doi.org/10.1007/978-94-007-0394-0_28)
- Armstrong, M., Jonscher, K. & Reisdorph, N. A. (2007). Analysis of 25 underivatized amino acids in human plasma using ion-pairing reversed-phase liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 21(16), 2717-2726. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/rcm.3124>
- Aryal, S. (2018). *Bacterial growth curve protocol*. Hentet 06.05. fra <https://microbenotes.com/bacterial-growth-curve-protocol/>
- Balouiri, M., Sadiki, M. & Ibnsouda, S. K. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6(2), 71-79. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>
- Barbieri, R., Coppo, E., Marchese, A., Daglia, M., Sobarzo-Sánchez, E., Nabavi, S. F. & Nabavi, S. M. (2017). Phytochemicals for human disease: An update on plant-derived compounds antibacterial activity. *Microbiological Research*, 196, 44-68. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.micres.2016.12.003>
- Bell, L., Oruna-Concha, M. J. & Wagstaff, C. (2015). Identification and quantification of glucosinolate and flavonol compounds in rocket salad (*Eruca sativa*, *Eruca vesicaria* and *Diplotaxis tenuifolia*) by LC-MS: highlighting the potential for improving nutritional value of rocket crops. *Food chemistry*, 172, 852-861. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.09.116>
- Bell, L. & Wagstaff, C. (2019). Rocket science: A review of phytochemical & health-related research in *Eruca* & *Diplotaxis* species. *Food Chemistry: X*, 1, 100002. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fochx.2018.100002>
- Borris, R. P. (1996). Natural products research: perspectives from a major pharmaceutical company. *Journal of Ethnopharmacology*, 51(1), 29-38. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0378-8741\(95\)01347-4](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0378-8741(95)01347-4)
- Bouarab Chibane, L., Degraeve, P., Ferhout, H., Bouajila, J. & Oulahal, N. (2019). Plant antimicrobial polyphenols as potential natural food preservatives. *J Sci Food Agric*, 99(4), 1457-1474. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9357>
- Breijyeh, Z., Jubeh, B. & Karaman, R. (2020). Resistance of Gram-Negative Bacteria to Current Antibacterial Agents and Approaches to Resolve It. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 25(6), 1340. <https://doi.org/10.3390/molecules25061340>
- Briers, Y., Klumpp, J., Schuppler, M. & Loessner, M. J. (2011). Genome Sequence of *Listeria monocytogenes* Scott A, a Clinical Isolate from a Food-Borne Listeriosis Outbreak. *Journal of bacteriology*, 193(16), 4284-4285. <https://doi.org/10.1128/jb.05328-11>
- Britannica. (2014). Nucleoside. I *Encyclopedia Britannica*. <https://www.britannica.com/science/nucleoside>

- Buffet-Bataillon, S., Tattevin, P., Bonnaure-Mallet, M. & Jolivet-Gougeon, A. (2012). Emergence of resistance to antibacterial agents: the role of quaternary ammonium compounds—a critical review. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 39(5), 381-389. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2012.01.011>
- Ceruso, M., Clement, J. A., Todd, M. J., Zhang, F., Huang, Z., Anastasio, A., Pepe, T. & Liu, Y. (2020). The Inhibitory Effect of Plant Extracts on Growth of the Foodborne Pathogen, *Listeria monocytogenes*. *Antibiotics*, 9(6), 319. <https://www.mdpi.com/2079-6382/9/6/319>
- Cowan, M. M. (1999). Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 12(4), 564-582. <https://doi.org/10.1128/cmr.12.4.564>
- Dahiya, P. & Purkayastha, S. (2012). Phytochemical Screening and Antimicrobial Activity of Some Medicinal Plants Against Multi-drug Resistant Bacteria from Clinical Isolates. *Indian journal of pharmaceutical sciences*, 74(5), 443-450. <https://doi.org/10.4103/0250-474X.108420>
- De Leersnyder, I., De Gelder, L., Van Driessche, I. & Vermeir, P. (2018). Influence of growth media components on the antibacterial effect of silver ions on *Bacillus subtilis* in a liquid growth medium. *Scientific Reports*, 8(1), 9325. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-27540-9>
- Doulgeraki, A. I., Efthimiou, G., Paramithiotis, S., Pappas, K. M., Typas, M. A. & Nychas, G.-J. (2017). Effect of Rocket (*Eruca sativa*) Extract on MRSA Growth and Proteome: Metabolic Adjustments in Plant-Based Media. *Frontiers in Microbiology*, 8(782). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00782>
- Drugbank. (2021a). *Adenine – Predicted MS/MS Spectrum - 20V, Positive (Annotated) (DB00173)*. Drugbank. Hentet 02.05 fra [https://go.drugbank.com/spectra/ms\\_ms/6981](https://go.drugbank.com/spectra/ms_ms/6981)
- Drugbank. (2021b). *Choline*. Drugbank Hentet 02.05 fra <https://go.drugbank.com/drugs/DB00122>
- Drugbank. (2021c). *Choline – Predicted MS/MS Spectrum - 20V, Positive (Annotated) (DB00122)*. Drugbank Hentet 02.05 fra [https://go.drugbank.com/spectra/ms\\_ms/316964](https://go.drugbank.com/spectra/ms_ms/316964)
- Drugbank. (2021d). *Cytidine – Predicted MS/MS Spectrum - 20V, Positive (Annotated) (DB02097)*. Drugbank. Hentet 02.05.21 fra [https://go.drugbank.com/spectra/ms\\_ms/178453](https://go.drugbank.com/spectra/ms_ms/178453)
- Drugbank. (2021e). *Guanosine – Predicted MS/MS Spectrum - 20V, Positive (Annotated) (DB02857)*. Drugbank. Hentet 02.05. fra [https://go.drugbank.com/spectra/ms\\_ms/178711](https://go.drugbank.com/spectra/ms_ms/178711)
- Drugbank. (2021f). *Isoleucine – Predicted MS/MS Spectrum - 20V, Positive (Annotated) (DB00167)*. Hentet 02.05. fra [https://go.drugbank.com/spectra/ms\\_ms/178771](https://go.drugbank.com/spectra/ms_ms/178771)
- Drugbank. (2021g). *Leucine – Predicted MS/MS Spectrum - 20V, Positive (Annotated) (DB00149)*. Hentet 02.05. fra [https://go.drugbank.com/spectra/ms\\_ms/178783](https://go.drugbank.com/spectra/ms_ms/178783)
- Drugbank. (2021h). *Tryosine – Predicted MS/MS Spectrum - 20V, Positive (Annotated) (DB00135)*. Hentet 02.05. fra [https://go.drugbank.com/spectra/ms\\_ms/178546](https://go.drugbank.com/spectra/ms_ms/178546)
- Drugbank. (2021i). *Valine – Predicted MS/MS Spectrum - 20V, Positive (Annotated) (DB00161)*. Drugbank Hentet 02.05. fra [https://go.drugbank.com/spectra/ms\\_ms/178807](https://go.drugbank.com/spectra/ms_ms/178807)



- Dufour, V., Stahl, M. & Baysse, C. (2015). The antibacterial properties of isothiocyanates. *Microbiology (Reading)*, 161(Pt 2), 229-243. <https://doi.org/10.1099/mic.0.082362-0>
- Fagerlund, A., Langsrud, S. & Møretrø, T. (2021). Microbial diversity and ecology of biofilms in food industry environments associated with *Listeria monocytogenes* persistence. *Current Opinion in Food Science*, 37, 171-178. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cofs.2020.10.015>
- Fagerlund, A., Wubshet, S. G., Møretrø, T., Schmidt, G., Borge, G. I. & Langsrud, S. (2021). Anti-listerial properties of chemical constituents of *Eruca sativa* (rocket salad): From industrial observation to in vitro activity. *PloS one*, 16(4), e0250648. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0250648>
- Farber, J. M. & Peterkin, P. I. (1991). *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiological Reviews*, 55(3), 476-511. <https://mmlbr.asm.org/content/mmlbr/55/3/476.full.pdf>
- Ferreira, V., Wiedmann, M., Teixeira, P. & Stasiewicz, M. J. (2014). *Listeria monocytogenes* Persistence in Food-Associated Environments: Epidemiology, Strain Characteristics, and Implications for Public Health. *Journal of Food Protection*, 77(1), 150-170. <https://doi.org/10.4315/0362-028x.Jfp-13-150>
- Friedman, M. (2017). Chemistry, Antimicrobial Mechanisms, and Antibiotic Activities of Cinnamaldehyde against Pathogenic Bacteria in Animal Feeds and Human Foods. *Journal of agricultural and food chemistry*, 65(48), 10406-10423. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b04344>
- Garner, D. & Katheriou, S. (2016). Fresh Produce–Associated Listeriosis Outbreaks, Sources of Concern, Teachable Moments, and Insights. *Journal of Food Protection*, 79(2), 337-344. <https://doi.org/10.4315/0362-028x.Jfp-15-387>
- Gilbert, P. & Moore, L. E. (2005). Cationic antiseptics: diversity of action under a common epithet. *Journal of Applied Microbiology*, 99(4), 703-715. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02664.x>
- Gray, J. A., Chandry, P. S., Kaur, M., Kocharunchitt, C., Bowman, J. P. & Fox, E. M. (2018). Novel Biocontrol Methods for *Listeria monocytogenes* Biofilms in Food Production Facilities. *Frontiers in Microbiology*, 9(605). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00605>
- Gyawali, R., Hayek, S. A. & Ibrahim, S. A. (2015). Plant extracts as antimicrobials in food products: Mechanisms of action, extraction methods, and applications. I T. M. Taylor (Red.), *Handbook of Natural Antimicrobials for Food Safety and Quality* (s. 49-68). Woodhead Publishing. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-1-78242-034-7.00003-7>
- Hylin, J. W. (1969). Toxic peptides and amino acids in foods and feeds. *Journal of agricultural and food chemistry*, 17(3), 492-496. <https://doi.org/10.1021/jf60163a003>
- Implen.no. (2021). OD600 – cell desity, bacterial growth, yeast growth. Implen. Hentet 06.05. fra <https://www.implen.de/od600-diluphotometer/od600/>
- Irkin, R. & Esmer, O. K. (2015). Novel food packaging systems with natural antimicrobial agents. *Journal of food science and technology*, 52(10), 6095-6111. <https://doi.org/10.1007/s13197-015-1780-9>

- Jarvis, N. A., O'Bryan, C. A., Ricke, S. C., Johnson, M. G. & Crandall, P. G. (2016). A review of minimal and defined media for growth of *Listeria monocytogenes*. *Food Control*, 66, 256-269. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.02.020>
- Jørgensen, H. J., Hauge, K., Lange, H., Lyngstad, T. M. & Heier, B. T. (2020). The Norwegian Zoonoses Report 2019. <https://www.vetinst.no/rapporter-og-publikasjoner/rapporter/2020/the-norwegian-zoonoses-report-2019>
- Kawahara, K., Kuraishi, H. & Zähringer, U. (1999). Chemical structure and function of glycosphingolipids of *Sphingomonas* spp and their distribution among members of the  $\alpha$ -4 subclass of Proteobacteria. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 23(4-5), 408-413. <https://doi.org/10.1038/sj.jim.2900708>
- Khameneh, B., Iranshahy, M., Soheili, V. & Fazly Bazzaz, B. S. (2019). Review on plant antimicrobials: a mechanistic viewpoint. *Antimicrobial Resistance & Infection Control*, 8(1), 118. <https://doi.org/10.1186/s13756-019-0559-6>
- King, T. C. & Krogstad, D. J. (1983). Spectrophotometric Assessment of Dose-Response Curves for Single Antimicrobial Agents and Antimicrobial Combinations. *The Journal of Infectious Diseases*, 147(4), 758-764. <https://doi.org/10.1093/infdis/147.4.758>
- Kinnula, S., Hemminki, K., Kotilainen, H., Ruotsalainen, E., Tarkka, E., Salmenlinna, S., Hallanvuo, S., Leinonen, E., Jukka, O. & Rimhanen-Finne, R. (2018). Outbreak of multiple strains of non-O157 Shiga toxin-producing and enteropathogenic *Escherichia coli* associated with rocket salad, Finland, autumn 2016. *Eurosurveillance*, 23(35), 1700666. <https://doi.org/https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2018.23.35.1700666>
- Lianou, A. & Sofos, J. N. (2007). A Review of the Incidence and Transmission of *Listeria monocytogenes* in Ready-to-Eat Products in Retail and Food Service Environments. *Journal of Food Protection*, 70(9), 2172-2198. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-70.9.2172>
- Lin, C. M., Kim, J., Du, W. X. & Wei, C. I. (2000). Bactericidal activity of isothiocyanate against pathogens on fresh produce. *J Food Prot*, 63(1), 25-30. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-63.1.25>
- Lokerse, R. F. A., Maslowska-Corker, K. A., van de Wardt, L. C. & Wijtzes, T. (2016). Growth capacity of *Listeria monocytogenes* in ingredients of ready-to-eat salads. *Food Control*, 60, 338-345. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.07.041>
- Mahady, G. B., Huang, Y., Doyle, B. J. & Locklear, T. (2008). Natural Products As Antibacterial Agents. I R. Atta ur (Red.), *Studies in Natural Products Chemistry* (Bd. 35, s. 423-444). Elsevier. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1572-5995\(08\)80011-7](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1572-5995(08)80011-7)
- Mattilsynet. (2013, 14.02.2013). *Listeria: Kriterier og metoder for å sikre trygg spiseklar mat*. Mattilsynet. Hentet 04.05. fra [https://www.mattilsynet.no/mat\\_og\\_vann/smitte\\_fra\\_mat\\_og\\_drikke/bakterier\\_i\\_mat\\_og\\_drikke/listeria/listeria\\_kriterier\\_og\\_metoder\\_for\\_aa\\_sikre\\_trygg\\_spiseklar\\_mat.8379](https://www.mattilsynet.no/mat_og_vann/smitte_fra_mat_og_drikke/bakterier_i_mat_og_drikke/listeria/listeria_kriterier_og_metoder_for_aa_sikre_trygg_spiseklar_mat.8379)
- Melrose, J. (2019). The Glucosinolates: A Sulphur Glucoside Family of Mustard Anti-Tumour and Antimicrobial Phytochemicals of Potential Therapeutic Application. *Biomedicines*, 7(3). <https://doi.org/10.3390/biomedicines7030062>

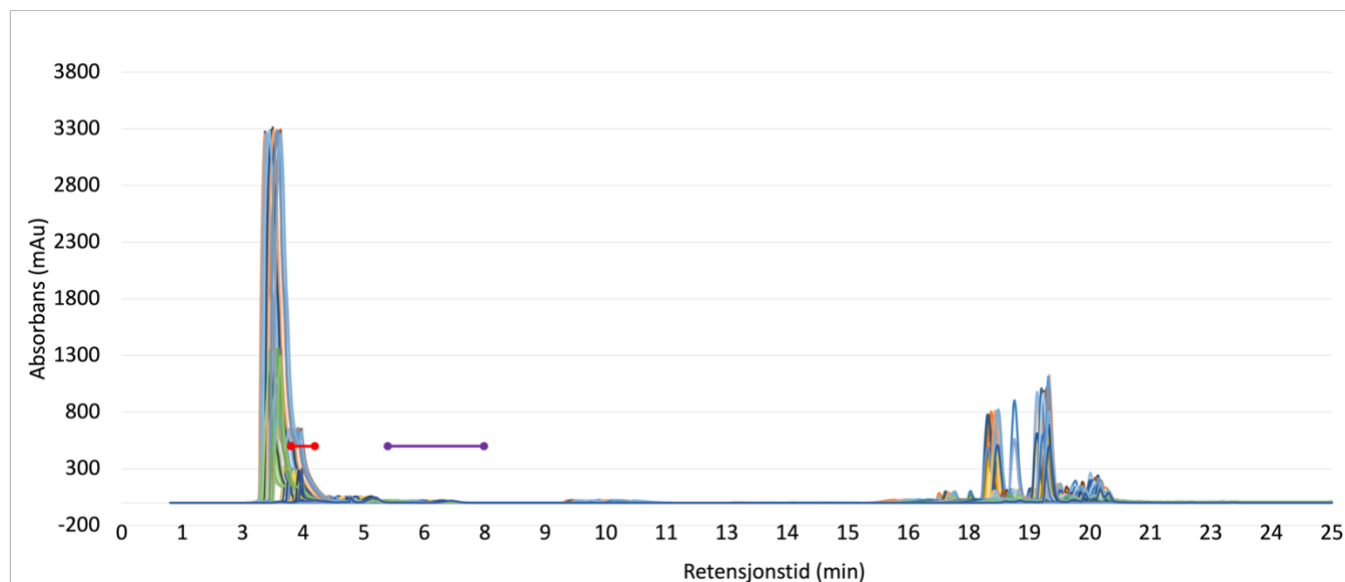
- Mittal, R. D. (2015). Tandem mass spectroscopy in diagnosis and clinical research. *Indian journal of clinical biochemistry : IJCB*, 30(2), 121-123. <https://doi.org/10.1007/s12291-015-0498-9>
- Molecular Probes. (2004). LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kits. <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/mp07007.pdf>
- Nwaiwu, O. (2020). What are the recognized species of the genus *Listeria*? *Access Microbiology*, 2(9). <https://doi.org/https://doi.org/10.1099/acmi.0.000153>
- Olaimat, A. N. & Holley, R. A. (2012). Factors influencing the microbial safety of fresh produce: A review. *Food Microbiology*, 32(1), 1-19. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.04.016>
- Ombra, M. N., Cozzolino, A., Nazzaro, F., d'Acierno, A., Tremonte, P., Coppola, R. & Fratianni, F. (2017). Biochemical and biological characterization of two Brassicaceae after their commercial expiry date. *Food chemistry*, 218, 335-340. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.09.082>
- Operating manual freeze-dryer Gamma 1-16 LSC*. (2013). Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH. . Hentet 05.05 fra <https://www.manualsdir.com/manuals/739283/martin-christ-gamma-2-16-lscplus-gamma-1-16-lscplus.html>
- Orsi, R. H. & Wiedmann, M. (2016). Characteristics and distribution of *Listeria* spp., including *Listeria* species newly described since 2009. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(12), 5273-5287. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7552-2>
- Pisoschi, A. M., Pop, A., Georgescu, C., Turcuş, V., Olah, N. K. & Mathe, E. (2018). An overview of natural antimicrobials role in food. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 143, 922-935. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.11.095>
- Pitt, J. J. (2009). Principles and applications of liquid chromatography-mass spectrometry in clinical biochemistry. *The Clinical biochemist. Reviews*, 30(1), 19-34. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2643089/>
- Premaratne, R. J., Lin, W. J. & Johnson, E. A. (1991). Development of an improved chemically defined minimal medium for *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*, 57(10), 3046-3048. <https://aem.asm.org/content/aem/57/10/3046.full.pdf>
- Pusterla, T. (2018). *Turbidity measurements in life science*. BMG Labtech. Hentet 06.05. fra <https://www.bmglabtech.com/turbidity-measurements-in-life-science/>
- Quinto, E. J., Caro, I., Villalobos-Delgado, L. H., Mateo, J., De-Mateo-Silleras, B. & Redondo-Del-Río, M. P. (2019). Food Safety through Natural Antimicrobials. *Antibiotics (Basel)*, 8(4). <https://doi.org/10.3390/antibiotics8040208>
- Raheem, N. & Straus, S. K. (2019). Mechanisms of Action for Antimicrobial Peptides With Antibacterial and Antibiofilm Functions. *Frontiers in Microbiology*, 10(2866). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02866>
- Rahman, A. & Kang, S. C. (2009). In vitro control of food-borne and food spoilage bacteria by essential oil and ethanol extracts of *Lonicera japonica* Thunb. *Food chemistry*, 116(3), 670-675. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.03.014>

- RASFF. (2020). *Salmonella detected in rucola packed in Poland, with raw material from Italy*. RASFF. Hentet 25.05 fra <https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/screen/notification/440616>
- Roald, B. (2020). Fluorescensmikroskopi. I *Store norske leksikon*. Hentet 14.05.21 fra <https://snl.no/fluorescensmikroskop>
- Sadiq, A., Hayat, M. Q. & Murad, S. (2014). Qualitative and Quantitative Determination of Secondary metabolites and Antioxidant Potential of *Eruca sativa*. *Natural Products Chemistry & Research*, 2, 7. <https://doi.org/10.4172/2329-6836.1000137>
- Sanders, S., Bartee, D., Harrison, M. J., Phillips, P. D., Koppisch, A. T. & Freil Meyers, C. L. (2018). Growth medium-dependent antimicrobial activity of early stage MEP pathway inhibitors. *PloS one*, 13(5), e0197638. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0197638>
- Sarker, S. D., Latif, Z. & Gray, A. I. (2006). *Natural Products Isolation*. Humana Press. <https://books.google.no/books?id=NIvvGGyeL3oC>
- Sarwar Alam, M., Kaur, G., Jabbar, Z., Javed, K. & Athar, M. (2007). *Eruca sativa* seeds possess antioxidant activity and exert a protective effect on mercuric chloride induced renal toxicity. *Food and Chemical Toxicology*, 45(6), 910-920. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fct.2006.11.013>
- Schneebeli, R. & Egli, T. (2013). A Defined, Glucose-Limited Mineral Medium for the Cultivation of *Listeria* spp. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(8), 2503-2511. <https://doi.org/10.1128/aem.03538-12>
- Schuchat, A., Swaminathan, B. & Broome, C. V. (1991). Epidemiology of human listeriosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 4(2), 169-183. <https://doi.org/10.1128/cmr.4.2.169>
- Self, J. L., Conrad, A., Stroika, S., Jackson, A., Whitlock, L., Jackson, K. A., Beal, J., Wellman, A., Fatica, M. K., Bidol, S., Huth, P. P., Hamel, M., Franklin, K., Tschetter, L., Kopko, C., Kirsch, P., Wise, M. E. & Basler, C. (2019). Multistate Outbreak of Listeriosis Associated with Packaged Leafy Green Salads, United States and Canada, 2015-2016. *Emerging infectious diseases*, 25(8), 1461-1468. <https://doi.org/10.3201/eid2508.180761>
- Silva-Angulo, A. B., Zanini, S. F., Rosenthal, A., Rodrigo, D., Klein, G. & Martínez, A. (2015). Combined effect of carvacrol and citral on the growth of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* and on the occurrence of damaged cells. *Food Control*, 53, 156-162. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.01.028>
- Smith, A., Moorhouse, E., Monaghan, J., Taylor, C. & Singleton, I. (2018). Sources and survival of *Listeria monocytogenes* on fresh, leafy produce. *Journal of Applied Microbiology*, 125(4), 930-942. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/jam.14025>
- SNL. (2021). Adenin. I *Store norske leksikon*. Hentet 15.05.2021 fra <https://snl.no/adenin>
- Swaminathan, B. & Gerner-Smidt, P. (2007). The epidemiology of human listeriosis. *Microbes and Infection*, 9(10), 1236-1243. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.micinf.2007.05.011>
- Tam, J. P., Wang, S., Wong, K. H. & Tan, W. L. (2015). Antimicrobial Peptides from Plants. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*, 8(4), 711-757. <https://doi.org/10.3390/ph8040711>
- Tcherkas, Y. V., Kartsova, L. A. & Krasnova, I. N. (2001). Analysis of amino acids in human serum by isocratic reversed-phase high-performance liquid chromatography with

- electrochemical detection. *Journal of Chromatography A*, 913(1), 303-308.  
[https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)01206-1](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)01206-1)
- Thomson, J. M. & Lamont, L. L. (2019). Nucleoside Analogues as Antibacterial Agents. *Frontiers in Microbiology*, 10(952). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00952>
- Toma, J. Q. (2010). *Chromatography: Types, Techniques and Methods* [Book]. Nova.  
<http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=e000xww&AN=339875&site=ehost-live>
- Tsai, H.-N. & Hodgson, D. A. (2003). Development of a Synthetic Minimal Medium for *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(11), 6943-6945. <https://doi.org/10.1128/aem.69.11.6943-6945.2003>
- UiO. (2011, 13.03.2019). *Sekundærmetabolisme*. Hentet 02.05.21 fra  
<https://www.mn.uio.no/ibv/tjenester/kunnskap/plantefys/leksikon/s/sekundaerme.html>
- Villatoro-Pulido, M., Priego-Capote, F., Álvarez-Sánchez, B., Saha, S., Philo, M., Obregón-Cano, S., De Haro-Bailón, A., Font, R. & Del Río-Celestino, M. (2013). An approach to the phytochemical profiling of rocket [*Eruca sativa* (Mill.) Thell]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(15), 3809-3819. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6286>
- VKM, Skjerdal, T., Eckner, K., Kapperud, G., Lassen, J., Grahek-Ogden, D., Narvhus, J., Nesbakken, T., Robertson, L., Rosnes, J. T., Skjerve, E., Vold, L. & Wasteson, Y. (2018). *Listeria monocytogenes* - vurdering av helseråd til gravide og andre utsatte grupper. Uttalelse fra Faggruppe for hygiene og smittestoffer i Vitenskapskomiteen for mat og miljø. . *Vitenskapskomite for mat og miljø (VKM)*, 2018:13.  
<https://www.vkm.no/risikovurderinger/allevurderinger/listeriabakteriervurderingavradt-ilgravideogandreutsattegrupper.4.5cdfac7815f59c3fd31cb336.html>
- Wangensteen, H. (2021). Ekstrakt - farmasi IStore medisinske leksikon. Hentet 05.05.21 fra  
[https://sml.snl.no/ekstrakt\\_-\\_farmasi](https://sml.snl.no/ekstrakt_-_farmasi)
- Weller, M. G. (2012). A Unifying Review of Bioassay-Guided Fractionation, Effect-Directed Analysis and Related Techniques. *Sensors*, 12(7), 9181-9209.  
<https://www.mdpi.com/1424-8220/12/7/9181>
- Wibetoe, G. (2020). Kromatografi. I Store norske leksikon. Hentet 06.05.21 fra  
<https://snl.no/kromatografi>
- Witte, C.-P. & Herde, M. (2020). Nucleotide Metabolism in Plants. *Plant physiology*, 182(1), 63-78. <https://doi.org/10.1104/pp.19.00955>
- Xu, X., Ou, Z. M. & Wu, C. D. (2018). Growth Media Affect Assessment of Antimicrobial Activity of Plant-Derived Polyphenols. *BioMed Research International*, 2018, 8308640. <https://doi.org/10.1155/2018/8308640>
- Yousefi, M., Khorshidian, N. & Hosseini, H. (2020). Potential Application of Essential Oils for Mitigation of *Listeria monocytogenes* in Meat and Poultry Products. *Frontiers in nutrition*, 7, 577287-577287. <https://doi.org/10.3389/fnut.2020.577287>
- Yssel, A. E. J., Vanderleyden, J. & Steenackers, H. P. (2017). Repurposing of nucleoside- and nucleobase-derivative drugs as antibiotics and biofilm inhibitors. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 72(8), 2156-2170. <https://doi.org/10.1093/jac/dkx151>

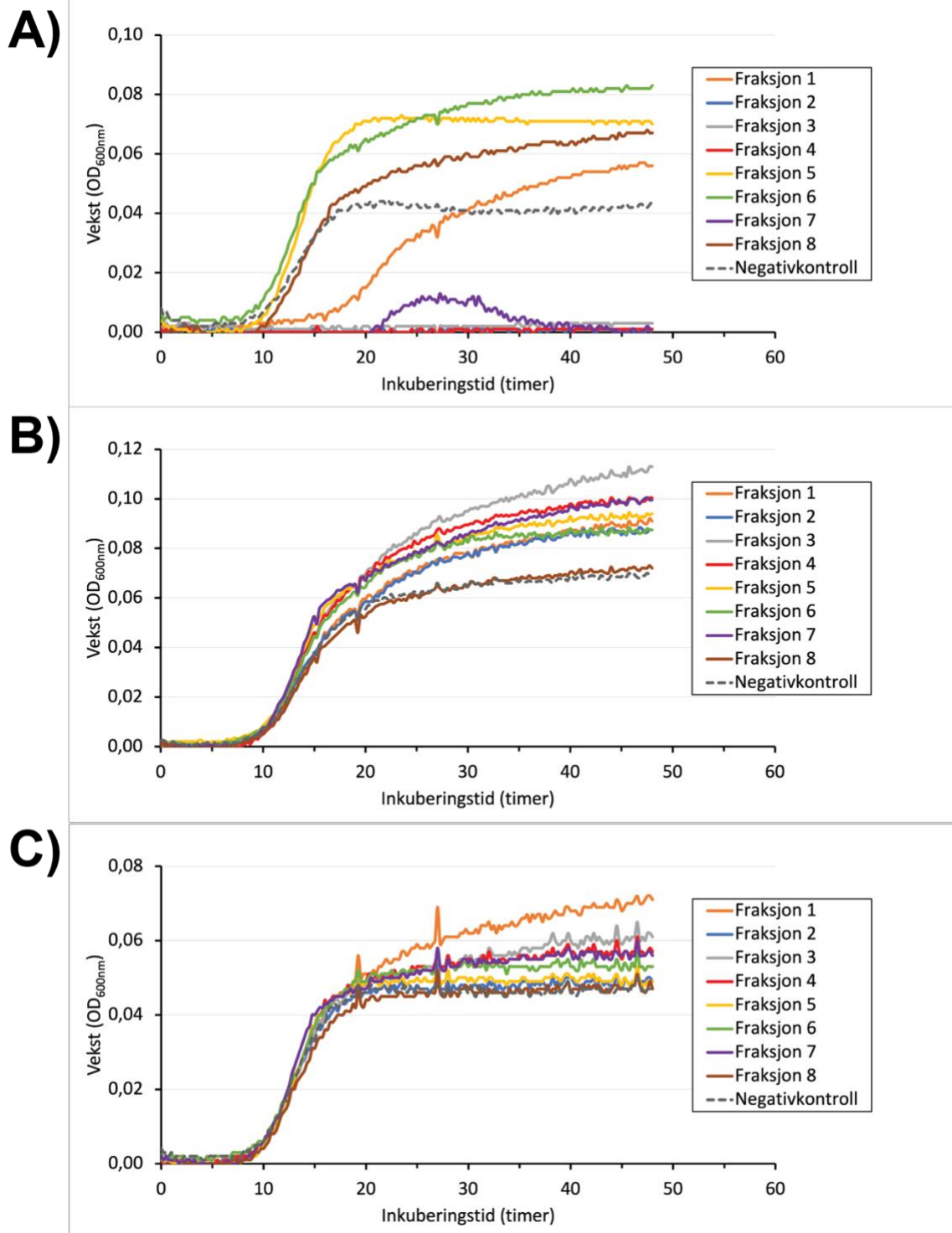


## Vedlegg 1 – Kromatogram fra HPLC med fraksjonering ved 214, 227 og 254 nm



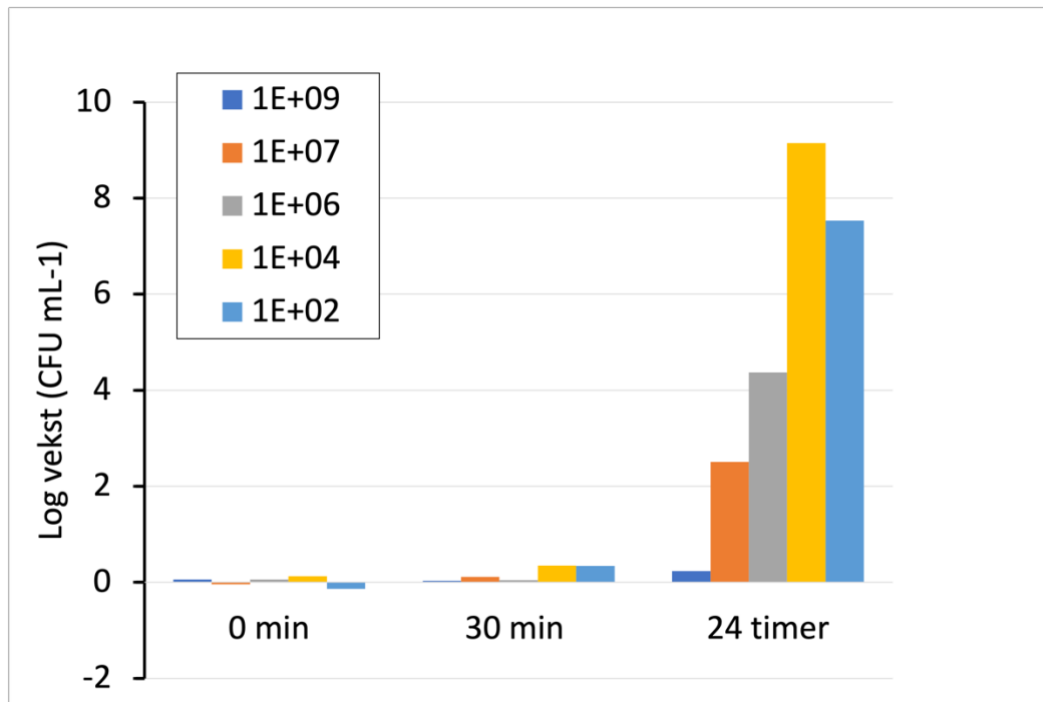
Kromatogram fra HPLC med fraksjonering (214, 227 og 254 nm),  
injeksjon var 50  $\mu$ l ruccolækstrakt (ruccolajuice ekstrahert med metanol), resuspendert i 50 %  
metanol i en 100 mg mL<sup>-1</sup> løsning. Det ble samlet inn fraksjoner fra de to markerte områdene,  
rødt er for fraksjon 2 og lilla er for fraksjon 4.

## Vedlegg 2 – Vekstkurver for *L. monocytogenes* i HPLC fraksjoner



Vekst av *L. monocytogenes* i fraksjon 1-8 isolert fra HPLC. Forsøket ble utført en gang. Alle fraksjoner (frysetørket) ble først fortynnet i 1 mL dH<sub>2</sub>O, og videre tilsatt i følgende volum i Bioscreen brett med et totalvolum 200 µl: **A)** 30 µl **B)** 3 µl **C)** 1 µl.

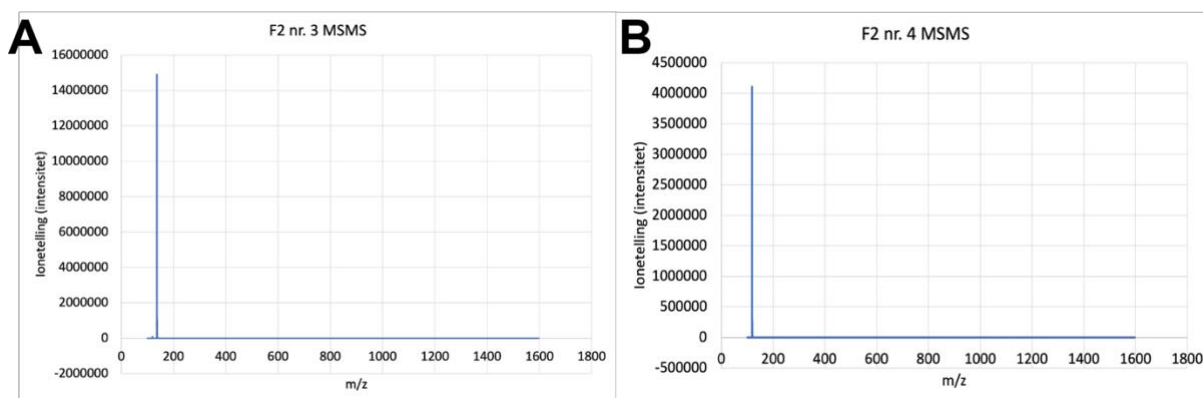
### Vedlegg 3 – Log<sub>10</sub> økning (CFU mL<sup>-1</sup>) av *L. monocytogenes* i ruccolajuice



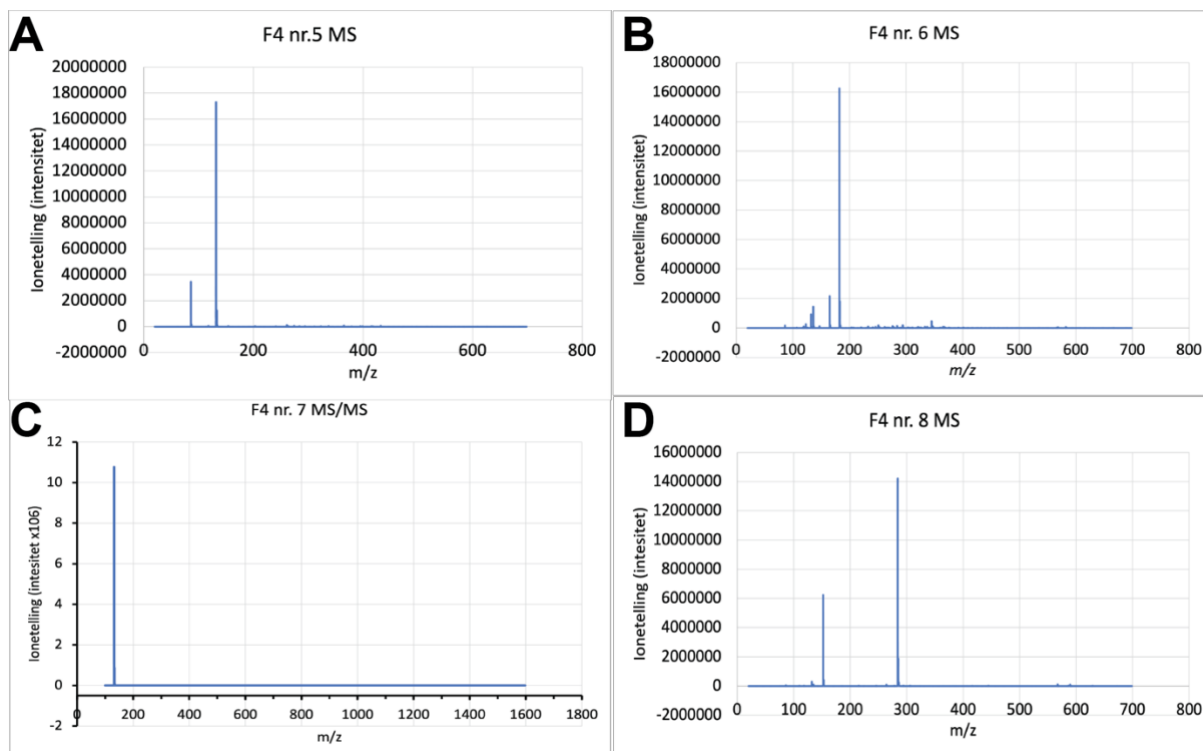
Log<sub>10</sub>-økning (CFU mL<sup>-1</sup>) i ruccolajuice etter 0 min, 30 min og 24 timer med ulikt inokulum av *L. monocytogenes*. Log<sub>10</sub>-økning beregnet ved å trekke fra verdi for kontrollprøve (kun dH<sub>2</sub>O) ved hvert tidspunkt.



#### Vedlegg 4 – MS og MS/MS spektrum fra LC-MS/MS med fraksjon 2 og 4



**Figur 1:** MS/MS spektrum fra LC-MS/MS med fraksjon 2. Komponentnummer korresponderende med Tabell 6 i resultater. **A)** MS/MS fra komponent nr. 3. **B)** MS/MS fra komponent nr. 4.



**Figur 2:** MS og MS/MS spektrum fra LC-MS/MS med fraksjon 4. Komponentnummer korresponderende med Tabell 6 i resultater. **A)** MS av komponent nr. 5. **B)** MS av komponent nr. 6. **C)** MS/MS fra komponent nr. 7. **D)** MS fra komponent nr. 8.



**Norges miljø- og biovitenskapelige universitet**  
Noregs miljø- og biovitenskapelige universitet  
Norwegian University of Life Sciences

Postboks 5003  
NO-1432 Ås  
Norway