

Rapport 17/2014 • Utgitt februar 2014

Gull fra havets sølv

Bjørnar Myrnes, Diana Lindberg og Ana Karina Carvajal





Nofima er et næringsrettet forskningsinstitutt som driver forskning og utvikling for akvakulturnæringen, fiskerinæringen og matindustrien.

Nofima har om lag 400 ansatte.

Hovedkontoret er i Tromsø, og forskningsvirksomheten foregår på seks ulike steder: Ås, Stavanger, Bergen, Sunndalsøra, Averøy og Tromsø

Hovedkontor Tromsø:

Muninbakken 9–13
Postboks 6122 Langnes
NO-9291 Tromsø

Ås:

Osloveien 1
Postboks 210
NO-1431 ÅS

Stavanger:

Måltidets hus, Richard Johnsensgate 4
Postboks 8034
NO-4068 Stavanger

Bergen:

Kjerreidviken 16
Postboks 1425 Oasen
NO-5828 Bergen

Sunndalsøra:

Sjølseng
NO-6600 Sunndalsøra

Averøy:

Ekkilsøy
NO-6530 Averøy

Felles kontaktinformasjon:

Tlf: 02140

E-post: post@nofima.no

Internett: www.nofima.no

Foretaksnr.:

NO 989 278 835

Rapport

Rapport

Tittel:

Gull fra havets sølv

Forfatter(e)/Prosjektleder:

Bjørnar Myrnes, Diana Lindberg og Ana Karina Carvajal

Avdeling:

Nofima Marin bioteknologi og SINTEF Fiskeri og havbruk

Oppdragsgiver:

RDA Troms, DU og NDF

Stikkord:

Restråstoff, NVG-sild, marin bioteknologi

Sammendrag/anbefalinger:

Prosjektet har tatt utgangspunkt i havet og dets bærekraftige ressurser med tanke på marin bioprospektering. Restråstoff fra fangst av norsk vårgytende sild (NVG-sild) er undersøkt for enzymer, bioaktive peptider og lipider samt funksjonelle proteiner med kommersielt potensiale.

En har utviklet ekstraksjonsmåter, implementert målemetoder og påvist mer en 20 ulike enzymer fra tre EC-klasser. Et av enzymene (med esteraseaktivitet) er delvis karakterisert i semi-isolert form og senere helt rensset. «Drug»-lignende komponenter er isolert og flere «hits» relatert til alvorlige virale sykdommer er påvist. En ny biosensor-basert metode for isolering av bioaktive peptider fra naturlige ekstrakter blitt etablert. Sildoljeproduisert fra ferskt restråstoff tilfredsstiller kravene til raffinerte fiskeoljer selv om oljen ikke har gjennomgått en renseprosess. Oksydasjonsstatus til oljen ligger langt under verdier rapportert for kommersielle oljer på markedet. Restråstoffet kan også være en kilde for protein til humant konsum men videre undersøkelser er nødvendig for å fjerne all bittersmak.

English summary/recommendation:

Byproducts from Norwegian spring spawning herring have been investigated with respect to bioactivities, i.e. peptides, lipids, enzymes and functional proteins, of commercial potential. The undifferentiated herring byproduct material have been used for biodiscovery of more than 20 industrially important enzymes covering three EC classes, and bioactive peptides with drug-like properties against deceases of fundamental impact against our society. Furthermore, oil made from ultra-fresh byproducts has been produced in semi-industrial scale with excellent peroxide and anisidine values. The herring by-products are also utilizable as a protein source for human consumption.

ISBN: 978-82-8296-181-3 (trykt)
ISBN: 978-82-8296-182-0 (pdf)
ISSN 1890-579X

Rapportnr.:

17/2014

Tilgjengelighet:

Åpen

Dato:

27. februar 2014

Ant. sider og vedlegg:

9+64

Oppdragsgivers ref.:

AT10/34 RER-09/146

Prosjektnr.:

20914

Innhold

1	Innledning.....	1
2	Målsetting.....	2
3	Gjennomføring.....	3
3.1	Enzymer og bioaktive peptider.....	3
3.1.1	Råstoffkarakterisering og utvinning av bioaktive komponenter.....	3
3.1.2	Påvisning og karakterisering/evaluering av bioaktive komponenter.....	4
3.2	Olje og funksjonelle proteiner.....	4
3.2.1	Råstoffkarakterisering samt utvinning av bioaktive komponenter og funksjonelle komponenter.....	4
4	Resultater og diskusjon	5
4.1	Enzymer.....	5
4.1.1	Utvinning og påvisning av enzymaktiviteter	5
4.1.2	Videre rensing og evaluering av enzymer	6
4.1.3	Isolering av esteraseaktivitet.....	8
4.2	Bioaktive peptider	8
4.3	Bioaktive lipider	8
4.4	Funksjonelle proteiner	9

Vedlegg

1 Innledning

Dette samarbeidsprosjektet mellom Nofima og SINTEF Fiskeri og havbruk har tatt utgangspunkt i et av områdene i den forrige regjeringens nordområdesatsing, nemlig havet og dets ressurser med tanke på marin bioprospektering. Marin bioprospektering er leting etter nye bioaktive molekyler og gener med opprinnelse i det marine miljø som kan kommersialiseres. Produkter fra bioprospektering er ofte rettet mot bioteknologisk, farmasøytisk og kosmetisk industri.

Med unntak av påvising og kommersialisering av enkelte enzymer fra torsk og reke er det svært lite gjort for å kartlegge potensielle bioaktiviteter i restråstoff fra havbruk og kommersielt fiske. Norsk vårgytende sild (NVG-sild) er en viktig pelagisk art i norsk fiskerinæring. Denne silda har sitt oppvekstområde i Barentshavet, men vandrer mellom beiteområdene i Norskehavet, overvintrer utenfor Nord-Norge og gyter langs Norskekysten. Store kvoter har ført til at pelagisk konsumindustri medfører store mengder biprodukt som hovedsakelig går til ensilering og gir lite økonomisk bidrag til sildebedriftene. Det er svært få publiserte studier på bioaktiviteter som blant annet enzym i NVG-sild. Tidligere studier i andre marine arter fra nordområdet har vist enzymer med særegne aktiviteter, blant annet kuldeadapterte egenskaper som er av påtakelig industriell interesse.

Lipider fra pelagisk fisk er en lite karakterisert ressurs. NVG-sild er en feit fisk og har vært brukt i lang tid til produksjon av sildolje som er godt karakterisert. Det er fått ny interesse for sildolje fordi at den inneholder spesielle fettsyrer som ikke tilhører omega-3 klassen. Andre lipider som glycolipider, voksester, lipoproteiner og steroider er lite karakterisert i pelagisk fisk. De få analyser som er gjort viser at silderogn inneholder mye protein og hoveddelen av fett i rogn er i form av fosfolipid. En kan vente at en pelagisk art som NVG-sild kan ha ulik lipidsammensetning, som vist i tunfisk som inneholder store mengder av fettsyren DHA. DHA produseres kommersielt fra disse hodene. Silderåstoff kan derfor være en interessant kilde til andre lipider enn bare tradisjonell olje.

Det er kjent at proteinhydrolysater fra fisk har en rekke gode egenskaper som kan brukes i ingrediensindustrien. Slike proteinhydrolysater er blant annet lett fordøyelige, viser god vannbindingsevne og har emulgerende og antioxidative egenskaper. Disse egenskapene er vist hos hydrolysater fra hvitfisk og laksefisk, men det er ikke produsert tilsvarende produkter fra pelagisk fisk. Industriell fremstilling av proteinhydrolysater gjøres ved kjemisk hydrolyse. Bruk av enzymer i hydrolyse av ulike marine restråstoff har gitt produkt som har like gode funksjonelle egenskaper som soyaprodukter. Produksjon av proteinhydrolysater ved bruk av enzymer har ikke tatt av i industriell matproduksjon.

I dette prosjektet har Nofima AS og SINTEF Fiskeri og havbruk AS sammen bidratt til å øke verdiskapingspotensialet til restråstoff fra NVG-sild produksjon gjennom identifisering av de bioaktive marine komponenter med kommersielt potensiale presentert i denne rapport. Prosjektet har videre bidratt til utdanning av to stipendiater og ansettelse av en post doc-stipendiat som sammen med andre i prosjektet har bidratt til etablering av en regional og nasjonal kunnskapsplattform for FOU innen marint restråstoff.

2 Målsetting

Prosjektets mål er å undersøke restråstoff fra norsk vårgytende sild for identifisering av nye molekyler og bioaktiviteter med kommersielt potensial, for å høyne verdien av restråstoff og skape nye og samfunnsmessige gevinster i nord av denne og lignende ressurser. Fokus var satt på avanserte marine naturprodukter som det er samfunnsmessig behov for. Målet var videre å rekruttere og utdanne tre stipendiater, etablere en regional og nasjonal kunnskapsplattform for FoU innen marint restråstoff samt styrke den faglige kompetansen innen fiskeindustrien.

Prosjektet var oppdelt i to faser med følgende inndeling:

- Nofima AS: bioprospektering etter enzym og bioaktive peptider
- SINTEF Fiskeri og havbruk AS: bioprospektering etter olje og funksjonelle proteiner

Fase 1 er blitt finansiert og beskrives i rapporten. Det omfatter følgende delmål:

1. Råstoffkarakterisering
2. Påvisning og utvinning av bioaktive og funksjonelle komponenter
3. Karakterisering/evaluering

Fase 2 er ennå ikke finansiert og omfatter:

1. Prosessdesign/teknologi
2. Industrialisering

Hovedmålet i arbeidet ved SINTEF Fiskeri og havbruk har vært å utnytte restråstoff fra NVG-sild til å produsere olje og protein av høy kvalitet som kan benyttes til humant konsum. Ultraferskt restråstoff (mindre enn 1 time etter filetering) har blitt benyttet som råstoff da tidligere studier har vist at lagringstid og betingelser påvirker kvaliteten på oljen og proteinene. Prosjektarbeidet hadde følgende delaktiviteter og delmål:

1. Studere, evaluere og forbedre industrielle prosesser for produksjon av olje og protein.
2. Utføre forsøkene i semi-industriell skala ved bruk av et mobilt produksjonsanlegg slik at resultatene lett kan overføres fra forskning til industri.
3. Bruke silderestråstoff inne en time etter filetering for å minimere nedbrytning av råstoffet og dermed øke kvaliteten på oljen og proteinene.
4. Studere effekten av produksjonsprosessen (varmebehandling eller enzymatisk hydrolyse) og prosessbetingelser (temperatur, bruk av polering, enzymtype) på oljekvalitet og stabilitet, samt egenskapene til proteinene.

3 Gjennomføring

Prosjektet er utført ved Nofima AS i Tromsø og ved SINTEF Fiskeri og Havbruk i Trondheim. Arbeidet i prosjektet er utført i samsvar med de planene som ble lagt fram i tilsagnsbrevet fra Næringssetaten i Troms fylkeskommune. Prosjektet har hatt to prosjektledere, Gunn Berit Olsson (2010) og Inge Waller Nilsen (2011–2013).

Sammenlagt fire stipendiater har vært ansatte i dette prosjektet. Den første har vært ansatt ved SINTEF. Ett tilsagn om tilskuddsfinansiering av ytterligere tre stipendiater ble bevilget av RDA i sluttet av 2010 som resulterte i at to doktorgradsstipendiater ble ansatt i prosjektet i 2011, en stipendiat ved SINTEF tilknyttet NTNU og en ved Nofima tilknyttet Nofimas samarbeidspartner ved Uppsala Universitet. Den siste stipendiaten er en Post doc som har vært ansatt ved Nofima 2011–2013. Denne forsinkelsen i tilgang til tilgjengelig personell i prosjektet førte til at sluttdato ble forskjøvet til siste desember 2013.

Det har blitt holdt felles prosjektmøter i Trondheim og Tromsø en til to ganger i året i prosjektperioden. Det ble i 2011 etablert en referansegruppe for prosjektet som ikke har fungert etter intensjonen.

3.1 Enzymer og bioaktive peptider

3.1.1 Råstoffkarakterisering og utvinning av bioaktive komponenter

Avfallet fra norsk vårgytende sild brukt i dette prosjektet ved Nofima AS er en blanding av ulike organer, blodrester, bein og hoder. Råstoffet brukt i prosjektarbeidet ble levert frosset fra Nergård AS og ferskt fra Norway Pelagic AS, Sommarøy. Det ferske restråstoffet (mindre enn 4 timer etter filetering) ble frosset ved ankomst til Nofima AS, både kvernet eller ikke kvernet, i alle tilfeller foruten da ferskt restråstoff ble brukt. Ved bruk av ikke kvernet frosset råstoff i blokk (20 kg) ble blokket saget i 2 cm strimler med bandsag og tint til 0 °C. Råstoffet ble deretter knust og homogenisert ved bruk av en Stephan homogenisator og fordelt i 0,5 og 1 kg porsjoner og frosset ved -20 °C til senere bruk. Dette homogenatet er videre kalt SP-ekstrakt. Dette ekstraktet ble benyttet som utgangspunkt for enzym og «drug» prospektering (vedlegg 1, side 1–4).

Ulike ekstraksjonsløsninger for ekstraksjon av enzym ble uttestet. Ekstraksjon ved pH 4,5 eller pH 9 ved bruk av syre og lut, eller bruk av bufferløsninger ved samme pH (se vedlegg 1, side 7 og 8) ble forsøkt. Det ble også forsøkt flere ulike måter å fjerne fettfraksjonen fra de resulterende ekstraktene, blant annet sentrifugering, ammonium sulfat presipitering (ASP), frys-tining og heksanekstrahering.

Fraksjonen som ble benyttet i «drug screening» ble preparert etter ekstraksjon av SP-ekstrakt med eddiksyre ved pH 4,5. «Drug»-lignende komponenter (små molekyler) ble separert fra andre proteiner/enzymer ved ultrafiltrering og videre fastfase ekstraksjon. Bioaktive småmolekyler er videre rensert ved bruk av HPLC og UPLC-MS.

Ved pilotskalaforsøk på Nofima ble det ferske råstoffet (15 kg) homogenisert i en KILIA homogenisator, deretter tilsatt kald natrium-acetat buffer pH 5 (150 liter) og ekstrahert under konstant røring i en tank ved 10–15 °C. Ekstraktet siles deretter gjennom rist av metall (1mm

lysåpning) før videre flokkulering av partikulært materiale ved +4 °C og forsøkt oppkonsentrert i en GEA Model R membran Filtration Pilot plant.

3.1.2 Påvising og karakterisering/evaluering av bioaktive komponenter

For metodikk for påvising, karakterisering og evaluering av enzym viser vi til vedlegg 1 og for peptider viser vi til vedlegg 2. Når aktuelt har enzymaktivitet blitt målt i ulike temperatur.

3.2 Olje og funksjonelle proteiner

Mobile SeaLab – et mobilt produksjonsanlegg for oljer og proteiner ble benyttet til å kjøre forsøkene ved SINTEF Fiskeri og havbruk AS. Kapasitetene til anlegget er 1000 kg restråstoff/time ved varmebehandling og 400 kg restråstoff/time ved hydrolyse. Anlegget ble montert opp i umiddelbar nærhet til fileteringsanlegget til Grøntvedt Pelagic på Uthaug, slik at det var mulig å få restråstoff direkte fra deres anlegg. Restråstoffet som ble benyttet bestod av hoder, rygger, buklist, lever, gonader og slo.

3.2.1 Råstoffkarakterisering samt utvinning av bioaktive komponenter og funksjonelle komponenter

Oppkvernet restråstoff fra Grøntvedt Pelagic (før ensilasje) ble overført direkte fra kvernen i fabrikken til kverna i Mobile SeaLab prosessanlegget. Prosessen for varmebehandling ble kjørt på følgende måte: Råstoffet ble etterkvernet og pumpet over i en skrapevarmeveksler hvor råstoffet ble varmet opp til 90 °C. Den oppvarmede massen ble overført til en tricanter hvor råoljefraksjon, vannfraksjon (limvann) og tørrstoff (grakse) ble separert. Prøver fra limvannet og tørrstoffet ble tatt og overført til aluminiumskanner som ble lagret kaldt. Oljen ble samlet i en beholder og pumpet kontinuerlig over i en poleringssentrifuge hvor rester av vann og uønskede komponenter ble fjernet. Beholderen hvor oljen ble samlet etter separasjon hadde nitrogentilførsel slik at oljen kom i kontakt med minst mulig oksygen. Oljen ble samlet i aluminiumskanner og flushet med nitrogen.

Ved kjøring av enzymatisk hydrolyse ble et hydrolysesteg innført etter varmeveksleren. Oppvarmet kvernet råstoff (55 °C) ble overført til hydrolysetanken sammen med oppvarmet vann (1:1). Hydrolysen ble startet ved å tilsette 0,1 % (tørrvekt enzym/våttvekt råstoff) Alcalase eller en blanding av papain og bromelain (1:1). Etter en time hydrolyse ble blandingen varmet opp til 90 °C for å inaktivere enzymene. Blandingen ble så separert i tre fraksjoner: olje, protein hydrolysat og sedimenter.

4 Resultater og diskusjon

De to stipendiatene, Ana Karina Carvajal ("Utilization of by-products from Norwegian spring spawning herring for human consumption", NTNU) og Tony Christopheit ("Protein Interaction Studies with Low Molecular Weight Ligands: Applications for Drug Discovery, Basic Research and Diagnostic Tool Design", Uppsala universitet) tok deres doktorgrader år 2013, og Vera Kristinova ("Peroxidation of marine lipids in liposomes and emulsions studied by dissolved oxygen consumption", NTNU) år 2014.

Prosjektet er presentert av prosjektleder og av delprosjektleder ved Nofima og SINTEF ved flere anledninger i inn og utland. Ett flertalls publikasjoner i nasjonale og internasjonale journaler er blitt publisert som ett resultat av prosjektet. Rettede seminarer til fiskeindustrien hvor vi har talt om prosjektet har bidratt til å styrke den faglige kompetansen innen dette fagområde.

4.1 Enzymer

4.1.1 Utvinning og påvisning av enzymaktiviteter

SP ekstrakt preparert som i seksjon 3 viste seg å være et utfordrende råstoff for prospektering etter enzymer. Av de ulike ekstraksjonsmåtene som er utprøvd var det ekstraksjon med bufferløsninger etterfulgt av frysing/tinging og filtrering som ga en partikkelfri ekstraktløsning som kunne brukes i rensing av sildeenzymer. Det er etablert et betydelig antall metoder for påvisning av enzymaktivitet.

		pH 4.5				pH 9.0			
		ASP		Hexane		ASP		Hexane	
		N	Y	Y	N	N	Y	Y	N
Triton X-100									
EC									
GST	2	100	77	92	36	6	1	1	2
Lyzosyme	3	100	49			nm	nm		
dsDNase, pH 5	3	96	100	5	22	24	20	10	11
Amidase (NBBA)	3	61	46	68	100	7	1	15	18
Amidase (CNBAA)	3	0	42	59	100	5	4	18	16
PLA2	3	87	77	88	39	100	82	74	91
pNPO	3	0	4	1	12	100	73	53	64
Aldolase	4	0	0	0	0	0	100	49	0
PLA2 (Ca ²⁺)	3	0	82	54	98	74	100	87	84
pNPA	3	25	20	41	28	89	100	96	91
pNPB	3	6	4	8	3	60	98	100	80
AOx (benzylamine)	1	0	24	0	28	63	95	100	65
Transglutaminase	2	69	45	42	44	83	94	100	82
GOx	1	76	44	80	0	50	42	100	74
Peroxidase	1	33	34	31	52	41	38	100	65
Protease	3	0	30	77	85	35	26	100	26
AOx (tyramine)	1	24	16	0	0	28	39	81	100
ALT	2	0	0	47	13	0	2	82	100
dsDNase, pH 7	3	69	25	21	55	28	44	79	100
ADH (ethanol)	1	0	0	+	+	0	0	77	100

Figur 1 Oversikt som viser noen av de enzymene som ble funnet i den innledende råstoffkarakteriserings- og påvisningsfasen fra silderestråstoffet. Aktivitet er gitt i prosent av høyeste aktivitet gitt i U/mg for hver enzymtype. Ved bruk av flere substrater gis spesifisering i parentes. Enzymene er ekstrahert ved pH 4.5 eller pH 9, med og uten 0,5 % Triton X-100. Fettfjerning i ekstraktene er utført med antigen ASP (ammonium sulfat felling) eller hexan.

Hver aktivitet skjuler sannsynligvis mer enn ett enzym da mange substrat er mulig å bruke for flere ulike enzym, klassifisert i henhold til ulike EC (Enzyme Commission)-klasser. Dette innebærer at mer en tjue forskjellige enzymer er blitt påvist i varierende grad og mengde i ulike ekstrakter (vedlegg 1, side 27–29, samt Figur 1). En del av de påviste enzymaktivitetene er det uttrykt interesse for av industrielle aktører.

Det er svært tilfredsstillende at så mange enzymaktiviteter kan påvises fra ekstrakter som er dannet fra ett restråstoff som ikke er blitt fraksjonert. Man kunne mistenke at konsentrasjonen av enzym fra ett ufraksjonert råstoff ble for lav for å kunne måle på, sammenlignet med annen forskning som bruker ekstrakt fra enkelte organer, men dette har ikke vært ett stort problem i disse undersøkelsene med tanke på resultatene. Det er også interessant å notere at måten å ekstrahere samt metoden for fettfjerning har så stor betydelse for hvor mye aktivitet man finner. Resultatene peker på at ved en enkel screening av enzymaktiviteter går det å finne mange aktiviteter ved å bruke en enkelt måte å ekstrahere og fjerne fett på, men for å klargjøre funn av flest mulige enzymaktiviteter så anbefaler vi at man benytter seg av flere kompletterende metoder.

Implementeringen av disse generiske enzymassayer har ført til en betydelig utvidelse i den generelle enzymkompetansen ved Nofima og danner ett utmerket grunnlag til leting av samme typer enzym i, for eksempel andre marine restråstoff.

For å få en første indikasjon av aktivitet i oppskalerte forsøk har man på Nofima utført enzymekstraksjon fra både frosset og fersk sildeavfall (fra Norway Pelagic, Sommarøy) i 150 liter skala. I pilotskala siles ekstraktet gjennom rist og partikulært materiale fjernes ved flokkulering med biologiske løsninger. Enzymløsningen lar seg oppkonsentrere 10 ganger i et GEA-pilotskala-filtreringsanlegg. Dette er egentlig noe som tilhører Fase 2 av prosjektet, ennå ikke finansiert. Utbytte av esteraseaktivitet har vært betydelig lavere i disse forsøkene enn i labskala ultra/diafiltrering og det gjenstår optimering for å nå bedre utbytte.

4.1.2 Videre rensing og evaluering av enzymer

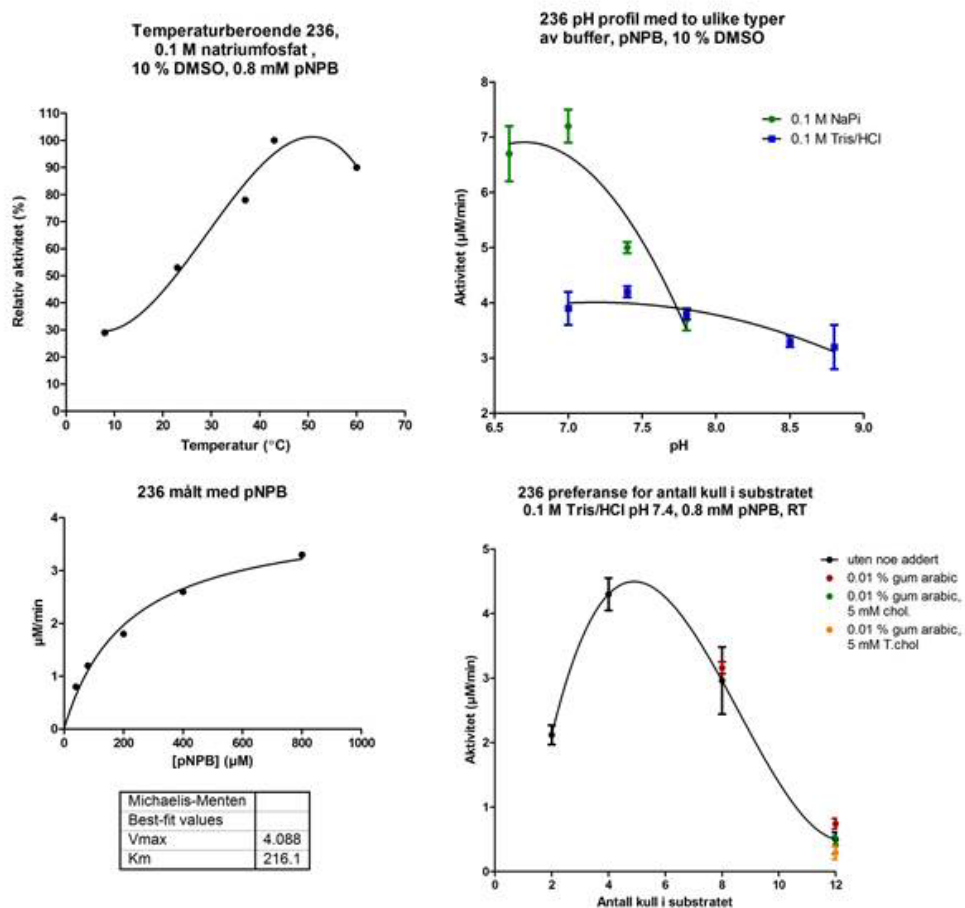
Videre rensetrinn/utvinning av enzymer fra 2,5 liter SP ekstrakt ved pH 7,4 og bruk av ultra-/diafiltrering og kromatografi er vist i vedlegg 1 side 19 til 25. Dette var et viktig eksperiment som viste at enzymer fra sild, kan renses ved kromatografi uten sentrifugering ved høy g-belastning eller fett fjerning ved bruk av organiske løsemiddel. Det ble utført forsøk på enzymrensing ved kromatografi fra SP-ekstrakt ved pH 9 uten oppkonsentrering og diafiltrering. Resultatene fra disse eksperimentene ga sterk indikasjon på at ekstraktløsningen inneholdt en faktor som førte til reduksjon i bindingskapasitet til enzym i kromatografikolonnene. Videre arbeid viste at god bindingskapasitet av enzym på anion- og kation gelene fra SP-ekstrakt kunne oppnås ved ammoniumsulfatfraksjonering og dialyse eller ved diafiltrering av ekstrakter mot 10 volum bufferløsning. Resultatene oppnådd i prosjektet har vist at de ulike enzymene som er påvist i sildeekstraktet, kan ekstraheres og renses ved bruk av ulike nedstrømsteknikker. Rensing/isolering av de ulike enzymene vil betinge ulikt valg av buffer- og kromatografisystem beroende på hvilke enzymer man renser på.

Evaluering av enzymenes aktivitet etter ulike rensetrinn (indikerer enzymets holdbarhet) og i tilfeller når temperaturaktivitet (vedlegg 1, appendiks 3 og 4) ble utført. Videre arbeid (vedlegg 4) førte til at det ble valgt å fokusere på en fraksjon (her kalt 236) grunnet industriell interesse for slike enzym.

Fraksjon 236 er en semi-renset fraksjon, noe som frekvent brukes i industrielle applikasjoner der enzymene aldri renses mer en nødvendig for å fjerne konkurrerende aktiviteter. All rensing fordyrer produktet. Vi valgte å karakterisere fraksjon 236 med hensyn på en rekke viktige enzymegenskaper (se Figur 2).

Tabell 1 Rensing av en esteraseaktivitet fra SP-ekstrakt

Fraksjon	Esteraseaktivitet			
	Protein (mg)	Sp.Akt (Units/mg)	Tot. Akt. (Units x 10 ³)	Utbytte (%)
SP ekstrakt	3876	1009	3909	100
Q-seph	1415	1737	2458	62,9
Phenyl-seph	326	6970	2272	58,1



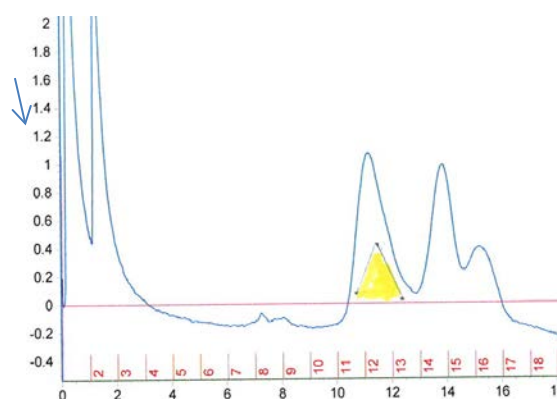
Figur 2 En sammenstilling av ulike målinger gjort for å karakterisere/evaluere esteraseaktiviteten i fraksjon 236

Tabell 1 viser på det gunstige utbyttet ved rensing av esteraseaktiviteten fra 0,5 l SP ekstrakt til fraksjon 236. Enzymaktiviteten eluerte ved 0,5 M NaCl ved både ionebytte- og hydrofob-interaksjonskromatografi.

Basert på disse data ble esteraseaktiviteten i fraksjon 236 bedømt å være så interessant at Nofima har søkt og fått bevilget Mabit-midler for videre karakterisering av aktiviteten.

4.1.3 Isolering av esteraseaktivitet

Det ble gjort forsøk på å isolere esteraseaktiviteten i fra fraksjon 236. Videre arbeid viste at en kombinasjon av Mono-Q-kromatografi, hydroxyapatitekromatografi og gelfiltrering på Superdex 75 HR ved pH 7,4 i en ÄKTA Primekromatografistasjon ga en ren fraksjon av en esterase fra sild, figur 1. Ytterligere arbeid i kommende prosjekt må til for en evaluering av denne fullstendig rensede esteraseaktiviteten.



Figur 3 Rensing av esterase på Superdex 75 HR - Pilen peker ut en fraksjon med en ren esteraseaktivitet

4.2 Bioaktive peptider

Fraksjoner ble screenet for proteasehemming med FRET (Fluorescence resonance energy transfer) basert aktivitetmåling. Mange «drug targets» er proteaser, og i dette prosjektet målte vi hemming av «drug target»-relaterte proteaser til blant annet sykdommene HIV, humant cytomegalovirus, og Alzheimers. Det er funnet flere interessante «hits» relatert til disse alvorlige virale sykdommer. Spesifisiteten i bindingen ble verifisert med hjelp av SPR (Surface plasmon resonance) bindingsmåling med instrument fra Biacore. I samarbeid med partnere i Uppsala er også en ny biosensor-basert metode for isolering av bioaktive emner fra naturlige ekstrakter blitt etablert (vedlegg 2).

Rekrutteringen av doktorgradsstudenten fra en internasjonalt anerkjent gruppe innen SPR teknologi på Uppsala universitet til Nofima i Tromsø har dannet grunnlag for en betydelig regional og nasjonal kompetanseheving innen dette område. Doktorgradsstudenten har nå gått videre til en Post doc i ett prosjekt med fokus på blant annet utvikling av SPR-teknologi ved UiT.

4.3 Bioaktive lipider

Kvaliteten på råstoffet, samt prosessbetingelsene vil påvirke kvaliteten (oksidasjonsstatus) og stabiliteten til råoljen. Lav innhold av frie fettsyrer (% FFA), lav oksidasjonsstatus og høy stabilitet er egenskaper som er nødvendige for oljer som skal benyttes i kosttilskudd eller som ingrediens i næringsmidler. Kvaliteten på råoljen vil gi føringer for hvilke rensetrinn som er nødvendig før oljen kan benyttes til humant konsum.

Andel frie fettsyrer i oljen var 0,23 % og er mye lavere enn verdier rapportert for kommersielle råoljer (2–5 %). Dette er en indikasjon på at restråstoffet benyttet i produksjonen var av høy kvalitet. Oljen produsert fra restråstoffet var av høy kvalitet. Både varmebehandling og enzymatisk hydrolyse var gode metoder for produksjon av oljen og resulterte i oljer med lav peroksidverdi (PV < 2,5 meq peroksider/kg lipider) og lav anisidin verdi (AV < 1.2). Råoljer benyttet til humant konsum har vanligvis en PV mellom 3 og 20 meq peroksider/kg lipid, mens AV ligger mellom 4 og 60. GOED (Global Organization for EPA and DHA omega-3s) krever at oljer (raffinerte) som skal benyttes til humant konsum ikke overstiger en PV på 5 meq peroksider/kg lipid (analysert ved bruk av AOAS Official Method Cd 8b-90) og en AV på 20 (analysert ved bruk av AOAS Official Method Cd 18–90).

Sildeoljen produsert fra ferskt restråstoff tilfredsstiller kravene for raffinerte fiskeoljer selv om oljen ikke har gjennomgått en renseprosess (vedlegg 3). Samtidig ligger oksidasjonsstatusen langt under de verdiene som er rapportert for kommersielle råoljer på markedet.

4.4 Funksjonelle proteiner

Proteiner produsert fra silderestråstoff inneholdt alle aminosyrene som er nødvendig for et balansert kosthold. Det viser at restråstoffet kan være en kilde til protein til humant konsum. Imidlertid påvirkes egenskapene og utseende til proteinene av prosessbetingelsene. Varmebehandling ga proteiner som var lysere og mindre gul sammenlignet med enzymatisk hydrolyse. Hydrolysebetingelsene og enzymtype spilte en viktig rolle når det kom til grad av bitterhet på hydrolysatene. Økt kompetanse om hvordan prosessbetingelsene påvirker smaken er nyttig informasjon som kan benyttes for å kontrollere bittersmak i produktet. Resultatene har også vist at sildeproteiner har antioksidative egenskaper og kan benyttes til å redusere jern- og hemoglobinmediert lipidoksidasjon.

Statusrapport 2011

Gull fra havets sølv

Prosjektnr 20914



Av

Bjørnar Myrnes, Kersti Øverbø og Diana Lindberg

23 januar 2012

Innehållsförteckning

Rapport "Gull fra havets sølv" år 2011.....	1
Bakgrund	1
Gull fra havets sølv 2011	1
Første ekstraheringen (A – D-løsningarna)	1
Andra ekstraheringen (10-20% - 60-80% løsningarna, samt 30 & 31)	2
De stora, basiska, ekstraktionerna (løsningar 41 – 43 och 51 – 54).....	3
Kolonnreningar (løsningar 55 – 59, 61 – 64)	3
Øvrigt av interesse från enzymmålinger och rensing.....	4
Appendiks 1: Ekstraksjon, ultrafiltrering og kromatografi	6
Første ekstraheringen (A – D-løsningarna)	6
Andra ekstraheringen (10-20% - 60-80% løsningarna, samt 30 & 31)	7
De stora, basiska, ekstraktionerna (løsningar 41 – 43 och 51 – 54).....	7
Appendiks 2: Måling av enzymaktivitet	10
ADH (Alkoholdehydrogenase, EC 1.1.1.1)	10
ALT (alanin transaminase EC 2.6.1.2)	10
Aldolase (EC 4.1.2.13).....	10
Amidase (EC 3.?).....	11
Chitinase (EC 3.2.1.14).....	11
dsDNase pH 5 og 7 (3.1.x.x).....	11
EH (Epoxid hydrolase EC 3.3.2.x).....	11
Esterase (3.1.1.x)	12
Fosfat fosfatas assay (EC 3.1.3.x).....	12
GOx (Glucose oxidase EC 1.1.3.4).....	13
GST (Glutathione S-transferase EC 2.5.1.8).....	13
Laccase (EC 1.10.3.2)	13
Lipase (3.1.1.3)	14
Lysozyme (3.2.1.17).....	14
MAO-A/B alt. SSAO (Monoamine oxidase A & B EC 1.4.3.4, alt. SSAO EC 1.4.3.6)	14
PLA2 (Fosfolipase A2 EC 3.1.1.4)	14
Protease pH 1,8 (EC 3.4.x.x)	15
Protease pH 7 (EC 3.4.x.x)	15
Proteasehemmer (Trypsinhemmer) pH 7	15
TG (transglutaminase EC 2.3.2.13)	16
Trypsin (EC 3.4.21.4).....	16
Appendiks 3: Resultat enzymmålinger koblet til rensinger.....	17
Førsta ekstraheringen (A - D), initial enzyme screening	17
Andra og tredje ekstraheringarna (10-20% - 60-80% løsningarna, 30 & 31, 41 - 43)	18
Ultrafiltrering/diafiltrering og kromatografi	19
.....	25
1 ml Q og S.....	26
Appendiks 4: Översikt över enzymmätdata	27
Appendiks 5: Sammanställning øver proteinmængdmålinger	30

Rapport "Gull fra havets sølv" år 2011

Bakgrund

Sillavfall från Nergård AS (Versterålen) blev i slutet av februari 2010 levererat till oss før kverning till homogen sillpasta (0 – 2 °C). Sillpastan (kallat SP) blev fördelat i kg-portioner, vacuumförpackad och frusen.

Tre olika ekstraheringar blev gjorda på detta material till att börja med, under olika betingelser. Den sista ekstraheringen, utförd på is med centrifugering och ultrafiltrering, resulterade i två fraktioner, en högmolekylär (>10 kDa) och en lågmolekylär (< 10 kDa). Man hade dock problem med efterfällning av partikulärt material och fett vid centrifugering och ultrafiltrering i dessa fraktioner. Det partikulära materialet avlägsnades med GFC/GFF-filtrering. Arbetet resulterade i 23 g frystorkat material från det sura lågmolekylära lösningen som senare har använts till inhiberingsförsök. Detta frystorkade material kan vi kalla **TP**.

Enzymaktiviteten, och annan biologisk aktivitet, i dessa hög- och lågmolekylära fraktioner från alla inledande ekstraheringar, kan sammanfattas till:

- Proteolytisk aktivitet vid alla pH
- DNase-aktivitet vid neutralt pH
- Trypsinhämmare i ekstrakten från SP och högmolekylärt koncentrat
- Lysozymaktivitet i sura extrakt

Slutligen kan konkluderas från detta tidigare arbete att den påvisade enzymaktiviteten i detta råstoff är lägre än andra restråstoff gruppen har arbetat med tidigare.

Gull fra havets sølv 2011

Første ekstraheringen (A – D-løsningarna)

Med tanke på att gruppens arbete nu inte behövde resultera i en frystorkad lågmolekylär fraktion så kunde buffrade lösningar användas. Därför valde man nu att starta ekstraheringar i liten skala i en sur (pH 4.5) och en basisk (pH 9.0) buffert (se Appendix 1). Før att undersøka om det gick att få mer enzym att gå i lösning beslöt man sig också før att använda sig av 0.05% Triton X-100 i hälften av vardera ekstrahering. Man hade nu fyra startekstrakt:

- A.** pH 4.5
- B.** pH 9.0
- C.** pH 4.5, 0.05% Triton X-100
- D.** pH 9.0, 0.05% med Triton X-100

Efter centrifugering innehöll ekstrakten fortsatt mycket fett i emulsion och partikulärt bottenfall. Man beslöt att använda sig av antingen ammoniumsulfat (20-70% fraktionen) eller hexan (1:9, 3x) før att försöka få bort detta. Förutom att bli av med fett och fällning ville man på detta sätt undersøka om vissa enzym hade lättare att gå i lösning vid tillsats av hexan (kan vara stabiliserande för hydrofoba enzym) eller ammoniumsulfat (verkar stabiliserande på vissa enzym). Detta arbete resulterade i åtta olika lösningar som man frøs ner i små fraktioner.

AS. A og AmSO₄
AH. A og hexan

BS. B og AmSO₄
BH. B og hexan

CTS. C og AmSO₄
CTH. C og hexan

DTS. D og AmSO₄
DTH. D og hexan

Samtidig med dette tog man også fram ett antal nye enzymassayer ved siden av de redan etablerade och arbetade før att a) etablera de olika assayerna, och før att b) kunna göra en första initial screening av vilka enzymatiska aktiviteter det fanns i dessa ekstrakt. Substraten och assayerna valdes før att kunna påvisa enzymreaktioner från olika klasser av enzym. Många av de reaktioner som vi letar efter har intressanta industriella applikationer, men vissa av aktiviteterna har efter vår kännedom aldrig påvisats tidigare. Se Appendiks 2 før mer information om de enzym man har mått på och enzymassayerne.

Resultaten av dessa initiala måtninger presenteras i Appendiks 3. Sammanfattningvis kan man säga att man hade lyckats bra med att initialt ta fram løsninger där man kan påvisa mange ulike enzymaktiviteter.

- Generellt sett verkar den basiske ekstraheringen ge en høgre enzymkoncentration og høgre aktivitet hos flertalet enzym
- Bortsett från ett fåtal undantag (ex. MAOA/B) så duger det bra med den betydeligt enklare ammoniumsulfatfällningen før att bli av med fett, en metode som også er mycket mer attraktiv før storskalige applikationer

Det visade sig dock att det blev en besværlig efterfællning i løsningerne med tiden. Senare målinger gjorde med centrifugerede løsninger, vilket i vissa fall ledde till skillnader i aktivitet mellom målinger og i vissa fall stora utslag i proteinmængden

Næste steg: Man beslutade att gøre dels en større sur og dels en større basisk ekstraktion, där økende koncentration av AmSO₄ skulle anvendes før att separera proteinerna i løsning. Med dette hoppades man a) få ut mer enzym i vardere koncentrationsspann, b) utføre en første grovrensing, samtidig som man ville c) undersøke møygheten att få ut enzym vid en andra ekstrahering från samma sillpasta, denna gång användande det andra pH:t (basiskt om sur førsteekstrahering, og vice versa).

Andra ekstraheringen (10-20% - 60-80% løsningerne, samt 30 & 31)

Denna første større ekstrahering med sur buffert (pH 4.4) baseras på 1 kg sillpasta där man stegvis tillsatt AmSO₄, centrifugerat og dialyserat mot buffert (pH 4.4) før att få fyra løsninger:

10 -20 % AmSO₄

20 -40 % AmSO₄

40 -60 % AmSO₄

60 -80 % AmSO₄

Pelletarna från de inledande centrifugeringerne anvendes før en ytterligere ekstrahering vid basiskt pH (pH 9.0). Från denna nye ekstrahering, användande AmSO₄ fællning (denna gång 20-70%) og dialys, fikk man ekstrakt **30** og **31**. Ytterligere information om dessa førfaranden finns i Appendiks 1.

Resultaten av dessa enzymmætninger presenteras i Appendiks 3. Sammanfattningvis kan man säga att før den sure ekstraheringen, med vissa enzymaktiviteter, så påvisades en dålig korrelasjon mellom enzymaktiviteten i denna ekstrahering og aktiviteten hos den fraktion från den førre ekstraheringen (AS) som man fikk fram under liknande betingelser.

Sammanfattningsvis, om båda ekstraheringarna:

- I vissa eller alla AMSO₄ lösningar påvisades en hög aktivitet med assayer för följande enzym: surt proteas, lysozym, alanin-transaminase (ALT) och *trans*-glutaminase (TG)
- Båda DNasen, amine oxidasen (MAO/SSAO) och glukos oxidaset (GOx) är exempel på enzym som gick mycket bättre ut i lösning vid den andra, basiska, ekstraktionen från samma sillpasta (ekstrakt 30 & 31)
- På grund av stora provmängder tog bearbetningen av ekstraktet lång tid (centrifugering, dialys). För att få bort fett och partiklar i denna försöksprocedur genomgick provlösningen också många och långa centrifugeringar vid höga varvtal. Resultatet av detta kan vara ett tapp av enzym eller enzymstabilitet och därmed negativ påverkan på enzymaktiviteten.

Nästa steg: För att korta tiden i centrifugering och för att evaluera andra sätt att bli av med fett och partiklar så bestämde man sig för att ta en helt ny approach till nästa ekstrahering, först och främst genom att bara föra en del av det initiala provet genom hela processen. Dessutom ville gruppen evaluera om det blev skillnader i enzymaktiviteten efter en stor basisk ekstrahering.

De stora, basiska, ekstraktionerna (lösningar 41 – 43 och 51 – 54)

Efter en storskalig ekstrahering med basisk buffer (pH 9.0) centrifugeras lösningen vid medels g-belastning. Fettet fjernas från supernatanten med hjälp av filtrering varpå lösningen fryses. Vid upptining av ett prov från denna lösning separerar lösningen i en övre och nedre fas. Den övre vattenfasen tas av och centrifugeras vilket ger en partikelfri lösning (**41**).

50 ml av den initiala ekstraktet (innan centrifugering) har man tagit undan för att prova möjligheten att få bort fett genom att sätta in det i frysen och, efter upptining på kylrum, se om ekstraktet separerar i två faser. Som man misstänker separerar lösningen. Efter detta filtrerar man bort fett och partiklar från resten av lösningen, något som resulterar i den klara lösningen **42**.

Det bortfiltrerade restmaterialet ekstraheras med sur buffer (pH 4.5). Efter frysning kan även denna lösning filtreras och en partikelfri lösning blir resultatet (**43**). Se Appendix 1 för mer information om förfarandet.

Enzymmålingarna visar att man i många fall har ungefär lika mycket, eller bättre, enzymaktivitet som tidigare med detta enklare sätt att få fett- och partikelfria lösningar. Detta sätt att få bort partiklar/fett är också väl lämpat för uppskalering. Man beslutade därför sig för att göra en uppskalering av 42 och kombinera detta med en S-sepharose kolonn (pH 7.4) för att se hur enzymaktiviteterna, och enzymerna, fördelades med detta reningsförfarande. Efter ekstrahering (pH 9.0) koncentrerades (10x) och diafiltrerades lösningen (mot pH 7.4 buffert) innan provet sattes på kolonnen. Prøver togs från alla steg av ekstrahering och kolonnkörning och döptes med start från 51 (**51-59**). Se Appendix 1 för mer information om förfarandet.

Enzymmålingarna på lösning 51 (se Appendix 3) visar att det i många fall blev något mindre aktivitet i denna ekstraktion jämfört med 41, men i några fall också högre (se exempelvis surt proteas).

Kolonnreningar (lösningar 55 – 59, 61 – 64)

Den utspädda lösning 54 blev satt på en S-sepharose kolonn. Efter tvätt eluerades proteiner med stegvis ökad natriumkloridkoncentration (se lösning **55 – 59**) (se Appendix 1). Tabeller på utbytet av hela ekstraheringen och reningen visar att koncentrerings (10x) och diafiltrering i de flesta fall har lett till ett tapp i aktivitet och proteinmängd. Enzymmålingar på lösningarna (55 – 59) visar att i de

flesta fall går enzymerna (undantag: glutation transferase (GST) och delar av DNase (pH 5) og amidase aktivitet) rakt igennem kolonnen vid detta pH och med denna kolonn (se Appendiks 2).

Den del av løsningen som går rakt igennem kolonnen (55) sætts senere på en Q-sepharose kolonn (pH 7.4) och de fraktioner som blir resultatet av denna rening kallas **61 – 64** (se Appendiks 1). Av de aktiviteter vi måler på ser vi att DNase (pH 7) går rakt igennem kolonnen. Før de andra enzymerna ser det ut som att relativt mycket av aktiviteten hittas i det som går rakt igennem kolonnen, men det finns också ganska mycket aktivitet i elueringsfraktionerna. Detta kan peka på nærvaron av flera enzym med korsande aktivitet.

Før att undersøke om man kan hitta mer optimala betingelser før en bättre separation av enzymer så gøres en småskaligt försøk med Q- och S-sepharosekolonner (1 ml) vid lägre (pH 4.4) och høgre (pH 8.2) pH. Som startmaterial används dialyserat och centrifugerat pre-41 och 51. Man samlar opp det som går igennem, både tvättfraktioner och det eluerade (**41A – D, 1 – 3** och **51A – D, 1 – 3**). På grund av att man hade så lite material så blir detta försøk inte evaluerat med alla tilgjengelige enzymassayer.

Det er testa for følgende enzymer: laccase, esterase, ADH, ALT, aldolase, sur protease og amidaserna. Felles for alle de målte enzymene er at de alle ser ut til å sitte på Q Sepharose ved pH 8,2 og er støt eluert av kolonnen med 1M NaCl. Fraksjonene er ikke dialysert, så for enkelte aktiviteter kan saltet forstyrre målingene.

Startprøvene befant seg i pH 9,0 og måtte igjennom dialyse. For alle prøvene skjedde det utfelling, mest i pH 5,0. Som forslag for fremtidige ekstrakter bør en tilstrebe og tilpasse ekstraksjons pH til kolonne pH. ADH ser ikke ut til å tåle dialyse (før diskusjon om dette se nedan). Mange av disse enzymene svekkes også ved pH justering pH 8,2 til pH 5.0. Det er også mulig at de ligger i den utfelte pelletten.

Amidase (målt med CNBAA) er det eneste enzymet som sitter på både S Sepharose ved pH 5,0 og sitter på Q Sepharose ved pH 8,2.

Øvrigt av interesse från enzymmålinger och rensing

Mätningar vid olika temperaturer

I Appendiks 4 presenteras en fullständig sammaställning av de enzymmålinger som har gjorts, som inte är relaterade till kolonnrensing.

Under den andra ekstraheringen (bland annat med AmSO_4) gjorde gruppen en del mätningar vid andra temperaturer än rumtemperatur før att se om det fanns interessant aktivitet vid låga temperaturer, indikativt før ett kyladapterat enzym. I de flesta fall när har man har gjort mätningar på de olika lösningarna vid olika temperaturer så hittar man den högsta aktiviteten vid høgre temperaturer. Ett undantag är de mätningar på MAO/SSAO-aktivitet i AmSO_4 -ekstrakten som pekar på ett möjligt kyladapterat enzym vid ekstrahering vid dessa betingelser.

När det gäller vilket pH som resulterar i høgst aktivitet så verkar de basiska ekstraheringarna vara de som ger bäst proteinmängd och aktivitet hos flest enzym. Klara undantag är EH, ett av fosfat fosfatasen, TG och GST.

Efterfällningsproblematik

De ulike førfaranden før att nå fram till klara løsningar har möjliggjort enzymmätningar som vore omøjlige med løsningar som inte var helt klara. Många gånger har det dock visat sig att efter det att løsningarna har stått en tid i frysen så har en del protein efterfällt. Dessa løsningar har alltid centrifugerats innan mätningar har ägt rum. I Appendix 5 finns en sammanställande tabell över de proteinmängder som har mätts upp. Vid upprepade proteinmängdmätningar på samma løsning (olika nedfrysna fraktioner) över tid presenteras dessa efter varandra i tabellen. Den sista kolonnen visar vilket/vilka proteinmängdvärden vi har använt i de olika tabellerna i Appendix 3.

Eftersom det i vissa fall är de ønskade enzymerna som har ingått i fällningen kan det vara så att før vissa enzym, i vissa løsningar, så har den relativa aktiviteten minskat med tid. Det kan vara en av anledningarna till att aktiviteten før båda DNaserna har minskat med tid i løsning A och C. Interessant nog så har aktiviteten istället økat med tid før surt protease når man mäter aktivitet i løsning A – D, något som kan peka på att en hämmare førsvinner i det som fäller ut.

Andra målinger där efterfällningar var ett problem var MAO-assayen med NBBA på 40 – 60 % løsningen där proteinerna började fälla i Eppendorfrøret en bit in i mätningarna. Centrifugering av løsningen gav fullständig førlost av all aktiviteten i løsningen. Lyckligtvis fanns det løsningar kvar där proteinet inte hade fallit och med dessa kunde man avsluta dessa målinger.

Mulig X-faktor før ADH-aktivitet i noen ekstrakter

Vi har sett att den førvøntade ADH aktiviteten i prov 42 och 51 som anvøndes till småkolonnførsøken inte gikk att återfinna i de løsningar som hade gått igennom dialys, en aktiviteten fanns vid mätningar i de ursprunglige basiske ekstrakterna. Det fødde en misstanke om att ”noe” var forsvunnet under dialysen fra pH 9 til pH 8,2 /5.0. Før att undersøke dette nærmere koncentrerades prov 42 och 51 på två ulike Ultrafree-MC Cetrifugal Filter Devices (Amicon NMWL 10 och 5 kDa). Man fikk då filtrerade ekstrakt utan allt som hade en storlek under 10 respektive 5 kDa. Det som gikk igennom filtret, de lågmolekylære fraktionerna, samlades upp. Mätningar gjordes sedan på:

- Blank
- Ekstraktet
- Filtrerat ekstrakt utan lågmolekylær fraktion
- Den lågmolekylære fraktionen
- Filtrerat ekstrakt med tillsatt lågmolekylær fraction

Ett annat sätt att undersøke om nærvaron av lågmolekylært material är viktig før ADH aktivitet var att tillsätta den lågmolekylære fraktionen som man fikk från en av de ekstraktioner som gjordes tidigast i projektet (TP, sid 1) **till filtrerad løsning 51?** Eftersom man hade en misstanke om att en mer koncentrerad TP gav mer aktivering koncentrerades denna 10 ggr innan den tillsattes løsning 51 vid mätningarna.

Sammanfattningvis kan man dra slutsatsen från resultatene att det finns all anledning att tro att det finns något med en storlek på 5000 Da eller under som påverkar antingen aktiviteten eller assayen. Vi måste gøre mer mätningar før att kunne uttale oss om vad som egentligen sker med større sikkerhet.

Appendiks 1: Ekstraksjon, ultrafiltrering og kromatografi

Første ekstraheringen (A – D-løsningarna)

SP ekstraktet hadde vist seg å være et utfordrende råstoff for enzym leting. En videre analyse av SP viste at det inneholdt 8, 5 % fett, 16,1 % protein, 71,6 % vann og 3,1 % aske. Det ble besluttet å bruke bufrede løsninger ved ekstraksjon av SP (A: 50 mM Na acetat pH 4,5 og B: 50 mM Tris/HCl pH 9,0) med og uten innhold av ikke ionisk detergent (0,05 % Triton X100), Tabell 1. Ekstraksjonen av SP ble gjort ved bruk av Waring Blender og videre omrøring på kjølerom i tre timer. Ekstraksjonsløsningene ble deretter sentrifugert ved 20 000 x g i 20 minutter.

Tabell 1: Ekstraksjon av SP

Ekstrakt	SP (g)	Buffer (ml)
A	52,1	200 A pH 4,5
B	51,6	200 B pH 9,0
C	50,4	200 A + triton
D	52,4	200 B + triton

Alle ekstraktløsningene etter sentrifugering inneholdt fett (emulsjon) og ga partikulært bunnfall ved henstand. Ekstraktløsningene var av en slik beskaffenhet at bare en svært begrenset "enzyme sceening" kunne gjøres. Fett i ekstraktløsningene måtte fjernes før en utvidet "enzyme screening" kunne gjøres.

Fjerning av fett i ekstrakt A, B, C og D

Fett ble forsøkt fjernet/reduisert i ekstraktløsningene ved bruk av GFC filtrering uten tilfredsstillende resultat. Fett ble forsøkt fjernet ved enten bruk av ammoniumsulfat fraksjonering av protein eller ekstraksjon av fett ved bruk av løsemiddelet hexan.

Ved ammoniumfraksjoneringen av ekstraktene (40-50 ml) ble 20-70 % fraksjonen fra alle ekstraktene tatt vare på. Pelletene fra ekstrakt A og C ble løst i 5 ml 10 mM Na acetat buffer pH 4.5 og pelletene fra B og D pelletene ble løst i 5 ml 10 mM Tris buffer pH 9,0. Ekstrakt løsningene, nå kalt AS og CS ble videre dialysert mot 2 x 5 l 10 mM Na acetat buffer pH 4.5, mens ekstrakt løsningene, nå kalt BS og DS ble dialysert mot samme mengde 10 mM Tris buffer pH 9,0. Ekstraktløsningene ble etter dialysen sentrifugert 20 000 x g/20 min før de fordeles i småporsjoner og fryses inn.

Frosne (- 20 °C) ekstraktløsninger A, B, C og D tines (40 ml av hver) og ekstraheres med hexan (9 deler ekstrakt : 1 del hexan). Rørene blandes godt og sentrifugeres 13 000 rpm/20 min. En tykk fetthinne legger seg på toppen. Den nederste fasen er ikke klar og blir overført til et nytt rør. Selve ekstraheringen av nedre fase gjentas 3x og det gir en klar nedre fase som tas av og fordeles i småporsjoner (se appendiks 1 for videre detaljer). De sentrifugerte ekstraktløsningene, nå kalt AH, BH, CH og DH fryses inn.

Ekstraktprøvene AS, BS, CS, DS, AH, BH, CH og DH ble fordelt på 20 -70 fraksjoner á 0,5 ml, frosset ved -20 °C og brukt i den videre enzym undersøkelsen.

Andra ekstraheringen (10-20% - 60-80% løsningsarna, samt 30 & 31)**Ekstraksjon ved pH 4,4 og fraksjonering av ekstraktet ved bruk av ammoniumsulfat.**

SP ekstrakt (1 kg) tines på kjølerom og homogeniseres i 4 liter 50 mM Na acetat buffer pH 4,4 ved bruk av Waring Blender. Blandingen omrøres i tre timer ved 8 °C for ekstraksjon av biologiske aktiviteter i løsningen. Ekstraktet sentrifugeres deretter ved 20 000 x g i 30 min. Pellet (509 g) etter sentrifugering fryses ved – 20 °C. Pellet fra 10% ammoniumsulfatfelling (146 g) fryses også inn ved – 20 °C. Løselige protein i supernatanten fraksjoneres ved bruk av ammoniumsulfat. De oppløste protein/enzym fraksjonene (10-20%; 20-40%; 40-60% og 60-80%) dialyseres mot 10 mM NaAc, pH 4,4. Pelletene (146 g og 509 g) tines, ekstraheres med 50 mM Tris/HCl pH 9 (1+4). Etter sentrifugering 7000g/40 min gjøres det en 20-70% ammoniumsulfatfelling på begge supernatantene. Kaster pelleten som er < 20% ammoniumsulfatfelling.

Pelleten fra 20-70% ammoniumsulfatfelling av "146 g" løses i 25 ml 50 mM Tris/HCl, pH 9.0 og dialyseres. Sluttvolumet er 50 ml, som fordeles i 39 eppendorfrør á 0,5 ml. Prøven kalles nå 30.

Pelleten fra 20-70% ammoniumsulfatfelling av "509 g" løses i 500 ml 50 mM Tris/HCl, pH 9.0 og dialyseres. Sluttvolumet er 950 ml, som fordeles i 40 eppendorfrør á 0,5 ml. Resten fryses inn i en stor porsjon. Prøven kalles nå 31

De stora, basiska, ekstraktionerna (lösningar 41 – 43 och 51 – 54)**Ekstraksjon 1**

SP ekstrakt (0,9208 kg) tines på kjølerom og homogeniseres i 3,6 liter 50 mM Tris buffer pH 9,0 på klimarom (8 °C) ved bruk av Waring Blender. Ekstraktløsningen omrøres ved 4 °C i 3 timer ved bruk av Heidolph røreverk. Testprøve (ca 50 ml) av SP ekstraktløsningen fryses ved – 20 °C og resten av løsningen sentrifugeres deretter ved 8400 x g i 15 minutter. Overflatefett i den sentrifugerte ekstraktløsningen fjernes ved filtrering av denne gjennom osteklede ved 8 °C. Dette SP ekstraktet 26/9 (3,15 liter) fordeles på ulike beholdere og fryses ved – 20 °C.

Tinte testprøve av SP ekstrakt 26/9 ved 4 °C. Den tinte ekstraktløsningen hadde skilt seg i en øvre og nedre fase. Den øvre vandige fasen ble tatt av og sentrifugert ved 20 000 x g i 15 min. Denne partikkelfrie SP ekstraktløsning 41 ble tatt vare på ved – 20 °C og på is.

Testløsningen (ca 50 ml) av SP ekstraktet før sentrifugering ble tint på kjølerom. Tining av denne løsningen resulterte ikke i en øvre og nedre fase som i forsøket ovenfor. Den tinte SP ekstraktløsningen hadde skilt seg i klar væske og utfelt materiale som var jamt fordelt i hele løsningen. Denne løsningen ble filtrert gjennom Whatman 4 filter (8 °C) og 37,5 ml partikkelfri og klar SP ekstraktløsning 42 ble oppnådd. Bunnfallet på filteret ble tatt vare på og videre ekstrahert over natt med 40 ml 50 mM Na acetat buffer pH 4,5. Denne ekstraktløsningen lot seg ikke filtrere ved bruk av Whatman 4 filter. Dette bunnfall ekstraktet pH 4,5 ble frosset (-20 °C) og deretter tint og Whatman 4 filtrert (8 °C) til 32,5 ml SP ekstrakt 43. SP ekstrakt 42 og 43 ble videre oppbevart som ekstrakt 41 ovenfor. Disse ekstraktene ble undersøkt for tilstedeværelsen av enzymer. SP ekstrakt 42 prøver (1 ml) ble dialysert mot 50 mM Na acetat buffer pH 4,5 og 50 mM Tris buffer pH 7,0. Dialysen mot pH 4,5 bufferen ga mye utfelling i ekstraktløsningen, mens pH 7 dialysen ikke førte til utstrakt utfelling (visuelt) av partikulært materiale. Sentrifugering (16 000 x g/15 min) viste liten hvit pellet i pH 7 ekstrakt løsningen.

Ekstraksjon 2

Ekstraksjon 1 over ga en klar og partikkelfri ekstrakt løsning 42 uten bruk av sentrifugering. SP ekstrakt (0,8809 kg) ble homogenisert i 3,2 liter 50 mM Tris buffer pH 9,0 buffer som i ekstraksjon 1 ovenfor. Et lite uhell med røreverket førte til tap av ca 300 ml ekstrakt. Resten av ekstraktløsningen ble fordelt på to 2 liters begerglass og frosset ved – 20 °C. Det ble tatt ut en prøve på 80 ml som ble frosset i 0,2 l begerglass.

Tining av 80 ml ekstraktløsningen og påfølgende Whatman 4 filtrering (ved 8 °C) ga 43 ml klar/partikkelfri ekstrakt løsning som oppnådd i løsning 42 ovenfor. De 2 liters begerglassene med SP ekstrakt ble tint (ved 4 °C) og deretter filtrert gjennom osteklede etterfulgt av Whatman 4 filtrering ved 8 °C. Dette ga 2,5 l partikkelfri ekstraktløsning kalt 51 SP ekstrakt.

Ultrafiltrering/diafiltrering

Ekstraktløsningen 51 SP eks ble oppkonsentrert 10 ganger ved bruk av Biomax 10 filter (2 x 50 cm²) på et Millipore Labscale TFF UF anlegg til 52 SP kons. Oppkonsentreringen gikk uten tekniske problemer ved "cut off" 10 kDa, "retentate pressure" var 10 psi, men "permeate flux" endret seg fra 4,93 ml/min til 1,14 ml/min under oppkonsentreringen. 52 SP kons løsningen ble diafiltrert under vakuum mot 1346,8 ml 50 mM Tris buffer pH 7,4 til 53 SP dia løsning, (se appendiks 3). Dette viser at 51 SP eks løsningen kan oppkonsentreres og endre pH på ved diafiltrering. Dette er viktige prosess tekniske egenskaper til denne SP ekstrakt løsningen preparert uten sentrifugering ved høy g-belastning og uten fett fjerning ved bruk av organisk løsemiddel eller ved saltfelling. Resultatet for de ulike enzymer ved konsentrering/diafiltrering av 51 SP ekstrakt vises i appendiks 3.

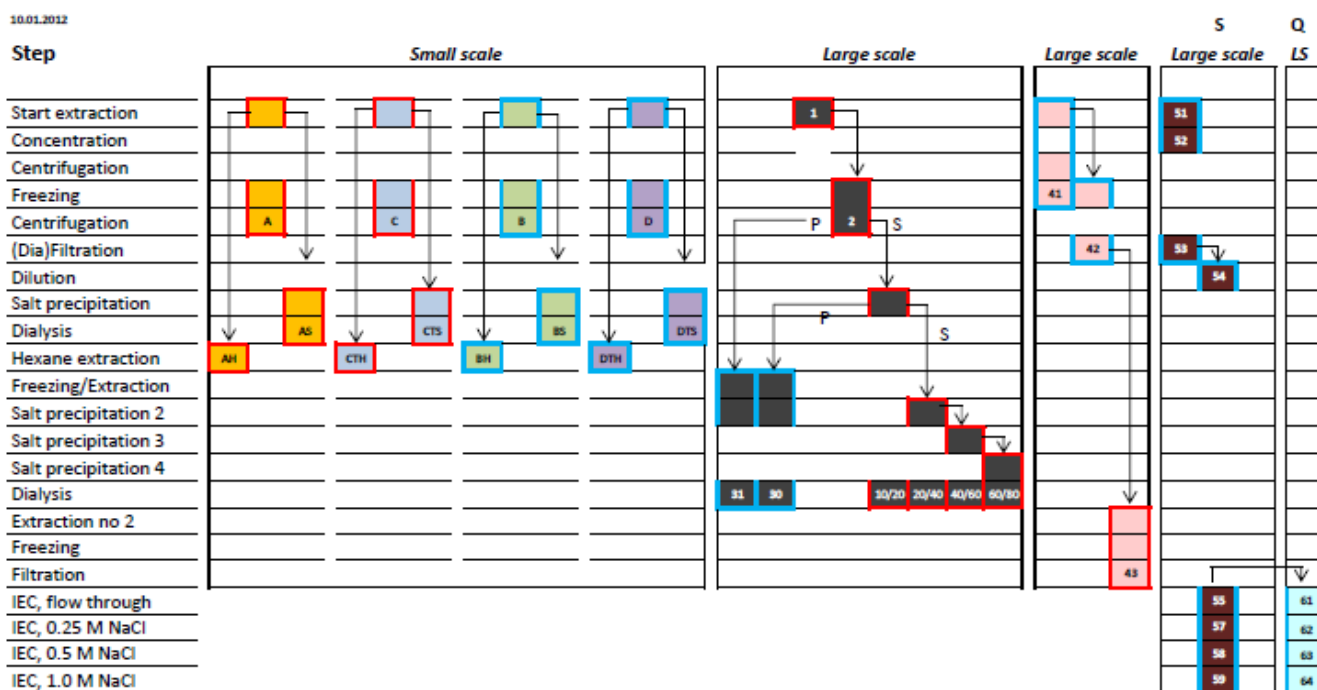
S sepharose kromatografi av 53 SP dia løsningen

53 SP dia løsningen hadde svært høy protein konsentrasjon og denne løsningen ble av tekniske grunner tynnet med 50 mM Tris buffer pH 7,4 til 54 SP på. Denne løsningen ble påsatt en ekvilibert 300 ml S sepharose kolonne ved pH 7,4, appendiks 3. Hovedmengden av protein i 54 SP på løsningen bandt ikke gelen ved pH 7,4. Gelen ble videre vasket med til sammen 2,98 liter Tris buffer pH 7,4 og bundet protein ble deretter eluert gelen stegvis med 0,25 M, 0,5 M og 1 M NaCl i Tris buffer pH 7,4, se appendiks 3.

Q sepharose kromatografi av enzymløsningen som ikke satt på S sepharose

Da enkelte enzymer ikke satt på kationebytteren ble en del av 55 S gj fraksjonen satt på en anionebytter (25 ml Q sepharose) ved pH 7,4. Kolonnen ble deretter vasket med Tris buffer pH 7,4 (270 ml buffer til A₂₈₀ lik 0,098) og protein/enzym eluert stegvis med økende konsentrasjon av salt i bufferen, se appendiks 3.

10.01.2012



Figur 1. Konkluderende oversikt på hvilke trinn hvert ekstrakt har gått igjennom.

Appendiks 2: Måling av enzymaktivitet

ADH (Alkoholdehydrogenase, EC 1.1.1.1)

ADH er et cofaktor avhengig oxidoreductase som katalyserer overgang fra primær og sekundær alcohol til aldehyd eller keton.

500 µl 0,1 M Natrium fosfat, pH 7,8

150 µl 2 M Etanol i vann, pH 5

250 µl 0,035 M NAD⁺ i 0,1 M Natrium fosfat, pH 7,8 (nylaget hver gang)

Løsningene blandes godt i en plast engangskuvette (kvalitet som dekker 340 nm). Blank absorbansen avleses ved 340 nm i tiden 0-300 sekunder. Dette gjøres for å oppnå temperaturlikevekt i kuvetten.

10-100 µl ekstrakt tilsettes kuvetten. Resten av prøvevolumet opp til 100 µl justeres med 0,1 M Natrium fosfat, pH 7,5 Blandes godt med parafilm. Nullstill spektrofotometeret og ny kinetikk reaksjon måles umiddelbart.

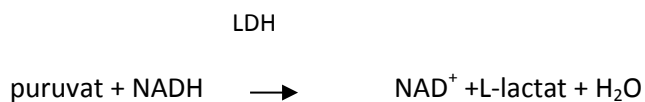
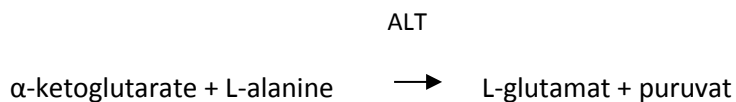
Absorbansen avleses ved 340 nm i tiden 0-300 sekunder. ($\epsilon = 6,22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

1 unit definieras som den aktiviteten som ger 1 Abs /min.

Ved å bytte ut etanol med andre lengre alkoholer, kan samme assay brukes til andre hydrogenaser.

ALT (alanin transaminase EC 2.6.1.2)

Reaksjoner:

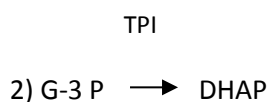
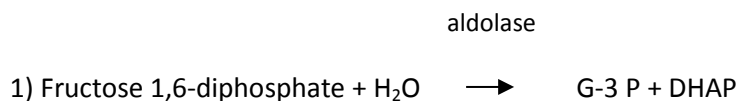


Substrat løsnings: 0,1 M Tris/HCl pH 7,4, 10 mM α -ketoglutarate, 100 mM L-alanine, 0,1 mM β NADH, 12,5 unit LDH

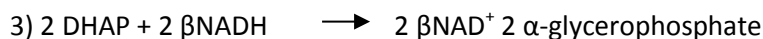
1 unit ALT er frigjøring av 1 µmol NAD⁺ produsert/min ved 340 nm.

Aldolase (EC 4.1.2.13)

Reaksjoner:



GDH



Substrat løsning: 0,1 M Tris/HCl pH 7,4, 1,9 mM F 1,6-diphosphate, 0,13 mM β NADH, TPI/GDH enzyme 50 units/ml

1 unit aldolase produserer 1 $\mu\text{mol NAD}^+/\text{min}$ ved 340 nm. ($\epsilon = 6,22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

Amidase (EC 3.?)

Enzymerna katalyserar omvandlingen av en amid till en karboxylsyra och en amin. Assayen är en sekundär assay och baseras på reaktion mellan den bildade aminen och en reaktant (NBD-Cl).

Buffert: 0.05 M natriumfosfat (pH 7.4)

Substratlösning: 20 mM amide (4-Chloro-N-benzylacetamide (CNBAA) eller N-benzylbenzamide (NBBA)) upplöst i DMSO.

Sekundär substratlösning: 40 mM 4-Chloro-7-nitrobenzofurazan (NBD-Cl) i DMSO.

1 unit definieras som en milliabsorbansenhet/minut (målt som skillnaden i absorbans per minut för enzymreaktionen minus bakgrundsreaktionen (målt utan enzym), vid 475 nm).

Chitinase (EC 3.2.1.14)

Substratlösning: 50 mM Na acetat buffer pH 5,5, finfordelt kitin (2,5 mg/ml), 150 mM NaCl.

Reksjonsmiks (400 μl substratlösning inkludert enzym) innkuberes ved 37 °C i 30 min. Reaksjonen stoppes ved tilsats og miksing av 1) 50 μl 50 % TCA, 2) 50 μl 3,4M NaOH og 3) 100 μl 0,8 M $\text{K}_2\text{B}_4\text{O}_7$. Blandingen plasseres på kokende vannbad i 3 min og avkjøles deretter på is. Den avkjølte løsningen tilsettes 3 ml av 10 % DMAB (dimethylaminobenzaldehyd) i konsentrert eddiksyre/saltsyre miks (9 +1 vol). La stå i 3 min og avles Abs 586 nm. Frigjort N-acetyl glucosamine (NAG) i reaksjonen avleses mot standardkurve av NAG (0,1 – 1,0 $\mu\text{mol NAG}$ i vann).

1 unit defineres som frigjøring av 1nmol NAG/min ved 37 °C.

dsDNase pH 5 og 7 (3.1.x.x)

DNaser er enzymer som katalyserer hydrolyse av phosphodiesterbindinger i enkel (ss)- eller dobbelltrådet (ds)DNA.

Reaksjonsbetingelser: 1 ml substrat (0.2 mg dsDNA i 0,1 M Tris/HCl (pH 7), 5 mM MgCl_2 eller i 0,1 M Na acetat (pH 5), 5 mM MgCl_2) og ekstrakt innkuberes ved rom temperatur (22 °C) i 60 minutter. Reaksjonen stoppes ved tilsetning av iskald 0,5 ml 12% perklorisyre (HClO_4) og sentrifugeres i 5 min ved 14 000 x g. Som reaksjons blank brukes tilsvarende reaksjon uten inkubasjon, men med direkte tilsats av perklorisyre. Absorbsjon ved 260 nm måles på reaksjon supernatant mot blank supernatant.

1 unit dsDNase pH 5 eller pH 7 defineres som endring av absorpsjons på 0,001 pr min ved 260 nm.

EH (Epoxid hydrolase EC 3.3.2.x)

Cytocoll eller membranbundne enzym funnet i mange isoformer i ulike organismer. EH hydrolyserer epoxid til dioler. EH måles ved at substrat forsvinner.

Buffert: 0,05 M natriumfosfat (olika pH (6.8, 7.0, 7.4))

Substratløsning: olika koncentrationer av epoxide (styrenoxid (SO) eller *trans*-stilbene oxid(TSO)), 100 x slutkoncentration av substrat, upplösta i acetonitril eftersom DMSO stör målingar vid aktuella våglängder (225 nm (SO), 229 nm (TSO))

1 unit definieras som $(-[S]/\text{min} \cdot 10^{-3})$ (där $\epsilon = -15 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ för TSO, och $\epsilon = -2.75 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ för SO)

Esterase (3.1.1.x)

Lager 100 mM 4-NPA (4-Nitrophenyl acetat) i DMSO (lagres i fryseren)

Rett før bruk fortynnes denne 100 ganger til 1mM 4-NPA i Natrium fosfat, pH 7,0.

990 µl 1mM 4-NPA i Natrium fosfat, pH 7,0 + 10 µl ekstrakt

Blandes godt med parafilm i en plast engangskuvette og målingen starter umiddelbart.

Absorbansen avleses ved 405 nm i tiden 0-300 sekunder. Reaksjonen er veldig reproducerbar og reaksjonstiden kan derfor reduseres til 120 sekunder.

Blanken kjøres først uten tilsetning av 10 µl ekstrakt eller tilsette 10 µl buffer som prøve.

1 unit defineres som $\Delta\text{abs} / \text{min}$

Lager 1000 mM 4-NPB (4-Nitrophenyl butyrate) i DMSO (lagres i fryseren)

Rett før bruk fortynnes denne 1000 ganger til 1 mM 4-NPB i Natrium fosfat, pH 7,0.

990 µl 1mM 4-NPB i Natrium fosfat, pH 7,0 + 10 µl ekstrakt

Blandes godt med parafilm i en plast engangskuvette og målingen starter umiddelbart.

Absorbansen avleses ved 405 nm i tiden 0-300 sekunder. Reaksjonen er veldig reproducerbar og reaksjonstiden kan derfor reduseres til 120 sekunder.

Blanken kjøres først uten tilsetning av 10 µl ekstrakt eller tilsette 10 µl buffer som prøve.

1 unit defineres som $\Delta\text{abs} / \text{min}$

Fosfat fosfatas assay (EC 3.1.3.x)

Klassen fosfor monoester hydrolaser inneholder ulike enzym som katalyserer klyvningen av en O-P-binding. Glycerate 3-fosfat bryts ner av glycerate-3-fosfat fosfatas (ett haloacid dehalogenas), medan inosine 5-fosfat i menneske bryts ner av de cytosoliske 5'-nucleotidaserna 1A og B (tillhør pyrimidine 5'-nucleotidasfamilien). Denna assay måler bildningen av fria fosfater i løsning og er alltså generell før alle enzym där fosfater frigøres.

Buffertløsning: 100 mM natriumacetat (pH 6.0)

Substratløsning: 15 mM av fosfat utblandad i ddH₂O

I en totalvolym av 50 µl blandas 10 µl substrat, 10 (5) µl ekstrakt og 30 (35) µl buffert. Reaktionen går i 0, 20 el 40 minutter og stoppas med 100 µl BIOMOL GREEN. Denna blandning får stå i 20 min innan absorbansen måles ved 620 nm. Substratnegativ blank: utan substrat. Enzymnegativ blank: utan ekstrakt.

1 unit definieras som en milliabsorbansenhet/minut (målt som skillnaden i absorbans per minut før enzymreaktionen minus bakgrundsreaktionen (utan enzym), vid 620 nm).

GOx (Glucose oxidase EC 1.1.3.4)

GOx er en oxidoreduktase som katalyserer oksidering av glukose til hydrogen peroksyd (HPR) og en lacton som igjen fører til nedbryting av sukker. HRP og Amplex red reduseres til resofurin som måles fluorofotometrisk ved ex/em 571/585 nm.

Buffert: 0,05 M natriumfosfat (pH 7.4)

Substratløsning: 100 mM glukos, 0.15-0.20 U/ml peroksidase (HRP), 10 µM Amplex red i buffertløsning. 100 µl av denna løsning adderes brunnar med 100 µl 2:5 el 1:25 utspädd enzymløsning.

Enzymnegativ kontroll: kokade enzymløsninger (10 min). Substrat-negativa kontroller: allt utom substratet. Negativ kontroll: 100 µl buffert och 100 µl substratløsning. Amplex red/peroxidpositiv kontroll: 1 µl av 1 mM peroxid i ddH₂O i 99 µl buffert med 100 µl substratløsning.

1 unit definieras som µM/min (den mängd resorufin som bildas under en minut, med en standardkurva som gav 343 fluoresensceenheter per µM bildad resorufin (från 19 augusti 2011)).

GST (Glutathione S-transferase EC 2.5.1.8)

GST er dimere enzymer som bla brukes av ulike organismer for å fjerne toksiske substanser. De katalyserer fjerning/tillegging av glutathione til endogene og exogene substrat og har en bred substrat spesifisitet.

Substrat løsning: 0,1 M kaliumfosfat buffer (pH 6,5), 1 mM 1-chloro-2-4-dinitrobenzene (CDNB), 1 mM glutathione (GSH).

1 unit GST produserer 1 µmol S-(2,4 dinotrofenol)glutathione/min ved 340 nm ($\epsilon = 9,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

Laccase (EC 1.10.3.2)

Laccase er et en-elktron oksyderende multi-kopper enzym som virker på phenoler og er funnet i planter, sopp og bakterier.

940 µl vann + 50 µl 10 mM ABTS (2,2'-azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate) i 20 mM Natrium acetat, pH 5 + 10 µl ekstrakt

Alt blandes godt i en plast engangskuvette og måles umiddelbart (kinetikk).

Absorbansen avleses ved 420 nm i tiden 0-300 sekunder.

Sluttkonsentrasjonen på ABTS er 0,5 mM.

Sluttkonsentrasjonen på buffer er 1 mM.

Fryser inn småporsjoner á 10 mM ABTS i 20 mM Natrium acetat, pH 5

1 unit definieras som den aktiviteten som ger 1 Abs /min.

Lipase (3.1.1.3)

Lager 1000 mM 4-NPO (4-Nitrophenyl octanoate) i 100% Metanol (lagres i fryseren)

Rett før bruk fortynnes denne 100 ganger til 1 mM 4-NPO i Natrium fosfat, pH 7,0.

990 µl 1mM 4-NPO i Natrium fosfat, pH 7,0 + 10 µl ekstrakt

Blandes godt med parafilm i en plast engangskuvette og målingen starter umiddelbart.

Absorbansen avleses ved 405 nm i tiden 0-300 sekunder. Reaksjonen er veldig reproducerbar og reaksjonstiden kan derfor reduseres til 120 sekunder.

Blanken kjøres først uten tilsetning av 10 µl ekstrakt eller tilsette 10 µl buffer som prøve.

1 unit defineres som $\Delta\text{abs} / \text{min}$

Lysozyme (3.2.1.17)

Lysozym ble målt ved bruk av *Micrococcus luteus* (0,2 mg/ml) i 0,1 M Na acetat buffer pH 6. Nedgang i absorpsjon ved 450 nm måles over tid ved rom temperatur.

1 unit lysozym aktivitet er den mengde enzym som katalyserer en nedgang i abs. på $0,001 \text{ min}^{-1}$.

MAO-A/B alt. SSAO (Monoamine oxidase A & B EC 1.4.3.4, alt. SSAO EC 1.4.3.6)

MAO A og B er membran bundne mitokondrielle flavoenzymer som katalyserer oksydering av aminer og iminer. To isoformer (A og B) av MAO med ulik substrat spesifisitet er funnet hos mennesket. Benzylamide og tyramine er også substrater for SSAO, som er funnet som ulike isoformer i plasma og membraner. Et av produktene av reaksjonen er en peroxid som HRP, som sammen med Amplex red, reduseres til resorufin som måles fluorometrisk med ex/em 571/585 nm.

Buffert: 0.05 M natriumfosfat (pH 7.4)

Substratløsning: 2 mM tyramin eller benzylamin, 1.5-2.0 U/ml peroksid (HRP), 200 µM Amplex red i buffertløsning. 100 µl av denna løsning adderes brunnar med 100 µl 2:5 el 1:25 utspätt enzymløsning.

Enzymnegativ kontroll: kokade enzymløsninger (10 min). Substrat-negativa kontroller: allt utom substratet. Negativ kontroll: 100 µl buffert och 100 µl substratløsning. Amplex red/peroxidpositiv kontroll: 1 µl av 1 mM peroxid i ddH₂O i 99 µl buffert med 100 µl substratløsning.

1 unit definieras som µM/min (den mängd resorufin som bildas under en minut, med en standardkurva som gav 343 fluoresensceenheter per µM bildad resorufin (från 19 augusti 2011)).

PLA2 (Fosfolipase A2 EC 3.1.1.4)

Fosfolipase A2 opptrer som Ca-avhengig/uavhengig enzym som er spesifikk for SN2 esterbindinger.

Løsninger

A: 0.07 % (w/v) lecithine, 0,5 % (w/v) Doc, 0,15 M Tris/HCl pH 8,5

B: 0,2 M hydroxylamine, 1,5% NaOH, 20% petroleumsbensin, 60% ethanol

C: 0,6 M FeCl₂

D: 3 N HCl

Assay: 80 µl A løsning + 20 µl ekstrakt/enzyme innkuberes ved rom temp i 30 min, deretter tilsettes 950 µl B løsning og videre innkubering i 20 min. Reaksjonen stoppes ved tilsetting av 150 µl C løsning og 150 µl D løsning.

1 unit PLA2 defineres som endring av absorpsjons på 0,001 pr min ved 570 nm.

Protease pH 1,8 (EC 3.4.x.x)

Proteaser katalyserer hydrolyse av peptidbindinger i protein og peptider.

Reaksjonsbetingelser: 0,5 ml substrat (2 % hemoglobin i 0,06 N HCl) og ekstrakt/enzyme innkuberes ved rom temperatur i 60 minutter. Reaksjonen stoppes ved tilsetting av 1 ml 5% TCA og sentrifugeres i 5 min ved 14 000 x g. Som reaksjons blank brukes tilsvarende reaksjon uten inkubasjon, men med direkte tilsats av TCA. Absorpsjon ved 280 nm måles på reaksjon supernatant mot blank supernatant.

1 unit protease pH 1,8 defineres som endring av absorpsjons på 0,001 pr min ved 280 nm.

Protease pH 7 (EC 3.4.x.x)

1,5 ml 5 mg azocoll /ml 0,1 M Na fosfat buffer, pH 7,0 i 2,2 ml eppendorfrør.

Tilsett 5-200 µl ekstrakt. Rørene med ekstrakt + substrat settes på vippe ved romtemperatur i for eksempel 15 min. Noter nøyaktig tid. Sentrifuger rørene 2 min / 14 000 g. Så raskt som mulig overføres supernatanten til TT-rør. Da er assay'n stoppa og absorbansen ved 520 nm avleses.

Som prøveblank brukes 1,5 ml azocoll som har inkubert samme tid som prøven. Ved tiden x tilsettes samme prøvemengde og blandes godt. Deretter sentrifugeres rørene så fort som mulig og supernatanten overføres til TT-rør.

Som standard brukes 20-40µl 1% Novo Neutrase

1 unit protease pH 7,0 defineres som økning av absorpsjons pr min ved 520 nm.

1 unit = Δ abs 520 nm / 15 min

Proteasehemmer (Trypsinhemmer) pH 7

1,5 ml 5 mg azocoll /ml 0,1 M Na fosfat buffer, pH 7,0 i 2,2 ml eppendorfrør.

Tilsett 5-200 µl ekstrakt i 2 rør.

Tilsett 5-200 µl ekstrakt i 2 rør + 5 µl 0,1% trypsin.

Rørene med substrat + ekstrakt eller (substrat + ekstrakt + trypsin) settes på vippe ved romtemperatur i for eksempel 30 min. Noter nøyaktig tid. Sentrifuger rørene 2 min / 14 000 g. Så raskt som mulig overføres supernatanten til TT-rør. Da er assay'n stoppa og absorbansen ved 520 nm avleses.

Som prøveblank brukes 1,5 ml azocoll som har inkubert samme tid som prøven.

Ved å sammenlikne ekstrakter med og uten tilsats av trypsin, kan en si noe om reduksjonen/hemmingen av trypsin utslaget. Det må også settes opp mange rør med bare 5 µl 0,1% trypsin for å få

tak i dette utslaget alene. Denne absorbanverdien settes til 100% og absorbansen av (ekstrakt + trypsin) kan beregnes som % hemming av trypsin alene

5 µl 0,1% trypsin i 30 min v/ romtemperatur i azocoll assay pH 7,0 defineres som 100% utslag.

% hemming = 100% (differansen mellom trypsin alene og trypsin + ekstrakt)

TG (transglutaminase EC 2.3.2.13)

Transglutaminase katalyserer acyl overføring mellom glutamine residuer i protein og en primær amine og danner inter- og intra-kryssbindinger i proteiner.

Substratløsning: 10 mM Z-Gln-Gly, 100 mM hydroxylamine, 5 mM CaCl₂, 1 mM EDTA, 0,1 M Na acetat buffer pH 6,0.

Stoppløsning: TCA : FeCl₃ : HCl (1 : 1 : 1)

1 unit transglutaminase katalyserer dannelsen av 1 µmol av peptidbindingen γ-glutamyl-hydroxamate pr. min.

Trypsin (EC 3.4.21.4)

Substratløsning: 1mM N-benzoyl-DL-arginine-2-naphtylamide (BABNA), 20 mM CaCl₂, 50 mM Tris/HCl buffer pH 8,2,.

Assay miks 2,5 ml (substratløsning og enzyme) innkuberes i 60 min og reaksjonen stanses ved tilsetning av 0,5 ml 30 % eddiksyre. Absorpsjon ved 410 nm avleses innen en time.

(ε = 8,8 mM⁻¹ cm⁻¹).

1 unit defineres som frigjøring av 1 µmol pNA (paranitroanilin)/min.

Appendiks 3: Resultat enzymmålinger koblet til rensinger

Førsta ekstraheringen (A - D), initial enzyme screening

Ekstrakt	Protein mg/ml	Protease pH 1,8 u/ml	Protease pH 7 u/ml	Trypsin u/ml	Protease hemmer %	Chitinase u/ml	Lysozyme u/ml
AH	4.2	43.8					*
BH	11.4	36.3					*
CTH	4.0	38.3					*
DTH	11.8	145.8					*
AS	2.8	23.3			49		200
BS	10.6	45.8	88	7	80	9	
CTS	4.6	16.6			69	3	160
DTS	11.3	35.8	108	9	79	9	
1 aa	11.5	91.7					

* lysozyme hemmer

Ekstrakt	Protein mg/ml	DNase pH 7 u/ml	DNase pH 5 u/ml	GST pH 6,5 u/ml x 10-3	ADH u/ml	Trans- glutaminase u/ml x 10-3	ALT pH 7,4 u/ml x 10-3
AH	4.2	7.9	52.5	18.8	+	52	1.6
BH	11.4	38.8	76.3	3.1	0.5	267	33.8
CTH	4.0	2.9	12.0	45.6	+	48	5.6
DTH	11.8	31.9	68.3	1.5	0.4	335	29.3
AS	2.8	6.6	157.5	34.6	0	55	0.0
BS	10.6	10.0	145.8	7.6	0	250	0.0
CTS	5.1	4.0	269.2	43.8	0	59	0.0
DTS	11.3	16.7	130.0	1.5	0	302	0.8
1 aa	11.5	72.8	47.5	0.0	+	215	4.2

Ekstrakt	Protein mg/ml	Laccase u/ml	Monoamine oxidase A u/ml	Monoamine oxidase B u/ml	Glucose oxidase u/ml	Amplex Red u/ml	Aldolase pH 7,4 u/ml x 10-3
AH	4.2	0.7	375	0	0	103	0.0
BH	11.4	2.4	3950	4650	2375	1500	125.0
CTH	4.0	0.4	0	0	900	0	0.0
DTH	11.8	3.8	4325	3875	3325	1900	63.2
AS	2.8	0.3	235	275	600	0	0.0
BS	10.6	1.4	2450	1200	1500	550	0.0
CTS	5.1	0.5	475	300	575	0	0.0
DTS	11.3	1.4	2675	1800	1350	1050	0.0
1 aa	11.5	1.3	850	900	675	195	0.0

Ekstrakt	Protein mg/ml	PLA2 pH 8 u/ml	PLA2 (Ca2+) pH8 u/ml	Esterase (4-NPA) u/ml	Esterase (4-NPB) u/ml	Lipase (4-NPO) u/ml
AH	4.2	6.0	11.5	0.5	0.1	2.0
BH	11.4	38.4	28.0	4.4	7.2	28.0
CTH	4.0	13.0	6.3	0.7	0.2	0.2
DTH	11.8	31.5	30.0	4.8	7.6	24.0
AS	2.8	9.0	0.0	0.3	0.1	0.0
BS	10.6	38.5	22.5	4.4	4.1	41.1
CTS	5.1	12.5	11.0	0.4	0.1	0.8
DTS	11.3	33.5	32.5	4.8	5.8	31.9
1 aa	11.5	64.0	30.0	0.7	1.4	17.8

Andra og tredje ekstraheringarna (10-20% - 60-80% lösningarna, 30 & 31, 41 - 43)

	Protein	Volum	Protease pH 1,8	Trans- glutaminase	ALT pH 7,4	ADH	Lysozyme
Fraksjon	mg/ml	ml	u/ml	u/ml x 10-3	u/ml x 10-3	u/ml	u/ml
AS	1.9	40	23.3	55.0	0.0	0.00	200
2	2.2	3280	73.0	16.3	24.0		66
10 - 20 %	0.2	160	455.0	30.2	12.0		43
20 - 40 %	0.9	183	434.0	122.4	0.0		0
40 - 60 %	1.8	224	87.0	148.8	34.0		437
60 - 80 %	1.2	170	0.0	62.0	24.0		564
30	3.9	50	72.0	8.6	8.0		
31	5.3	950	22.0	11.6	0.0		
41	7.7	43	125.0	3.0	16.0	0.16	
42	12.3	38	188.3	7.0	32.0	0.32	
43	1.2	33	53.1	1.0	4.0		

	Protein	Volum	DNase pH 7	DNase pH 5	GST pH 6,5	Aldolase pH 7,4	Laccase
Fraksjon	mg/ml	ml	u/ml	u/ml	u/ml x 10-3	u/ml x 10-3	u/ml
AS	1.9	40	6.6	157.5	34.6	0.0	0.3
2	2.2	3280	19.6	119.0	6.8	0.0	0.2
10 - 20 %	0.2	160	0.0	0.0	37.0		0.1
20 - 40 %	0.9	183	0.0	0.0	12.5		0.1
40 - 60 %	1.8	224	0.0	0.0	28.1		0.7
60 - 80 %	1.2	170	0.0	10.7	14.0		0.4
30	3.9	50	0.0	145.0		0.0	0.0
31	5.3	950	17.0	115.0		0.0	0.3
41	7.7	43	28.1	69.9	4.6	151.0	2.4
42	12.3	38	41.6	138.3	12.5	814.0	3.4
43	1.2	33	8.8	38.5	16.1	0.8	0.0

	Protein	Volum	Amidase CNBAA	Amidase NBBA	Monoamie oxidase A Benzylamid	Monoamie oxidase B Tyramine	Glucose oxidase
Fraksjon	mg/ml	ml	u/ml	u/ml	u/ml	u/ml	u/ml
AS	1.9	40	32.0	27.0	235	275	600
2	2.2	3280					
10 - 20 %	0.2	160	41.0	31.0	550	205	400
20 - 40 %	0.9	183	61.0	51.0	0	165	0
40 - 60 %	1.8	224	75.0	45.0	0	125	0
60 - 80 %	1.2	170	0.0	3.2	0	58	0
30	3.9	50	52.0	27.0	925	1150	400
31	5.3	950	36.0	14.0	1600	1300	525
41	7.7	43	88.0	85.0	2475	4175	1625
42	12.3	38	72.0	77.0	4100	6750	2275
43	1.2	33	52.0	64.0	575	575	575

	Protein	Volum	Esterase (4-NPA)	Esterase (4-NPB)	Lipase (4-NPO)
Ekstrakt	mg/ml	ml	u/ml	u/ml	u/ml
AS	1.9	40	0.30	0.1	0.0
SP sup	2.2	3280	0.20	1.2	0.2
10 - 20 %	0.2	160	0.00	0.3	0.0
20 - 40 %	0.9	183	0.00	0.3	0.0
40 - 60 %	1.8	224	0.00	0.3	0.0
60 - 80 %	1.2	170	0.00	0.3	0.0
30	3.9	50	0.13	1.2	0.4
31	5.3	950	0.20	2.8	0.5
41	7.7	43		19.0	4.5
42	12.3	38			
43	1.2	33	0.00		

Ultrafiltrering/diafiltrering og kromatografi

S sepharose (300 ml) pH 7.4					Protease pH 1.8			
	Fraction	Volum (ml)	Protein (mg/ml)	T. protein (mg)	Activity units/ml	Sp. activity units/mg	T. activity units	Utbytte %
51	Sp ekstrakt	2500	10,7	26750	325,0	30,4	812500	100,0
52	SP kons	252	92,3	23260	2087,0	22,6	525924	67,2
53	SP dia	353	62,6	22098	1254,0	20,0	442662	54,5
54	SP på	1500	14,0	21000	258,0	18,4	387000	100,0
55	S gj	1625	12,1	19663	223,0	18,4	362375	93,6
56a	S vask 1	600	0,7	420	27,0	38,6	16200	4,2
56b	S vask 2	2200	0,2	440	4,0	20,0	8800	2,0
56c	S vask 3	180	0,1	18	2,0	20,0	360	0,1
57	S sep 0.25 M	465	2,7	1256	11,7	4,3	5441	1,4
58	S sep 0.5 M	465	0,6	279	9,0	15,0	4185	1,1
59	S sep 1 M	570	0,0	17	4,5	150,0	2565	0,7

S sepharose (300 ml) pH 7.4					DNase pH 7			
	Fraction	Volum (ml)	Protein (mg/ml)	T. protein (mg)	Activity units/ml	Sp. activity units/mg	T. activity units	Utbytte %
51	Sp ekstrakt	2500	10,7	26750	42,0	3,9	105000	100,0
52	SP kons	252	92,3	23260	329,0	3,6	82908	78,9
53	SP dia	353	62,6	22098	106,0	1,7	37418	35,6
54	SP på	1500	14,0	21000	15,1	1,1	22650	100,0
55	S gj	1625	12,1	19663	8,1	0,7	13163	58,1
56a	S vask 1	600	0,7	420		0,0	0	0,0
56b	S vask 2	2200	0,2	440		0,0	0	0,0
56c	S vask 3	180	0,1	18		0,0	0	0,0
57	S sep 0.25 M	465	2,7	1256	0,0	0,0	0	0,0
58	S sep 0.5 M	465	0,6	279	1,4	2,3	651	2,9
59	S sep 1 M	570	0,0	17	1,6	53,3	912	4,0

S sepharose (300 ml) pH 7.4					DNase pH 5			
	Fraction	Volum (ml)	Protein (mg/ml)	T. protein (mg)	Activity units/ml	Sp. activity units/mg	T. activity units	Utbytte %
51	Sp ekstrakt	2500	10,7	26750	219,0	20,5	547500	100,0
52	SP kons	252	92,3	23260	754,0	8,2	190008	34,7
53	SP dia	353	62,6	22098	479,0	7,7	169087	30,9
54	SP på	1500	14,0	21000	106,0	7,6	159000	100,0
55	S gj	1625	12,1	19663	36,0	3,0	58500	36,8
56a	S vask 1	600	0,7	420		0,0	0	
56b	S vask 2	2200	0,2	440		0,0	0	
56c	S vask 3	180	0,1	18		0,0	0	
57	S sep 0.25 M	465	2,7	1256	185,0	68,5	86025	54,1
58	S sep 0.5 M	465	0,6	279	5,8	9,7	2697	1,7
59	S sep 1 M	570	0,0	17		0,0	0	

S sepharose (300 ml) pH 7.4					Laccase (ABTS)			
	Fraction	Volum (ml)	Protein (mg/ml)	T. protein (mg)	Activity* u/ml	Sp. activity units/mg	T. activity units	Utbytte %
51	Sp ekstrakt	2500	10,7	26750	2,7	0,3	6750	100,0
52	SP kons	252	92,3	23260	23,0	0,2	5796	85,9
53	SP dia	353	62,6	22098	12,0	0,2	4236	62,8
54	SP på	1500	14,0	21000	2,7	0,2	4050	100,0
55	S gj	1625	12,1	19663	1,6	0,1	2600	64,2
56a	S vask 1	600	0,7	420	0,1	0,1	60	1,5
56b	S vask 2	2200	0,2	440	0,0	0,0	0	
56c	S vask 3	180	0,1	18	0,0	0,0	0	
57	S sep 0.25 M	465	2,7	1256	0,1	0,0	47	1,2
58	S sep 0.5 M	465	0,6	279	0,2	0,3	93	2,3
59	S sep 1 M	570	0,0	17	0,0	0,0	0	0,0

*1 unit er delta abs/min

S sepharose (300 ml) pH 7.4					Esterase (4-NPA)			
	Fraction	Volum (ml)	Protein (mg/ml)	T. protein (mg)	Activity* u/ml	Sp. activity units/mg	T. activity units	Utbytte %
51	Sp ekstrakt	2500	10,7	26750	3,0	0,3	7500	100,0
52	SP kons	252	92,3	23260	19,0	0,2	4788	63,8
53	SP dia	353	62,6	22098	15,0	0,2	5295	70,6
54	SP på	1500	14,0	21000	3,3	0,2	4950	100,0
55	S gj	1625	12,1	19663	3,1	0,3	5038	101,7
56a	S vask 1	600	0,7	420	0,0	0,0	0	3,8
56b	S vask 2	2200	0,2	440		0,0	0	
56c	S vask 3	180	0,1	18		0,0	0	
57	S sep 0.25 M	465	2,7	1256	0,4	0,1	186	
58	S sep 0.5 M	465	0,6	279	0,0	0,0	0	
59	S sep 1 M	570	0,0	17	0,0	0,0	0	

*1 unit er delta abs/min

S sepharose (300 ml) pH 7.4					ADH (etOH)			
	Fraction	Volum (ml)	Protein (mg/ml)	T. protein (mg)	Activity* u/ml	Sp. activity units/mg	T. activity units	Utbytte %
51	Sp ekstrakt	2500	10,7	26750	0,3	0,03	850	100
52	SP kons	252	92,3	23260		0,00	0	
53	SP dia	353	62,6	22098		0,00	0	
54	SP på	1500	14,0	21000	0,0	0,00	0	
55	S gj	1625	12,1	19663	0,0	0,00	0	
56a	S vask 1	600	0,7	420		0,00	0	
56b	S vask 2	2200	0,2	440		0,00	0	
56c	S vask 3	180	0,1	18		0,00	0	
57	S sep 0.25 M	465	2,7	1256		0,00	0	
58	S sep 0.5 M	465	0,6	279		0,00	0	
59	S sep 1 M	570	0,0	17		0,00	0	

*1 unit er delta abs/min

S sepharose (300 ml) pH 7.4					GST			
	Fraction	Volum (ml)	Protein (mg/ml)	T. protein (mg)	Activity u/ml x 10-3	Sp. activity units/mg x 10-3	T. activity units	Utbytte %
51	Sp ekstrakt	2500	10,7	26750	4,2	0,4	10400	100,0
52	SP kons	252	92,3	23260	39,6	0,4	9979	96,0
53	SP dia	353	62,6	22098	6,8	0,1	2383	22,9
54	SP på	1500	14,0	21000	1,6	0,1	2340	100,0
55	S gj	1625	12,1	19663	0,0	0,0	0	0,0
56a	S vask 1	600	0,7	420		0,0	0	0,0
56b	S vask 2	2200	0,2	440		0,0	0	0,0
56c	S vask 3	180	0,1	18	0,0	0,0	0	0,0
57	S sep 0.25 M	465	2,7	1256	5,2	1,9	2418	103,3
58	S sep 0.5 M	465	0,6	279	0,0	0,0	0	0,0
59	S sep 1 M	570	0,0	17	0,0	0,0	0	0,0

S sepharose (300 ml) pH 7.4					Aldolase			
	Fraction	Volum (ml)	Protein (mg/ml)	T. protein (mg)	Activity u/ml x 10-3	Sp. activity units/mg x 10-3	T. activity units	Utbytte %
51	Sp ekstrakt	2500	10,7	26750	477,0	44,6	1192500	100,0
52	SP kons	252	92,3	23260	4320,0	46,8	1088640	91,1
53	SP dia	353	62,6	22098	1865,0	29,8	658345	48,8
54	SP på	1500	14,0	21000	366,0	26,1	549000	100,0
55	S gj	1625	12,1	19663	286,0	23,6	464750	87,0
56a	S vask 1	600	0,7	420	14,0	20,0	8400	1,6
56b	S vask 2	2200	0,2	440		0,0	0	0,0
56c	S vask 3	180	0,1	18		0,0	0	0,0
57	S sep 0.25 M	465	2,7	1256	44,0	16,3	20460	3,8
58	S sep 0.5 M	465	0,6	279	0,0	0,0	0	0,0
59	S sep 1 M	570	0,0	17	0,0	0,0	0	0,0

S sepharose (300 ml) pH 7.4					ALT			
	Fraction	Volum (ml)	Protein (mg/ml)	T. protein (mg)	Activity u/ml x 10-3	Sp. activity units/mg x 10-3	T. activity units	Utbytte %
51	Sp ekstrakt	2500	10,7	26750	22,0	2,1	55000	100,0
52	SP kons	252	92,3	23260	168,0	1,8	42336	77,0
53	SP dia	353	62,6	22098	114,0	1,8	40242	73,2
54	SP på	1500	14,0	21000	26,0	1,9	39000	100,0
55	S gj	1625	12,1	19663	25,0	2,1	40625	104,1
56a	S vask 1	600	0,7	420	3,2	4,6	1920	4,9
56b	S vask 2	2200	0,2	440		0,0	0	0,0
56c	S vask 3	180	0,1	18		0,0	0	0,0
57	S sep 0.25 M	465	2,7	1256	2,4	0,9	1116	2,9
58	S sep 0.5 M	465	0,6	279	0,8	1,3	372	0,9
59	S sep 1 M	570	0,0	17		0,0	0	0,0

S sepharose (300 ml) pH 7.4					Glucose oxidase			
	Fraction	Volum (ml)	Protein (mg/ml)	T. protein (mg)	Activity u/ml	Sp. activity units/mg	T. activity units	Utbytte %
51	Sp ekstrakt	2500	10.7	26750	1175	110	2937500	100.0
52	SP kons	252	92.3	23260	12775	138	3219300	109.6
53	SP dia	353	62.6	22098	7600	121	2682800	91.3
54	SP på	1500	14.0	21000	1500	107	2250000	100.0
55	S gj	1625	12.1	19663	1500	124	2437500	108.3
56a	S vask 1	600	0.7	420		0	0	
56b	S vask 2	2200	0.2	440		0	0	
56c	S vask 3	180	0.1	18		0	0	
57	S sep 0.25 M	465	2.7	1256	550	204	255750	11.4
58	S sep 0.5 M	465	0.6	279	300	500	139500	6.2
59	S sep 1 M	570	0.0	17	195	6500	111150	4.9

S sepharose (300 ml) pH 7.4					Amidase (CNBAA)			
	Fraction	Volum (ml)	Protein (mg/ml)	T. protein (mg)	Activity* u/ml	Sp. activity units/mg x 10-3	T. activity units	Utbytte %
51	Sp ekstrakt	2500	10.7	26750	39.0	3.6	97500	100.0
52	SP kons	252	92.3	23260	143.0	1.5	36036	37.0
53	SP dia	353	62.6	22098	130.0	2.1	45890	47.1
54	SP på	1500	14.0	21000	44.0	3.1	66000	100.0
55	S gj	1625	12.1	19663	38.0	3.1	61750	93.6
56a	S vask 1	600	0.7	420		0.0	0	
56b	S vask 2	2200	0.2	440		0.0	0	
56c	S vask 3	180	0.1	18		0.0	0	
57	S sep 0.25 M	465	2.7	1256	33.0	12.2	15345	23.3
58	S sep 0.5 M	465	0.6	279	17.0	28.3	7905	12.0
59	S sep 1 M	570	0.0	17	11.0	366.7	6270	9.5

*1 unit er delta abs/min

S sepharose (300 ml) pH 7.4					Amidase (NBBA)			
	Fraction	Volum (ml)	Protein (mg/ml)	T. protein (mg)	Activity* u/ml	Sp. activity units/mg x 10-3	T. activity units	Utbytte %
51	Sp ekstrakt	2500	10.7	26750	42.0	3.9	105000	100.0
52	SP kons	252	92.3	23260	143.0	1.5	36036	34.3
53	SP dia	353	62.6	22098	113.0	1.8	39889	38.0
54	SP på	1500	14.0	21000	37.0	2.6	55500	100.0
55	S gj	1625	12.1	19663	28.0	2.3	45500	82.0
56a	S vask 1	600	0.7	420		0.0	0	
56b	S vask 2	2200	0.2	440		0.0	0	
56c	S vask 3	180	0.1	18		0.0	0	
57	S sep 0.25 M	465	2.7	1256	31.0	11.5	14415	26.0
58	S sep 0.5 M	465	0.6	279	16.0	26.7	7440	13.4
59	S sep 1 M	570	0.0	17	4.0	133.3	2280	4.1

*1 unit er delta abs/min

S sepharose (300 ml) pH 7.4					Monoamine oxidase (Benzylamide)			
	Fraction	Volum (ml)	Protein (mg/ml)	T. protein (mg)	Activity u/ml	Sp. activity units/mg	T. activity units	Utbytte %
51	Sp ekstrakt	2500	10.7	26750	4450	416	11125000	100.0
52	SP kons	252	92.3	23260	9775	106	2463300	22.1
53	SP dia	353	62.6	22098	11200	179	3953600	35.5
54	SP på	1500	14.0	21000	3850	275	5775000	100.0
55	S gj	1625	12.1	19663	3850	318	6256250	108.3
56a	S vask 1	600	0.7	420		0	0	
56b	S vask 2	2200	0.2	440		0	0	
56c	S vask 3	180	0.1	18		0	0	
57	S sep 0.25 M	465	2.7	1256	550	204	255750	4.4
58	S sep 0.5 M	465	0.6	279	178	296	82538	1.4
59	S sep 1 M	570	0.0	17	425	14167	242250	4.2

S sepharose (300 ml) pH 7.4					Monoamine oxidase (Tyramine)			
	Fraction	Volum (ml)	Protein (mg/ml)	T. protein (mg)	Activity u/ml	Sp. activity units/mg	T. activity units	Utbytte %
51	Sp ekstrakt	2500	10.7	26750	6050	565	15125000	100.0
52	SP kons	252	92.3	23260	16225	176	4088700	28.0
53	SP dia	353	62.6	22098	18575	297	6556975	43.4
54	SP på	1500	14.0	21000	6025	430	9037500	100.0
55	S gj	1625	12.1	19663	5400	446	8775000	97.1
56a	S vask 1	600	0.7	420		0	0	
56b	S vask 2	2200	0.2	440		0	0	
56c	S vask 3	180	0.1	18		0	0	
57	S sep 0.25 M	465	2.7	1256	450	167	209250	2.3
58	S sep 0.5 M	465	0.6	279	183	304	84863	0.9
59	S sep 1 M	570	0.0	17	425	14167	242250	2.7

Q sepharose (25 ml) pH 7.4				Protease pH 1.8			Utbytte
Fraction	Total volum (ml)	Protein (mg/ml)	Total protein (mg)	Activity units/ml	Sp. activity units/mg	Total activity units	
Q sep på	172	12,1	2081	235,0	19,4	40420,0	100,0
61 Q gj	188	6,1	1147	101,6	16,7	19100,8	47,2
62 Q sep 0.25 M	53	8,7	461	322,5	37,1	17092,5	42,3
63 Q sep 0.5 M	53	4,6	244	20,8	4,5	1102,4	2,7
64A Q sep 1 M A	53	0,8	42	16,0	20,0	848,0	2,1
64B Q sep 1 M B	53	0,2	11	3,0	15,0	159,0	0,4

Q sepharose (25 ml) pH 7.4				DNase pH 7			Utbytte
Fraction	Total volum (ml)	Protein (mg/ml)	Total protein (mg)	Activity units/ml	Sp. activity units/mg	Total activity units	
Q sep på	172	12,1	2081	8,3	0,7	1427,6	100,0
61 Q gj	188	6,1	1147	6,7	1,1	1259,6	88,2
62 Q sep 0.25 M	53	8,7	461			0,0	
63 Q sep 0.5 M	53	4,6	244			0,0	
64A Q sep 1 M A	53	0,8	42			0,0	
64B Q sep 1 M B	53	0,2	11			0,0	

Q sepharose (25 ml) pH 7.4				DNase pH 5			Utbytte
Fraction	Total volum (ml)	Protein (mg/ml)	Total protein (mg)	Activity units/ml	Sp. activity units/mg	Total activity units	
Q sep på	172	12,1	2081	34,2	2,8	5882,4	100,0
61 Q gj	188	6,1	1147	20,8	3,4	3910,4	66,5
62 Q sep 0.25 M	53	8,7	461	29,2	3,4	1547,6	26,3
63 Q sep 0.5 M	53	4,6	244		0,0	0,0	
64A Q sep 1 M A	53	0,8	42		0,0	0,0	
64B Q sep 1 M B	53	0,2	11		0,0	0,0	

Q sepharose (25 ml) pH 7.4				Laccase (ABTS)			Utbytte
Fraction	Total volum (ml)	Protein (mg/ml)	Total protein (mg)	Activity* units/ml	Sp. activity units/mg	Total activity units	
Q sep på	172	12,1	2081	1,6	0,1	275,2	100,0
61 Q gj	188	6,1	1147	1,3	0,2	244,4	88,8
62 Q sep 0.25 M	53	8,7	461	1,2	0,1	63,6	23,1
63 Q sep 0.5 M	53	4,6	244	1,5	0,3	79,5	28,9
64A Q sep 1 M A	53	0,8	42	0,3	0,4	15,9	5,8
64B Q sep 1 M B	53	0,2	11	0,0	0,0	0,0	

*1 unit er delta abs/min

Q sepharose (25 ml) pH 7.4				Esterase (4-NPA)			Utbytte
Fraction	Total volum (ml)	Protein (mg/ml)	Total protein (mg)	Activity* units/ml	Sp. activity units/mg	Total activity units	
Q sep på	172	12,1	2081	2,8	0,2	481,6	100,0
61 Q gj	188	6,1	1147	0,8	0,1	150,4	31,2
62 Q sep 0.25 M	53	8,7	461	3,4	0,4	180,2	37,4
63 Q sep 0.5 M	53	4,6	244	0,2	0,0	10,6	2,2
64A Q sep 1 M A	53	0,8	42	0,0	0,0	0,0	
64B Q sep 1 M B	53	0,2	11	0,0	0,0	0,0	

*1 unit er delta abs/min

Q sepharose (25 ml) pH 7.4				Aldolase			Utbytte
Fraction	Total volum (ml)	Protein (mg/ml)	Total protein (mg)	Activity u/ml x 10 ⁻³	Sp. activity units/mg x 10 ⁻³	Total activity units	
Q sep på	172	12,1	2081	149,0	12,3	25628,0	100,0
61 Q gj	188	6,1	1147	76,0	12,5	14288,0	55,8
62 Q sep 0.25 M	53	8,7	461	96,0	11,0	5088,0	19,9
63 Q sep 0.5 M	53	4,6	244	16,0	3,5	848,0	3,0
64A Q sep 1 M A	53	0,8	42	6,0	7,5	318,0	1,2
64B Q sep 1 M B	53	0,2	11		0,0	0,0	

Q sepharose (25 ml) pH 7.4				ALT			Utbytte
Fraction	Total volum (ml)	Protein (mg/ml)	Total protein (mg)	Activity units/ml	Sp. activity units/mg	Total activity units	
Q sep på	172	12,1	2081	20,0	1,7	3440,0	100,0
61 Q gj	188	6,1	1147	10,5	1,7	1964,6	57,1
62 Q sep 0.25 M	53	8,7	461	25,6	2,9	1356,8	39,4
63 Q sep 0.5 M	53	4,6	244	3,2	0,7	169,6	4,9
64A Q sep 1 M A	53	0,8	42	2,4	3,0	127,2	3,7
64B Q sep 1 M B	53	0,2	11		0,0	0,0	

Q sepharose (25 ml) pH 7.4				Amidase (CNBAA)			Utbytte
Fraction	Total volum (ml)	Protein (mg/ml)	Total protein (mg)	Activity* units/ml	Sp. activity units/mg	Total activity units	
Q sep på	172	12,1	2081	38,0	3,1	6536,0	100,0
61 Q gj	188	6,1	1147	32,0	5,2	6016,0	92,0
62 Q sep 0.25 M	53	8,7	461	56,0	6,4	2968,0	45,4
63 Q sep 0.5 M	53	4,6	244		0,0	0,0	
64A Q sep 1 M A	53	0,8	42	26,0	32,5	1378,0	21,1
64B Q sep 1 M B	53	0,2	11	2,0	10,0	106,0	1,6

*1 unit er delta abs/min

Q sepharose (25 ml) pH 7.4				Amidase (NBBA)			Utbytte
Fraction	Total volum (ml)	Protein (mg/ml)	Total protein (mg)	Activity* units/ml	Sp. activity units/mg	Total activity units	
Q sep på	172	12,1	2081	28,0	2,3	4816,0	100,0
61 Q gj	188	6,1	1147	20,0	3,3	3760,0	78,1
62 Q sep 0.25 M	53	8,7	461	48,0	5,5	2544,0	52,8
63 Q sep 0.5 M	53	4,6	244		0,0	0,0	
64A Q sep 1 M A	53	0,8	42	12,0	15,0	636,0	13,2
64B Q sep 1 M B	53	0,2	11	24,0	120,0	1272,0	26,4

*1 unit er delta abs/min

1 ml Q og S

Laccase (ABTS)						
Ekstrakt		Q pH 8,2	SpH 8,2		Q pH 5,0	SpH 5,0
pre 41	på satt, pH 8,2	4.8	4.8	på satt, pH 5,0	0.3	0.3
	gjennom	0	2.6	gjennom	0.1	0
	vask	0	0.6	vask		
	eluering 1M NaCl	1.7	0.4	eluering 1M NaCl	0	0
51	på satt, pH 8,2	3.2	3.2	på satt, pH 5,0	0.2	0.2
	gjennom	0	1.3	gjennom	0	
	vask	0	0.3	vask	0	
	eluering 1M NaCl	0.9	0.3	eluering 1M NaCl	0	0

Esterase (4-IIPA)						
Ekstrakt		Q pH 8,2	SpH 8,2		Q pH 5,0	SpH 5,0
pre 41	på satt, pH 8,2	2.2	2.2	på satt, pH 5,0	0.5	0.5
	gjennom	0.5	1.5	gjennom	0	0
	vask	0	0.3	vask	0	
	eluering 1M NaCl	1.1	0.4	eluering 1M NaCl	0.2	0
51	på satt, pH 8,2	2.3	2.3	på satt, pH 5,0	0.6	0.6
	gjennom	0.2	1.4	gjennom	0.4	0.3
	vask	0	0.3	vask	0	0
	eluering 1M NaCl	1.2	0.4	eluering 1M NaCl	0	0

Alkoholdehydrogenase (EtOH)						
Ekstrakt		Q pH 8,2	SpH 8,2		Q pH 5,0	SpH 5,0
pre 41	på satt, pH 8,2	0	0	på satt, pH 5,0		
	gjennom	0	0	gjennom	0	0
	vask			vask		
	eluering 1M NaCl	0	0	eluering 1M NaCl	0	0
51	på satt, pH 8,2			på satt, pH 5,0		
	gjennom	0		gjennom		
	vask			vask		
	eluering 1M NaCl	0		eluering 1M NaCl		

ALT						
Ekstrakt		Q pH 8,2	SpH 8,2		Q pH 5,0	SpH 5,0
pre 41	på satt, pH 8,2	7.23	7.23	på satt, pH 5,0		
	gjennom	0.8	4.0	gjennom		
	vask			vask		
	eluering 1M NaCl	4.15	2.41	eluering 1M NaCl		
51	på satt, pH 8,2	11	11	på satt, pH 5,0	0	0
	gjennom	0	0.032	gjennom		
	vask			vask		
	eluering 1M NaCl	3.2	1.6	eluering 1M NaCl		

Aldolase						
Ekstrakt		Q pH 8,2	SpH 8,2		Q pH 5,0	SpH 5,0
pre 41	på satt, pH 8,2	73.9	73.9	på satt, pH 5,0	9.6	9.6
	gjennom	0	41.8	gjennom		
	vask			vask		
	eluering 1M NaCl	28.9	9.6	eluering 1M NaCl		

Protease pH 1,8			
Ekstrakt		Q pH 8,2	SpH 8,2
pre 41	på satt, pH 8,2	145	145
	gjennom	3.9	85
	vask		
	eluering 1M NaCl	73	21

Amidase (IIBAA)						
Ekstrakt		Q pH 8,2	SpH 8,2		Q pH 5,0	SpH 5,0
pre 41	på satt, pH 8,2	27	27	på satt, pH 5,0	13	13
	gjennom	0	36	gjennom	11	3
	vask			vask		
	eluering 1M NaCl	10	70	eluering 1M NaCl	0	3

Amidase (IIBAA)						
Ekstrakt		Q pH 8,2	SpH 8,2		Q pH 5,0	SpH 5,0
pre 41	på satt, pH 8,0	30	30	på satt, pH 5,0	22	22
	gjennom	7		gjennom	15	7
	vask			vask		
	eluering 1M NaCl	34	0	eluering 1M NaCl	0	15

Appendiks 4: Oversikt over enzymmåtdata

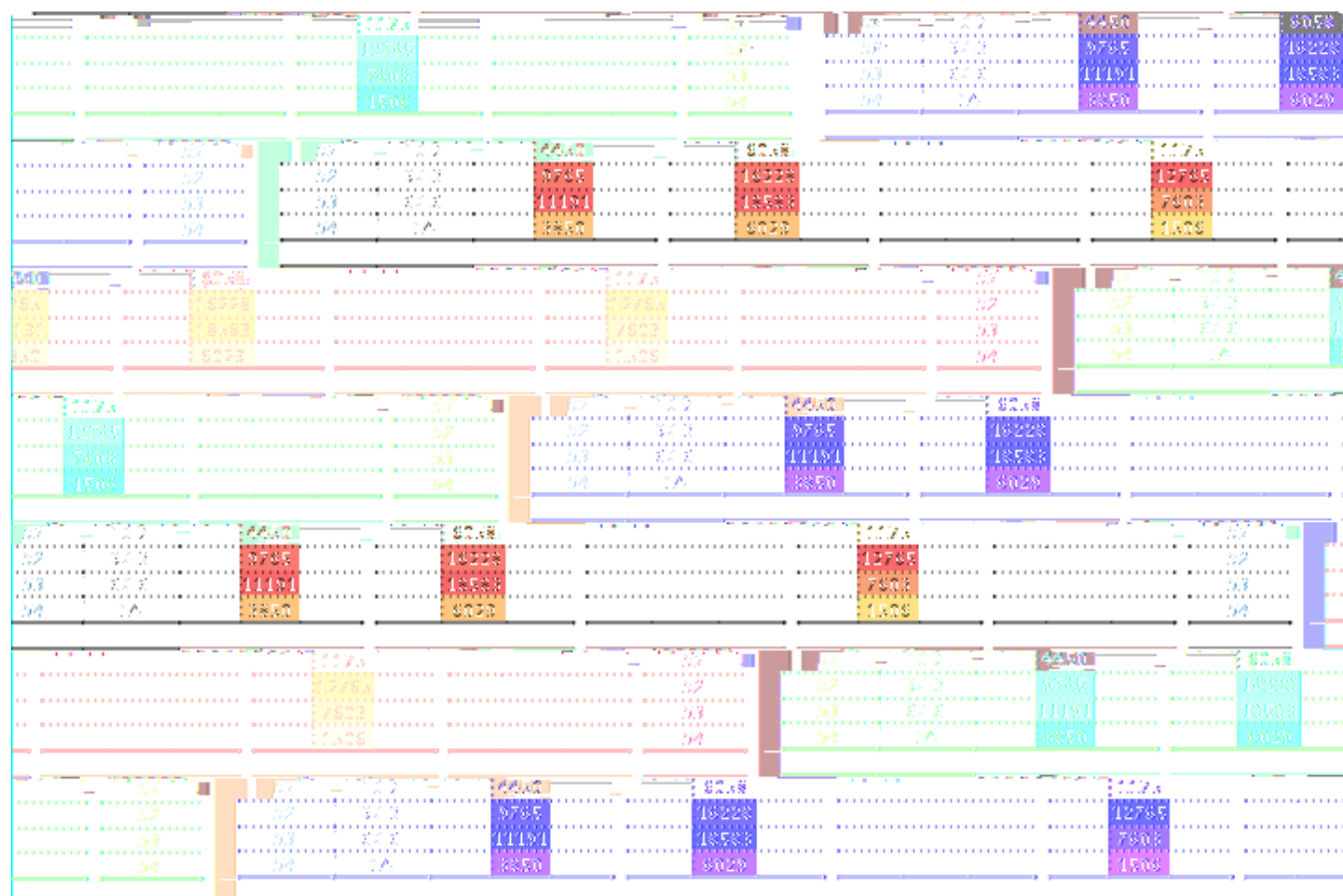
Enzyme Units	Prot. konc	ADH (Δabs/min/ml)	Laccase (Δabs/min/ml)			Esterase (Δabs/min/ml)			Esterase/Lipase (Δabs/min/ml)			Lipase (Δabs/min/ml)			Enzyme Units
Substrate		Ethanol	Substrate			4-NPA			4-NPB			4-NPO			Substrate
°C		8 RT 37	8 RT 37	8 RT 37	8 RT 37	8 RT 37	8 RT 37	8 RT 37	10 RT 37	10 RT 37	10 RT 37	10 RT 37	10 RT 37	10 RT 37	°C
Samples															Samples
"100"	10 / 11.5	+		1.30		0.70			1.40			18			"100"
"1"	2.2	0.16		0.20											"1"
"2"	2.2			0.20		0.20			1.20			0.20			"2"
A	7.3 / 1.1	-		0.20		0			0.60			0.10			A
43	1.2			0		0									43
AS	1.9 / 2.8	0		0.30		0.30			0.10			0			AS
10-20	0.4			0.10		0			0.30			0			10-20
20-40	2.4			0.10		0			0.30			0			20-40
40-60	2.8			0.70		0			0.30			0			40-60
60-80	1.3			0.40		0			0.30			0			60-80
C	6.7					0.05			0.05			0			C
CTS	4.6	0		0.50		0.40			0.10			0.80			CTS
CTH	4.0	+		0.40		0.70			0.20			0.20			CTH
AH	4.2	+		0.70		0.50			0.10			2.00			AH
41	7.5	0.16		2.4					19			4.5			41
42	11.4	0.32		3.4											42
B	15.8	-		0.45		11			11			1.3			B
BS	10.6 / 9.6	0		1.4		4.0			4.1			4.1			BS
"30"	3.9			0		0.13			1.2			0.4			"30"
"31"	5.3			0.30	0.80	0.20			2.8			0.5			"31"
D	16					0.48			12			1.1			D
DTS	11.3	0		1.4		4.8			5.8			32			DTS
BH	11.4	0.50		2.4		4.4			7.2			28			BH
DTH	11.8	0.40		3.8		4.8			7.6			24			DTH
51	10.7	0.30		2.7		3.0									51
52	92.3			23		19									52
53	62.6			12		15									53
54	14			2.7		3.3									54

Enzyme Units	Prot. konc	Amidase (mAbs/min/ml)	Amidase (mAbs/min/ml)			Phosphatase (mAbs/min/ml)			Phosphatase (mAbs/min/ml)			EH			Enzyme Units
Substrate		CNBAA	NBBA			G3-Ph			I5-Ph			Substrate			Substrate
°C		10 RT 37	10 RT 37	10 RT 37	10 RT 37	10 RT 37	10 RT 37	10 RT 37	10 RT 37	10 RT 37	10 RT 37	8 RT 37	8 RT 37	8 RT 37	°C
Samples															Samples
"100"	10 / 11.5	13		59								0	++		"100"
"1"	2.2											0	-		"1"
"2"	2.2											0	-		"2"
A	7.3 / 1.1											0	++		A
43	1.2	4.0	52	67	1)	64	48					0	+++		43
AS	1.9 / 2.8		32			27						0	+++		AS
10-20	0.4	8.7	41	27	25	21	29	0	29	760	0	54	6	0	10-20
20-40	2.4	4.1	61	72	35	43	62	0	55	160	0	100	22	0	20-40
40-60	2.8	10	75	61	33	35	46	15	220	110	0	85	20	0	40-60
60-80	1.3	0	0	11	32	0.0	3.9	200	52	34	0	10	0	0	60-80
C	6.7											0	+++		C
CTS	4.6		37			33						0	++		CTS
CTH	4.0		45			43						0	++		CTH
AH	4.2		80			66						0	+		AH
41	7.5	19	88	226	1)	85	236								41
42	11.4	16	72	252	1)	77	258								42
B	15.8											0	0		B
BS	10.6 / 9.6		9.2			12						0	+		BS
"30"	3.9	0	52	89	1)	27	101	210	360	550	100	260	350	0	"30"
"31"	5.3	1.0	36	76	1)	14	74	100	290	340	150	290	500	0	"31"
D	16											0	0		D
DTS	11.3		8.1			2.4							+++		DTS
BH	11.4		35			32						0	+		BH
DTH	11.8		40			27						0	+		DTH
51	10.7		39			42									51
52	92.3	7.0	143			143									52
53	62.6		130			113									53
54	14		44			37									54

1) extract precipitation at 10 degrees

When two prot. conc. values present = two measurements are used

Enzyme Units	Prot. konc	MAO/SSAO µmol/min/ml Benzylamide			MAO/SSAO µmol/min/ml Tyramine			µmol/min/ml Amplex red			GOx µmol/min/ml Glucose			Protease (Δabs/15 min/ml) pH 7	Enzyme Units
Substrate															Substrate
°C/måling		10	RT	37	10	RT	37	10	RT	37	8	RT	37	1	°C/måling
Samples															Samples
"100"	10/11.5		850			900			195			675			"100"
"1"	2.2														"1"
"2"	2.2														"2"
A	7.3/1.1														A
43	1.2	45.0	575	750	575	575	1150				400	575	1150		43
AS	1.9/2.8		235			275		0				600			AS
10-20	0.4	750	548	342	103	205	115.0				0	400	0		10-20
20-40	2.4	825	0	0	250	165	0				0	0	0		20-40
40-60	2.8	87.5	0	0	168	125	0				0	0	0		40-60
60-80	1.3	0	0	0	23	58	0				0	0	0		60-80
C	6.7														C
CTS	4.6		475			300		0				575			CTS
CTH	4.0		0			0		0				900			CTH
AH	4.2		375			0		103				0			AH
41	7.5	950	2475	1800	2100	4175	5325				750	1625	1700		41
42	11.4	1950	4100	2750	3525	6750	7125				950	2275	2750		42
B	15.8														B
BS	10.6/9.6		2450			1200		550				1500		88	BS
"30"	3.9	450	925	850	275	1150	925				22.5	400	1025		"30"
"31"	5.3	675	1600	1400	550	1300	1300				205	525	1050		"31"
D	16														D
DTS	11.3		2675			1800		1050				1350		108	DTS
BH			3950			4650		1500				2375			BH
DTH	11.8		4325			3875		1900				3325			DTH
51	10.7		4450			6058						1175			51
52	92.3		9765			16228						12765			52
53	62.6		11191			18583						7603			53
54	14		3850			6029						1506			54



Enzyme Units Substrate	Prot. konc	ALT NAD ⁺ /min/ml (μmol)	Lyzosyme mAbs/min/ml	Aldolase NAD ⁺ /min/ml (μmol)	PLA2 mAbs/min/ml	PLA2 (Ca ²⁺) mAbs/min/ml	Enzyme Units Substrate
Måling		1	1	1	1	1	°C
Samples							Samples
"100"	10 / 11.5	4.2		0	64	30	"100"
"1"	2.2						"1"
"2"	2.2	24	66	0			"2"
A	7.3 / 1.1	12	112	0.0			A
43	1.2	4.0	0	0.8			43
AS	1.9 / 2.8	0	200	0	9.0	0	AS
10-20	0.4	12	43				10-20
20-40	2.4	0	0				20-40
40-60	2.8	34	437				40-60
60-80	1.3	24	564				60-80
C	6.7	4.0	122	0			C
CTS	4.6	0	160	0	13	11	CTS
CTH	4.0	5.6	1)	0	13	6.3	CTH
AH	4.2	1.6	1)	0	6.0	12	AH
41	7.5	16	0	151			41
42	11.4	32	0	814			42
B	15.8	109	0	185			B
BS	10.6 / 9.6	0		0	39	23	BS
"30"	3.9	8.0		0			"30"
"31"	5.3	0		0			"31"
D	16	8.5	0	210			D
DTS	11.3	0.8		0	34	33	DTS
BH	11.4	34	1)	125	38	28	BH
DTH	11.8	29	1)	63	32	30	DTH
51	10.7	22		477			51
52	92.3	168		4320			52
53	62.6	114		1865			53
54	14	26		366			54

1) lysosyme hemmertilste

When two prot. conc. values present = two measurements are used

Appendiks 5: Sammanställning øver proteinmängdmålinger

I starten av forsøket (A-D / salt og hexanfelte ekstrakter) var det vanlig at proteinkonsentrasjonen ble bestemt på miksa ekstrakter, ofte også på ikke frosne ekstrakter. Dette gir veldig store utslag i proteintallene pga utfellinger.

Underveis i forsøkene og før vi starta opp med å måle aktivitet i smårøra, ble det bestemt at alle skulle sentrifugere de tinte rørene 5 min / 14 000g før aktivitet og protein ble målt på supernatanten.

Forsøket A-D har ingen proteinmålinger på sentrifugerte prøver, fordi målet med forsøket var å screene for mulige aktiviteter.

For andre ekstrahering ble det tint og sentrifugert prøver helt tilbake til A, for å kunne sammenlikne renseprosedyren.

Før innfrysing har alle ekstraktene vært ~klare, men etter frysing og tining av rørene kan en oppservere store utfellinger. Spesielt de sure ekstraktene gir store utfellinger. Mange rør får også etterfellinger ved henstand på is.

Aktivitetestallene refereres til sentrifugerte prøver, så derfor bør også proteintallene kobles til sentrifugerte prøver. Proteintall som er målt enkeltvis bør sees på som veiledende, fordi metoden gir store variasjoner. Dersom tallene skal sammenliknes bør de måles i samme serie og avleses i samme standardkurve. I tabellene har vi valgt å bruke snittet av flere fortynninger /målinger.

Mixa prøver Dato:			x 18.03.2011	x 23.03.2011	x 24.03.2011	x 04.07.2011	snitt
	anm.	Utseende	mg /ml	mg /ml	mg /ml	mg /ml	brukes i tabellen mg /ml
A 15/3-11	hom./4,5	melkehvit	11,1*	7.29	6,81**		7.3[†]
B 15/3-11	hom./9,0	melkehvit	16.3	15.79	15,04**		15.8
C 15/3-11	hom./4,5/triton	melkehvit	9,2*	6.72	6,42**		6.7
D 15/3-11	hom./9,0/triton	melkehvit	17.1	15.95	15,04**		16.0
AH 15/3-11 [#]	hom./4,5/hexan	4 ml A→klar		4.25			se nedan
BH 15/3-11 [#]	hom./9,0/hexan	4 ml B→klar		6.9			se nedan
CH 15/3-11 [#]	hom./4,5/triton/hexan	4 ml C→klar		4.18			se nedan
DH 15/3-11 [#]	hom./9,0/triton/hexan	4 ml D→klar		7.61			se nedan
AH 15/3-11:	hom./4,5/hexan	40 ml A→klar				4.16	4.2
BH 15/3-11:	hom./9,0/hexan	40 ml B→klar				11.44	11.4
CH 15/3-11:	hom./4,5/triton/hexan	40 ml C→klar				3.97	4.0
DH 15/3-11:	hom./9,0/triton/hexan	40 ml D→klar				11.79	11.8
E:	vann /hom./3,5	klar,utfell. henstand	3				3.0
F:	vann /magnet/3,5	klar,utfell. henstand	3.4				3.4
G:	vann /hom./10,3	klar,utfell. henstand	3.2				3.2
AS 18/3-11:	4,5 (AmSO4)	svak blakka	3.3	2.78			2.8[†]
BS 18/3-11:	9,0 (AmSO4)	klar	10.3	10.56			10.6[†]
BS						9.56	9.6[†]
CS 18/3-11:	4,5/triton(AmSO4)	klar	5.1	4.58			4.6
DS 18/3-11:	9,0/triton(AmSO4)	klar	10.8	11.31			11.3
1aa	(gult eppendorfrør)					11.51	11.5[†]

* ikke fortynna prøve,for lite volum

** nye fortynninger

[#] 4 ml småvolum hexanfelte prøver[†] två värden har använts i olika tabeller

Sentrifugerte prøver Mixa prøver Dato:	x 12.08.2011	x 13.10.2011	x 18.10.2011	x 18.10.2011	x 08.12.2011-1x	x 08.12.2011-2x	x 08.12.2011-3x	x snitt
	mg /ml	mg /ml	mg /ml	mg /ml	mg /ml	mg /ml	mg /ml	brukes i tabellen mg /ml
A		1.07						1.1 [†]
AS		1.86						1.9 [†]
30, pellet i pH 9		3,83 / 3,93						3.9
31, pellet i pH 9		5,26 / 5,39						5.3
41 Bjørnar 1		7.45						
42 Bjørnar 2		(10,5) / 12,54						
43 Bjørnar 3		1.27						
41F Bjørnar 1		7.71						7.7
42F Bjørnar 2		(10,51) / 12,29						11.4
43F Bjørnar 3		1.20						1.2
1aa (GFC filtrert)		(9,38) / 10,63						10 [†]
1. (4,8 l)		2.20	(3,97) / 7,42	2.87				2.2
2. (4,1 l)		2.16	2,92 / 3,65	2.88				2.2
10-20% AmSO ₄	3**	0.20	0,80 / 0,90	0,31 / 0,71				0.4
20-40% AmSO ₄	9.5**	0.93	3,69 / 5,49	2,12 / 4,11				2.4
40-60% AmSO ₄	11.47**	1.78	3,24 / 5,08	2,51 / 4,15				2.8
60-80% AmSO ₄	1.29**	1.17	1.45	1.33				1.3
51					10.7			10.7
52					97.7	94.3	84.8	92.3
53					61.3	66.6	59.9	62.6
54					14.4	14.5	13.1	14.0
55					12.3	12.7	11.4	12.1
56-V1					0.7			0.7
56-V2					0.2			0.2
56-V3					0.1			0.1
57					2.7			2.7
58					0.7	0.6	0.5	0.6
59					0.03	0.03	0.02	0.03
55					12.3			12.3
61					6.1			6.1
62					8.7			8.7
63					4.6			4.6
64A					0.8			0.8
64B					0.2			0.2
64C					0.1			0.1

** En viss usikkerhet beheftet med disse tall (antakeligvis tall fra før dialyse)

[†] två värden har använts i olika tabeller

Article

Efficient Screening of Marine Extracts for Protease Inhibitors by Combining FRET Based Activity Assays and Surface Plasmon Resonance Spectroscopy Based Binding Assays

Tony Christopeit ^{1,2,*}, Kersti Øverbø ¹, U. Helena Danielson ² and Inge W. Nilsen ¹

¹ Nofima AS, Muninbakken 9-13, Tromsø 9291, Norway; E-Mails: kersti.overbo@nofima.no (K.Ø.); inge-w.nilsen@nofima.no (I.W.N.)

² Department of Chemistry—BMC, Uppsala University, Box 576, Uppsala 751 23, Sweden; E-Mail: helena.danielson@kemi.uu.se

* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: tony.christopeit@nofima.no; Tel.: +47-77-62-9234.

Received: 3 July 2013; in revised form: 20 October 2013 / Accepted: 21 October 2013 /

Published: 30 October 2013

Abstract: The screening of extracts from marine organisms is a widely used strategy to discover new drug leads. A common problem in the screening process is the generation of false positive hits through unspecific effects from the complex chemical composition of the crude extracts. In this study, we explored a combination of a fluorescence resonance energy transfer (FRET) based activity assay and a surface plasmon resonance (SPR) based binding assay to avoid this problem. An aqueous extract was prepared from rest raw material of the Norwegian spring spawning herring, and further fractionated by methanol solubility and solid phase extraction. FRET based activity assays were used to determine the influence of each extract on the activity of different proteases. Several extracts showed more than 50% inhibition. The inhibition mechanisms were elucidated by SPR based competition experiments with known inhibitors. For the secreted aspartic proteases 1, 2, 3 and HIV-1 protease, the results indicated that some extracts contain inhibitors interacting specifically with the active site of the enzymes. The study shows that a combination of an activity assay and an SPR based binding assay is a powerful tool to identify potent inhibitors in marine extracts. Furthermore, the study shows that marine vertebrates offer an interesting source for new bioactive compounds, although they have rarely been explored for this purpose.

Keywords: HIV-1 protease; secreted aspartic proteases; marine vertebrates; Norwegian spring spawning herring; *Clupea harengus* L.

1. Introduction

Small organic molecules produced by marine organisms are a vast source for novel bioactive compounds and drugs leads [1]. During the last decades, new bioactive compounds with anti-cancer, anti-bacterial and anti-fungal activity have been isolated from marine sources, proving the high potential of marine drug discovery [2,3].

One of the first steps in marine drug discovery is the production of crude fractionated extracts from a selected marine source [4]. Extracts containing bioactive compounds are identified by different types of screening assays. In phenotypic based cell assays, the presence of bioactive compounds is indicated by the influence on the proliferation or viability of e.g., cancer cells or pathogenic microorganism. Target based cell assays utilize genetically modified cells expressing a drug target coupled to a reporter system. In contrast, cell free assays use pure proteins to measure the influence on a special drug target [5,6]. However, a problem with all these assays is the generation of false positive hits, especially during screening of crude marine extracts with their complex chemical compositions [7].

A widely used type of screening assay to identify bioactive compounds inhibiting proteases, an important class of drug targets, are fluorescence resonance energy transfer (FRET) based activity assays due to the simple design of substrates, the high sensitivity of the read out and the real time monitoring of cleavage [8]. FRET based activity assays give direct information about the inhibitory effects of an extract. However, only little information is obtained about the inhibition mechanism. Hence false positives are often found, caused by the complex chemical composition of the extracts influencing the assay, e.g., interaction with the substrate, changes in pH or influence on the fluorescence read out. A more recently developed type of screening assay to study protease inhibitors involves the analysis of binding to the target, using surface plasmon resonance spectroscopy (SPR) [9–11]. Such assays enable the elucidation of the interaction mechanism and the discrimination between specific and unspecific interactions. In this way, SPR based binding assays allow the identification of false positive hits from activity assays and are hence a good complement. However, SPR based binding assays give no information about the inhibitory effects of an extract, which makes the combination with activity assays inevitable. Despite the clear advantages of the method and the widely use for the screening of chemical libraries [12], SPR rarely has been applied to extracts from natural sources [13].

The process of marine drug discovery is strongly dependent on the supply of sufficient biological material of the marine source for identification, isolation and structure determination of a bioactive compound. However, the marine invertebrates and microorganisms used in marine drug discovery are often only available in small quantities, expensive to collect, or in the, case of microorganism, difficult to cultivate [14,15]. On the other hand, marine vertebrates are available in large amounts, often as rest material from the fishing industry. Furthermore, these large amounts of biological material often have a constant composition due to the collection under similar conditions. Despite these clear advantages, marine vertebrates have rarely been used in marine drug discovery [1].

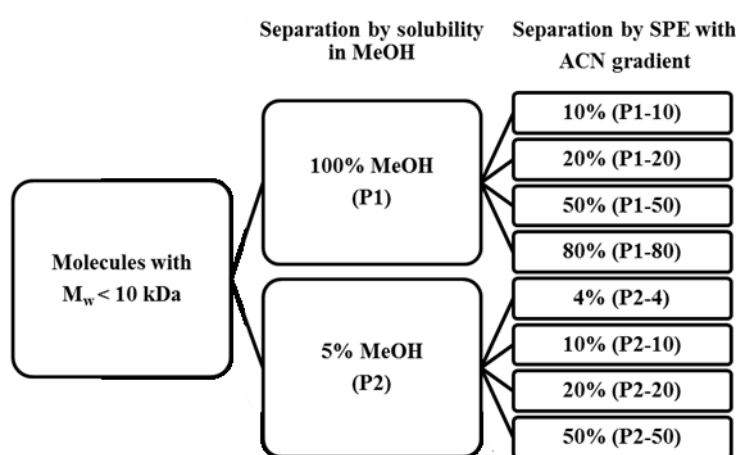
Proteases are important drug targets for many different diseases and several protease inhibitors are now in clinical use, targeting, e.g., HIV-1 protease, renin and thrombin [16]. Furthermore, several proteases are currently under investigation as promising drug targets, like secreted aspartic proteases (SAP) for candidiasis [17], the human cytomegalovirus (HCMV) protease for HCMV [18] and the β -site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1 (BACE1) for Alzheimer's disease [19].

In this study, we explored extracts from the Norwegian spring spawning herring for inhibitors of the proteases SAP1, 2 and 3 from *Candida albicans*, HIV-1 protease, pepsin, BACE1 and HCMV protease. A novel approach was used by combining a FRET based activity assay and an SPR based binding assay. The FRET based activity assay allowed the identification of extracts inhibiting the proteases, whereas the SPR based binding assay elucidated the mechanism causing the inhibition. In this way it was possible to identify extracts containing promising protease inhibitors.

2. Results and Discussion

An extract containing low molecular weight compounds ($MW < 10$ kDa) was prepared from rest raw material of the Norwegian spring spawning herring. The extract was further fractionated by differential solubility in methanol and solid-phase extraction (SPE), using a C18 column and an acetonitrile (ACN) gradient (Figure 1). The resulting extracts were screened for protease inhibition by FRET based activity assays. In addition, extracts were subsequently screened by an SPR based binding assay to verify true inhibitors or to discharge false positive hits.

Figure 1. Separation scheme for the crude extracts using differential solubility in MeOH and solid-phase extraction (SPE). Soluble material was first extracted with 100% and 5% MeOH. For further fractionation by SPE, the extracts were loaded onto a C18 column and eluted with different acetonitrile (ACN) concentrations. The nomenclature for the extracts is shown in brackets.



2.1. Screening for Inhibitors of HIV-1 Protease, SAP1, SAP2, SAP3 and Pepsin

HIV-1 protease, SAP1, 2 and 3 from *Candida albicans* and pepsin belong to the group of aspartic proteases and share a common catalytic mechanism. Despite their different origin from a vertebrate, a fungus and a retrovirus, their active sites have high structural similarities and interact with the same

active site inhibitors, e.g., acetyl-pepstatin and saquinavir [10,20,21]. The results from the FRET based activity assay and the SPR based binding assay were similar for HIV-1 protease, SAP1, SAP2, SAP3 and pepsin.

In the FRET based activity assay, all extracts were screened for protease inhibition in a dilution of 1:300 (Table 1). The dilution was to be chosen as low as possible to ensure the detection of low inhibitor amounts in the extracts. However, dilutions lower than 1:300 resulted in strong background signals, interfering with the read out of the FRET based activity assay.

Table 1. Inhibition of protease activities by extracts from *Clupea harengus*. Inhibition higher than 50% is highlighted (bold). Errors were calculated as the standard deviation from three independent experiments.

Extract	% Inhibition						
	HIV-1 protease	SAP1	SAP2	SAP3	Pepsin	BACE1	HCMV Protease
P1-10	27 ± 1	11 ± 1	−5 ± 6	−6 ± 1	5 ± 2	7 ± 1	41 ± 4
P1-20	70 ± 13	47 ± 1	36 ± 15	44 ± 1	34 ± 2	44 ± 3	71 ± 4
P1-50	56 ± 6	75 ± 11	68 ± 4	76 ± 3	47 ± 13	27 ± 3	68 ± 10
P1-80	−1 ± 1	29 ± 4	60 ± 1	51 ± 1	54 ± 14	2 ± 4	45 ± 5
P2-4	11 ± 1	10 ± 7	4 ± 11	6 ± 4	11 ± 11	3 ± 3	43 ± 6
P2-10	14 ± 3	21 ± 8	−5 ± 4	8 ± 4	10 ± 5	11 ± 3	49 ± 2
P2-20	28 ± 3	−5 ± 15	7 ± 1	−2 ± 7	12 ± 1	22 ± 4	30 ± 9
P2-50	−18 ± 4	8 ± 5	36 ± 13	14 ± 1	13 ± 6	9 ± 1	10 ± 3

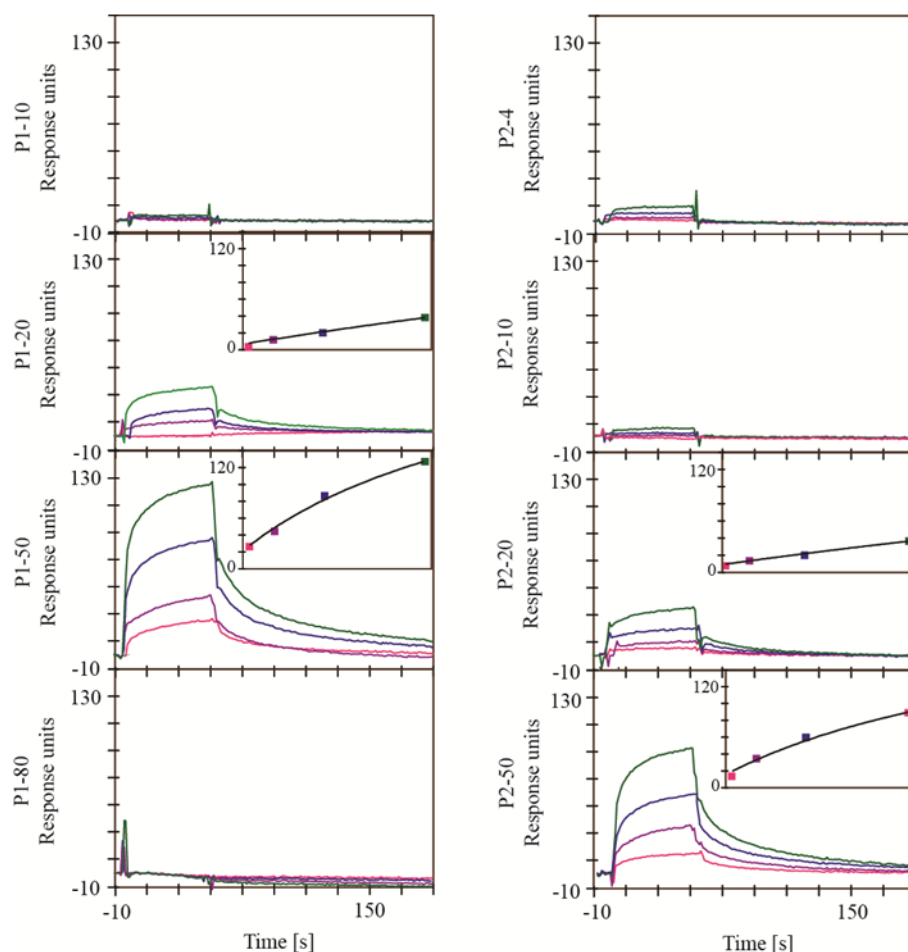
Extracts P1-20 and P1-50 reduced the protease activities by more than 30% and 45%, respectively. Extract P1-80 inhibited all proteases, except HIV-1 protease, by more than 30%. Extract P2-50 increased the activity of the HIV-1 protease. All other extracts had only weak effects on the protease activities. For confirmation of the results obtained with the 1:300 dilutions, all extracts were also tested at a dilution of 1:600. The results from both dilutions were in accordance, although inhibition was higher with the lower dilution 1:300. The mechanisms causing the detected inhibitions were not clear and hence an SPR based binding assay was used to elucidate the inhibition mechanism.

In the SPR based binding assay, all extracts were analyzed using an active surface with the immobilized protease and an empty surface for reference corrections. Several extracts produced sensorgrams with concentration dependent signals (data not shown). However, the interpretation of the sensorgrams was difficult due to high bulk effects, a common problem in SPR spectroscopy, especially for complex samples or if there are large differences between the active and the reference surfaces [22]. Additionally, the steady state plots showed a linear concentration dependency and high saturation values, typical for nonspecific binding which can mask specific interactions [23]. To overcome these problems alternative experimental setups for the SPR based binding assay were developed.

In the experimental setup A, a surface with the immobilized protease and the active site blocked by an inhibitor was used for reference correction. Since the only difference between the active and the reference surface was the blocking of the active site, it was expected to reduce signals from bulk effects and nonspecific interactions. Furthermore, this experimental setup allowed identification of extracts containing compounds, which compete with inhibitors binding to the active site of a protease. However, this type of experimental setup is dependent on the availability of an active site inhibitor

with a slow dissociation. For the HIV-1 protease, the active site inhibitor saquinavir meets this requirement and was hence used to prepare the reference surface [24]. Every extract was analyzed at four different concentrations (Figure 2).

Figure 2. Sensorgrams from the surface plasmon resonance (SPR) based binding assay for the interaction of the extract with HIV-1 protease using experimental setup A. A surface with immobilized HIV-1 protease and the active site blocked by saquinavir was used for reference correction. Extracts were analyzed in dilutions of 1:80 (green), 1:160 (blue), 1:320 (purple) and 1:640 (pink). Responses are shown as absolute responses. Insets show the steady state plots.

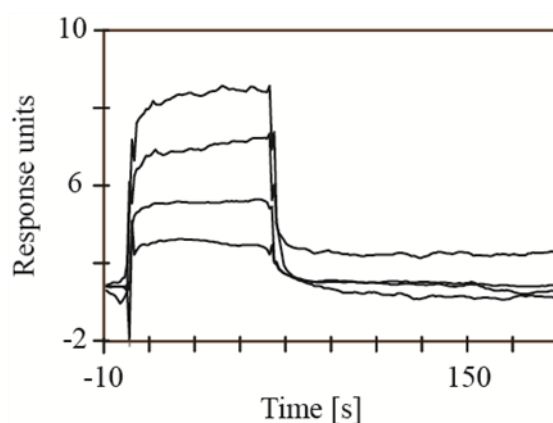


Extracts P1-20, P1-50, P2-20 and P2-50 showed sensorgrams with association and dissociation phases indicative of actual interactions. The corresponding steady state plots showed concentration dependency and saturations levels between 230 and 300 RU, reasonable for an interaction with a small molecule. Hence, it can be assumed that the extracts contain compounds specifically interacting with the active site of the HIV-1 protease. For SAP1, SAP2 and SAP3, an inhibitor with sufficiently slow dissociation was not available for preparation of a stable reference surface. Experimental setup B was therefore developed to test the extracts.

In the experimental setup B, every extract was analyzed in the presence and the absence of an active site inhibitor. The sensorgrams obtained in the presence of the active site inhibitor were used for

reference correction. In this way, it was possible to remove signals from nonspecific binding as well as bulk effects. To validate this type of experimental setup, it was used to study the interaction between HIV-1 protease and acetyl-pepstatin (Figure 3). Although the quality of the obtained sensorgrams were not good enough to determine kinetic values, probably due to secondary effects caused by the competition of the inhibitors, it was clearly possible to detect an interaction. Furthermore, the sensorgrams indicate an affinity in a μM range for acetyl-pepstatin, which is in accordance with the literature [9]. Hence, experimental setup B is suitable to study the marine extracts.

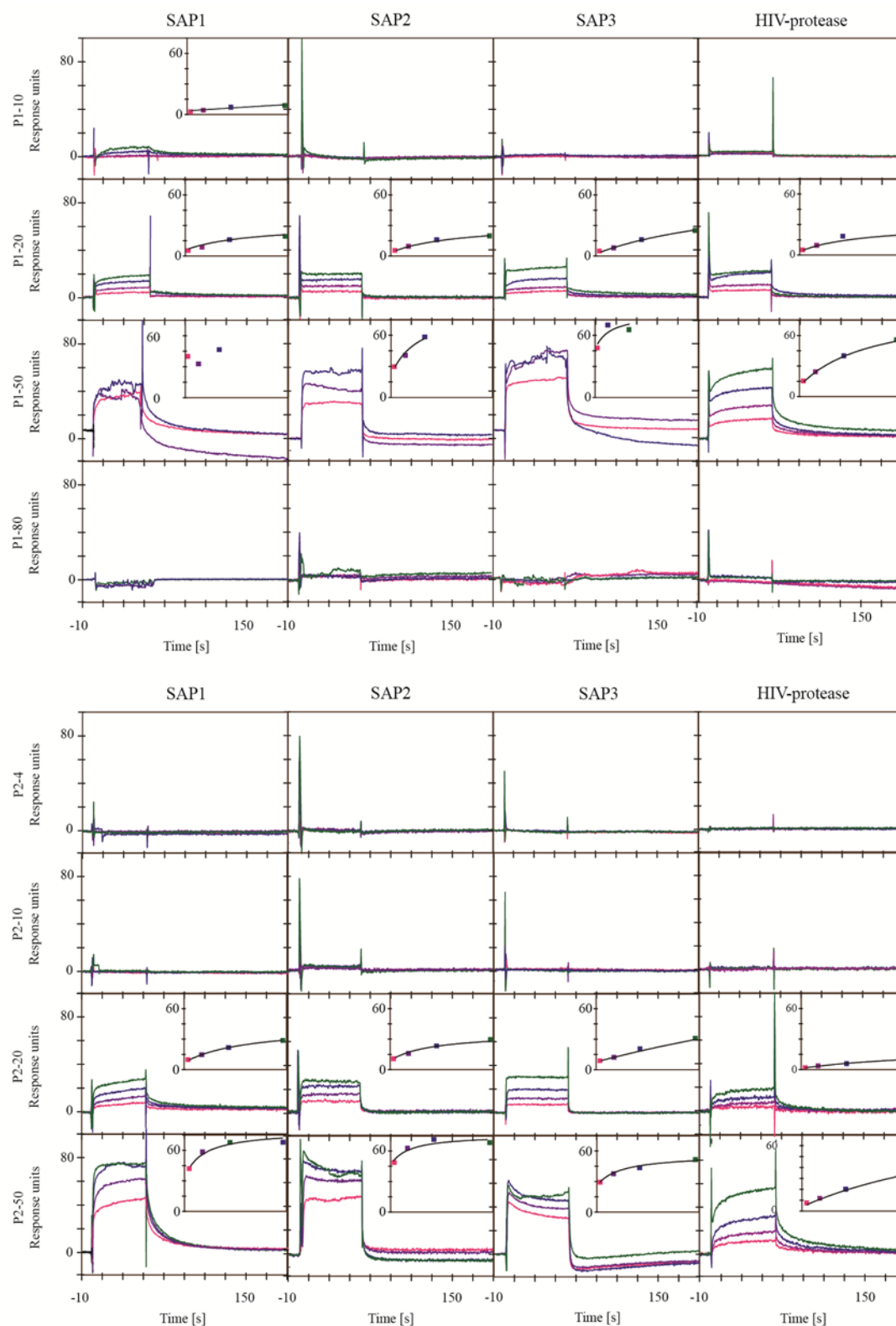
Figure 3. Interaction of acetyl-pepstatin with HIV-1 protease using experimental setup B. Acetyl-pepstatin was analyzed using 10, 20, 40 μM and 80 μM . Sensorgrams recorded in the presence of saquinavir were used for reference correction.



Every extract was analyzed at four different dilutions with SAP1, SAP2, SAP3 and HIV-protease using experimental setup B (Figure 4). Extracts P1-20, P1-50, P2-20 and P2-50 were found to contain compounds interacting with the proteases. The association and dissociation of the interactions were fast and did not allow the determination of association or dissociation rate constants. Steady state plots showed a concentration dependency with saturation levels between 30 RU and 105 RU, which is reasonable for a specific interaction with a small molecule. For the SAP's, the dilution 1:80 of extract P1-50 was removed from the sensorgrams due to problems with solubility, which is also reflected in the poor quality of the sensorgrams with higher dilution. Extracts P1-50 and P2-50 reached saturation, which is a strong indication for a specific interaction. The results show that the extracts contained compounds competing with the active site inhibitors used, and hence most likely bind to the active site of the proteases. All other extracts showed no or only weak signs of interactions. The results obtained for HIV-1 protease with experimental setup B were in accordance with the results obtained from experimental setup A.

No reliable SPR data were generated for pepsin due to high DMSO sensitivity of the enzyme, reported earlier [25]. The high DMSO sensitivity was also reflected in the high standard deviation of the inhibition values for pepsin from the FRET based activity assay.

Figure 4. Sensorgrams from the SPR based binding assay for the interaction of the extracts with SAP1, SAP2, SAP3 and HIV-1 protease using experimental setup B. Sensorgrams for reference correction were recorded in the presence of 300 μ M saquinavir for HIV-1 protease and 300 μ M acetyl-pepstatin for SAP1, SAP2 and SAP3. Extracts were analyzed in dilutions of 1:80 (green), 1:160 (blue), 1:320 (purple) and 1:640 (pink). Responses are shown as absolute responses. Insets show the steady state plots.



The combination of the results from the FRET based activity assay and the SPR based binding assay allowed the identification of extracts containing promising protease inhibitors. Extracts P1-20 and P1-50 showed high inhibition in the FRET based activity assay. The SPR based binding assay demonstrated that the inhibition was most likely due to interaction with the active site of the proteases. Hence these extracts are interesting candidates for a further purification of the contained inhibitor. Extracts P2-20 and P2-50 showed clear signs of interaction in the SPR based binding assay, but only weak inhibition potency in the FRET based activity assay. For the HIV-1 protease even an increase in the monitored activity was observed. Although it is possible that an increase of the protease activity is caused by a direct interaction with an allosteric site, it is more likely caused by influencing assay conditions and thereby masking the potential influence of an inhibitor. It has been reported before that small amounts of organic solvents can increase the activity of proteases, e.g., trypsin [25]. However, despite the good results from the SPR based binding assay, the fractions P2-20 and P2-50 might not be good candidates for further inhibitor purification, since it is not clear that the observed interaction can inhibit the proteases. Extract P1-80 showed high inhibition potency in the FRET assay for SAP1, SAP2, SAP3 and pepsin. In contrast, the SPR studies showed no signs of interaction. The extract P1-80 contains mainly compounds with a hydrophobic character since it was prepared by elution with 80% acetonitrile during solid phase extraction. The FRET substrates also have a hydrophobic character. Hence, it is likely that the inhibition observed in the FRET based activity assay is a false positive, caused by interaction between the substrates and small molecules from the extract. Extracts P1-10, P2-4, P2-10 showed no inhibition in the FRET assay or any signs of interaction in the SPR based binding assay. These extracts are therefore not considered for further purification.

2.2. Screening for Inhibitors of BACE1

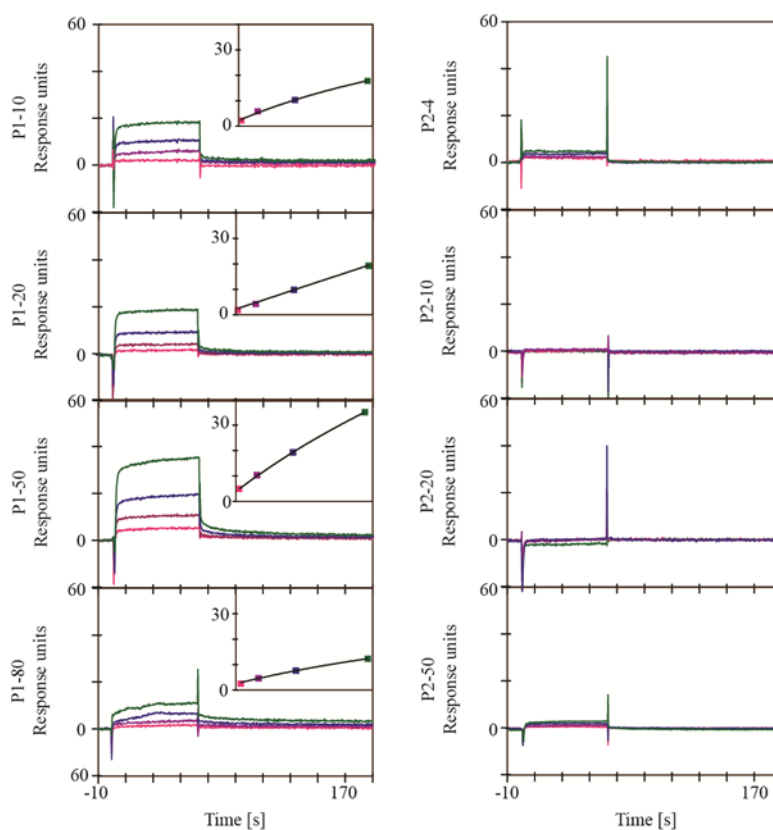
BACE1 belongs to the group of aspartic proteases. In contrast to other aspartic proteases, BACE1 is a transmembrane protein and only poorly inhibited by common aspartic protease inhibitors, e.g., acetyl-pepstatin [26]. It is therefore not surprising that the extracts showed different results in the FRET based activity assay for BACE1 compared with the other aspartic proteases used in this study. Only extract P1-20 showed a clear inhibition with 44% reduction of protease activity. All other extracts showed only weak inhibitions. The extracts were also analyzed in an SPR based binding assay with full length BACE1 embedded into a lipid membrane. The sensorgrams showed strong bulk effects and signs of nonspecific interactions, which did not allow any interpretations of the sensorgrams. Although it was possible to reduce the bulk effects by preparing a reference surface with BACE1 blocked by the high affinity active site inhibitor Om99-2 [27], the interpretation of the sensorgrams were still difficult and they showed no clear signs of a specific interaction (data not shown). BACE1 is a transmembrane protease and hence the immobilization for the SPR based binding assay was more complex compared to that for the other proteases used in this study [11]. The prepared surface did not only contain BACE1, but also an immobilized antibody and a lipid membrane. Especially the lipid membrane might cause strong nonspecific interaction since it can interact with a broad range of small molecules. Additionally, the complex structure of the surface increases the chances to have significant differences between the active and the reference surface, which complicates the reference corrections for removing signals from bulk effects and nonspecific interactions. Although interaction studies with

pure compounds did not show any problems [11], the complex chemical composition of the extracts in combination with the complex structure of the SPR based binding assays may have generated these problems. Without any result from the SPR based binding assay, it is difficult to make assumption about the specificity of the inhibition. Hence, none of the extracts are considered for further purification. Furthermore, this shows a clear limitation of the SPR based binding assay. Despite the proofing of different experimental setups and the availability of a high affinity inhibitor, it was not possible to gain sensorgrams of good quality due to the complexity of the SPR based binding assay.

2.3. Screening for Inhibition of HCMV Protease

HCMV protease belongs to a special class of serine proteases and is an interesting drug target for antiviral therapy against HCMV, although no inhibitors are in clinical use yet [18]. The extracts were tested in a FRET based activity assay in a dilution 1:300. All extracts prepared with 100% MeOH (P1) inhibited HCMV protease by more than 40% with P1-20 and P1-50 showing the highest inhibitions of 71% and 68%, respectively. All extracts prepared with 5% MeOH (P2), except P2-50, showed inhibitions higher than 30% (Table 1).

Figure 5. Sensorgrams from the SPR based binding assay for the interaction of the extracts with HCMV protease. Extracts were analyzed in dilutions of 1:80 (green), 1:160 (blue), 1:320 (purple) and 1:640 (pink). Responses are shown as absolute responses. Insets show the steady state plots.



In the SPR based binding assay, the extracts prepared with 100% MeOH (P1) generated sensorgrams with association and dissociation phases indicative of interacting compounds (Figure 5).

Although the steady state plots showed concentration dependency, the saturation levels were as high as 3700 RU, indicating a nonspecific interaction. Since no high affinity inhibitor for HCMV protease is available, competition experiments could not be used to verify a specific interaction. This shows a limitation of the SPR based binding assay and the experimental setups used in this study, since a final confirmation of a specific interaction is dependent on the availability of a potent inhibitor. Although it cannot be completely excluded that unspecific binding masks a specific interaction, none of the extracts prepared with 100% MeOH are considered for a further purification. The extracts prepared with 5% MeOH (P2) showed only weak signs of interactions in the SPR based screening assay. This shows that the inhibition of these extracts detected in the FRET based activity assay were not caused by a specific interaction and were hence false positives.

3. Experimental Section

3.1. Preparation of Extracts from Norwegian Spring Spawning Herring

One kilogram of frozen grinded rest raw material (remaining material after fillet production) from Norwegian spring spawning herring (*Clupea harengus*) was dissolved in 4 L water and the pH adjusted to 4.5 with acetic acid. All insoluble material was separated from the solution by centrifugation for 30 min at 14,000× g. The supernatant was removed and a Pelicon XL/10 kDa filter was used to isolate all molecules with $M_w < 10$ kDa. After filtration the material was freeze dried and stored at -20 °C. The soluble material was extracted from 1 g of the freeze dried powder using four times 2 mL methanol/0.025% trifluoroacetic acid (TFA). Insoluble materials were removed by centrifugation for 5 min at 800 g. In a second step, the extraction was repeated with two times 2.5 mL 5% methanol/0.025% TFA. All extracts were again freeze dried and stored at -20 °C.

The freeze dried extracts were dissolved in water with 0.1% TFA and further fractionated by solid phase extraction using a RapidTrace Workstation (Caliper Life sciences, Hopkinton, MA, USA). The extracts were applied to a 200 mg Sep-Pak C18 cartridge (Waters, Milford, MA, USA), washed with 3 mL water with 0.1% TFA and eluted with different concentrations of acetonitrile (Figure 1). All extracts were analyzed by HPLC using a LC-20A prominence system (Shimadzu, Duisburg, Germany) and a SymmetrieShield RP18 column (3.5 μ m, 3.0 mm × 20 mm, Waters, Milford, MA, USA). The mobile phase was composed of 2% ACN and 0.1% formic acid. During elution, the acetonitrile (ACN) concentration was increased to 98% in a linear gradient within 4 min. For the activity, assays and binding assay all samples were freeze dried and dissolved in as little DMSO as practically possible.

3.2. Protease Production and FRET Based Activity Assay

Proteases were recombinantly expressed and purified or purchased from commercial sources. FRET based activity assays were used to determine the influence of the extracts on the protease activity. All extracts were tested at a final dilution of 1:300 and 1:600. The substrates and the extracts dissolved in pure DMSO were diluted with buffer to match the DMSO concentration of the assay buffers. Signal increases were recorded with a fluorescence plate reader for 10, 20 or 30 min dependent on the enzyme activity. All activity measurements were done as duplicates. The mean values of the duplicates were used to calculate the percentage of enzyme inhibition by comparing the signal increases with a

reference without extracts. The final percentage of enzyme inhibition was calculated as average from three independent experiments. Errors were calculated as standard deviation.

3.2.1. HIV-1 Protease

The enzyme was recombinantly expressed in *Escherichia coli*, purified and the activity confirmed according to published procedures [9]. The FRET assay was carried out with the purified enzyme and an internally quenched peptide substrate DABCYL- γ Abu-Ser-Gln-Asn-Tyr-Pro-Ile-Val-Gln-EDANS (Bachem, Bubendorf, Switzerland). The final concentration in each well was 15 nM HIV-1 protease and 10 μ M substrate. The assay buffer consisted of 100 mM Na-acetate, 50 mM NaCl, pH 5.0 and 5% DMSO.

3.2.2. SAP1, SAP2 and SAP3

SAP1, SAP2 and SAP3 from *Candida albicans* were expressed, purified and the activity tested according to published procedures [28]. The custom synthesized FRET substrate DABCYL-Lys-Pro-Phe-Glu-Leu-Phe-Lys-Leu-Glu-EDANS (Biomatik, Wilmington, DE, USA) was used at a concentration of 3.33 μ M. The final enzyme concentration was 5.3 nM for SAP1, 1.6 nM for SAP2 and 31.3 nM for SAP3. The assay buffer contained 100 mM Na-acetate, 150 mM NaCl, pH 3.8 and 5% DMSO.

3.2.3. Pepsin

The protease was purchased from Sigma-Aldrich (St. Louise, MO, USA) and the FRET substrate MOCAC-Ala-Pro-Ala-Lys-Phe-Phe-Arg-Leu-Lys(Dnp)-NH₂ from Peptide (Osaka, Japan). The assay was carried out in 0.1 M formic acid buffer, pH 3.0 with an enzyme concentration of 1.1 nM and a final substrate concentration of 1.6 μ M.

3.2.4. BACE1

Full length BACE1 was expressed in Sf9 cells. For the FRET based activity assay, the Sf9 cells were lysed in PBS with 2% Triton and all insoluble material was removed by centrifugation. The supernatant was directly added to the internally quenched substrate EDANS-Glu-Val-Asn-Leu-Asp-Ala-Glu-Phe-Lys-DABCYL (Bachem, Bubendorf, Switzerland) at a final substrate concentration of 4.9 μ M in buffer consisting of 100 mM Na-acetate, 50 mM NaCl, pH 4.5, 5% DMSO and 2% Triton. The FRET assay and the protein expression were carried out as previously described [11].

3.2.5. HCMV Protease

The enzyme was expressed in *Escherichia coli* and purified according to published procedures [29,30]. The internally quenched peptide DABCYL-Arg-Gly-Val-Val-Asn-Ala-Ser-Ser-Arg-Leu-Ala-EDANS (Bachem, Bubendorf, Switzerland) was used as FRET substrate at a final concentration of 1.25 μ M. The final enzyme concentration was 33 nM. The assay buffer contained 100 mM TES, 50 mM NaCl pH 7.6, 0.1 mM EDTA 15% glycerol and 5%DMSO.

3.3. SPR Based Binding Assays

All SPR assays were performed at 25 °C with Biacore S51 or Biacore 2000 instruments (GE Healthcare, Uppsala, Sweden). The extracts were injected for 60 s at dilutions of 1:80, 1:160, 1:320 and 1:640. The dissociations were recorded for 2 min.

3.3.1. HIV-1 Protease

Between 3500 and 5500 RU HIV-protease was immobilized and cross linked as previously described [9]. All experiments were carried out in 100 mM Hepes pH 7.4, 50 mM NaCl and 5% DMSO. The extracts were tested in two different experimental setups. In experimental setup A, reference correction was done by a surface with immobilized HIV-1 protease, where the active sites were blocked by three injections for 30 s of 1 µM saquinavir (Sigma-Aldrich, St. Louise, MO, USA) previously to every dilution series. In the experimental setup B, the sensorgrams were also recorded in the presence of 300 µM saquinavir (Sigma-Aldrich, St. Louise, MO, USA), reference corrected and subtracted from sensorgrams recorded in the absence of saquinavir.

3.3.2. SAP1, SAP2 and SAP3

All SAP's were biotinylated and immobilized as earlier described [10,28]. Shortly, the protease buffer was changed to 0.1 M phosphate buffer pH 7.2 and incubated in 1:1 molar ratio with Biotin-X-NHS (Calbiochem, San Diego, CA, USA) for 30 min at 22 °C. The final concentration of enzyme was around 2 µM. Unreacted biotin-X-NHS was removed by centrifugal filter devices with a molecular cut off ~30 kDa and the buffer changed to 100 mM Na-acetate, 150 mM NaCl and pH 4.75. For immobilization, the proteins were injected for 20 min over a surface with immobilized streptavidin (Sigma-Aldrich, St. Louise, MO, USA). The immobilization of streptavidin was carried out by standard amine coupling. The protein was dissolved in 10 mM Na-acetate pH 5.0 at a concentration of 300 µg/mL and injected for 20 min. The interaction studies with the extracts were carried out in 100 mM Na-acetate, 150 mM NaCl, pH 3.8, 0.05% Tween 20 and 3% DMSO. All extracts were analyzed in the presence of 300 µM acetyl-pepstatin (Calbiochem, San Diego, CA, USA) and the sensorgrams subtracted from sensorgrams recorded in the absence of acetyl-pepstatin. All sensorgrams were reference corrected by a surface with immobilized streptavidin.

3.3.3. BACE1

Full length BACE1 was immobilized as described earlier [11]. For reference correction either a surface without BACE1 or a surface with BACE1 where the active site was blocked by three injection of 1 µM OM99-2 (Sigma-Aldrich, St. Louise, MO, USA) was used. All experiments were carried out in 100 mM Na-acetate pH 4.5, 50 mM NaCl and 5% DMSO.

3.3.4. HCMV Protease

The enzyme was immobilized by standard amine coupling and cross linked [29]. The experiments were carried out in 100 mM Hepes, 50 mM NaCl, pH 7.4, 0.05% Tween 20 and 3% DMSO.

4. Conclusions

In this study, we showed that the combination of an activity assay and an SPR based binding assay is a powerful tool for screening marine extracts for protease inhibitors, since it allows the identification of false positive hits. Extracts from Norwegian spring spawning herring containing specific inhibitors for HIV-1 protease, SAP1, SAP2 and SAP3 were identified, which demonstrates that marine vertebrates offer an interesting source for marine drug discovery. The novel approach used in this study to screen for protease inhibitors can be easily adapted to other types of enzymes and has hence a high potential for improving marine drug discovery. Furthermore, the approach can also be used for bioactivity guided isolation of bioactive compounds.

Acknowledgments

Tony Christopheit was supported by a fellowship from Troms County Council, and the work received further financial support from the ministries of Fisheries and Coastal Affairs and of Foreign Affairs. The work was supported by the Swedish Research Council (U.H.D.). We thank Angelica Ehrenberg and Dan Backman, University of Uppsala, Sweden for supplying HCMV protease, SAP1, SAP2 and SAP3.

Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interest.

References

1. Blunt, J.W.; Copp, B.R.; Keyzers, R.A.; Munro, M.H.; Prinsep, M.R. Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* **2012**, *29*, 144–222.
2. Molinski, T.F.; Dalisay, D.S.; Lievens, S.L.; Saludes, J.P. Drug development from marine natural products. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2009**, *8*, 69–85.
3. Bhatnagar, I.; Kim, S.K. Immense essence of excellence: Marine microbial bioactive compounds. *Mar. Drugs* **2010**, *8*, 2673–2701.
4. Seidel, V. Initial and bulk extraction of natural products isolation. *Methods Mol. Biol.* **2012**, *864*, 27–41.
5. Mishra, K.P.; Ganju, L.; Sairam, M.; Banerjee, P.K.; Sawhney, R.C. A review of high throughput technology for the screening of natural products. *Biomed. Pharmacother.* **2008**, *62*, 94–98.
6. Harvey, A.L.; Cree, I.A. High-Throughput screening of natural products for cancer therapy. *Planta Med.* **2010**, *76*, 1080–1086.
7. Keseru, G.M.; Makara, G.M. Hit discovery and hit-to-lead approaches. *Drug Discov. Today* **2006**, *11*, 741–748.
8. Kim, G.B.; Kim, Y.P. Analysis of protease activity using quantum dots and resonance energy transfer. *Theranostics* **2012**, *2*, 127–138.
9. Gossas, T.; Danielson, U.H. Analysis of the pH-dependencies of the association and dissociation kinetics of hiv-1 protease inhibitors. *J. Mol. Recognit.* **2003**, *16*, 203–212.

10. Backman, D.; Monod, M.; Danielson, U.H. Biosensor-Based screening and characterization of hiv-1 inhibitor interactions with sap 1, sap 2, and sap 3 from candida albicans. *J. Biomol. Screen.* **2006**, *11*, 165–175.
11. Christopeit, T.; Stenberg, G.; Gossas, T.; Nystrom, S.; Baraznenok, V.; Lindstrom, E.; Danielson, U.H. A surface plasmon resonance-based biosensor with full-length bace1 in a reconstituted membrane. *Anal. Biochem.* **2011**, *414*, 14–22.
12. Danielson, U.H. Fragment library screening and lead characterization using spr biosensors. *Curr. Top. Med. Chem.* **2009**, *9*, 1725–1735.
13. Borch, J.; Roepstorff, P. Screening for enzyme inhibitors by surface plasmon resonance combined with mass spectrometry. *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 5243–5248.
14. Beutler, J.A. Natural products as a foundation for drug discovery. *Curr. Protoc. Pharmacol.* **2009**, *46*, 9.11.1–9.11.21.
15. Li, J.W.; Vederas, J.C. Drug discovery and natural products: End of an era or an endless frontier? *Science* **2009**, *325*, 161–165.
16. Drag, M.; Salvesen, G.S. Emerging principles in protease-based drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2010**, *9*, 690–701.
17. Braga-Silva, L.A.; Santos, A.L. Aspartic protease inhibitors as potential anti-candida albicans drugs: Impacts on fungal biology, virulence and pathogenesis. *Curr. Med. Chem.* **2011**, *18*, 2401–2419.
18. Holwerda, B.C. Herpesvirus proteases: Targets for novel antiviral drugs. *Antivir. Res.* **1997**, *35*, 1–21.
19. Evin, G.; Lessene, G.; Wilkins, S. Bace inhibitors as potential drugs for the treatment of Alzheimer's disease: Focus on bioactivity. *Recent Pat. CNS Drug Discov.* **2011**, *6*, 91–106.
20. Calugi, C.; Guarna, A.; Trabocchi, A. Insight into the structural similarity between hiv protease and secreted aspartic protease-2 and binding mode analysis of hiv-candida albicans inhibitors. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2012**, *28*, 936–943.
21. Hoegl, L.; Korting, H.C.; Klebe, G. Inhibitors of aspartic proteases in human diseases: Molecular modeling comes of age. *Die Pharm.* **1999**, *54*, 319–329.
22. *Biacore™ Assay Handbook*, Edition AA; GE Healthcare Bio-Sciences AB: Uppsala, Sweden, 2012.
23. Giannetti, A.M.; Koch, B.D.; Browner, M.F. Surface plasmon resonance based assay for the detection and characterization of promiscuous inhibitors. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 574–580.
24. Markgren, P.O.; Hamalainen, M.; Danielson, U.H. Kinetic analysis of the interaction between hiv-1 protease and inhibitors using optical biosensor technology. *Anal. Biochem.* **2000**, *279*, 71–78.
25. Batra, R.; Gupta, M.N. Enhancement of enzyme-activity in aqueous-organic solvent mixtures. *Biotechnol. Lett.* **1994**, *16*, 1059–1064.
26. Vassar, R. Beta-secretase (bace) as a drug target for Alzheimer's disease. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2002**, *54*, 1589–1602.
27. Hong, L.; Koelsch, G.; Lin, X.; Wu, S.; Terzyan, S.; Ghosh, A.K.; Zhang, X.C.; Tang, J. Structure of the protease domain of memapsin 2 (beta-secretase) complexed with inhibitor. *Science* **2000**, *290*, 150–153.

28. Backman, D.; Danielson, U.H. Kinetic and mechanistic analysis of the association and dissociation of inhibitors interacting with secreted aspartic acid proteases 1 and 2 from candida albicans. *Biochim. Biophys. Acta* **2003**, *1646*, 184–195.
29. Geitmann, M.; Danielson, U.H. Studies of substrate-induced conformational changes in human cytomegalovirus protease using optical biosensor technology. *Anal. Biochem.* **2004**, *332*, 203–214.
30. Burck, P.J.; Berg, D.H.; Luk, T.P.; Sassmannshausen, L.M.; Wakulchik, M.; Smith, D.P.; Hsiung, H.M.; Becker, G.W.; Gibson, W.; Villarreal, E.C. Human cytomegalovirus maturational proteinase: Expression in escherichia coli, purification, and enzymatic characterization by using peptide substrate mimics of natural cleavage sites. *J. Virol.* **1994**, *68*, 2937–2946.

© 2013 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution license (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

Annual report, 2013

Employee: Vera Kristinova, PhD. student
NTNU, Department of Biotechnology, Trondheim
SINTEF Fisheries and aquaculture (SFH), Trondheim

PhD thesis: **Peroxidation of marine lipids in liposomes and emulsions studied by dissolved oxygen consumption**

Part of project: Gull fra havets sølv

Duration: 01/2011 – 12/2013

Supervisors: Turid Rustad, PhD., professor at NTNU
Ivar Storrø, PhD., senior scientist at SFH (retired 8/2013)

Aim of the thesis:

Better understanding of oxidation and antioxidation of marine lipids in emulsified systems.

The aim of this study is to increase knowledge on oxidation of omega-3 fatty acids from fish in emulsified systems, so that oxidation of omega-3 into more complex emulsions (processed food) is better understood. The main focus is on understanding, elucidation and characterization of the key factors influencing lipid oxidation in multiphase systems (model system of liposomes and emulsions), especially when it comes to the activity of dietary endogenous pro-oxidants (transition metals, hemoglobin) and antioxidants (chelators, radical scavengers) added into these systems for protection of the lipids.

The research contains several topics within the lipid oxidation problematics, which are first looked upon separately, and finally bound together to provide a more complex picture. The topics overlap by means of the lipid system used incl. physicochemical conditions, and the studied pro-oxidants and antioxidants. The main method for the lipid oxidation studies is measurement of dissolved oxygen consumption.

Status per 30.11.2013

- teaching duties not required
- courses at NTNU – completed

Course number	Course title	Course type	Credits	Grade
BT 81101	Advanced Food Chemistry	DR	9.00	B
BT 81171	Marine Lipids	DR	7.50	A
BT 81121	Fish Salting	DR	5.00	passed
BT 81141	Marine Biochemistry	DR	7.50	A
	Uncertainty analysis and experimental planning	M	3.75	B
Total			32,5	

- publishing: four first author publications

one additional publications – review article in cooperation with various research groups in the field of lipid oxidation in Europe

No.	Publication title/tentative title	Status
1	Kristinova, V., Mozuraityte, R., Storro, I., Rustad, T. (2009). Antioxidant activity of phenolic acids in lipid oxidation catalyzed by different prooxidants. <i>Journal of Agricultural and Food Chemistry</i> , 57(21), 10377–10385.	Published
2	Kristinova, V., Storror, I., Rustad, T. (2013) Influence of human gastric juice on oxidation of marine lipids – <i>in vitro</i> study , <i>Food Chemistry</i> , 141, 3859-3871.	Published
3	Kristinova, V., Mozuraityte, R., Aaneby, J., Storror, I., Rustad, T. (2013) Iron-mediated peroxidation in marine emulsions and liposomes studied by dissolved oxygen consumption , <i>Eur. J. Lipid Sci. Technol.</i> , 115.	Published
4	Kristinova, V., Aaneby, J., Mozuraityte, R., , Storror, I., Rustad, T. (2013) Activity of antioxidants in iron-mediated peroxidation in marine emulsions and liposomes studied by dissolved oxygen consumption	In preparation
5	Medina, I., Undeland, I., Larsson, K., Storror, I., Rustad, T., Jacobsen, C., Kristinová, V., & Gallardo, J. M. (2012). Activity of caffeic acid in different fish lipid matrices: A review. <i>Food Chemistry</i> , 131(3), 730-740.	Published

- dissemination: oral presentations or posters at at least three conferences – completed

First International Marine Ingredients Conference

19. – 20. September 2010, Oslo, Norway

Poster: Antioxidant activity depends on the type of pro-oxidant

Poster: The impact of moisture and metal ions on the oxidative stability of fish oil

26th Nordic Lipid Forum Symposium

19. – 22. June 2011, Ålesund, Norway

Presentation: The Role of Added Compounds in Oxidation of Marine Lipids: Methemoglobin

41st Annual WEFTA Meeting

27. – 30. September 2011, Göteborg, Sweden

Presentation: Methemoglobin in Oxidation of Marine Lipids

10th Euro Fed Lipid Congress

23. – 26. September 2012, Cracow, Poland

Presentation: Oxidation of marine lipids in gastric juice – *in vitro* study

27th Nordic LipidForum Symposium

17. – 19. June 2013, Helsinki, Finland

The fate of marine lipids in gastric juice - *in vitro* study of lipid oxidation and the effect of antioxidants

International Marine Ingredients Conference

22. – 24. September 2013, Oslo, Norway

Presentation: Oxidation of marine lipids in gastric juice - *in vitro* study

42nd WEFTA Meeting

9. – 11. October 2013, Tromsø, Norway

Presentation: Measurement of oxygen consumption as a tool for assessing hurdles for lipid oxidation

Year 2013

In the course of the third and final year of the PhD. program the following work was done:

- Preparation of paper no. 3 and 4
- Publishing paper no. 3
- Attending three conferences – dissemination of paper 2 and 3
- Preparation of PhD thesis (expected submission: 01/2014)

Trondheim, 28.11.2013

Gull fra havets sølv: 2012

Årsskifte till november 2012

I januar jobbede vi med å sammenstille arbeidet vi hadde gjort året innen som er sammenfattet i rapport fra 2011. Da hadde vi sett at det gikk bra at få en klar løsning (fjerne fett og cellulære komponenter) gjennom at tina et ekstrakt og la det stå kjølig i noen dager før at sedan filtrere av en kake av fett og annet. I begynnelsen av året startede vi ett sådant løp for rensing av sildekstraktet.

NB! DET ER VIKTIGT AT HUSKE AT VI UNDER VÅREN FELAKTIGT KALLADE VÅR ESTERASE AKTIVITET (MÅLT MED pNP-DERIVAT MED 2, 4 ELLER 8 KULL) FØR LIPASE AKTIVITET.

pH 9.0 ekstrahering, hvilket senere gav 71 og 71B

Start 3/2, ekstrahering av sildpasta. Cirka 930 g ble homogenisert i 3 l buffer, pH 9.0. Innfrysing av mer enn tre liter løsning i fraksjoner av ulike størrelse.

71-løpet

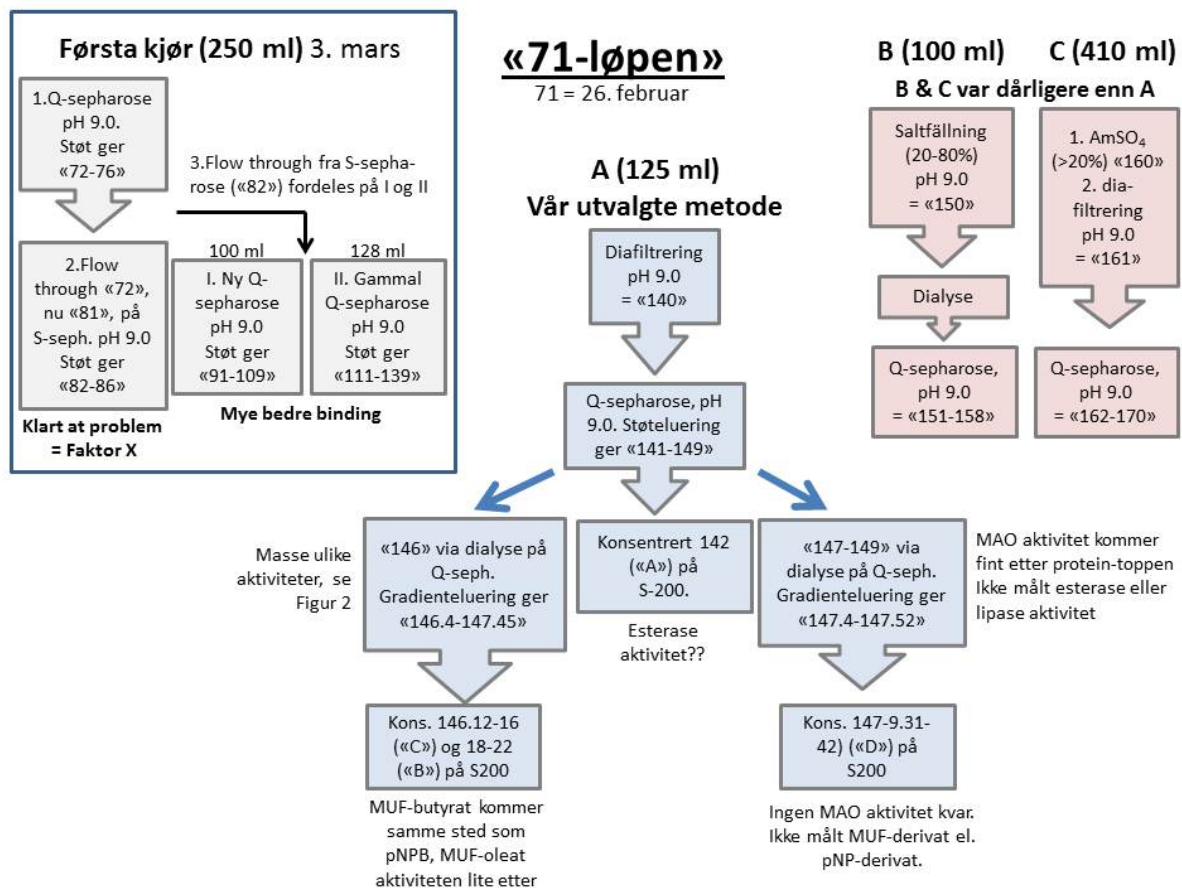
26/2 tinte vi en fraksjon av ekstraktet fra 3/2 på kjølerom ved 4 °C og etter noen dager fjernet vi et filtrat fra ekstraktet, hvilket gav 71 (57 % utbytte (volum)). Løsning 71 frøs vi in i fraksjoner.

250 ml 71 (tatt fra frysen) kjørtes på en 24 ml Q-sepharose («første kjørt» i figur 1) som elueres med 0.25, 0.5 og 1 M salt. Det var førvånande at se at nesten alle enzym hadde gått dels rakt igjennom kolonnen.

Resultatet viser svært lav bindingskapasitet og et annet bindingsmønster for de fleste enzymene i gelen ved pH 9, sammenlignet med pH 7.4 i tidligere forsøk. Den enzymfraksjonen (72) som gikk gjennom Q-sepharose kolonna, døpes om til 81 og settes på en S-sepharose kolonne ekvilibrent med buffer pH 9 (se Fig. 1). Tilnærmet all aktivitet til de ulike enzymene bandt ikke gelen ved disse betingelsene.

For å undersøke om det kanskje ble bedre innbinding av løsningen på en Q-sepharose nå når løsningen som gått igjennom både en Q og en S-sepharose og var mindre «crude», anvende vi konsentrert fraksjon 82, fordelt på en ny Q og den gamle Q'en fra første trinnet. Dette for å se om det kan ha vart noen problemer med den gamle Q'ens innbindingskapasitet eller om det var en generell trend med dårlig innbinding av 71 odialysert på en Q-sepharose gel. Etter at ha kjørt 82 på kolonnene så vi att enzymene band mye bedre til både den gamle og nye Q'en.

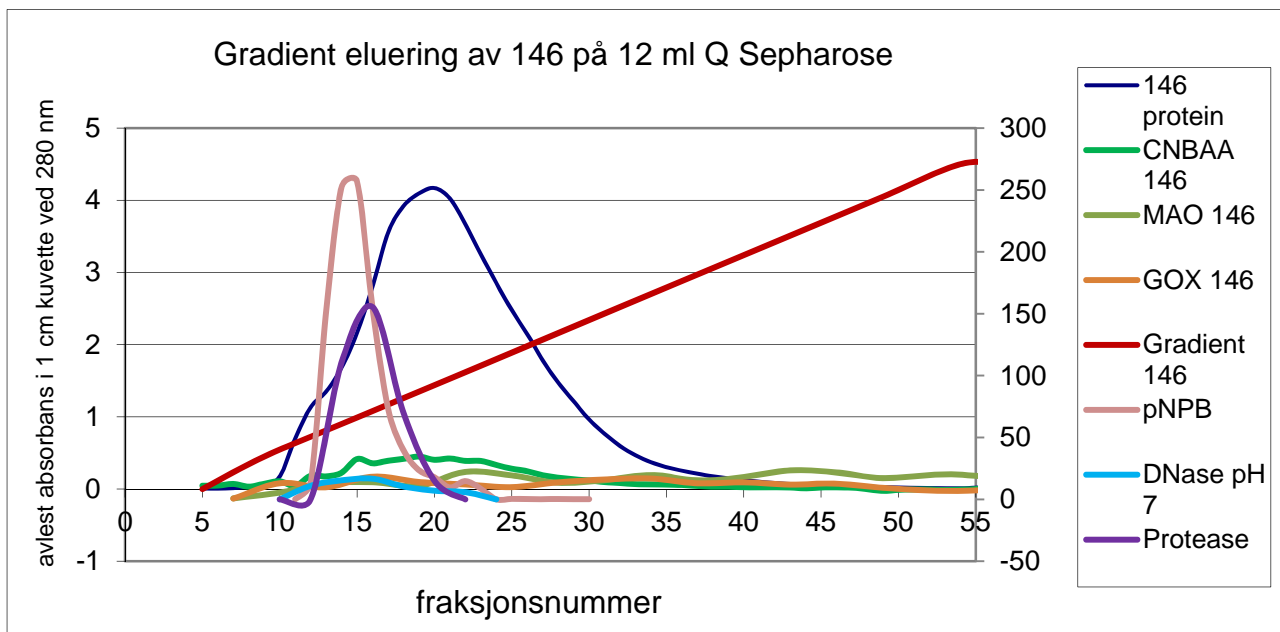
Vurdering av resultat: Det ser ut som at en ukjent faktor i ekstraktløsningen fører til kapasitetsproblemer på de to kolonnene.



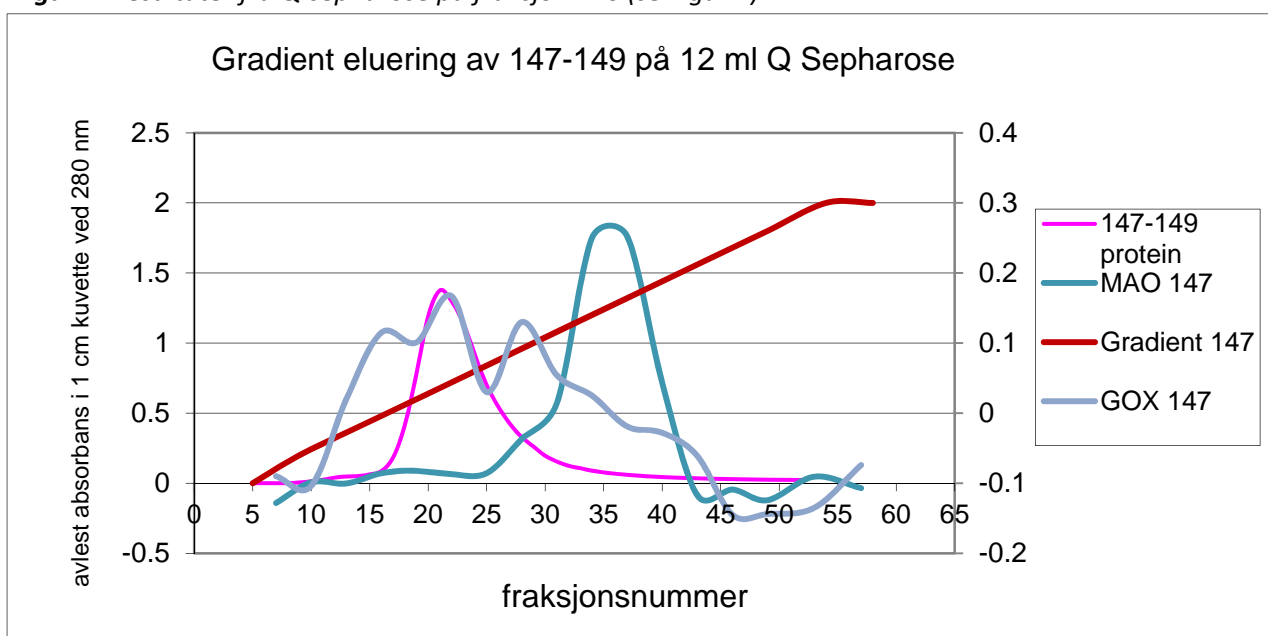
Figur 1. Relevante fraksjoner fra 71, og litt resultater.

For å undersøke om man kunde fjerne Faktor X tog vi fram andre fraksjon av 71 før å gjøre en undersøkelse om vi med A) diafiltrering, B) saltfällning eller C) saltfällning og diafiltrering kunde fjerne Faktor X og enda ha aktive protein med god innbinding til en Q-sepharose kolonne. Etter initial diafiltrering og/eller saltfällning kjørt de resulterende fraksjonene i A-C-løpene på var sin Q-sepharose. Vi målte aktivitet før at kunne si hvilket løp som var det beste. A gav best resultat målt på de enzymer testet da og derfor så bestemte vi at vi skulle gjøre et nytt løp, i større skala, enligt det «reseptet» som løp A innebar.

Under tiden som vi begynnte med en ny tine/filtrering fra ekstraktet 3/2 (gav 71B/200, se sid 5) så gjennomførte vi videre Q-sepharose rensinger med gradienteluering på fraksjonerne 146 (første 50 ml støteluering 1M NaCl) og 147-149 (resterende volum fra 1 M NaCl) fra A-løpet. Dette for at de såg ekstra interessante ut vad gjelder aktivitet på utvalgte enzymer. Se Figur 2 og 3 for resultat på Abs280 (146 protein), gradienten og utvalgte enzymmålinger fra Q-sepharose med 146 og 147-9.



Figur 2. Resultater fra Q-sepharose på fraksjon 146 (se Figur 1)



Figur 3. Resultater fra Q-sepharose på fraksjon 147-9 (se Figur 1)

Med tanke på at pNPB (Fig. 2) og MAO'en (Fig. 3) så bra ut så vi konsentrerte oss på dem. Vi tok ut utvalgte fraksjoner over aktivitetstoppen, konsentrerte disse og kjørte to S-200 med fokus på lipase/esterase aktivitet fra 146 og MAO/GOX fra 147-9 fraksjonene (vi var nysjerrige på at få en første uppskattning på størrelse på enkelte enzym). Etter gelfiltreringene måltes aktivitet. MAO'en tapte all aktivitet, hvilket kan bero på at det er et membran-protein og trenger eksempelvis Triton. Esteraset kom tidlig i gelfiltreringa, dog etter proteintoppen hvilket indikerer en størrelse mellom 50 og 100 kDa. Vi målte også aldolase og transaminase aktivitet, men det så tynt ut med aktivitet. Her begynte vi og se på fraksjonene med SDS-PAGE før å se om de så forskjellige ut.

Sammenligning enzymaktivitet mellom 71 og 71B, samt slutsatser fra 71 A-C-løpet

Protease

Aktivitet 71 har holdt sig bra øver tid, vid sammenligning mellom nygjord fraksjon og fryst/tint fraksjon. A ger bra binding til Q'en, B ger en bedre binding, C er sämst. Det finns også en forskjell vid diafiltrering, der A ger lite tap og det er større tap før C. Hemmas ikke av protease hemmere (cystein-, serin- og metalloproteinase inhibitor). Et aspartat protease?

DNase pH 5

Av litet interesse, ikke bra pH før detta enzym.

DNase pH 7

A og B ser bra ut bindingsmessing, C ikke målt.

Amidase (CNBAA)

Enzym i 71B har lavere aktivitet enn 71. Alle behandlinger gjør at en del aktivitet sitter, en del går igjennom. Kanskje to enzym?

MAO (benzylamine)

Aktiviteten i 71 og 71B ser lika ut. Øver 100 % utbytte??! Något är lite skumt med denne assay med disse løsninger. Før A – C ser det lika ut: ungefär hälften binder, hälften släpper.

GOX (glucose)

Aktivitet i 71B lite bedre enn 71. Øver 100 % utbytte??! Något er lite skumt med denne assay med disse løsninger. Ser trots det bra ut før videre rensing. A og B bedre enn C. Konstig forskjell mellom de to 71:orna (71 og 71B).

Aldolase

Gigantiskt tap i trinna mellom 71 og startfraksjoner A, B og C på Q-sepharosen. Stor forskjell på aktiviteten etter eluering i A, B og C ser ut. I 169 og 170 kan det finnes aktivitet i men inget vi fokuserer på før tilfallet.

ALT

Aktivitet i 71B sammenligningsbar med opprinnelig 71. Stort tap i aktivitet mellom 71 og A-C, som før aldolaset. Stor forskjell på aktiviteten etter eluering i A, B og C ser ut. Med løp A og C så sitter det på kolonnen. A best totalaktivitet, som finns i andra 1.0 M fraksjonen.

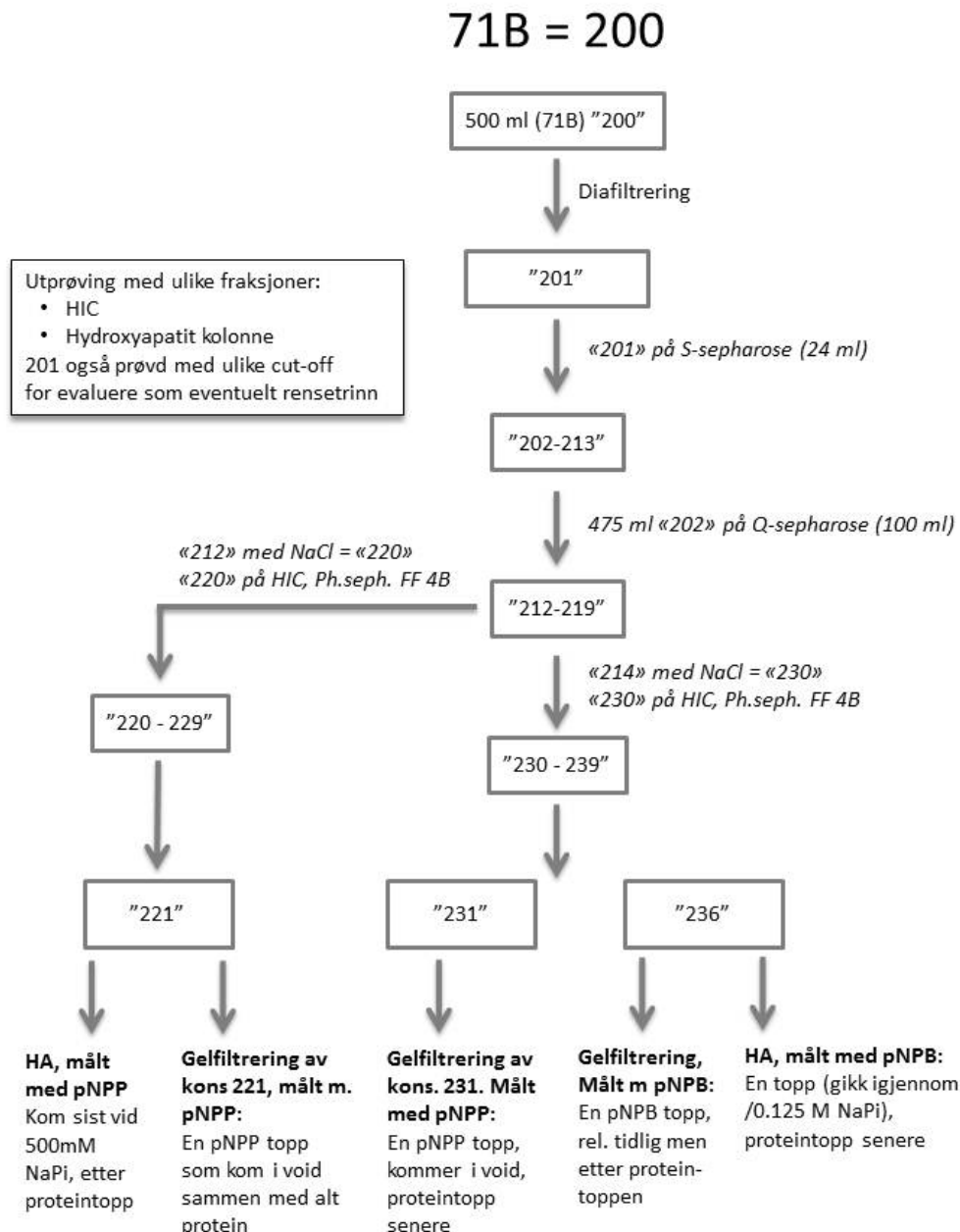
Esterase (og eventuelt lipase)

Aktivitet i 71 og 71B ser lika ut. Bra utbytte efter eluering.

71B/200-løpet

Vi gjorde en andre tina-og-ta-bort-fellingen-rensing av grunnekstraktet fra 3/2. Den nye rensede løsningen fikk navnet 71B ettersom den kom fra samme ekstrakt. Vi døpte straks om 71B til 200 for å unngå sammenblanding med 71, og ettersom nummeringa fra nå skulle være i 200-serien.

Etter diafiltrering (til fraksjon 201) kjørt en S-sepharose ved pH 9 (Tris/HCl) som gav fraksjon 202-209. 475 ml av enzymløsning som ikke bandt S-sepharose gelen (202) ble påsatt en Q-sepharose kolonne ekvilibrert med samme buffer som oven. Enzymløsningen som ikke bandt gelen (212) ble tatt vare på. Gelen ble deretter vasket med samme pH 9 buffer til lav absorpsjon ved 280 nm. Protein/enzym bundet på gelen elueres med 0.5 M NaCl (214 og 215), 1M NaCl (216-218) og til slutt 2 M NaCl i buffer pH 9 (219) (Fig. 4). De eluerte enzymfraksjonene ble frosset og lagret ved -20°C .



Figur 4. Relevante fraksjoner fra 71, og litt resultater.

Vi vurderte et tag om det skulle være en bra idé at filtrere 201 for å fjerne det høymolekylære bånd som vi så på alle SDS-PAGE geler. Spinnkolonner med 100, 50 og 30 kDa cut-off utprøvd og vi målte

resulterende pNPB aktivitet. Nesten all esterase aktivitet gikk tapt hvilket gjorde at denne metode ikke blev et alternativt rensetrinn.

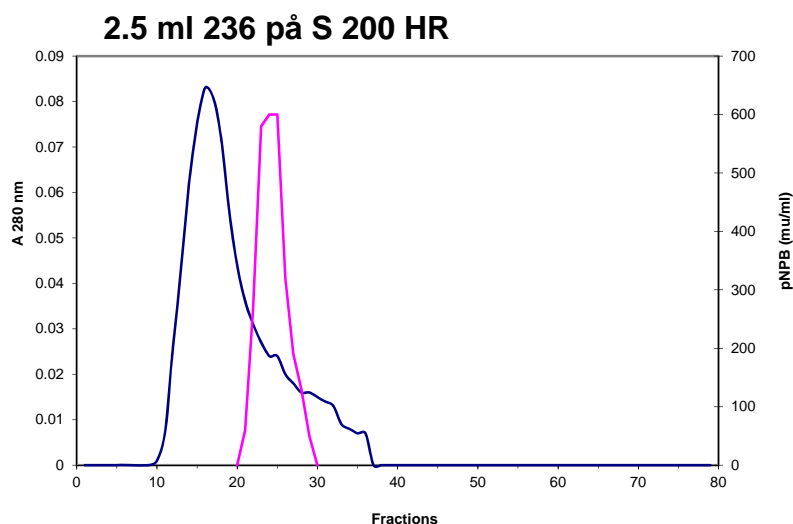
Under tiden då vi kjørte den første Q-sepharose kolonnen på fraksjon 201, og fremover, anvende vi oss av ulike fraksjoner og prøvde om vi også fikk innbinding på andre kolonner enn Q-sepharose ved rensing av lipase, esterase, protease eller DNase (de enzymene som vi skulle konsentrere oss på videre). Det gjordes opprensinger i småskala av ulike fraksjoner på hydroxyapatit og phenylsepharose gel. Det ble bestemt at vi skulle gå videre med en phenylsepharose etter Q-sepharosen, og vi rakk å kjøre phenylsepharose rensinga med fraksjon 212 og 214 før ferien: Enzymløsning 212 og 214 tines. Etter tilsetning av 2M NaCl renses enzymer i løsningen ved phenylsepharose 4B kromatografi. Fraksjon 212 gav fraksjoner 221-229 og 214 gav fraksjoner 231-239 (se Fig. 4).

I sluttet av august blev det besluttet om at vi må konsentrere oss på noen få enzymer, og lipase og esterase blev valgt ut.

Esterase-løpet

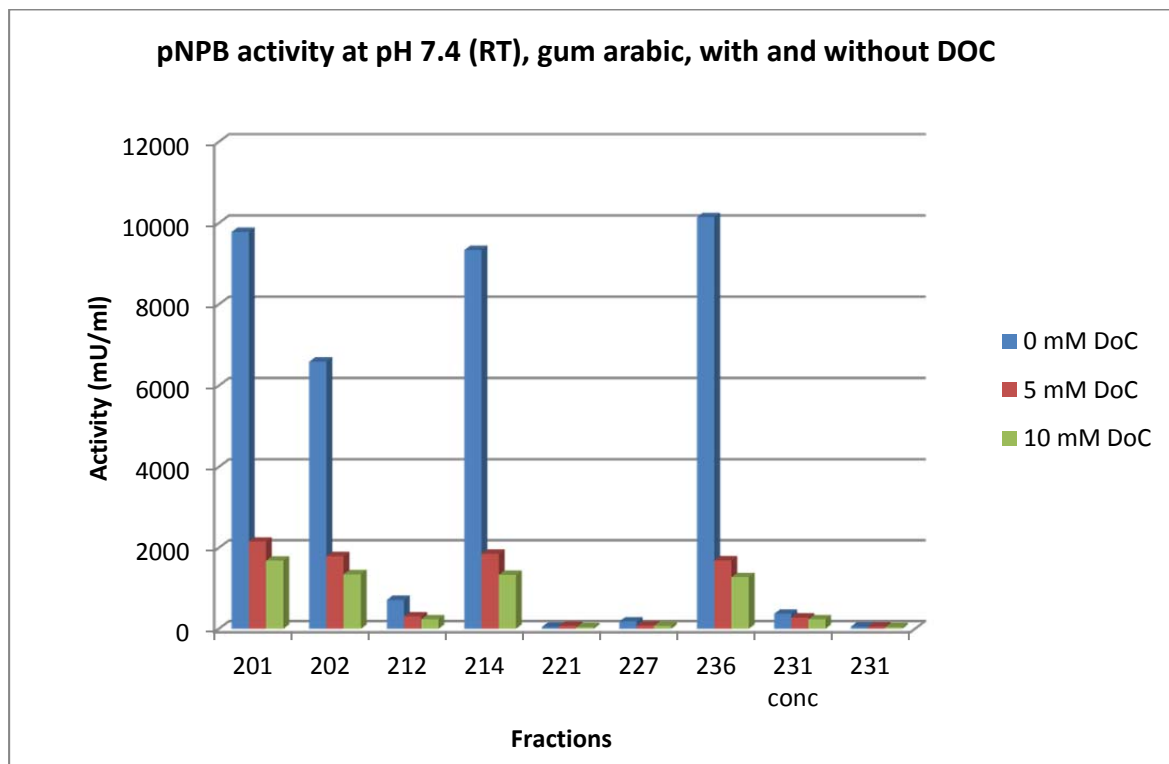
Vi fant esterase aktivitet i fraksjonen som gikk igjennom Q-sepharosen (212), i det som kom i 0.5 M fraksjonen (214) og viss aktivitet i det som kom med 1.0 M (216-217). Etter 212 og 214 hadde gått igjennom hver sin phenylsepharose kolonne var det klart at dedikert mest aktivitet fantes i 236 (fra 214), målt med pNPB.

236 er kjørt på gelfiltrering som kan ses i Figur 5, og eluerer mellom 50 – 100 kDa.



Figur 5. *Clupea harengus* esterase på gelfiltrering. Proteintopp i blått, pNPB aktivitet i rosa.

Vi karakteriserte esterase fraksjonene 226-229 og 236 med avseende på temperatur, pH og substratlengde (2, 4, 8, 12 kull, pNP-derivat). Det var dårlig aktivitet i 226-229 så vi konsentrerte oss på 236. Resultatene deltes ut til alle før Inge for til Unilever. Med 236 og pNPB så vi enn ordentlig minking i aktivitet med tilsats av gallesalt i prøvene (16% aktivitet kvar med 5 mM deoxycholate (DOC), sammenlignet uten gallesalt). I Fig. 6 presenteres aktiviteten (gammel unit!) med utvalgte 200-fraksjoner målt med 5 og 10 mM DOC.



Figur 6. pNPB aktivitet med ulike 200-fraksjoner målt uten og med 5 respektive 10 mM DOC.

Vi ville også ha muligheten at måle esterase og lipase aktivitet etter en eventuell separasjon på en native page gel, så vi begynte også med å finne geler som det var mulig at kjøre nativ page, samt med å finne rett substrat at måle aktivitet på geler med. Vi har etablert en metode for å kjøre native page og for å måle esterase aktivitet på geler med hjelp av MUF butyrate. Det samme substratet brukes i fluorescens målinger.

Vi har fått resultater fra MUF-butyrat innfarging av esterase-bånd fra Native page geler, sammenfattede i Tabell 1.

Tabell 1. Resultat fra Native page gel. Fraksjoner, nærvaro av og størrelse på band som indikerer esterase aktivitet.

Fraksjon	Band I Ca. 700 kDa	Band II Ca. 300 kDa	Band III Ca. 45-50 kDa	Band IV
71	x	x	x	x
71B	x	x	x	x
202	x		x	
212	x			
214			x	
216				
236			x	

Vi har også resultater fra MUF-butyrat målinger i plate assayer og trendene er godt sammenlignbare med tidligere resultater fra pNPB-målinger i plate med samme fraksjoner.

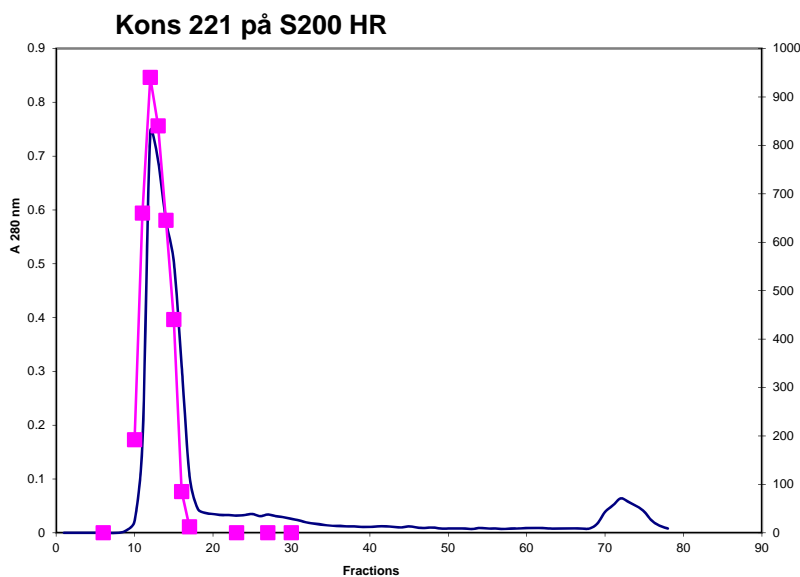
Lipase-løpet

I juni var første gangen vi begynte at måle med et «riktig» lipase-substrat, på plater: pNPP (16 kull). Det så ut som at det ble litt bedre aktivitet med tilsats av gallesalter men det var så mye dårligere

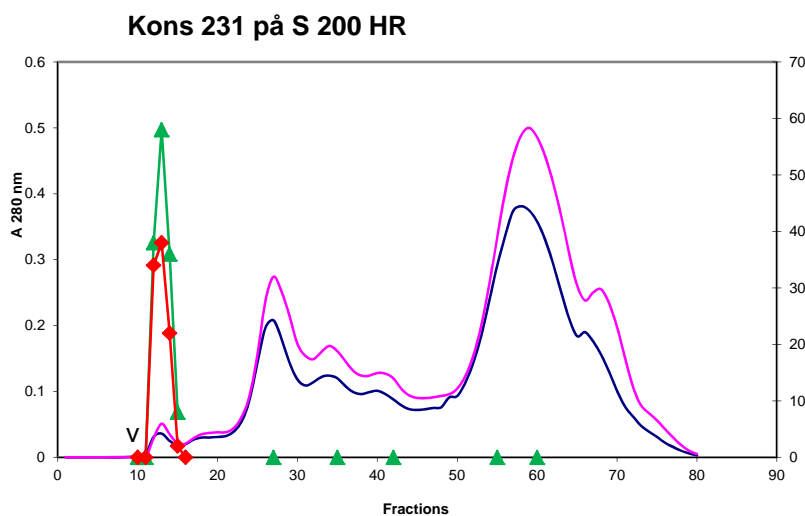
med aktivitet med pNPP i en plate assay sammenlignbart med pNPB så dette var egentlige ikke et alternativ.

Vi gikk videre med at vurdere metoden i kyvetter og trudde at vi hadde fått i orden pNPP assay'en under sommeren. Med denne metode fant vi god aktivitet i 221 og 231 (målt med DOC som så ut at aktivere enzymet, dvs. gi en bedre aktivitet).

For å kunne gå videre med en gelfiltrering (vurdering av enzymets størrelse og om dette var et bra rensetrinn), ble fraksjon 231 konsentrert cirka 70 ganger og 221 cirka 36 ganger. Aktiviteten som vi i begynnelsen så i 231 ble i stort sett tapt med konsentreringa. Konsentrert 221 (K221) (og et pH 4.5 ekstrakt) viste på høy lipase aktivitet med pNPP metoden. K221 og K231 ble kjørt på S-200 kolonne og aktiviteten som vi så kom i begynnelsen av fraksjonene, hvilket tyder på høy molekylvekt (Fig 7 og 8).



Figur 7. Konsentrert 221 på S-200 ved pH 7.4 og 0.15 M NaCl. Proteintopp i blått, pNPP aktivitet i rosa.



Figur 8. Gelfiltrering av konsentrert 231 ved pH 7.4 og 0.15 M NaCl. Proteinkonsentrasjoner fra to gelfiltreringer i blått og rosa og aktivitet i grønt og rødt.

Vi kunde også initialt si at det var forskjell i aktivitet (målt med pNPP) beroende på hvilket gallsalt som anvendes (cholat, taurocholat, DOC og taurodeoxycholat). Med anledning av alt dette tog Inge kontakt med Unilever i begynnelsen av september og fikk booket en tid med Neil i begynnelsen av oktober. Nu hastede det med karakterisering av fraksjonene med avseende på esterase og lipase aktivitet.

Vi begynte også å jobbe på at få en fungerende UPLC/MS metode for å kunne måle regioselektivitet.

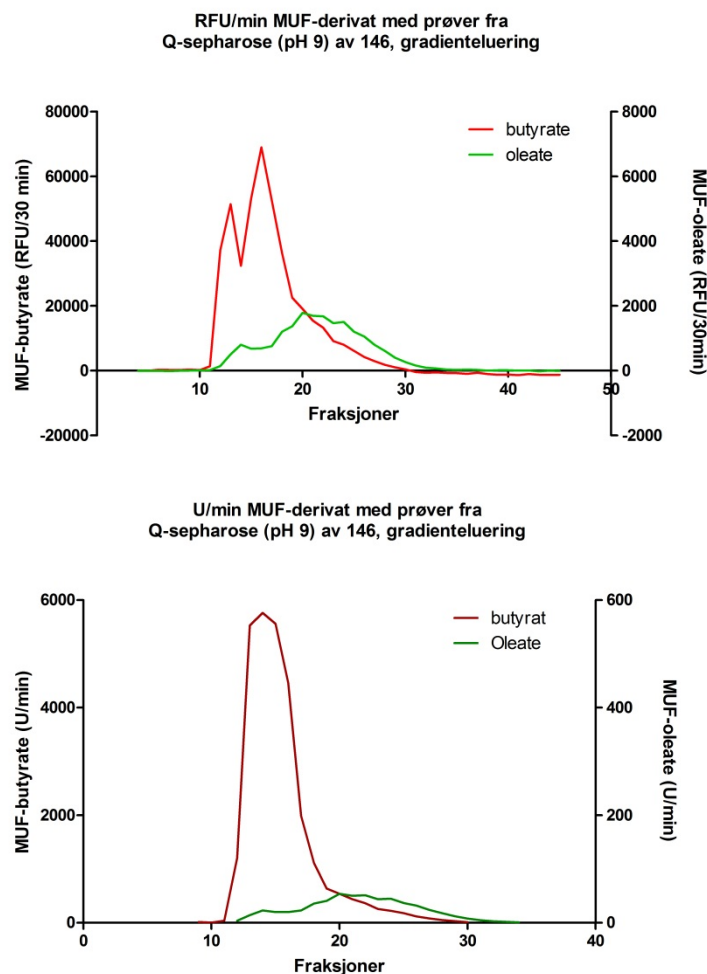
Mitt i dette blev det klart at pNPP-metoden ikke fungerte, og at all lipase aktivitet vi hadde sett inntil må isprerresettes. Vi gjorde vårt aller beste for og klara ut hvordan og om aktivitet fantes i fraksjonene før Inge skulle treffe Neil. Klart var at det var mye lavere aktivitet enn vi først trudde. Inge traff dog Neil og fant ut at han interessert ikke bare i lipaser, men også i protease hemmere, chitinaser og transglutaminaser.

Siden dess har vi fått i orden «copper soap» metoden for å måle med alle typer av naturlige oljer og fetter. For å kunne måle med olivenolje var vi tvungne at etablere en metode (kisel/kull/sukker-kolonne) for å kunne rense frem en olivenolje som ikke inneholdt oksiderte, anti- and pro-oksiderative stoff og frie fettsyrer. Med C16-substrat (for eksempel største bestanddelen i olivenolje) er den minste konsentreringen av frie fettsyrer vi har målt med noenlunde sikkerhet 200 μ M. Til nu har vi ikke sett noe aktivitet i 71B, de opprinnelige A-D (15/3 2011) eller 140, målt med «copper soap» metoden og rensed olivenolje. Vi vet at metoden fungerer for det er ikke noen problem at måle aktivitet med lipase fra Sigma Aldrich (kallas LipX).

Lipase aktivitet går å måle hvis man anvender sig av MUF oleat, en mer følsom assay enn copper-soap metoden, men det er ikke «riktige» substrat, dvs. triglycerider. Vi har målt omtrent like høy aktivitet med dette substrat i 71 og 71B som for LipX. Bland de opprinnelige ekstraktene fra år 2011 slår de to pH 9 ekstraktene vi gjorde våre aller første enzymmålinger på (B og D) samt 42 (fra 2011, pH 9 ekstrahering) bedre ut når det gjelder aktivitet enn 71 og 71B sett i RFU/30 min målt på 10 μ l ekstrakt. Det finnes også relativt mye MUF-oleat aktivitet i 214 og 236. Vi må fortsatt finne ut den minste aktivitet (U/ml) som er mulig å måle.

I samband med dette er det interessant å notere i Fig. 9 at når man kjør aktivitetsmålinger på 146-fraksjonene som resultere fra den andre Q-sepharose kjøringa fra A-løpet, vid pH 9 med gradieneluering (se Fig. 1), så ser man at MUF-oleat og MUF-butytrat aktiviteten separerer. Dette er en fraksjon som man kan si er sammenlignbar med 212-216, så man kan tolke dette som at det finnes et enzym med ren esteraseaktivitet og kanskje et andre enzym med en mer lipase-lignende aktivitet.

Et nærvær av to ulike aktiviteter kan kanskje støttes i resultatene fra målingene med MUF-butytrat og MUF-oleat av 214 – 216 med og uten DOC. Til tross for at aktiviteten generelt blir lavere ser det ut som at DOC vid målinger ikke hemmer en presumtiv oleat-aktiviteten like mye som butytrat-aktiviteten ettersom kvoten mellom oleat-aktivitet over butytrat-aktivitet bli større som man har DOC i løsning.



Figur 9. Aktivitet med MUF-derivat i fraksjoner fra Q-sepharose, pH 9, med gradienteluering.

Vi sliter fortsatt med å få sett aktivitet med MUF oleat på native page geler.

Med UPLC/MS går det også å måle forekomst av frie fettsyrer etter miks av fraksjoner og rene fetter (f.eks. trioleat) og fett med ulike fettsyrer ved ulike posisjoner (for å måle regioselektivitet). Vi jobber fortsatt på at tolke data fra disse oppsett. Den minste mulige mengde fettsyre som kan måles er pmol(?).

pH 4.5 ekstraksjoner

pH 4.5 og 4.6 ekstraksjoner

SP (913.8 g) homogeniseres i 3 liter buffer (pH 4.5) ved bruk av Warring Blendor ved 8 °C. Ekstraktet i 50 mM Na acetate (pH 4.5) buffer ble fordelt beholdere og frosset ved – 20 °C og oppbevart ved denne temperatur til senere bruk.

Tinte 2 liter av SP-ekstrakt pH 4,5 på kjølerom + 4 °C og fjernet partikulært materiale i løsningene ved osteklede etterfulgt av Whatmann no. 4 filtrering. Utbytte av partikkelfri løsning pH 4.5 ekstraktet var henholdsvis 65 %. Den partikkelfrie pH 4.5 ekstraktløsningen ble oppbevart ved -20 °C.

971.3 g SP tines i 4 liter kaldt vann (pH 6.5 etter tining). Den tinte SP suspensjonen tilsettes 8 ml 100 % eddiksyre og WB homogeniseres. SP ekstraktet som hadde pH 4.6 ble frosset ved -20 °C.

Protease hemmere: Assay'en er etablert og det opprinnelige ekstraktet (pH 4.5) er kjørt på en S-sepharose og eluert med 0.25, 0.5 og 1.0 M NaCl. Det återstår at måle hvor protease hemmeren er.

Vi har også jobbet med:

Innkjøp og innkjøring av ny fotometer, ÄKTA, UPLC/MS

Reparasjoner av fotometer, UPLC/MS og fluorescensmålere

Konferanser, kurser og foredrag samt andre oppdrag på MB og Fiskehelse

En sammenligning mellom Bio-Rad og Pierce metoden for protein konsentrasjon målinger blev utført og det så ut som at både var lika bra. Ettersom Pierce'en er enklere og dekker et større konsentrasjonsområde i plate, med god følsomhet, benytter vi oss av den.

Innkjøring av metoder for lipase-målinger (fremst høsten):

- Ikke endogene substrat
 - pNPP/D (12 og 16 kull)
 - fluorescensmålinger med MUF-butyrat og MUF-oleat
 - Native page geler og måling av aktivitet på disse med MUF-derivaten
- Endogene substrat
 - cupper-soap metoden
 - UPLC/MS målinger med riktige substrat

Tabell 2. Rensetabeller for tre av enzymene fra sild. Det økte utbytte av sur protease under opprensing kan skyldes fjerning av enzym hemmer(e) under kromatografi.

Clupea harengus esterase

	Protein	Sp. activity	Tot. activity	Recovery
Fraction	mg	u/mg	units	%
Crude ex.	3876	1009	3909725	100,0
Q-seph	1415	1737	2458100	62,9
phenyl-seph	326	6970	2272200	58,1

Clupea harengus protease

	Protein	Sp. activity	Tot. activity	Recovery
Fraction	mg	u/mg	units	%
Crude ex.	3876	5	19808	100,0
Q-seph	1415	16	22631	114,3
phenyl-seph	326	195	39000	196,9

**Clupea harengus
DNase**

	Protein	Sp. activity	Tot. activity	Recovery
Fraction	mg	u/mg	units	%
Crude ex.	3876	2	6128	100,0
Q-seph	1415	3	3854	62,9
phenyl-seph	59	74	4320	70,5

