

**SINTEF Fiskeri og havbruk AS**

Postadresse: 7465 Trondheim
Besøksadresse:
SINTEF, Forskningscenteret på Rotvoll
Arkitekt Ebbellsvei 10
7053 Ranheim
Telefon: 73 59 56 50
Telefaks: 73 59 56 60
E-post: fish@sintef.no
Internett: www.fish.sintef.no
Foretaksregisteret: NO 980 478 270 MVA

SINTEF RAPPORT

TITTEL

Pelagisk kvalitet – Kit for måling av enzymaktivitet i pelagiske fangster

FORFATTER(E)

Iciar Martinez og Hanne Digre

OPPDRAGSGIVER(E)

FHL industri og eksport / Pelagisk forum
Norges forskningsråd, Bioproduksjon og foredling

RAPPORTNR. STF 80A	GRADERING Åpen	OPPDRAGSGIVERS REF. Turid Hiller	
GRADER. DENNE SIDE Åpen	ISBN 82-14-01477-8	PROSJEKTNR. 83-0112.01	ANTALL SIDER OG BILAG 10 (+2)
ELEKTRONISK ARKIVKODE rapport_030407.doc		PROSJEKTLEDER (NAVN, SIGN.) Snorre Angel	VERIFISERT AV (NAVN, SIGN.) Ingrid Overrein
ARKIVKODE	DATO 06-02-21	GODKJENT AV (NAVN, STILLING, SIGN.) Marit Aursand, forskningssjef	

SAMMENDRAG

MÅLSETTING:

Målsettingen med prosjektet var å utføre forundersøkelser samt gjennomføring av forsøk for å avdekke mulighetene for utvikling av en analysemetode i form av et instrument/kit. Dette arbeidet skal lede frem til mulighetene for å lage et kit eller en hurtigtest som fiskerne kan benytte *in situ* for objektiv vurdering av aktuell enzymaktivitet i pelagiske fangster. Prosjektet fokuserer i hovedsak på sild (*Clupea harengus*).

KONKLUSJON:

Det er mulig å lage (1) et kit for å måle pepsinaktivitet og (2) et kit for å måle pepsin-proteinet. Imidlertid er enzymaktiviteten påvirket av flere variabler enn kun målinger av pepsinet. Blant annet har følgende parametre betydning for enzymaktiviteten: inkubasjonstid og temperatur, prosedyre for måling av produktet fra pepsinaktivitet og frysing/tinging av ekstraktet faktorer.

Derfor anbefales det å lage et antistoff-basert kit for å måle pepsin-proteinet. Denne typen kit er langt mer brukervennlig og stiller mindre krav til tid og temperatur kontroll.

STIKKORD	NORSK	ENGELSK
GRUPPE 1	Pepsin	Pepsin
GRUPPE 2	Pelagisk fisk	Pelagic fish
EGENVALGTE		

INNHALDSFORTEGNELSE

1	Innledning	3
2	Bakgrunn	3
3	Målsetting	4
4	Organisering	4
5	Arbeidsbeskrivelse	5
6	Materiell og metoder	5
	6.1 Fisk	5
	6.2 Pepsin aktivitet	5
7	Resultater	6
8	Konklusjon og anbefaling	9
9	Videre arbeid	10

1 Innledning

Prosjektet ”Pelagisk kvalitet – fra hav til fat”, er et større samarbeid mellom Fiskeri- og Havbruksnæringens Landsforening (FHL) ved Pelagisk Forum og Norges Sildesalgslag (NSSL) samt flere FOU-institusjoner¹, hvor instituttvirksomheten ledes og koordineres av SINTEF.

Hensikten med prosjektet er å øke verdiskapning og lønnsomhet i pelagisk sektor gjennom å sikre optimal kvalitet på pelagisk råstoff til konsum innenfor alle delene av verdikjeden, fra havmiljø til marked. Innenfor prosjektet er det en rekke oppgaver som har et klart FOU-preg, hvor problemstillinger gitt i dette prosjektet var en av de.

2 Bakgrunn

Gjennom et avsluttende prosjektmøte i Bergen, 05.12.01 mellom aktørene i prosjektet, fremholdt representantene fra næringen at en av de større utfordringene var kvalitetsforringelse som har sammenheng med høyt innhold av åte² i råstoffet. Såkalt ”buksprengeing” kan skje når fisken spiser store mengder dyreplankton og en opplever at råstoffet til tider blir forringet i en slik grad at det ikke er egnet for konsumanvendelse. Dette medfører en vesentlig reduksjon i potensialet for verdiskapning gjennom verdikjeden da fisk til konsum er bedre betalt enn fisk til mel/olje.

Buksprengeingen og den generelle kvalitetsforringelsen antas å ha sammenheng med stor enzymaktivitet som bryter ned fiskens proteiner (proteolyse). Enzymaktiviteten er forårsaket av fiskens egne fordøyelsesenzymmer og/eller av enzymer i åten og/eller enzymer fra fiskens tarmbakterier.

Innholdet av åte i fangsten kan variere fra art til art (sild, lodde, makrell), fra år til år, gjennom året og mellom ulike fangstfelt. Med kunnskap om slike variasjoner og eventuelle sammenhenger kan en til en viss grad redusere problemene. For eksempel fanger deler av flåten makrellkvoten så sent som mulig i sesongen, da en erfaringsmessig har mindre problemer med åteinhold³. Slik kunnskap er imidlertid ikke systematisert og vil være en av oppgavene innenfor hovedprosjektet ”Pelagisk kvalitet – fra hav til fat”.

I dag foregår vurderingen av åteinholdet/enz.akt. ombord i fartøyet, basert på fiskernes erfaringer. Som uttalt på møtet blir en slik vurdering meget subjektiv og kan variere stort fra fartøy til fartøy. Det er også en rekke arter ”åte” som ikke lett lar seg oppdage visuelt, slik at enzymaktiviteten kan være høy uten at det foreligger synlige tegn før etter flere dager. Spesielt foredlingsindustrien/fiskekjøperne opplever dette som et problem, da råstoffet ikke har den kvaliteten som var forutsatt under oppkjøpet. Fangstfolkene ombord på fartøyet på sin side har behov for å vite noe om fiskens tilstand slik at nødvendige tiltak kan treffes i tide (f.eks. fyllingsgrad i tanker, kjøling, lagrings- og transporttid).

Det finnes metoder for måling av aktivitet fra aktuelle enzymer (f.eks. pepsin-, trypsin- liknende enz.). Anvendelse av metodene krever imidlertid laboratoriefasiliteter og et visst kunnskapsnivå. I tillegg er analysene tidkrevende. Disse mer arbeidsintensive og krevende metodene er således ikke egnet som verktøy som fiskerne kan benytte for målinger ombord i fartøyene.

På bakgrunn av ovenstående er det et sterkt ønske fra både fiskere og foredlingsindustri / fiskekjøpere om utvikling av en lett anvendelig analysemetode som fiskerne kan benytte for

¹ SINTEF Fiskeri og havbruk A/S, Møreforskning og Fiskeridirektoratets ernæringsinstitutt

² Menes her div. arter som sild/lotde/makrell beiter på.

³ Ref: Gjermund Langedal, Pelagisk forum

objektive målinger av enzymaktiviteten i fangsten *in situ*, for dermed å være bedre rustet for beskrivelse av råstoffets kvalitet.

Tidligere arbeider angående buksprenging av lodde (Gildbert, 1982⁴), indikerer imidlertid at problemene blir forårsaket av flere ulike faktorer. Det er derfor lite trolig at en enkelt analyse kan benyttes for å forutse buksprenging. Arbeidet til Gildbert viste imidlertid at:

1. Buksprenging krever nedbryting av collagen og denne nedbrytingen forårsakes av proteaser.
2. Collagen blir svekket ved lav pH, og det er motstandsdyktig mot proteaser ved nøytral og alkalisk pH. Collagen er også svakere hos fisk med stort matinntak i forhold til hos sulteforet fisk.
3. Lav pH oppstår ved lekkasje av (1) HCl (saltsyre) fra magen og (2) av dannelse av melkesyre i muskelen post-mortem, når muskelen er rik på glukose ved dødstidspunktet. Begge faktorene skjer når fisken har stort næringsopptak.
4. Når collagen er denaturert kan det hydrolyseres av pepsin. Pepsin vil også hydrolysere myofibrill-proteiner. Pepsin enzymer kommer fra magen sammen med HCl. Pepsiner er aktive ved lav (3-5) pH.
5. HCl og pepsiner er tilstede for fordøyelse av maten. Når fisken nylig har hatt matopptak, og magen er full av åte, er det imidlertid liten lekkasje av pepsin fra magen. Dette kan ha sin årsak i at det er et lag mellom den aktuelle maten og magens enzymer, eller mer sannsynlig, på grunn av pepsin er sterkt bundet til selve føden.
6. Buksprenging skjer oftere i fisk etter at den har hatt næringsopptak, og allerede har en tom mage, enn hos fisk med en full mage.
7. Tarmbakterier (som i større grad er tilstede i fisk med stort fødeopptak enn i sulteforet fisk), kan medvirke til buksprenging nær analåpningen, spesielt i fisk fanget med full mage hvor mageinnholdet enda ikke har blitt tilført tilstrekkelig syre.
8. Det antas at matopptaket i seg selv har en effekt på buksprengingen, men det er ikke klarlagt hvilke faktorer som forårsaker problemene. For klargjøring bør det settes opp et kontrollert forsøk hvor fisk blir matet med ulike dietter.

3 Målsetting

Målsettingen med prosjektet var å gjøre forundersøkelser og å gjennomføre forsøk for å avdekke mulighetene for å utvikle en analysemetode i form av et instrument/kit som fiskerne kan benytte *in situ* for objektiv vurdering av aktuell enzymaktivitet i pelagiske fangster. Prosjektet fokuserer i hovedsak på sild (*Clupea harengus*).

4 Organisering

Prosjektet er del av et større prosjekt "Pelagisk kvalitet – fra hav til fat" og har en overordnet organisering som er beskrevet i søknaden.

⁴ Gilberg, A. (1982) Autolysis of fish tissue – General aspects. Dr Scient. Thesis. Institute of Fisheries, University of Tromsø, 1982.

Prosjektgruppen i dette prosjektet:

Gjermund Langedal/Jan Thorsen	Prosjektansvarlig (FHL, ved Pelagisk Forum)
Snorre Angell/ Hanne Digre	Prosjektleder (SINTEF Fiskeri og havbruk A/S)
Iciar Martinez	Prosjektmedarbeider (SINTEF Fiskeri og havbruk A/S)

SINTEF har faglig ansvar for gjennomføring og resultatformidling fra prosjektet. FHL, ved pelagisk Forum, har ansvar for koordinering og tilrettelegging for feltundersøkelser. Ved en eventuell kommersialisering av måleutstyret må en industripart inkluderes for ferdigstilling og produksjon av kit/instrument.

5 Arbeidsbeskrivelse

Arbeidet ble delt i to oppgaver:

1. Undersøke brukervennlighet av målinger av pepsin-aktivitet. Vi har undersøkt effekter av:
 - Behandling/lagring av ekstrakt
 - Prosedyre for samling av produktet fra pepsinaktivitet
2. Undersøke muligheten for å isolere pepsinet for mulig å lage en antistoffbasert kit

6 Materiell og metoder

6.1 Fisk

Sild (str. over 300g) ble fisket den 20/21-10-2002 innen fangstrute 0010, pakket / fryst den 23-10-2002. SINTEF Fiskeri og havbruk fikk fisken frossen fra Bergen Fiskeindustri AS. Fisken ble oppbevart frossen og ble deretter tint over natten i kjølerom for uttak av magesekker. Mager fra frossen makrell (str. 300-500 g, fisket den 04/05-11-2002 innen fangstrute 4264, pakket / fryst den 06-11-2002) og fra ikke-frossen, nylig avlivet oppdrettstorsk (4-5 kg) ble brukt for sammenligning. Bare resultater fra sild rapporteres her.

6.2 Pepsinaktivitet

Pepsinekstrakter, pepsinaktivitet og isolering av pepsin-proteinet ble gjort som beskrevet av Diaz-Lopez *et al* (1998)⁵. Detaljerte beskrivelse finnes i Vedlegg 1.

Kort beskrevet; først ble pepsinet isolert fra magecellene hvor det finnes naturlig. Inne i magecellene finnes pepsinet i dets inaktive form kalt pepsinogen. Pepsinogen ekstraheres ved å lage et vannekstrakt, og aktiveres ved å la det stå over natten i kjøleskap. Pepsin-ekstrakter ble fryselagret med og uten glyserol (som er en stabilisator). Ekstrakter uten glyserol ble frosset og tint flere ganger (opp til 4 ganger) for å måle deres aktivitet.

Pepsinaktivitet analyseres ved å blande pepsinet med et substrat (hemoglobin) som pepsinet spalter. De store og intakte hemoglobinmolekylene må da separeres fra de mindre spaltede fragmentene. Videre måles mengde stoff som er igjen i den fasen hvor de små fragmenter finnes: desto mere stoff jo høyre pepsinaktivitet og *vice versa*. Hvor mye protein som er spaltet beregnes

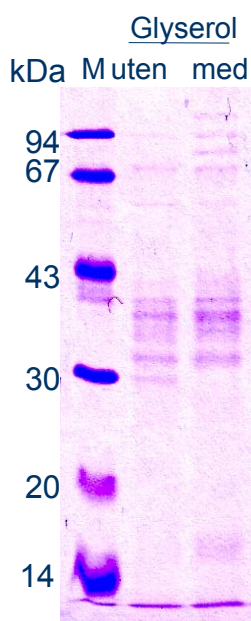
⁵ Diaz-Lopez, M., Moyano-Lopez, F.J., Alarcon-Lopez, F.J., Garcia-Carreño & Navarrete del Toro, M.M. (1998) Characterization of fish acid proteases by substrate-gel electrophoresis. *Comp. Biochem. Physiol.*, B121: 369-377.

ved å måle optisk densitet av den fase som inneholder fragmentene ved 280 nm (bølgelengde). Problemet med denne analysen er at også substratet absorberer lys ved de samme bølgelengder, og resultatene påvirkes derfor av hvor effektiv separasjonen av disse to fasene er. Vi har i dette prosjektet prøvd to separasjonsmetoder: sentrifugering, som er lettest å kjøre, og filtrering. Sentrifugering ble gjort ved to forskjellige hastigheter: lavt (2,000g) og høyt (16,000g). En transportabel sentrifuge ble benyttet ved den laveste hastigheten, denne type sentrifuge kan egne seg til bruk ombord. For høyeste rotasjonshastighet ble en større ikke transportabel labsentrifuge benyttet. For filtrering av ekstraktene brukte vi Millex-GS, engangsfiltre av 0.22µm i pore størrelse.

Pepsinproteinet ble isolert ved bruk av protein-elektroforese (separasjon i en fast gel-aktige matrise ved hjelp av strøm) av pepsinekstraktet. Pepsinet ble identifisert *in situ* for dets proteolytiske aktivitet ved bruk av hemoglobin som substrat.

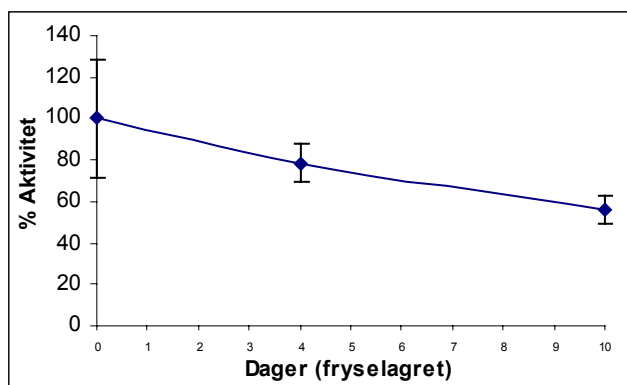
7 Resultater

Aktiviteten av pepsin varierer med inkubasjonstid og temperatur, noe som er velkjent for alle proteaser. I dette arbeidet ble 25°C og 30 min valgt, fordi det ser ut til å være optimale inkubasjonsparametre for pepsiner som stammer fra fisk. Pepsinekstraktet inneholdt flere proteiner, som vist i Figur 1. Det ble funnet at fryselagring og tining av ekstrakter uten tilsetning av glyserol fører til forandring av proteinmønsteret, hvilket tyder på at det skjer en protein-degradering under lagring/tiningsprosessen. Dette er forventet, siden pepsin har proteolytisk aktivitet under disse forholdene. Måling av enzymaktiviteten i disse fryselagrede ekstraktene viser at pepsinet mister aktivitet med økt lagringstid og ved gjentatte fryse/tinings sykluser. Opptil 40% av aktiviteten ble mistet etter 10 dagers oppbevaring og 2 tinings sykluser (Fig. 2). Dette betyr at pepsinaktiviteten bør måles etter identiske behandlinger av alle ekstrakter. Dette kan være en u hensiktsmessig prosedyre ombord på fiskefartøy, da det optimale bør være at flere ekstrakter akkumuleres og analyseres sammen når det passer med tid, fangst, etc.

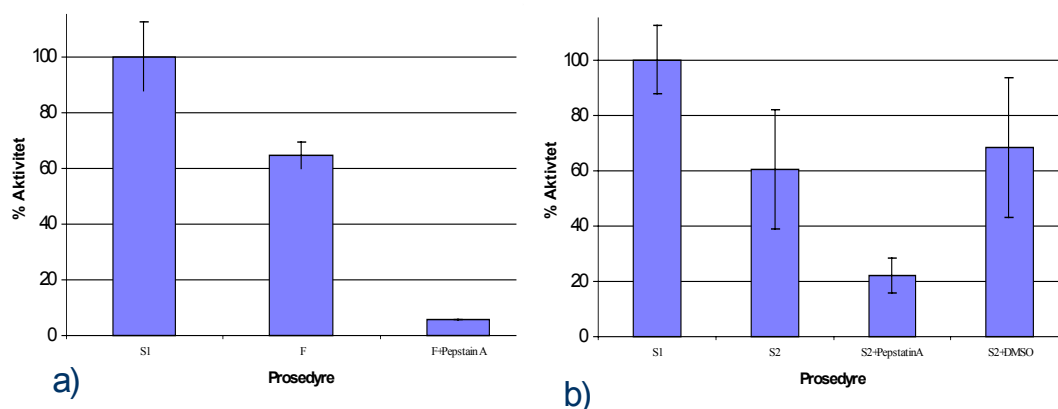


Figur 1. 15% SDS-PAGE av pepsinekstrakter frossen uten og med glyserol. M, markører for molekylær-mass

Prosedyren for å separere reaksjonsproduktet (sentrifugering *versus* filtrering) påvirket resultatene, da den mest effektive metoden var den med høyest sentrifugeringshastighet (16,000 g) etterfulgt av filtrering, mens den minst effektive metoden var sentrifugering med den transportable sentrifugen (Figur 3). Pepstatin A er en inhibitor som er spesifikk for pepsin. Det ser ut som inhiberingen er lavere i eldre ekstrakter, men dette kan kun være en effekt av at total aktivitet i disse ekstraktene er lavere, og at en del av denne "aktiviteten" kan tilskrives DMSO, som ble brukt for å løse pepstatin A (Fig. 3b).



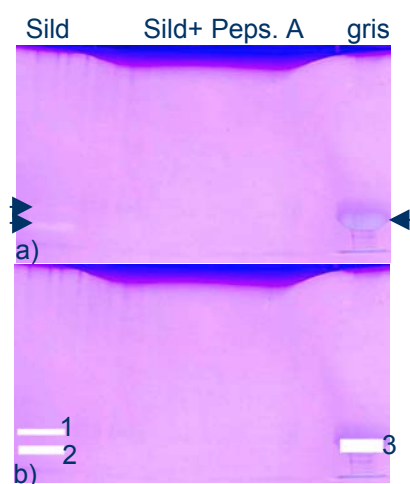
Figur 2. Effekt av fryselagring og frysing- tining på pepsinaktiviteten. Ekstrakter frosset uten glyserol. Gjennomsnitt \pm standard avvik



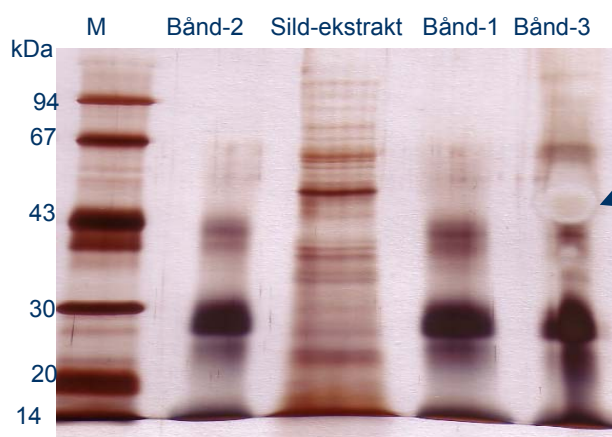
Figur 3a,b.-Effekten av metode for å isolere fasen med spaltet substrat fra fasen med hele hemoglobin og større fragmenter om målt pepsin aktivitet. S1, sentrifugering ved 2,000g; F, filtrering; S2, sentrifugering ved 16,000g. Pepsin ekstrakter lagret uten glyserol. a) ble analysert etter 10 dagers fryselagring, b) S1 er verdi etter 10 dagers fryselagring mens S2 er etter 3 måneders. Pepstatin A er en inhibitor av pepsin, DMSO er stoffet hvor pepstatin A er løst opp.

Pepsinet ble også isolert i polyacrylamid geler og aktiviteten ble visualisert *in situ*; der hvor det var proteolytiske aktivitet var gelen gjennomsiktig, mens den var farget blå der hvor det ikke var proteolyse. I Figur 4a indikerer pilene pepsin-aktiviteten (det kan være vanskelig å se dette i bildet, men lettere å identifisere på selve gelen). I Figur 4b illustreres bånd 1 og 2 aktivitet fra sildeekstrakt, mens bånd 3 illustrerer aktivitet av pepsin fra gris. Disse båndene ble kuttet for videre analyser. De to båndene (1 og 2) viser pepsin aktivitet, fordi inkubering med pepstatin A (Fig. 4a) fullstendig annullerer proteolyse.

Videre analyser er viktig for å forsikre oss om hvor mange ulike proteolytiske aktiviteter man kan finne i ekstraktene. Det er viktig å finne ut om det bare er pepsin tilstede eller om det kan være andre enzymer i tillegg. Det vil også være nødvendig å finne ut om en av båndene er et aktivt degradasjonsfragment av det andre. Et rent protein vil være nødvendig for å kunne lage et antistoff, som kan benyttes i brukervennlige og temperatur uavhengige kits. Et rent protein skulle bare gi et bånd når en måler dets isoelektriske punkt (elektrisk ladning) og bare et bånd også når en måler størrelsen av proteinet.. I dette forsøket fikk man ikke tilstrekkelig gode resultater fra målingen av isoelektriske punkt av protein-båndene (resultater er ikke vist). Ved måling av proteinenes størrelse fant en at prøven ikke var tilstrekkelig ren. Dette skyldes mest sannsynligvis at hemoglobinet som ble brukt som substrat kontaminerte prøven. Analyse av innkjøpt pepsin fra gris, som ble kjørt samtidig med pepsin fra sild, viser at det er mulig å isolere proteinet (Figur 5), men det er nødvendig å bruke mer "bånd" fra den først gelen eller en ekstrakt med høyere aktivitet.



Figur 4.- Pepsinaktivitet i geler. Aktiviteten vises som gjennomskiktige områder mot blå bakgrunn, merket med piler i a). Aktiviteten er pepsin, da det ble inhibert med pepstatin A (Peps.A). Bånd med pepsin fra sild (1 og 2) og fra gris (3) ble kuttet som vist i b) for videre karakterisering, som vist i Figur 5.



Figur 5. Innholdet av bånd som ble kuttet som vist i Figur 4. I "Bånd 3" er gris pepsinet merket med en pil.

8 Konklusjon og anbefaling

Det er mulig å lage et kit for å måle pepsinaktivitet ved å samle alle reagenser, eksempelvis i en liten sprøyte. Sprøyten kan inkuberes (for en bestemt tid og temperatur), reaksjonen stoppes og sprøyten kan kobles til et filter for å separere den fasen som inneholder det spaltede proteinet. Filtratet kan da tas inn i et rent rør hvor OD måles. Andre prosedyrer for aktivitetsdeteksjon kan også brukes. Denne prosedyren er imidlertid ikke så objektiv som man kunne anta, da små variasjoner i tid, temperatur eller mengde substrat etc, kan påvirke resultatene. I likhet med subjektiv vurdering er også denne metoden avhengig av hvem som utfører analysen. Det kreves trening for å oppnå resultater som er pålitelige og konsekvente (å få samme resultater fra samme prøve når analyser gjentas).

Pepsinaktivitet vil være avhengig av mengden av pepsin og pepsinogen i sildas mage. Det vil derfor være mulig å estimere aktiviteten ved å måle pepsinmengden, selv om man ikke skal måle aktiviteten i seg selv. Dette åpner for muligheter for å bruke en antistoffbasert analysemetode i en hurtigtest/kit. Figur 6 viser to kits for påvisning av patogene bakterier: *E. coli* O157 ("hamburger coli") og *Campylobacter* spp (ikke uvanlig i kylling, og antatt å være ansvarlig for de fleste infeksjoner forårsaket av mat). Disse analysene er vanligvis ikke helt kvantitative, men de kan lett gjøres semikvantitative (for eksempel ved å analysere flere fortynninger av samme prøve). Videre kan man ved bruk av antistoff laget mot denaturerte proteiner, lage pepsinekstraktet en dag, denaturere det (ved f.eks. koking), og kjøre analysene når det passer. Ved denne prosedyren vil proteinet variere i mye mindre grad i forhold til om analysene kjøres for å detektere native (naturlige og aktive) proteiner.



E. coli O157 *Campylobacter* spp

Figur 6. Eksampel av to kommersielle produkter for å påvise spesifikke og denaturerte proteiner. I disse tilfeller fra patogene mikroorganismer (*E. coli* og *Campylobacter* arter).

9 Videre arbeid

Videre arbeid vil bestå av:

1. Etablere en prosedyre for rengjøring av tilstrekkelig mengde pepsin for å kunne lage antistoff.
2. I samarbeide med andre institusjoner å immunisere kaniner eller mus for å lage polyklonal eller monoklonal antistoff for bruk i analysen.
3. Testen må prøves ombord for å vurdere brukervennlighet og sammenheng mellom resultater fra analysen og kvaliteten av fangsten.
4. Dersom det finnes en akseptabel sammenheng mellom resultatene fra analysene og fangskvalitet, vil det være aktuelt å lage et kit kommersielt

SINTEF har erfaring med *in situ* evaluering av kommersielle kit av den typen som er vist i Figur 6 for påvisning og semikvantitativ analyse av PSP (Paralytisk Shellfish Poison) i skjell⁶.

⁶ Overrein, I., Asp, T.N. & Aune, T. (2002) Utprøving av hurtigtesten MIST Alert™ for påvisning av PSP (Paralytisk Shellfish Poison) i skjell sammenlignet med musetest, SINTEF Rapport nr STF80 A022005. ISBN 82-14-01872-2.

Estimation of pepsin activity of crude extracts

Materials and Methods

Preparation of extracts with enzymatic activity

The fish stomachs were separated from the esophagus and the pyloric caeca. The gastric mucosa was homogenised with ddH₂O, 0°C, pH 6.0, 1:10 (w/v) and the homogenate was centrifuged at 16,000 g for 30 min at 4°C. The supernatant was left overnight at 4°C to activate the pepsinogen to pepsin.

The amount of protein in the supernatant was estimated by the OD₂₈₀. Absorbance of the extract. The extract was frozen stored at -20°C with and without the addition of glycerol to a final concentration of 50%.

Gel electrophoresis of proteins

SDS-PAGE analysis of the extracts was performed according to Laemmli (1970). In 8 x 10 cm, 0.75 mm thick gels. The stacking gel contained 5% acrylamide and 0.13% piperazine diacrylamide, and the separating gels 15% acrylamide 0.087% piperazine diacrylamide (Anderson et al., 1973). The extracts were diluted with Laemmli buffer and were not boiled (Diaz-Lopez, Moyano-Lopez et al. 1998). About 1 µg of protein was loaded for Coomassie Blue staining. Electrophoresis was carried out at 175 V (constant) for about 1 hour (until the bromophenol blue reached about 1 cm from the bottom of the gel).

After electrophoresis the gels were stained for about 1 h in 0.2% Coomassie Brilliant blue R-250 (Sigma.), 50% ethanol (or methanol) 10% acetic acid, and destained by alternating solutions of 30% ethanol 10% acetic acid with 5% ethanol, 5% acetic acid (too avoid excess destaining). Stained gels were dried between two sheets of cellophan and scanned.

Characterization of fish pepsins in zymograms

Fish pepsin activity was visualised in gels after electrophoresis under neutral conditions as described by (Diaz-Lopez, Moyano-Lopez et al. 1998). The composition of the gels is shown in Table 2. For this system polyacrylamide consisted of an acrylamide-piperazine diacrylamide mixture in the ratio 30:0.8 (Laemmli 1970), (Hochstrasser, Patchornik et al. 1988). Electrophoresis was performed for 1h at constant 100 V. The tracking dye electromobility during this period was about 6 cm.

	Stacking gel	Resolving gel
Final % Polyacrylamide	4 %	12%
Gel buffer	0.1M Tris-H ₃ PO ₄ , pH 5.5	(Alarcon, Diaz et al. 1998) 0.07M Tris-HCl, pH 7.5
10% Ammonium persulfate	40 µl	75 µl
TEMED	15 µl	8 µl
Total volume	5 ml	10 ml
Sample buffer:	0.1M Tris-H ₃ PO ₄ , pH 5.5, 20% glycerol, 0.02% methylene blue	
Electrophoresis (electrode) buffer	5 mM Tris, 0.62 M Gly, pH 7.0	

Development of enzyme activity (zymograms)

After electrophoresis, the gels were removed from the chambers and soaked during 15 min in 0.1M HCl to activate the enzyme by reducing the pH to 2.0. Then the gels was incubated for further 30 min in a solution containing 0.25% hemoglobin (Sigma) in 0.1 M Gly-HCl, pH 2.0 at 4°C, and then for further 90 min in a fresh Hb solution at 37°C. Gels were then washed in distilled water and fixed for 15 min in a 12% TCA solutions, and stained as described above with Coomassie Brilliant Blue R-250. Clear zones, indicating protease activity, can be visualised after a few minutes, but well-defined zones are obtained after 2-4 h of staining. Gels were dried and scanned as described above.

Identification of pepsins in the zymograms

Pepsins belong to a group of proteases called aspartate proteases, which are specifically inhibited by Pepstain A. 40 ul of protease extract were mixed with 10 ul of the inhibitor (1 mM Pepstain A in DMSO), for 1 h at 25°C. Afterwards, the mixture was diluted (1:1) with sample buffer and 25 ul were loaded into Neutral PAGE gels for enzymatic activity visualisation as previously described. After electrophoresis, excess inhibitor was removed by washing the gels for 15 min at room temperature with 0.1M HCl, pH 2.0 (solution:gel, 100:1), before incubation with the substrate as described in “*Development of enzyme activity (zymograms)*”

Determination of the Isoelectric points (IP) and molecular mass (Mw) of the pepsins

Bands identified as corresponding to pepsins by zymograms were excised from the gels and equilibrated in Laemmli buffer (Laemmli 1970) prior to SDS-PAGE. The equilibrated gel slices were then loaded into the slots of 15% SDS-PAGE gels (Anderson *et al.* 1973). The gels were silver stained (Ansorge, 1983) Isoelectric focusing was performed using a miniProtean III unit from BioRad on pI 3-10 ready made gels following the instructions of the manufacturer.

References

- Alarcon, F. J., M. Diaz, et al. (1998). "Characterization and functional properties of digestive proteases in two sparids; gilthead seabream (*Sparus aurata*) and common dentex (*Dentex dentex*)." *Fish Physiology and Biochemistry* 19: 257-267.
- Anderson, C. W., P. R. Baum, et al. (1973). "Processing of adenovirus 2-induced proteins." *Journal of Virology* 12: 241-252.
- Ansorge, W. (1983). Fast visualization of protein bands by impregnation in potassium permanganate and silver nitrate. *Electrophoresis*'82. D. Stathakos. Berlin, New York, Walter de Gruyter & Co: 235-242.
- Diaz-Lopez, M., F. J. Moyano-Lopez, et al. (1998). "Characterization of fish acid proteases by substrate-gel electrophoresis." *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology* 121(4): 369-377.
- Hochstrasser, D. F., M. G. Harrington, et al. (1988). "Methods for increasing resolution of two-dimensional electrophoresis." *Analytical Biochemistry* 173(424-435).
- Hochstrasser, D. F., A. Patchornik, et al. (1988). "Development of Polyacrylamide Gels That Improve the Separation of Proteins and Their Detection by Silver Staining." *Analytical Biochemistry* 173(2): 412-423.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* 227: 680-685.
- O'Farrell, P. H. (1975). "High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins." *Journal of Biological Chemistry* 250: 4007-4021.