

# Kinetic properties of fruit enzymes used as meat tenderizers

## Indhold

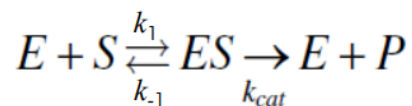
Introduktion .....	2
Formål.....	4
Metodeafsnit .....	4
Resultater.....	5
Diskussion af resultater.....	10
Konklusion og perspektivering .....	11
Referencer .....	12
Bilag .....	13

## Introduktion

Enzymet papain er en protease som findes naturligt i papaya. Papain er en hydrolase, som bryder peptidbindinger under reaktion med vand.

Papain bruges blandt andet som et exogent enzym i klaring af øl. Grunden hertil er, at enzymet fungerer som en endopeptidase og klipper proteinet i mindre kæder således, at proteinet kan holde sig i opløsning. En ulempe ved papain under ølbrygning er, at det kan mindske skumstabiliteten, fordi de store proteiner kløves. (Damodaran and Parkin, 2017)

Et enzym fungerer som en katalysator ved at mindske aktiveringsenergien og uden selv at blive forbrugt. Enzymet er substratspecifikt, hvorved kun specifikke substrater kan bindes til det aktive site. De fleste enzymer følger Michaelis-Mentens kinetikken, hvor en simpel reaktion mellem enzymet og substratet kan beskrives som følgende:



Enzymet binder til et substrat og danner et enzymsubstratkompleks. Denne binding mellem enzym og substrat indgår i en ligevægt, med følgende hastighedskonstanter:  $k_1$  og  $k_{-1}$ . Det vil sige at reaktionen mellem enzym og substrat også kan forløbe som en reversibel proces.

Efterfølgende sker det katalytiske trin hvor enzymsubstratkomplekset omdannes til produkt og det frie enzym, som nu kan bindes til et nyt substrat. Denne reaktion beskrives med hastighedskonstanten  $k_{cat}$ .

Hvis der antages at ved steady-state er hastigheden for dannelse og adskillelse af enzymsubstratkompleks det samme, kan Michaelis konstant findes ved følgende:

$$k_1 [E] \cdot [S] = (k_{-1} + k_{cat})[ES] \quad \Leftrightarrow \quad \frac{[E] \cdot [S]}{[ES]} = \frac{(k_{-1} + k_{cat})}{k_1} = K_m$$

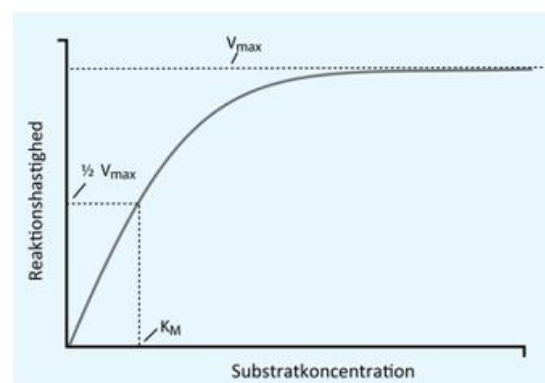
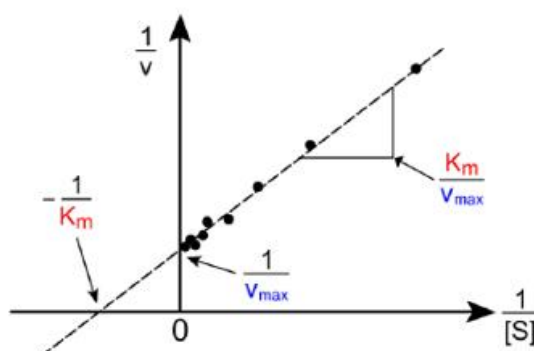
Michaelis konstanten  $K_M$  er den substratkonzentration hvor  $\frac{1}{2}V_{max}$  opnås, med andre ord den substratkonzentration hvor halvdelen af enzymernes aktive-sites er optaget af substrat.  $K_M$  beskriver hermed affiniteten mellem substratet og enzymet. Hvis  $K_M$  er lille, opnår reaktionen den maksimale reaktionshastighed  $V_{max}$  hurtigere, hvilket indikerer høj affinitet. Derimod hvis  $K_M$  er høj, opnås  $V_{max}$  først ved højere substratkonzentration, og hermed er affiniteten lav.

Den maximale reaktionshastighed  $V_{max}$  beskriver stadiet i reaktionen, hvor enzymet er fuldt mættet af substratet, her vil reaktionen ikke forløbe hurtigere selvom der tilsættes mere substrater. Dermed er  $V_{max}$  afhængig af enzymkoncentration. (Damodaran and Parkin, 2017)

### Lineweaver-Burk plot.

Den mest almindelig måde at estimere  $K_M$  og  $V_{max}$  ude fra eksperimentelt data er ved at bruge Lineweaver-Burk plot. Lineweaver-Burk plot bruges til at lave en lineær transformation af enzymets  $K_M$  og  $V_{max}$ . Dette gøres ved at plote data med den reciprokke værdi af substratkoncentrationen på x-aksen og den reciprokke værdi af hastigheden på y-aksen. Dermed kan følgende ligning opstilles:  $\frac{1}{v} = \frac{K_M}{V_{max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$

For at sikre en god estimering af  $K_M$  og  $V_{max}$  er det vigtig, at datapunkterne udgør en god balance af observationer under, over og omkring  $K_M$ . Dette er for at sikre at der ikke bliver skæv fordeling af den øvre eller nedre del af den hyperbolske kurve i Michaelis-Mentens kinetikken (se figur 1). Den primære begrænsning af Lineweaver-Burk plottet er, at de svageste punkter i datasættet med den største grad af usikkerhed tillægges den størst betydning dvs. punkter med lav substratkoncentration. Dette gør at selv små fejl og usikkerheder kan få betydning for placeringen af regressionslinjen i Lineweaver-Burk plottet. (Damodaran and Parkin, 2017)



Figur 1: Til venstre ses Lineweaver-Burk plottet med regressionslinje og til højre ses kurven for Michaelis-Mentens kinetikken.

## Formål

Formålet med forsøget er at bestemme den maksimale reaktionshastighed ( $V_{max}$ ) og Michaelis konstanten ( $K_M$ ) for enzymet Papain ved hjælp af et Lineweaver-Burk plot.

## Metodeafsnit

Materialelisten ses i protokollen “Kinetic properties of fruit enzymes used as meat tenderizers” som er udleveret til lektion 8 på Brightspace.

Standardopløsning af glutamin aminosyre samt substrat af BSA (Bovine Serum Albumin) (96% protein) blev fortyndet i Eppendorfrør ved hjælp af PBS-buffer (Phosphate-Buffered Saline). Ligningen, som blev brugt til at beregne fortynding:  $c_{før} \cdot V_{før} = c_{efter} \cdot V_{efter}$ , hvor  $c$  er koncentration og  $V$  er volumen. Bilag 1 og 2 viser fortyndingerne for henholdsvis glutamin opløsning og BSA-opløsning.

Det fortyndede BSA-substrat blev splittet i to eppendorfrør med et volumen på 250  $\mu$ l i hver. Halvdelen af eppendorfrørene fik tilsat 250  $\mu$ l af enzymet papain og blev efterfølgende mixet. Til den anden halvdel blev der tilsat 250  $\mu$ l af PBS og eppendorfrørene blev mixet. Alle substratopløsningerne blev sat i varmeskab ved 60 °C i 15 minutter.

Bagefter blev til alle substratopløsninger og glutaminopløsninger tilsat 300  $\mu$ l 5% TCA (Trichloroacetic acid). De nye opløsninger blev mixet og holdt på is i 15 minutter. Til sidst blev alle opløsningerne centrifugeret i 15 minutter ved 14000 rct og ved 4 °C.

10  $\mu$ l af hver eppendorfrør (både glutamin og substrat) blev overført i triplikater til 96 brønds plade og efterfølgende blev der tilsat 200  $\mu$ l af OPA (o-Phthalaldehyde). Bilag 3 viser setup af brønden. Opløsningerne inkuberes i 15 min ved stuetemperatur og bagefter blev absorbansen målt ved 340 nm.

## Blank og kontrolprøver

Blank og kontrolprøver er oftest brugt i forbindelse med kemisk og kvantitative analyser for at kunne fjerne støj og anden form for kontaminering af sine prøver. De bliver trukket fra det givne resultat udvundet af den analyt man er interesseret i, for at give et mere præcist og korrekt resultat. I dette tilfælde benyttes blanken til at fjerne den mulige støj, der kommer fra

Phosphate-Buffered Saline (PBS) buffer, som er opløsningsmidlet der bruges til at lave BSA substrate koncentrationer ud fra. Kontrolprøverne bruges til og fjerne støjen fra de endestillede amino og lysin grupper, som kan være tilbage hvis ikke alt protein blev udfældet af TCA i kontrolprøverne.

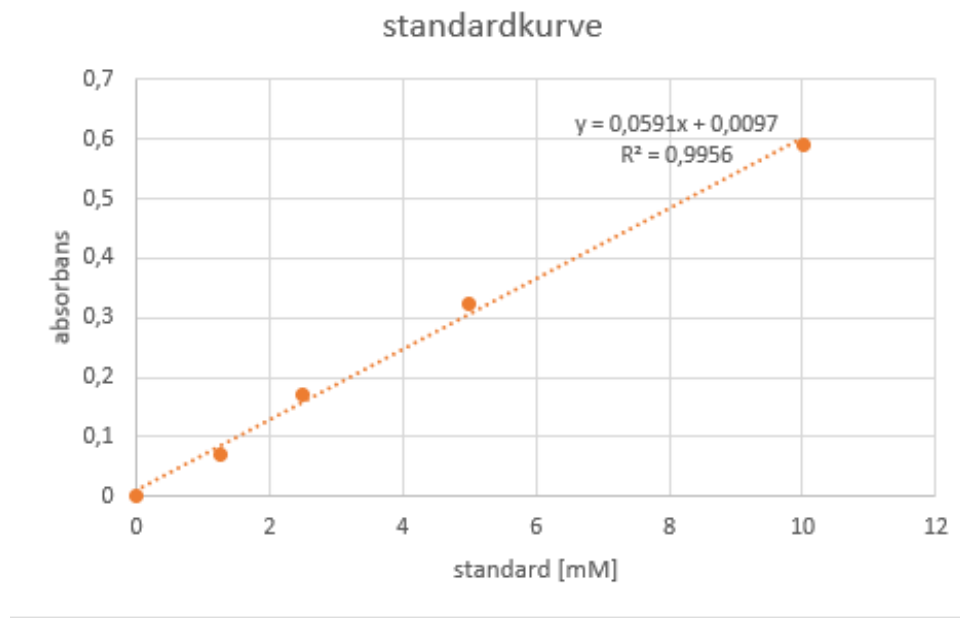
## Resultater

*Tabel 1:* Middelværdi af absorbans samt standardafvigelse for glutaminopløsningen. Middelværdien er fratrasket blank, som ligger på 0,193.

std. (mM)	abs_middelværdi	standardafvigelse
20	1,320	0,118
10	0,589	0,036
5	0,325	0,062
2,5	0,172	0,010
1,25	0,071	0,014
0	0,00	

Tabel 1 viser forskellige koncentration af glutamine i den første kolonne. Den anden kolonne viser middelværdi af absorbansen, idet der er målt på absorbans for 3 prøver af samme koncentration. Denne værdi er fratrasket blank, som har en værdi på 0,193, for at tage højde for baggrundsstøj. Den sidste kolonne viser standardafvigelserne. Den totale tabel med rådata som der er analyseret på ses i bilag 4.

Ud fra absorbansen af glutamin opstilles en standardkurve. Beregningerne til standardkurven ses i tabel 1. Denne standardkurve viser en lineær sammenhæng mellem absorbans og koncentration af glutamin med en  $R^2$ -værdi på 0,99. Standardkurven ses i figur 2. Funktionsforskriften er  $y = 0,0591x + 0,0097$ .



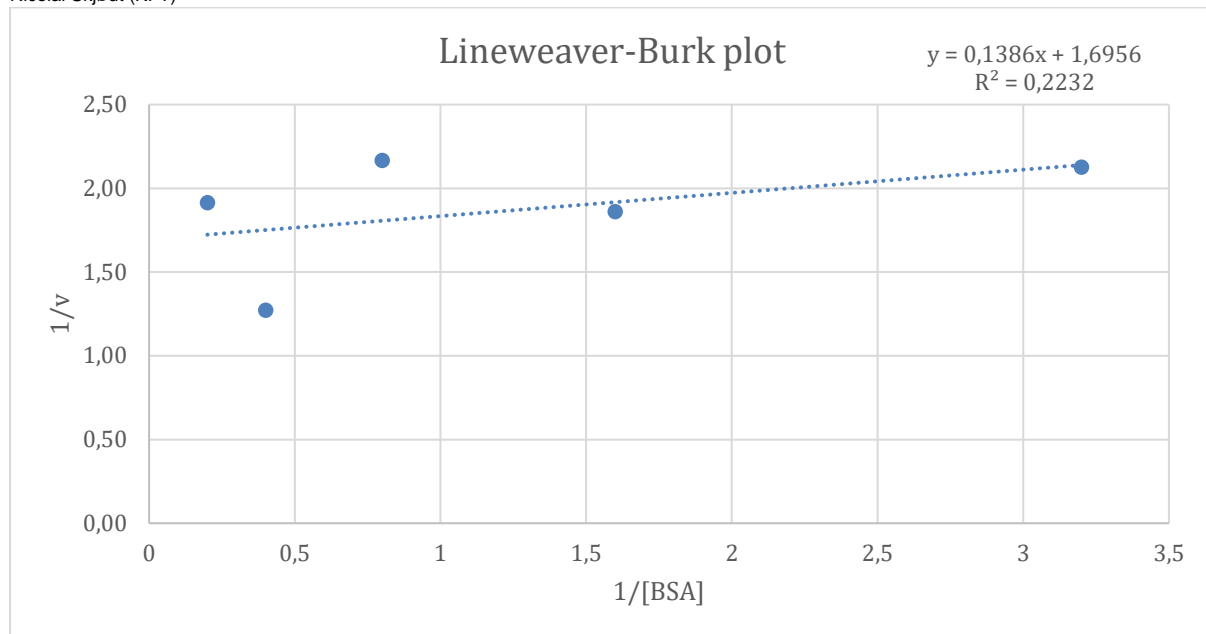
*Figur 2:* Standardkurve af glutaminopløsningen. X-aksen angiver koncentrationen af glutamin i mM mens y-aksen angiver absorbansen som er enhedsløs.

Standardkurven benyttes til at beregne reaktionshastigheden idet glutamin koncentrationen er ækvivalent med den relative substrat hydrolyse. Denne reaktionshastighed har enheden mg/mL pr. 15 minutter, da reaktionen forløb over 15 min.

v som er reaktionshastigheden beregnes med følgende formel:

$$v = \frac{abs - skæring}{hældning} = \frac{abs - 0,0097}{0,0591}$$

Dermed kan reaktionshastigheden for prøverne med enzym beregnes. Disse værdier plottes i et Lineweaver-Burk plot, hvor x-aksen angiver 1/[substrat] og y-aksen angiver 1/v. Et Lineweaver-Burk plot ses i figur 3 nedenfor, mens alle beregningerne hertil ses i bilag 5.



Figur 3: Lineweaver-Burk plot af papain enzymet fra egne resultater.

Ud fra modellen i figur 3 kan det ses, at  $R^2$ -værdier ligger på 0,2232 hvilket er en meget dårlig  $R^2$ -værdi. Desuden kan det også ses, at punkter ligger meget spredt, hvorfor der ikke er en lineær sammenhæng mellem punkterne. Da gruppens resultater ikke er særlige brugbare grundet den manglende lineære sammenhæng, er de udleverede data benyttet til at lave en nyt Lineweaver-Burk plot.

Tabel 2: Tabel over udleverede værdier benyttet til Lineweaver-Burk plot. De udleverede data indeholder substrat koncentration og absorbans. Mens beregning af reaktionshastigheden i de forskellige enheder og  $1/[S]$  og  $1/v$  er beregnet i Excel.

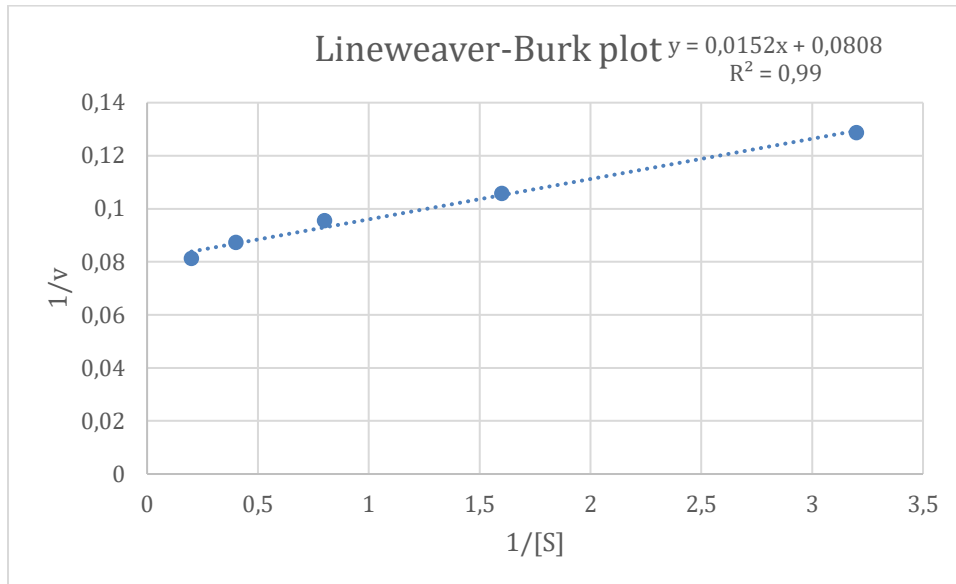
[s]	abs	v [mg/mL/15min]	v [mg/mL*min]	1/[S]	1/v
5,000	0,869	184,5919325	12,30612883	0,2	0,08126
2,500	0,815	171,9277674	11,46185116	0,4	0,08725
1,250	0,752	157,1529081	10,47686054	0,8	0,09545
0,625	0,687	141,9090056	9,460600375	1,6	0,1057
0,3125	0,579	116,5806754	7,772045028	3,2	0,12867

De udleverede data indeholder koncentrationen af substrat, middelværdi af absorbans for BSA+enzym, som var fratrasket kontrolabsorbansen, samt skæringen og hældningen på glutamin standardkurven som hhv. ligger på 0,0819 og 0,004264.

v som er reaktionshastigheden beregnes med følgende formel:

$$v = \frac{abs - skæring}{hældning} = \frac{abs - 0,0819}{0,004264}$$

I Lineweaver-Burk plottet som ses nedenfor (figur 3) ses  $\frac{1}{[S]}$  ud af x-aksen og  $\frac{1}{v}$  op af y-aksen.



Figur 4: Lineweaver-Burk plot af papain enzymet fra udleverede resultater. X-aksen angiver  $\frac{1}{[S]}$  og y-aksen angiver  $\frac{1}{v}$ .

Ud fra Figur 4 kan det ses, at  $R^2$ -værdien ligger på 0,99. Dette betyder, at der er en god lineær sammenhæng mellem  $\frac{1}{[S]}$  og  $\frac{1}{v}$ . De udleverede data giver dermed en god lineær transformering af Michaelis-Mentens kinetikken og dermed kan  $K_m$  og  $V_{max}$  nu beregnes.

Funktionsforskriften  $y = 0,0152x + 0,0808$  kan omskrives til  $\frac{1}{v} = 0,0152 \cdot \frac{1}{[S]} + 0,0808$

Ifølge forskriften for Lineweaver-Burk plottet er  $\frac{K_M}{V_{max}} = 0,0152$  og  $\frac{1}{V_{max}} = 0,0808$

Nu kan  $V_{max}$  og  $K_m$  beregnes:

$$\frac{1}{V_{max}} = 0,0808$$



Ligningen løses for  $V_{max}$  vha. WordMat.



$$V_{max} = 12,37624 \frac{mg}{mL \cdot min} \approx 12,38 \frac{mg}{mL \cdot min}$$

$$\frac{K_M}{V_{max}} = 0,0152$$

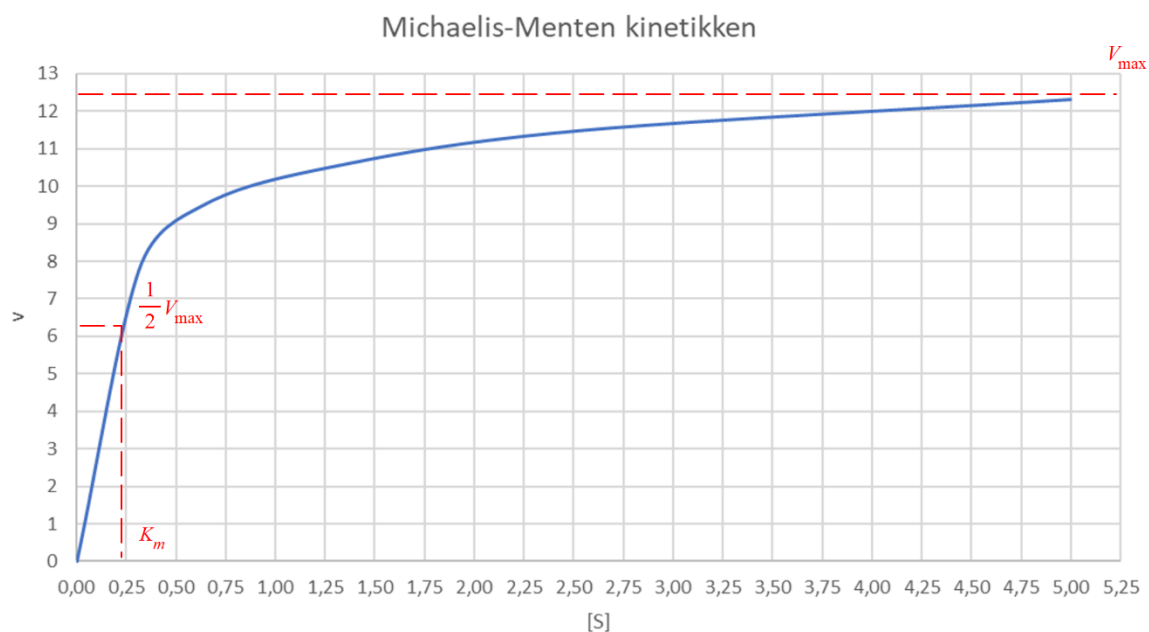


$$\frac{K_M}{12,37624} = 0,0152$$



Ligningen løses for  $K_M$  vha. WordMat.

$$K_M = 0,1881188 \frac{mg}{mL} \approx 0,188 \frac{mg}{mL}$$



Figur 5: Graf over Michaelis-Menten kinetikken fra de udleverede data. Her er  $V_{max}$  og  $K_M$  indtegnet.

For at tjekke om de udregnede  $K_M$  og  $V_{max}$  følger Michaelis-Mentens kinetikken, plottes substratkoncentrationen fra tabel 2 på x-aksen og reaktionshastigheden på y-aksen. Dette ses i figur 5. Her ligger  $K_M$  på cirka 0,248 mg/mL ud fra grafen og den udregnede værdi ligger på 0,188 mg/mL, samtidigt ses det, at  $V_{max}$  ligger på cirka  $12,5 \frac{mg}{mL \cdot min}$  på grafen og den udregnede værdi ligger på  $12,38 \frac{mg}{mL \cdot min}$ .

## Diskussion af resultater

Målet med øvelsen var at bestemme de kinetiske parametre  $V_{max}$  og  $K_M$  af papain enzymet. I den forbindelse blev der lavet en fortyndingsrække af kendt koncentration af glutamin opløsning og ved hjælp af en standardkurve blev reaktionshastigheden ( $v$ ) bestemt. Den kendte koncentration af substrat samt reaktionshastigheden blev brugt til at bestemme  $V_{max}$  og  $K_M$  af enzymet ved hjælp af Lineweaver-Burk plot. Forventninger var, at der kunne ses en lineær sammenhæng mellem den reciprokke værdi af substratkoncentrationen og reciprokke værdi af reaktionshastigheden, som ville kunne bruges til at estimere  $K_M$  og  $V_{max}$ . Dette var ikke tilfældet med den beregnede data i figur 3.

Under forsøget glemte gruppen at omrøre enzymopløsningerne med vortexmixeren, før det blev tilføjet i TCA-blandingen, da dette ikke var beskrevet i vejledningen. Her har gruppen kunne observere et bundfald, hvilket kan have betydning i det endelige resultat. Det er vigtigt at holde enzymopløsning homogene, da det ellers ikke er muligt at kunne pipettere med det korrekte mængde enzym.

En anden faktor der kunne have en indflydelse på resultaterne er, at enzymet og andre materiale kunne have været forældet, og hermed har mistet deres reaktionsevne. Siden forsøget er bygget op på enzymets evne til at katalysere, vil det derfor ikke være muligt at få brugbare resultater.

Siden der pipetteres med meget små mængder væske, kan det være svært at opnå en ensartethed i alle prøverne. For at forbedre dette, kræver det, at gruppen får større erfaring med pipettering blandt andet gennem flere øvelser. Dog indikerer pipetteringen i forbindelse med standardkurven (jf. figur 2) at der er en stor ensartethed under pipettering idet, der her er en lineær sammenhæng med en  $R^2$ -værdi på 0,9956. Udover dette kan forureningen være en af de potentielle årsager til at det endelig resultat ikke var som ønsket.

På baggrund af alle disse mulige fejlkilder blev der ikke udført beregninger af  $V_{max}$  og  $K_M$  af gruppens Lineweaver-Burk plot. I stedet blev der beregnet på udleverede data fra et forrigt forsøg.

I figur 5 ses det, at de beregnede værdier fra Lineweaver-Burk plottet for de udleverede data følger Michaelis-Mentens kinetikken og blev derfor som forventet.

## **Kødmørning**

Papain og andre endopeptidaser er typisk brugt som kødmørnings enzymer på kød, der ikke er mørnet nok i forbindelse med aldring efter døden. Det er et meget effektivt kødmørnings enzym, da det kan hydrolysere kollagen og elastin, som er de bindevævsproteiner, der er med til at gøre kødet sejt og elastisk. Det skal dog understreges, at mørningen fra enzymer og fra aldring af kød ikke resulterer i den samme slags mørning. Mørt kød indtrådt vha. aldring giver typisk et blødere og mere smagfuldt stykke kød. Mørt kød indtrådt vha. enzymatisk protease giver kød et mere porøst udtryk, næsten smuldrende i stedet for et blødere udtryk, og har sjældent en gavnende effekt på smagen, da endopeptidaser godt kan resultere i bitterhed. Dette ses særligt ved overdosering af enzymet, og kan også resultere i reduceret udbytte og tørhed af det tilberedte stykke kød. Dvs. udnyttelse af enzymer til mørning af kød, skal ske under meget kontrollerede forhold, således den rigtige dosering benyttes, og man får det ønskede sensoriske resultat. (Tarté, 2009, Damodaran and Parkin, 2017)

## **Konklusion og perspektivering**

Det var ikke muligt at lave databehandling på det udførte forsøg. Ud fra det udleverede data kan der konkluderes, at  $K_M$  er 0,188 mg/mL og  $V_{max}$  er  $12,38 \frac{mg}{mL \cdot min}$ . Det kan også ses, at det udleverede data for Papain følger Michaelis-Mentens kinetikken, som forventet.

Tidligere i rapporten blev det nævnt, at Papain bliver brugt i industrien til øl klaring og kødmørning. Udover øvelsen, kan der laves forsøg med forskellige pH- og temperatur optimum for at finde de optimale betingelser for papain enzymet.

Godkendt

## **Referencer**

DAMODARAN, S. & PARKIN, K. L. 2017. *Fennema's Food Chemistry*, London, CRC Press.  
TARTÉ, R. 2009. *Ingredients in Meat Products Properties, Functionality and Applications*, New York, NY, Springer New York.

## Bilag

### Bilag 1: Fortyndingsrække af glutamin (standard)

	koncentration (mM)	Volumen af respektiv opløsning (µl)	Volumen af PBS (µl)	Totalt volumen (µl)
1	20	200 (fra stock)	800	1000
2	10	500 (fra opløsning 1)	500	1000
3	5	500 (fra opløsning 2)	500	1000
4	2,5	500 (fra opløsning 3)	500	1000
5	1,25	500 (fra opløsning 4)	500	1000
6	0 (blank)		500	500

### Bilag 2: fortyndingsrække af BSA (substrat)

	Koncentration (mg/ml)	Volumen af respektiv opløsning (µl)	Volumen af PBS (µl)	Total volumen (µl)
1	5	500	500	1000
2	2,5	500	500	1000
3	1,25	500	500	1000
4	0,625	500	500	1000
5	0,3125	500	500	1000

### Bilag 3: setup af 96 brønds plade

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Std. 20	Std. 20	Std. 20	Papain 5	Papain 5	Papain 5	Substrat- control 5	Substrat- control 5	Substrat- control 5			
B	Std. 10	Std. 10	Std. 10	Papain 2,5	Papain 2,5	Papain 2,5	S.contr. 2,5	S.contr. 2,5	S.contr. 2,5			
C	Std. 5	Std. 5	Std. 5	Papain 1,25	Papain 1,25	Papain 1,25	S.contr. 1,25	S.contr. 1,25	S.contr. 1,25			
D	Std. 2,5	Std. 2,5	Std. 2,5	Papain 0,625	Papain 0,625	Papain 0,625	S.contr. 0,625	S.contr. 0,625	S.contr. 0,625			
E	Std. 1,25	Std. 1,25	Std. 1,25	Papain 0,3125	Papain 0,3125	Papain 0,3125	S.contr. 0,3125	S.contr. 0,3125	S.contr. 0,3125			
F	Blank	Blank	Blank									
G												
H												

**Bilag 4:** Målt absorbans for alle prøver. Tallene, der er markeret med \*, er outliers og benyttes ikke i beregningerne.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
A	1,518	1,392	1,628	1,663 *	0,695	0,704	0,177	0,641 *	0,276
B	0,796	0,809	0,742	1,089	0,8	0,769	0,178	0,544 *	0,181
C	0,447	0,561	0,545	0,571	0,58	0,782	0,272	0,197	0,207
D	0,376	0,361	0,358	0,685	0,663	0,657	0,199	0,173	0,174
E	0,267	0,249	0,277	0,614	0,567	0,621	0,176	0,176	0,17
F	0,188	0,205	0,186						

Tabellen viser absorbansen for alle prøverne i brøndspladen. De første 3 kolonner viser absorbansen for standarden, med undtagelse af række E, som viser absorbansen for den blanke prøve. Kolonne 4, 5 og 6 viser absorbansen for prøver med enzymet, og de sidste 3 kolonner viser absorbansen for substrat uden enzymet, hvilket svarer til kontrol.

## Bilag 5: tabeller og beregninger til Lineweaver-Burk plot.

Kontrol				
[BSA]	abs_middelværdi	abs-blank	standardafvigelse	% RSD
5	0,227	0,034	0,070	30,91
2,5	0,180	-0,014	0,002	1,18
1,25	0,225	0,032	0,041	18,07
0,625	0,182	-0,011	0,015	8,09
0,3125	0,174	-0,019	0,003	1,99

Ovenstående tabel viser middelværdi og standardafvigelse af absorbans for kontrolprøverne ved forskellige koncentrationer af BSA. Middelværdien af absorbansen er fratrasket middelværdien for blank, som ligger på 0,193, for at tage højde for baggrundsstøj.

Enzym								
[BSA]	abs_middelværdi	abs-kontrol-blank	standardafvigelse	% RSD	v [mg/mL/15min]	v [mg/(mL*min)]	1/[BSA]	1/v
5	0,70	0,47	0,01	0,91	7,84	0,522617033	0,2	1,91
2,5	0,89	0,71	0,18	19,92	11,79	0,786012408	0,4	1,27
1,25	0,64	0,42	0,12	18,52	6,93	0,461703328	0,8	2,17
0,625	0,67	0,49	0,01	2,21	8,06	0,537657454	1,6	1,86
0,3125	0,60	0,43	0,03	4,89	7,06	0,47035157	3,2	2,13

Ovenstående tabel viser middelværdi og standardafvigelse på absorbansen for prøverne, der er tilsat enzym. Disse middelværdier er fratrasket kontrolværdien og blank. Ud fra denne værdi kan man beregne reaktionshastigheden(v) vha. standardkurven af glutamin. Beregningen er således:

$$v = \frac{abs - skæring}{hældning} = \frac{abs - 0,0097}{0,0591}$$

De to sidste kolonner er den reciprokke værdi af koncentrationen og reaktionshastigheden beregnet. Disse værdier benyttes til Lineweaver-Burk plottet, som ses i figur 3. Her ses  $\frac{1}{[BSA]}$  ud af x-aksen og  $\frac{1}{v}$  op af y-aksen.