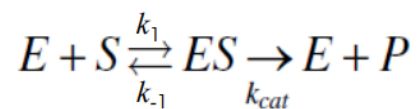


Kinetic properties of fruit enzymes used as meat tenderizers

Introduktion

Enzymet papain er en protease som findes naturligt i papaya. Papain er en hydrolase som bryder peptidbindinger under reaktion med vand. Enzymet bruges i forskellige fødevarer processer. 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.

Et enzym er et protein der fungerer som en katalysator, ved at mindske aktiveringsenergien og uden selv at blive forbrugt. Enzymet er substratspecifikt, hvorved kun bestemte 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 sket 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:

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

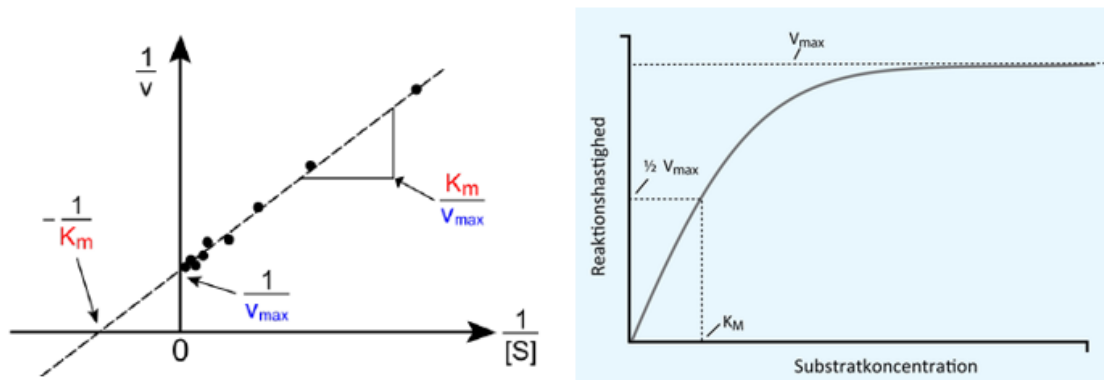
Michaelis konstanten K_m er den substratkoncentration hvor $\frac{1}{2}V_{max}$ opnås, med andre ord den substratkoncentration hvor halvdelen af enzymets aktive-sites er optaget af substrat. K_m fortæller hermed affiniteten mellem substratet og enzymet. Hvis K_m er lille, opnår reaktion den maximale reaktionshastighed V_{max} hurtigere, hvilke indikerer høj affinitet, derimod hvis K_m er høj, opnås V_{max} først ved højere substratkoncentration hermed er der lav affinitet. 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.

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 et lineære transformation af enzymets K_m og V_{max} . Dette gøres ved at plotte data ind i et plot med den reciprokke værdi fra substratkoncentrationen på x-aksen og den reciprokke værdi af hastigheden på y-aksen. Dermed kan følgende ligning opstilles:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_M}{V_{max}} \times \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

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 det 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.



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”

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: $c_{\text{før}} V_{\text{før}} = c_{\text{efter}} V_{\text{efter}}$, hvor c er koncentration og V er volumen. Tabel 1 og 2 viser fortyndingerne for henholdsvis glutamin opløsning og BSA opløsning.

Tabel 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

Tabel 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

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

Bagefter blev til alle substratopløsninger og glutamateopløsninger tilsat 300 µl 5% TCA (Trichloroacetic acid). Ny 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 µl af hver eppendorfrør (både glutamin og substrat) blev overført i tre eksemplarer til 96 brønds plade og efterfølgende blev der tilsat 200 µl af OPA (o-Phthalaldehyde). Tabel 3 viser setup af brønden. Opløsningerne inkuberes i 15 min ved stuetemperatur og bagefter blev absorbansen målt ved 340 nm.

Tabel 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.	Std.	Std.	Papain	Papain	Papain	S.contr.	S.contr.	S.contr.			

- *hvorfor inkluderer vi 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 4: Målt absorbans for alle prøver.

	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						

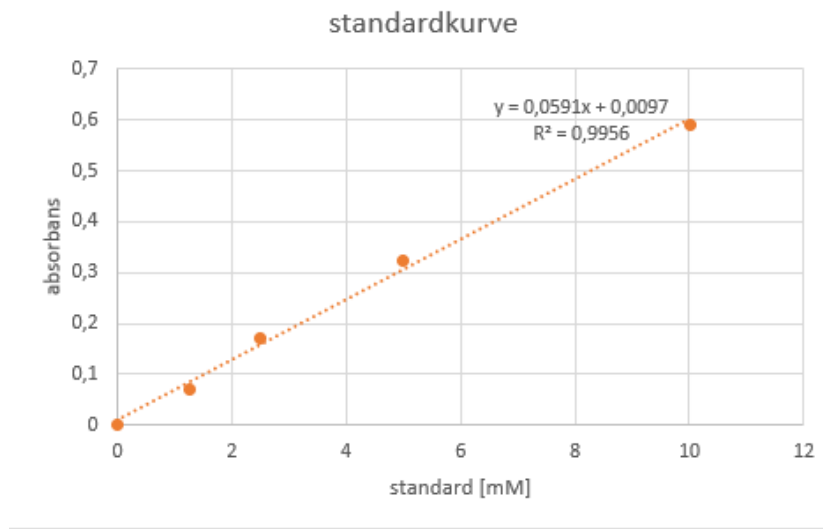
Tabel 4 viser absorbansen for alle prøverne 96 brøndsprøven. De første 3 kolonner viser absorbansen for standarden, med undtagelse af række E, som viser absorbansen for den blanke prøve. Kolonne 4, 5, 6 viser absorbansen for prøver med enzymet, og de sidste 3 kolonner viser absorbansen for substrat uden enzymet, hvilket svarer til kontrol. Tallene, der er markeret med en stjerne, er outliers og benyttes ikke i beregningerne.

Ud fra absorbansen af glutamin opstilles en standardkurve. Beregningerne til standardkurven ses i bilag 1. Denne standardkurve viser en lineær sammenhæng mellem koncentration af glutamin med en R^2 -værdi på 0,99. Funktionsforskriften $y=0,0591x+0,0097$. Den benyttes til at beregne reaktionshastigheden idet glutamin koncentrationen er ækvivalent med den relative substrat hydrolyse.

v som er reaktionshastigheden beregnes med følgende formel:

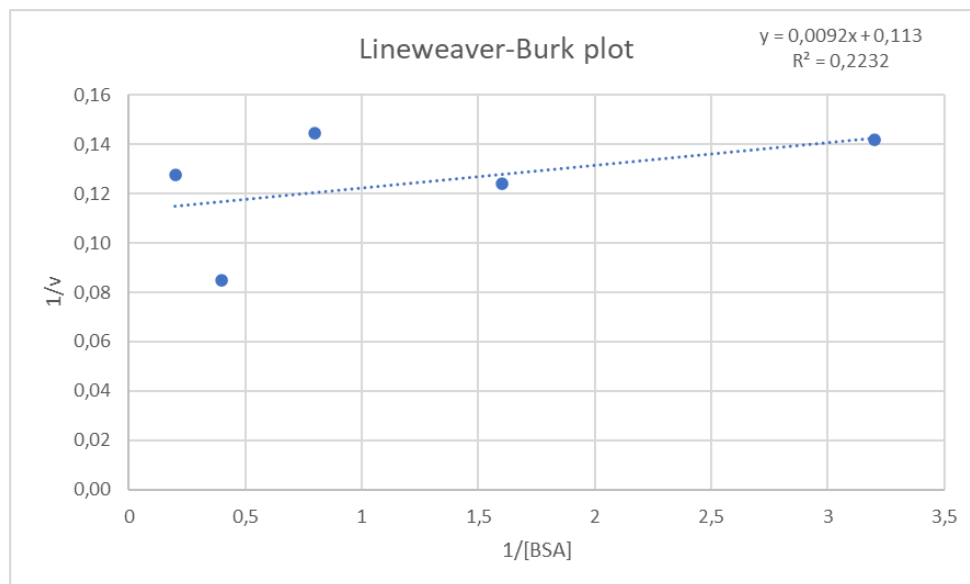
Sofie Lentz Adersen (KFT)
Sofie Munch Agerskov (BT-Dip)
Vatunyu Pimkeeree Bruuse (KFT)
Mykola Franckuk (KFT)
Nicolai Skjødtt (KFT)

$$v = (abs - skæring)/hældning = (abs - 0,0097)/0,0591$$



Figur 2: Standardkurve af glutaminopløsningen.

Et Lineweaver-Burk plot ses i figur 3 nedenfor, mens alle beregningerne hertil ses i bilag 2.



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 5: Tabel over værdier benyttet til Lineweaver-Burk plot.

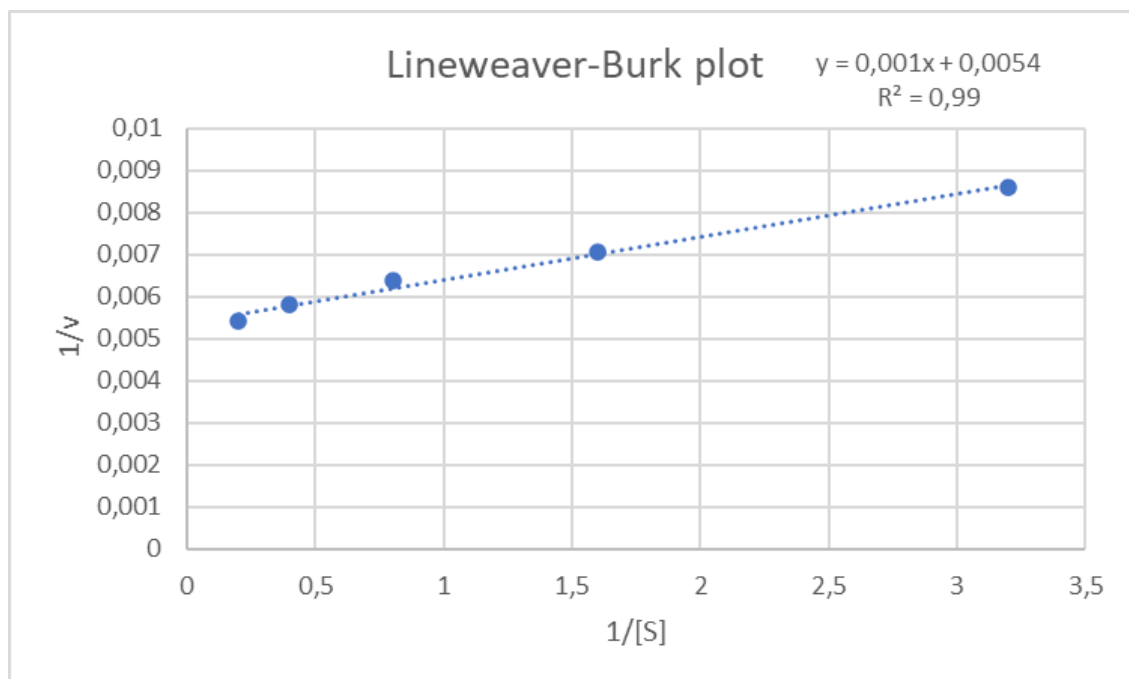
[s]	abs	v	1/[S]	1/v
5,000	0,869	184,5919	0,2	0,005417
2,500	0,815	171,9278	0,4	0,005816
1,250	0,752	157,1529	0,8	0,006363
0,625	0,687	141,909	1,6	0,007047
0,3125	0,579	116,5807	3,2	0,008578

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:

$$v = (abs - skæring)/hældning = (abs - 0,0819)/0,004264$$

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



Figur 4 : Lineweaver-Burk plot af papain enzymet fra udleverede resultater.

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 $1/[S]$ og $1/v$. De udleverede data giver dermed en god lineær transformering af Michaelis-Mentens kinetikken og dermed kan K_m og V_{max} nu beregnes.

Funktionsforskriften $y = 0,001x + 0,0054$ kan omskrives til

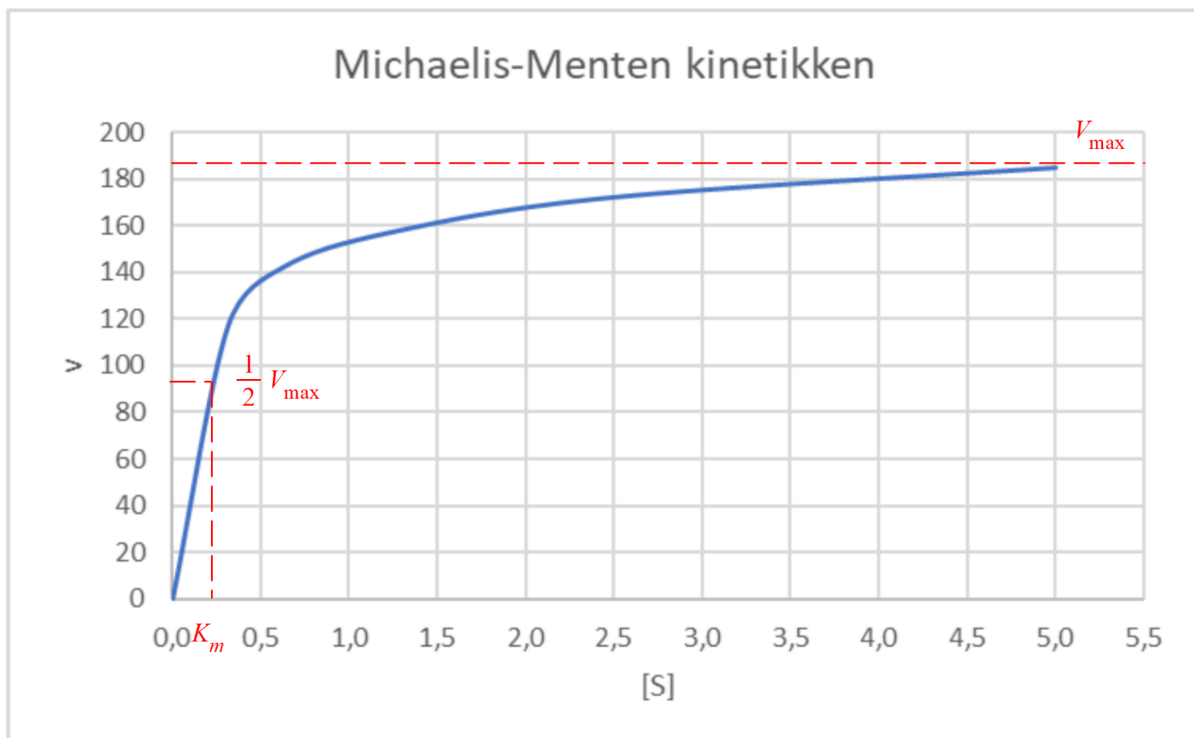
$$1/v = 0,001 * 1/[S] + 0,0054$$

Ifølge forskriften for Lineweaver-Burk plottet er $K_m/V_{max} = 0,001$ og $1/V_{max} = 0,0054$

Nu kan V_{max} og K_m beregnes:

$$\frac{1}{V_{max}} = 0.0054 \xrightarrow{\text{isolate for } V_{max}} V_{max} = 185.1851852$$

$$0.001 = \frac{K_m}{185.1851852} \xrightarrow{\text{isolate for } K_m} K_m = 0.1851851852$$



For at tjekke om de udregnede K_m og V_{max} følger Michaelis-Mentens kinetikken, plottes substratkoncentrationen fra tabel 5 på x-aksen og reaktionshastigheden på y-aksen fra tabel 5. Dette ses i figur 5, hvor K_m ligger på cirka 0,2 ud fra grafen og den udregnede værdi ligger på 0,185, samtidigt ses det at V_{max} ligger på cirka 185 på grafen og den udregnede værdi ligger på 185.15.

Diskussion af resultater

Målet med øvelsen var at bestemme kinetisk parameter 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 reaktionshastighed (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 dataen.

Under forsøget glemte gruppen at omrøre enzymopløsningerne med vortexmixeren før det blev tilføjet i TCA-blandingen, da dette ikke var beskrevet i vejledningen. Hermed har gruppen kunne observere et bundfald, hvilket kan have betydning i det endelige resultat. Da det er vigtigt at holde enzymopløsning homogene, ellers er det ikke muligt at kunne pipetteres 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 at forsøget er bygget op på enzymets evner til at katalysere, vil det derfor ikke være muligt at gennemføre forsøget.

Siden at der pipetteres med meget små mængde 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. Udover dette kan forureningen være en af de potentielle årsag til at det endelige resultat ikke var som ønskede.

Sofie Lentz Adersen (KFT)
Sofie Munch Agerskov (BT-Dip)
Vatunyu Pimkeeree Bruuse (KFT)
Mykola Franckuk (KFT)
Nicolai Skjødt (KFT)

På baggrund af alle disse mulige fejlkilder blev der ikke udført beregninger 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 plotet for de udleverede data følger Michaelis-Mentens kinetikken og blev derfor som forventet.

- *What is the potential of papain in relation to meat tenderization?*

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 bindevævsproteiner, der er med til at gøre kødet sejt og elastisk. Det skal dog understreges at mörningen fra enzymer og fra aldring af kød ikke resulterer i den samme slags mörning. 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 mörning af kød, skal ske under meget kontrolleret forhold, således den rigtige dosering benyttes og du får det ønskede sensoriske resultat.

kilder: [978-0-387-71327-4.pdf \(springer.com\)](https://doi.org/10.1007/978-0-387-71327-4) og Fennemas food chemistry by Damodaran, Srinivasan Parkin, Kirk Lindsay

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 0,185 og V_{max} er 185.15. 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 kødmörning. Udover øvelsen, kan der laves forsøg med forskellige pH- og temperatur optimum for at finde optimale betingelser for papain enzymet.

Referencer

bogen

Bilag

Bilag 1: tabel over middelværdi af absorbans for glutaminopløsningen

std. (mM)	abs_middelværdi-blank	standardafvigelse
20	1,32	0,12
10	0,59	0,04
5	0,32	0,06
2,5	0,17	0,01
1,25	0,07	0,01
0	0,00	

Tabellen 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. Den sidste kolonne viser standardafvigelserne.

Bilag 2: 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	1/[BSA]	1/v
5	0,70	0,47	0,01	0,91	7,84	0,2	0,13
2,5	0,89	0,71	0,18	19,92	11,79	0,4	0,08
1,25	0,64	0,42	0,12	18,52	6,93	0,8	0,14
0,625	0,67	0,49	0,01	2,21	8,06	1,6	0,12
0,3125	0,60	0,43	0,03	4,89	7,06	3,2	0,14

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 v (reaktionshastigheden) vha. standardkurven af glutamin.

Beregningen er således:

$$v = (abs - skæring)/hældning = (abs - 0,0097)/0,0591$$

Sofie Lentz Adersen (KFT)
Sofie Munch Agerskov (BT-Dip)
Vatunyu Pimkeeree Bruuse (KFT)
Mykola Franckuk (KFT)
Nicolai Skjødt (KFT)

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