

Bestämning av den protolytiska aktiviteten hos Enzobact™

- en enzymatisk analysmetod



**LUNDS TEKNISKA
HÖGSKOLA**
Lunds universitet

Examensarbete:
Mari Johansson

© Copyright Mari Johansson

LTH Ingenjörshögskolan vid Campus Helsingborg
Lunds universitet
Box 882
251 08 Helsingborg

LTH School of Engineering at Campus Helsingborg
Lund University
Box 882
SE-251 08 Helsingborg
Sweden

Tryckt i Sverige
Media-Tryck
Biblioteksdirektionen
Lunds Universitet
Lund 2004

Sammanfattning

Bestämning av den protolytiska aktiviteten hos Enzobact™ - en enzymatisk analysmetod

Detta examensarbete redogör för en enzymatisk metod för att analysera den protolytiska aktiviteten i Enzobact™. Enzobact™ är en ostmognadskultur, som framställs genom värmebehandling av *Lactobacillus helveticus*, och tillämpas vid ystning av lågfetthaltiga ostar. Det är lämpligt att en ostmognadskultur har en låg protolytisk aktivitet för att den färdiga produkten ska ha samma smak och utseende som en normalfet ost.

Vid pH 7.0 analyseras den protolytiska aktiviteten m ha peptidderivatet N-succinyl-ala-ala-pro-phe-p-nitroanilide (PHE) och en gulfärgning uppstår vars absorbans mäts spektrofotometriskt. Den protolytiska aktiviteten som erhålls för Enzobact™, batchnr. 04-101 20-CP, är 1.64 ± 0.36 units/g Enzobact™. Utifrån den framtagna analysmetoden mäts aktiviteten i sju olika odlingsprover tillhandahållna av Medipharm AB, där man kommer fram till att provet som odlats i Medie 3 är önskvärt att använda vid tillverkning av lågfetthaltiga ostar. Detta eftersom dess protolytiska aktivitet är låg.

Nyckelord: *Lactobacillus helveticus*, Enzobact™, enzymer, enzymkinetik, peptidderivat, protolytisk aktivitet, fermenteringsprover.

Abstract

Determination of the proteolytic activity in Enzobact™ - an enzymatic analyzing method

This thesis has developed an enzymatic method for analyzing the proteolytic activity in Enzobact™. Enzobact™ is a cheese ripening culture, which is made from heat-treated *Lactobacillus helveticus*, and is used during the ripening of low-fat cheese. It is appropriate that a cheese ripening culture have a low proteolytic activity so the finished product will have the same taste and texture as a normal-fat cheese.

At pH 7.0 the proteolytic activity is analyzed with the peptide derivate N-succinyl-ala-ala-pro-phe-p-nitroanilide (PHE) and a yellow colour appears and its absorbance is measured with a spectrophotometer. The proteolytical activity obtained for Enzobact™, batchnr. 04-101 20-CP, is 1.64 ± 0.36 units/g Enzobact™. The activity in seven different fermentation samples, provided by Medipharm AB, is measured by using this enzymatic analyzing method and it's determined that the sample which has been cultured in Media 3 is desirable to use in manufacturing of low-fat cheese. This is because its proteolytical activity is low.

Keywords: *Lactobacillus helveticus*, Enzobact™, enzymes, enzyme kinetics, peptide derivate, proteolytic activity, fermentation samples.

Förord

Föreliggande examensarbete har kommit till som ett resultat av att Kerstin Holmgren, Medipharm AB, kom med önskemål om en spektrofotometrisk metod för analysering av den protolytiska aktiviteten i deras ostmognadskultur Enzobact™.

Jag vill tacka min handledare Jonas Kronkvist, mina examinatorer Anita Tocaj och Björn Sivik för deras hjälp och stöd under arbetets gång. Jag vill även tacka mina kurskamrater Rose-Marie Cederlund och Gisela Nachmanson för deras trevliga sällskap under långa och arbetsamma dagar. Till sist vill jag tacka alla som hjälpt mig under skrivandets gång med frågor och korrekturläsning.

Innehållsförteckning:

1. Inledning	sida	1
1.1. Mjölksyrabakterier	sida	1
1.1.1. <i>Lb. helveticus</i>	sida	1
1.1.2. Enzobact™	sida	2
1.2. Enzymer och enzymkinetik	sida	2
1.3. Protolytisk aktivitet	sida	3
1.3.1. LEU och PHE	sida	4
1.4. Celltvätt	sida	4
1.5. Aktivitetsberäkning	sida	5
1.6. Kvalitetssäkring	sida	5
1.6.1. Precision	sida	5
1.6.2. Noggrannhet	sida	6
1.6.3. Linjäritet	sida	6
1.6.4. Repeterbarhet och reproducerbarhet	sida	6
2. Material och metod	sida	7
2.1. Försöksplanering	sida	8
2.2. Celltvätt	sida	8
2.3. Val av pH	sida	9
2.4. Val av substratvolym	sida	10
2.5. Val av provmängd och substratets tidsberoende	sida	10
2.6. Identifiering av felkällor	sida	10
2.7. Reproducerbarhet för PHE	sida	11
2.8. Fermenteringsprover	sida	11
3. Resultat och Diskussion	sida	13
3.1. Val av pH	sida	13
3.2. Val av substratvolym och substrat	sida	13
3.3. Val av provmängd och substratets tidsberoende	sida	14
3.4. Felkällor	sida	15
3.5. Protolytisk aktivitet och reproducerbarhet	sida	16
3.6. Fermenteringsprover	sida	17
4. Fortsatt arbete	sida	19
Referenser	sida	20

1. Inledning

Vid tillverkning av ostar tillsätter man speciella bakteriekulturer, så kallade ostmognadskulturer, till mjölken under ystningen för att förbättra ostens smak och konsistens. Det är extra viktigt att en ost med låg fetthalt erhåller dessa egenskaper eftersom dessa ostar gärna har mindre smak och en gummigaktig konsistens. En ostmognadskultur som åstadkommer ovanstående egenskaper hos lågfetthaltiga produkter är värmebehandlad *Lactobacillus helveticus*, Enzobact™, som produceras av Medipharm AB i Kågeröd.

Medipharm AB manipulerar *Lb. helveticus* genom att odla dem i olika mediesammansättningar och vid olika temperaturer för att i första hand påverka aktiviteterna för aminotransferas, aminopeptidas och proteas. För att ostens konsistens och smak ska påverkas positivt är det önskvärt att den värmebehandlade *Lb. helveticus* har en hög aminopeptidas- och aminotransferas-aktivitet samt att den har en låg protolytisk aktivitet.

I nuläget finns det redan en spektrofotometrisk metod för analys av aminopeptidasaktiviteten i Enzobact™ på Medipharm AB. Eftersom det saknas en metod för att kunna analysera den protolytiska aktiviteten koncentrerar sig detta examensarbete på en utveckling av en spektrofotometrisk metod för den protolytiska aktiviteten genom att utgå från befintlig metod hos Medipharm AB.

1.1. Mjölksyrabakterier [1, 2, 3, 4, 15]

Mjölksyrabakterier är långa gram-positiva stavar med liten rörlighet och saknar sporer, de är fermentativa och kräver rika och komplexa medier som helst ska innehålla glukos för att kunna växa. Mjölksyrabakterier är beroende av ett komplext protolytiskt (proteinnedbrytande) system som tillåter dem att utnyttja till exempel kasein för att tillgodose sitt behov av aminosyror. Detta protolytiska system består av proteaser som klyver kaseinet till stora peptider, så att peptidaser vidare kan sönderdela dessa till mindre peptider och aminosyror för att transporteras in i cellen av specifika transportproteiner.

1.1.1 *Lactobacillus helveticus*

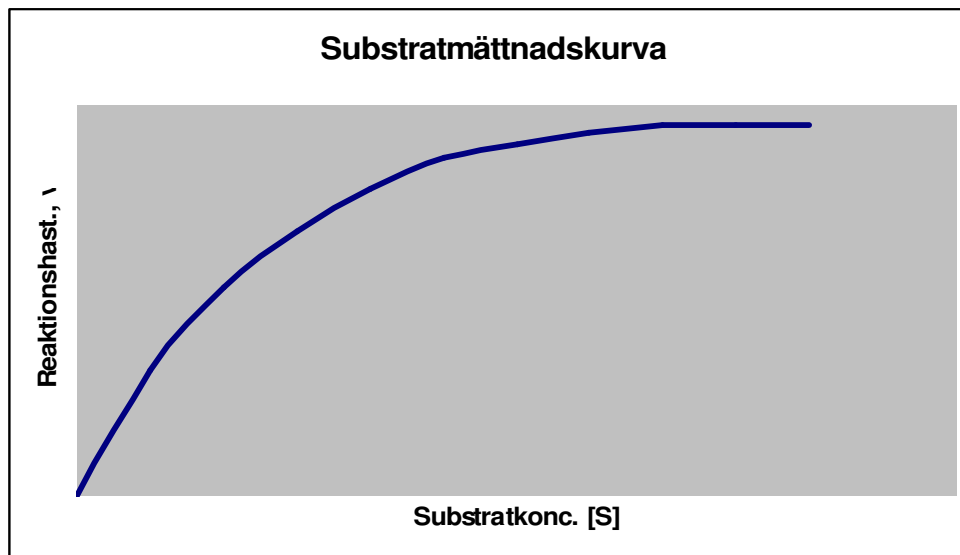
Lb. helveticus är homofermentativa och termofila bakterier som kräver mer exogena aminosyror än andra mjölksyrabakterier för att kunna tillväxa. *Lb. helveticus* är lämplig att använda vid osttillverkning, eftersom dess termofila egenskaper gör att en kraftig upphettning av ostmassan möjlig.

1.1.2. Enzobact™

Starterkulturen, Enzobact™, som används i detta examensarbete tillhandahålls av Medipharm AB. Enzobact™ bidrar till att antalet fria aminosyror fördubblas vid osttillverkning. Aminopeptidas ökar ostmognadstakten genom att mängden fria aminosyror som frisläpps uppnår halter som finns i vällagrade ostar utan att påverka den primära protolysen. Vid låga halter av proteas i ostmognadskulturen blir smaken hos osten mer mogen och strukturen förbättras markant, dvs. osten blir hårdare och mindre elastisk. Det första steget vid proteinnedbrytningen inne i cellen är när aminotransferas överför aminosyrans aminogrupp till en α -ketosyra och ostens smak förstärks.

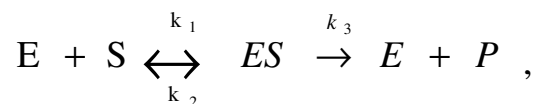
1.2. Enzymer och enzymkinetik [8, 9]

Enzymer är cellulära proteiner som katalyserar biokemiska reaktioner, är specifika och har regulatoriska egenskaper. I detta arbete har ett substrats specificitet utnyttjats för att detektera den protolytiska aktiviteten hos Enzobact™. Enzymer är mycket selektiva angående vilken reaktion de katalyserar, vilka substanser de integrerar med, samt att den genererade produkten för ett visst enzym är mycket specifik. Detta innebär att man måste veta vilka egenskaper den önskade reaktionen har för att kunna välja rätt substrat för att kunna undersöka reaktionens aktivitet.



Figur 1: Förhållandet mellan substratkoncentrationen [S] och reaktionshastigheten (v) för en given koncentration av ett enzym.

Enligt Garrett och Grisham illustrerar enzymkinetik reaktionsförloppet för ett specifikt enzym, den maximala reaktionshastigheten för enzymet, men också enzymets bindningsförmåga till substrat och inhibitorer. Reaktionshastigheten (v) hos enzymkatalyserade reaktioner ökar med ökad substratkoncentration till dess att vidare tillsats av substrat inte bidrar till en fortsatt ökning. Man har nu uppnått substratets mättnadsnivå för reaktionen vid en given enzymkoncentration och reaktionshastigheten planar ut, se figur 1. Ovanstående information kan även formuleras med följande reaktionsformel:



där E står för enzym, S för substrat och P för produkt, och ES står för enzymsubstratkomplex.

Enzymaktiviteten påverkas av temperatur och pH. Vissa enzymer är beroende av olika co-faktorer för sin funktion. Enzymaktiviteten är temperaturberoende och ökar gradvis tills ett temperaturoptimum uppnås för att sedan avta igen. Vid låga temperaturer är enzymaktiviteten låg och vid temperaturoptimum som högst, men har temperaturen stigit över optimum riskerar man att denaturera (förstöra) enzymet. Enzymer är starkt beroende av vilket pH som reaktionslösningen har, det är därför viktigt att enzymreaktioner utförs i buffrade lösningar. Genom att utgå utifrån de funktionella grupperna hos substratet kan man gissa vilket pH en buffert bör ha så att optimal miljö skapas för enzymreaktionen. Enzymer kan behöva löst bundna organiska föreningar (co-enzym) eller metalljoner (co-faktorer) till sig för att vara aktiva. Det är därför viktigt att uppmärksamma detta vid tvättning av celler för att inte förlora förmågan att kunna analysera enzymaktiviteten.

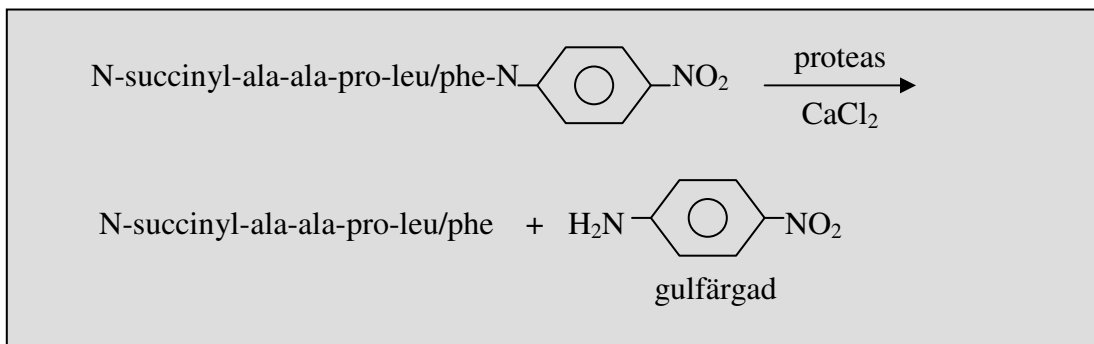
1.3. Protolytisk aktivitet [5, 6, 15, 17]

Protolytisk aktivitet innebär att proteinnedbrytande enzymer, så kallade proteaser hydrolyserar proteiner och/eller polypeptider till mindre peptider och/eller aminosyror.

Protolytisk aktivitet kan detekteras på olika sätt t ex med azocasein eller genom att använda syntetiska peptidderivat. De syntetiska peptidderivaten består av ett fåtal aminosyror kopplat till t ex p-nitroanilid. Detektion av den protolytiska aktiviteten sker genom att man egentligen detekterar mängden p-nitroanilin som bildas ur reaktionen illustrerad i figur 2, sida 4. Den senare metoden är mer användarvänlig eftersom den inte är cancerframkallande, som

azocasein är. För att detektion av den protolytiska aktiviteten hos Enzobact™ med peptidderivat krävs det en co-faktor innehållande kalciumjoner som bidrar med att stabiliteten hos enzympreparatet ökar vid frigörandet av aminosyror från cellväggsproteaset. Kalcium buffrar för att frigöra protolytisk aktivitet så att enzymets struktur modifieras och underlättar detektionen.

När proteaset klyver peptidderivatet, bildas en aminosyrakedja (peptid) och p-nitroanilin, (se figur 2). p-nitroanilin har en gul färg med ett absorptionsmaximum vid 405 nm, vilket innebär att man kan detektera bildad mängd med spektrofotometri. Förhållandet mellan p-nitroanilin och proteas är 1:1, vilket innebär att den protolytiska aktiviteten är lika stor som detekterad mängd p-nitroanilin. Det gäller att inte överskrida substratets mättnadsnivå (se substratmättnadskurvan i figur 1, sida 3) för då påverkas metodens noggrannhet och validitet negativt.



Figur 2: Reaktionsformel för detektion av den protolytiska aktiviteten hos Enzobact™ med hjälp av peptidderivaten PHE och LEU.

1.3.1. LEU och PHE

N-succinyl-ala-ala-pro-leu-p-nitroanilide (LEU) och N-succinyl-ala-ala-pro-phe-p-nitroanilide (PHE) är de syntetiska peptidderivat som används vid detektering av den protolytiska aktiviteten hos Enzobact™ i detta examensarbete. Man vet att peptidderivaten är aktiva vid olika pH, samt att den protolytiska aktiviteten troligast finns vid pH 5.5 och 7.0. Eftersom denna detektionsmetod inte tidigare har prövats på Enzobact™ kan man inte med säkerhet bekräfta denna uppgift, utan försök utförs vid olika pH för att finna pH-optimum för de olika peptidderivaten.

1.4. Celltvätt [7]

Tvättning av de frystorkade cellpreparaten görs för att avlägsna odlingsmedie samt eventuella föroreningar. Medipharm AB har redan en befintlig tvättmetod för Enzobact™ som används vid analys av aminopeptidasaktiviteten, denna tvättmetod utökas med en inledande

citrattvätten för att avlägsna skummjörkpulver. Skummjörkpulver stör vid analys genom att kaseinet i mjörk interfererar med proteas och den protolytiska aktiviteten blir inte representativ för provet. En eventuell grumling av preparatet beroende av mjörkpulvret uppvisas vid analys genom att absorbansen blir högre än förväntat och därmed inte representativ för mängden proteas i Enzobact™.

1.5. Aktivitetsberäkningar

Den protolytiska aktiviteten (units/g Enzobact™) beräknas ur följande formel tillhandahållen av Medipharm AB:

$$\text{Aktiviteten} = \frac{(\Delta A/t) \cdot SP}{\varepsilon \cdot m \cdot l}$$

där ΔA står för absorbansen, t för tiden (min), SP för spädningsfaktorn, ε för absorptionskoefficienten (units·min·g⁻¹), l för kyvettlängden (cm) och m för provmängden Enzobact™ (g). Absorptionskoefficienten som används i detta arbete är 9.62 units·min·g⁻¹ och kyvettlängden är 1 cm.

1.6. Kvalitetssäkring [10, 11, 12, 13, 18]

För att vara säker på att en analysmetod ger tillförlitliga resultat utvärderar man dessa utifrån specifika egenskaper; precision, noggrannhet, linjäritet, reliabilitet och validitet. Det är även viktigt att analysförfarandet är beskrivet på ett sådant sätt att andra kvalificerade personer kan utföra analysen och få samma resultat. Därför skriver man SOPar (Standard Operation Procedure). De omfattar även hur olika lösningar och reagens bereds, vilka instrument som används och eventuella formler för att beräkna slutresultatet. Detta för att säkra metodens repeterbarhet och reproducerbarhet.

1.6.1. Precision

Precisionen hos en serie mätvärden anger hur väl de sammanfaller, god precision innebär att mätvärdena är samlade nära varandra. Spridningen av mätvärden kring medelvärdet av alla mätningar anges av standardavvikelsen (s), men kan även anges av den relativa standardavvikelsen (RSD) och beräknas ur formeln:

$$RSD = 100 \cdot \frac{s}{x_{medel}}$$

Precisionen bestäms genom att utföra ett stort antal mätningar och utifrån dessa resultat göra en statistisk analys för att beräkna RSD. Värdet på den relativa standardavvikelsen för detta analysystem får vara max 10 %, för att godkännas som analysmetod hos Medipharm AB.

1.6.2. Noggrannhet

Noggrannheten anger hur nära mätvärdena för en serie mätningar ligger det sanna värdet. För att noggrannheten för en mätserie ska vara hög måste precisionen för serien också vara hög. I detta arbete är det dock svårt att utvärdera noggrannheten eftersom vi inte känner det sanna värdet för proteaskoncentrationen.

1.6.3. Linjäritet

För att kunna beräkna koncentrationen för ett prov är det viktigt att responsen för en viss mängd prov följer ett linjärt samband, dvs. är en första ordningens reaktion. Enzymreaktioner som följer Michaelis-Menten kinetiken är av första ordningen vid låga substratkoncentrationer. (Se substratmättnadskurvan i figur 1, sida 2). Ur standardkurvor med givna koncentrationer kan linjäriteten bestämmas antingen grafiskt eller matematiskt genom linjär regression. Den linjära regressionen används för att påvisa en kurvas linjäritet. En korrelationskoefficient (r) beräknas ur formeln nedan och används sedan som en måttstock för att påvisa en kurvas linjäritet.

$$r = \frac{\sum_i (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\left(\sum_i (x_i - \bar{x})^2\right)\left(\sum_i (y_i - \bar{y})^2\right)}}$$

God linjäritet uppvisas när r -värdet ligger nära 1.

1.6.4. Reliabilitet och validitet

Reliabilitet innebär hur pålitlig en analysmetod är, medan validitet innebär hur relevant mätresultatet är. Det räcker dock inte med att reliabiliteten är hög för att resultatet ska ha hög validitet, men en hög validitet garanterar att reliabiliteten är hög.

Vid kvantitativ mätning är reliabiliteten lika med reproducerbarheten. Tre påståenden undersöks för att utreda om analysmetoden är reproducerbar; (1) är metoden utan systematiska fel? (inter-rater reliability), (2) hur påverkas resultatet av tiden? (test-retest reliability), och (3) hur väl stämmer resultaten överrens med varandra? (internal consistency reliability). Begreppen inom parentes används bara inom kvalitativa studier, vilket innebär att kunna beskriva den insamlade och bearbetade datan på ett systematiskt och

uppriktigt sätt. Reproducerbarheten för en analysmetod fås när samma personal använder sig av samma utrustning och laboratorie för att erhålla en resultatserie.

Repeterbarheten för en analysmetod fås när olika personal använder sig av olika utrustning och laboratorium för att erhålla individuella mätserier, dock ska dessa mätserier stämma överrens med varandra för att god repeterbarhet uppnås.

I detta arbete har reproducerbarheten för den framtagna analysmetoden kunnat påvisas, men inte dess repeterbarhet eftersom tiden inte räckt till.

2. Material och metod

2.1. Försöksplanering

En försöksplanering (se tabell 1) upprättades för att underlätta utvecklingen av den nya analysmetoden, där de olika försöken namngavs från A-H.

- I. Försök A, C och H görs för att finna pH optimum för substrat LEU.
- II. Försök B görs för att visa att substrat PHE är aktivt vid pH 7.0.
- III. Försök B, D och E görs för att finna lämplig koncentration av substrat PHE.
- IV. Försök C, F och G görs för att finna lämplig koncentration av substrat LEU.

Utöver dessa försök görs ytterligare försök för att finna lämplig provmängd av frystorkad Enzobact™, eventuellt tidsberoende samt för att validera den nu framtagna metoden.

Tabell 1: Försöksplanering

Försök	pH	Substrat	Substrat-mängd (ml)	CaCl ₂ (ml)	Prov-volym (ml)	Total-volym (ml)	Prov-mängd
A	5.0	LEU	3.0	1.5	1.5	15	1g/2g
B	7.0	PHE	3.0	1.5	1.5	15	1g/2g/3g
C	5.5	LEU	3.0	1.5	1.5	15	1g/2g/3g
D	7.0	PHE	1.5	1.5	1.5	15	1g/2g/3g
E	7.0	PHE	0.3	1.5	1.5	15	1g/2g/3g
F	5.5	LEU	1.5	1.5	1.5	15	1g/2g/3g
G	5.5	LEU	0.3	1.5	1.5	15	1g/2g/3g
H	6.0	LEU	3.0	1.5	1.5	15	1g/2g/3g

2.2. Celltvätt

Notera tomvikten på centrifugröret utan lock och väg in handmalt, frystorkat Enzobact™ batchnr. 04-101 20-CP, tillhandahållet av Medipharm AB (Kågeröd, Sverige). Tillsätt 15 ml kylskåpskall, helt löst, 0.1 M natriumcitratlösning, beställd från Merck KGaA (Darmstadt, Tyskland), och skaka på vortex i 5 min eller tills det är löst. Låt de uppslammade cellerna svälla i kyl i 30 min.

Centrifugera sedan vid 6000 rpm (4000G), + 4°C, 15 min, i en Hermle Z 320 K centrifug. Detta första tvättsteg är citrattvätten. Håll av supernatanten (var noga med att inte hälla av någon cellmassa).

Tillsätt 15 ml kylskåpskall, helt löst, buffert enligt tabell 2 och slamma upp cellmassan genom att vortexa i 5 min eller tills det är löst. Upprepa därefter centrifugeringen. Detta steg upprepas ytterligare en gång. För att därefter tillsätta kylskåpskall buffert till en totalvikt av 15 g. Slamma upp cellmassan som ovan.

Tabell 2: Buffertarnas olika pH.

PH	0.1 M NaAc	0.1 M HAC	0.1 M Na ₂ HPO ₄	0.1 M NaOH
5.0	550 ml	316 ml	----	----
5.5	600 ml	100 ml	----	----
6.0	----	----	500 ml	56 ml
7.0	----	----	500 ml	291 ml

NaAc, HAC och NaOH är beställda från Merck KGaA (Darmstadt, Tyskland). Na₂HPO₄·2H₂O är beställd från KEBO Lab AB (Stockholm, Sverige).

2.3. Val av pH

Tvättade och uppslammade Enzobact™, 2.0 mM PHE/LEU, 0.1 M CaCl₂, beställd från Merck KGaA (Darmstadt, Tyskland), och buffert vid olika pH, enligt tabell 2, tillsätts till provrör med lock enligt tabell 3 till en totalvolym på 15 ml. N-succinyl-ala-ala-pro-leu-p-nitroanilide (LEU) och N-succinyl-ala-ala-pro-phe-p-nitroanilide (PHE), är beställda från Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Schnelldorf, Tyskland). Provrören inkuberas i vattenbad, + 30 °C. 1.5 ml prov tas ut var 30:e minut under 4 h och överförs till eppendorfrör. Pelleten centrifugeras ned i 2 minuter vid 13 000 rpm i en bordscentrifug (Hermle Z 160 M) vid rumstemperatur. 1 ml av supernatanten överförs till halvmikrokyvetter och absorbansen mäts vid 405 nm (Varian Cary 1E).

Tabell 3: Inkuberingsvolymen vid provtagning.

	Prov		Blank	
	pH högt	pH lågt	PH högt	pH lågt
0.1 M CaCl ₂	1.5 ml	1.5 ml	1.5 ml	1.5 ml
Enzobact™	1.5 ml	1.5 ml	1.5 ml	1.5 ml
2.0 mM LEU	----	3 ml	----	----
2.0 mM PHE	3 ml	----	----	----
Buffert pH högt	9 ml	----	12 ml	----
Buffert pH lågt	----	9 ml	----	12 ml

2.4. Val av substratvolym

Tvättade och uppslammade Enzobact™, 2.0 mM PHE/LEU, 0.1 M CaCl₂ och buffert vid pH 7.0 respektive 5.5 tillsätts till provrör med lock enligt tabell 4 till en totalvolym på 15 ml. Därefter sker inkubering och provtagning enligt samma metod som vid val av pH.

Tabell 4: Inkuberingsvolymen vid provtagning.

	Prov		Blank	
	pH 7.0	pH 5.5	pH 7.0	pH 5.5
0.1 M CaCl ₂	1.5 ml	1.5 ml	1.5 ml	1.5 ml
Enzobact™	1.5 ml	1.5 ml	1.5 ml	1.5 ml
2.0 mM LEU	----	0.3 ml 1.5 ml 3.0 ml	----	----
2.0 mM PHE	0.3 ml 1.5 ml 3.0 ml	----	----	----
Buffert pH 7.0	11.7 ml 10.5 ml 9.0 ml	----	12 ml	----
Buffert pH 5.5	----	11.7 ml 10.5 ml 9.0 ml	----	12 ml

2.5. Val av provmängd och substratets tidsberoende

Tvättade och uppslammade Enzobact™, med provmängderna 1, 2 och 3 g, tillsätts till provrör med lock tillsammans med 2.0 mM PHE, 0.1 M CaCl₂ och buffert vid pH 7.0. Därefter inkuberas provrören i vattenbad, + 30 °, och det tas 1.5 ml prov ut som överförs till ett eppendorfrör var 5:e minut de första 30 minuterna, därefter var 15:e minut tills det gått 2 timmar och därefter var 30:e minut tills det gått totalt 4 timmar. Pelleten centrifugeras ned i 2 minuter vid 13 000 rpm i en bordscentrifug (Hermle Z 160 M) vid rumstemperatur. 1 ml av supernatanten överförs till halvmikrokyvetter och absorbansen mäts vid 405 nm (Varian Cary 1E).

2.6. Identifiering av felkällor

Det handmalda, frystorkade pulvret är inte en homogen blandning då det finns stora omalda bitar blandat med mer eller mindre malda delar. Denna

felkälla är opåverkbar och innebär att det är svårt att vid invägning av bakteriepulver garantera att man får med sig lika mängd bakterier, mjölkpulver och eventuellt fryspulver vid alla uppvägningar.

En annan felkälla är, att eftersom cellsuspensionen är viskös är det svårt att garantera att samma mängd uppslammade bakterier fås upp vid pipetteringen.

För att utvärdera dessa båda felkällor testades a) flera analyser av samma uppvägning – för att se om det största felet ligger vid pipetteringen och b) olika uppvägningar av det handmalda, frystorkade pulvret för att se om felet ligger i det ohomogena utgångsmaterialet.

Först kontrolleras om en omvänd pipettering kan påverka noggrannheten, eftersom det är en viskös slurry som ska analyseras. Sedan utförs analyser av den protolytiska aktiviteten, dels med normal pipettering och dels med omvänd pipettering.

Slutligen fördubblas pipetteringsvolymen för slurryn (från 0.5 till 1 ml) samtidigt som man använder en större pipettspets (1-5 ml istället för 100-1000 μ l).

2.7. Reproducerbarheten för PHE

Ett flertal prover ur samma batch (04-101), odlingstemperatur (20 °C) och utan fryspulver (-CP) analyserades vid olika tidpunkter och under flera dagar för att sedan kunna jämföras statistiskt. Detta för att bestämma reproducerbarheten för den framtagna analysmetoden.

2.8. Fermenteringsprover

Sju olika prover erhålles från Medipharm AB's försöksfermenteringar. De är odlade i MRS-medie med olika tillsatser och namnges som Medie 1-7.

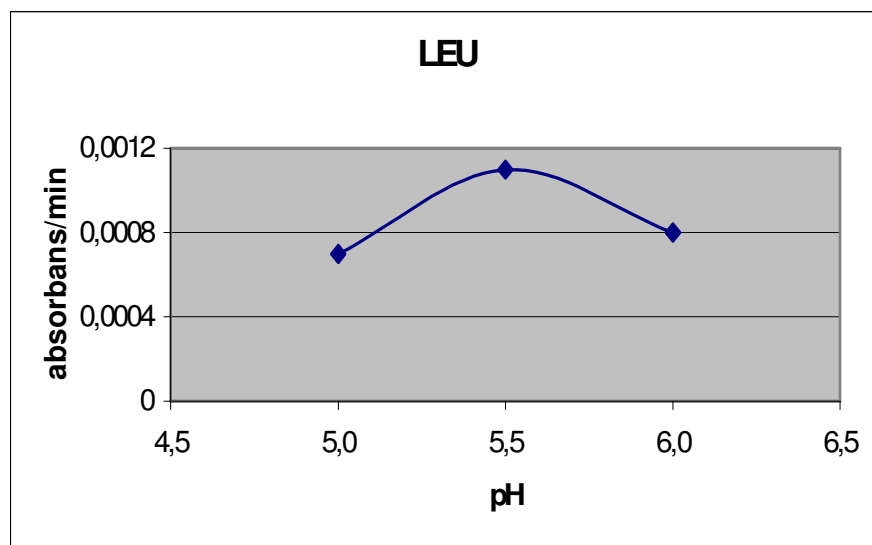
Proverna erhöles tvättade och uppslammade med 0.05 M fosfatbuffert med 0.01 M $MgCl_2$, pH 7.0. Proverna hade en totalvolym på 8 ml. Dessa tvättades ytterligare en gång med ren fosfatbuffert, pH 7.0, för att ta bort $MgCl_2$, som annars kan störa analysen av protolytiska aktiviteten. Fermenteringsproverna koncentrerades även in genom att efter den sista tvätten endast 1 ml fosfatbuffert med ovanstående pH så att pelleten kunde slammas upp. Detta sista steg utfördes för att underlätta vid detektion av den protolytiska aktiviteten.

Analysen utfördes därefter enligt den nu framtagna metoden. Det togs dock inga dubbelprover eftersom provmängden var för liten.

3. Resultat och Diskussion

3.1. Val av pH

Vid pH 7.0 är den protolytiska aktiviteten hög då proteas klyver peptidderivatet PHE och en stark gul färgning uppkommer, medan vid klyvning av peptidderivatet LEU uppvisas ingen aktivitet vid pH 7.0. Vid pH 5.5 uppkommer en svag gul färgning vid klyvning av peptidderivatet LEU, men eftersom denna klyvning inte bidrar till en lika hög protolytisk aktivitet som klyvningen av PHE vid pH 7.0, undersöks LEU vid ytterligare två pH, 5.0 och 6.0. Ett pH optimum uppvisas vid pH 5.5 enligt figur 3, vilket innebär att det är lämpligt att undersöka aktiviteten för LEU vid pH 5.5



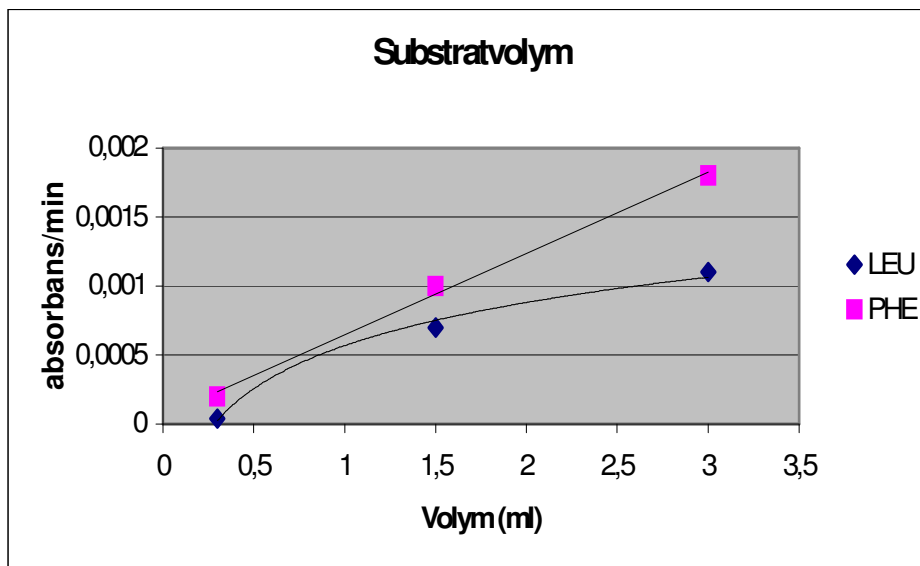
Figur 3: pH optimum för LEU vid pH 5.5.

3.2. Val av substratvolym och substrat

I figur 4 kan man iakttaga hur aktiviteten för klyvningen av PHE är linjär, vilket tolkas som att substratet finns i överskott, att mätvärdena är validerade samt att aktiviteten inte avtar och planar ut som för LEU. Man kan även se att aktiviteten för klyvningen av LEU avtar med ökad substratvolym och detta indikerar på att man har passerat det linjära området, vilket är ett tecken på att systemet inte kan valideras. Detta gör att LEU inte är lämpligt att använda vid analys av den protolytiska aktiviteten i Enzobact™.

Eftersom aktiviteten för klyvningen av PHE ligger inom det linjära området kan man använda sig av substrattillsatser under 3 ml. Tillsats av PHE med en volym på 3 ml är dock lämpligast att använda eftersom den ger bäst

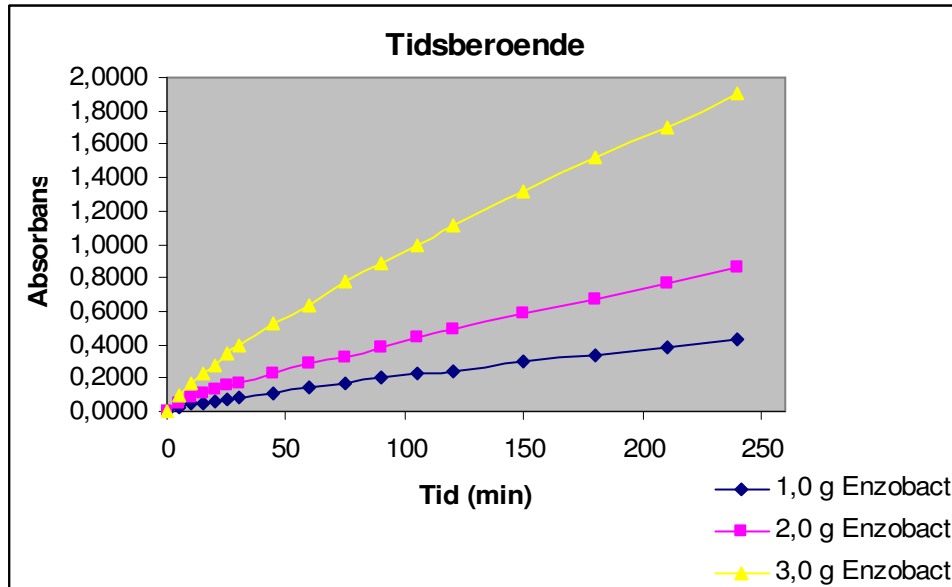
noggrannhet samt att absorbanserna blir högre och felet vid mätningen blir mindre. Detta visas vid absorbansmätning då man får i princip samma absorbans oavsett när analysen utförs.



Figur 4: Substratmättnadskurva för LEU respektive PHE.

3.3. Val av provmängd och substratets tidsberoende

När 2.0 och 3.0 g Enzobact™ tvättas och slammas upp upplevs det svårt eftersom deras lösningar är en mycket viskösa. Efter tre tvättningar finns det fortfarande mjölkpulver och fryspulver kvar i röret med 3.0 g Enzobact™ som interfererar vid absorbansmätningen, samt att vid pipettering är det svårt att få upp samma volym prov på grund av den höga viskositeten. Därför är det inte lämpligt att använda sig av denna provmängd trots att den protolytiska aktiviteten är hög (se figur 5), dvs. en gulfärgning uppstår från p-nitroanilin (se figur 2, sida 4), eftersom ovanstående problem uppstår. Provmängden 2.0 g är också olämplig eftersom det är svårt att åstadkomma god reperterbarhet vid pipettering av den tvättade och uppslammade Enzobact™. Det är även lämpligt att använda sig av provmängden 1.0 g trots att dess absorbanser är väldigt låga, se figur 5, eftersom att vid pipettering av dess slurry fås god reperterbarhet då den är lagom viskösa.



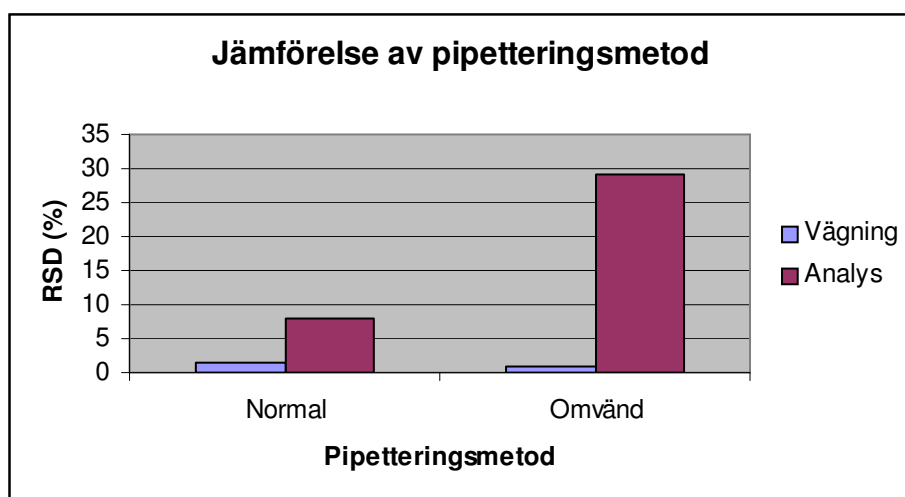
Figur 5: Diagram över substratets tidsberoende och provmängden Enzobact™ som tvättas och slamas upp.

Inkubationstiderna som väljs är 60, 75 och 90 minuter. Detta eftersom förhållandet mellan absorbansen och tiden under detta intervall följer räta linjens ekvation och den protolytiska aktiviteten kan beräknas.

3.4. Felkällor

Vid vägning av normal och omvänd pipettering med destillerat vatten finner man att RSD-värdet är 1.4 % respektive 0.9 %. Vid analys av den protolytiska aktiviteten finner man att RSD-värdet är 8 % för normal pipettering och 29 % för omvänd pipettering. Det är alltså lämpligt att använda sig av normal pipettering vid analys av den protolytiska aktiviteten i Enzobact™ eftersom RSD-värdet ligger under 10 % (rekommenderat av Medipharm AB) vid pipettering av den viskösa cellsuspensionen. Se figur 6 för visuell jämförelse av de båda pipetteringsmetoderna.

Då pipetteringsvolymen fördubblas finner man att RSD-värdet förblir lågt (se figur 8 för RSD-värden), vilket innebär att pipettering med dubbel slurryvolym har en positiv effekt på resultatet. Den dubbla pipetteringsvolymen används vid vidare analys av den protolytiska aktiviteten i Enzobact™ eftersom en bra noggrannhet uppvisas.



Figur 6: Jämförelse av två olika pipetteringsmetoder, samt av pipetteringsvolymens signifikans till ökad analytisk noggrannhet.

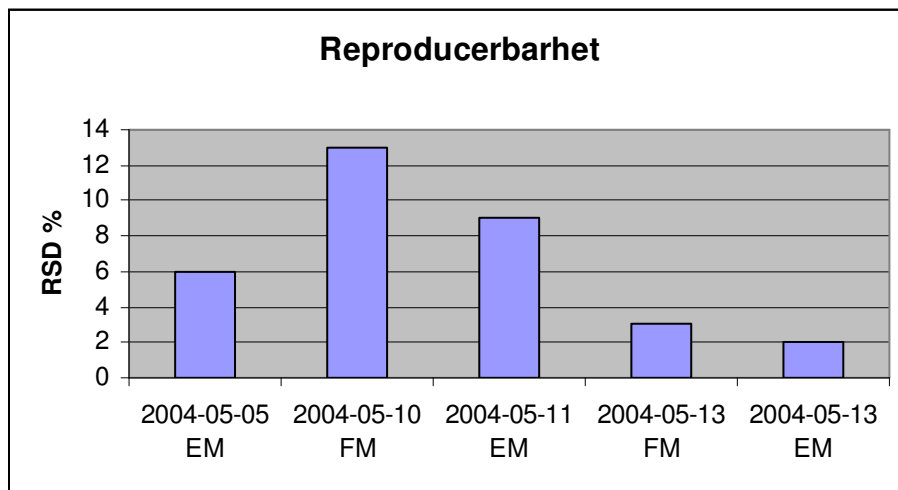
3.5. Protolytisk aktivitet och reproducerbarhet

Den protolytiska aktiviteten i Enzobact™ beräknas till 1.64 ± 0.36 units/g Enzobact™ genom att använda sig av Excel-bladet i figur 7.

Batch no.	Datum	Abs 1	Abs 2	Abs 3	Δ Abs/min	SP	Provvikt (g)	ϵ	units/g	Utförd av
Tid (min)		0	15	30						
Enzobact 04-101 20-CP Aa	20040510	0,223	0,269	0,305	0,0027	5	1	9,62	1,42	MJ
Enzobact 04-101 20-CP Ab	20040510	0,211	0,271	0,313	0,0034	5	1	9,62	1,77	MJ
Enzobact 04-101 20-CP Ba	20040510	0,229	0,269	0,330	0,0034	5	1	9,62	1,74	MJ
Enzobact 04-101 20-CP Bb	20040510	0,217	0,280	0,331	0,0038	5	1	9,62	1,98	MJ
Enzobact 04-101 20-CP Ca	20040510	0,227	0,308	0,328	0,0034	5	1	9,62	1,76	MJ
Enzobact 04-101 20-CP Cb	20040510	0,249	0,292	0,322	0,0024	5	1	9,62	1,27	MJ
Enzobact 04-101 20-CP Da	20040510	0,215	0,280	0,318	0,0034	5	1	9,62	1,78	MJ
Enzobact 04-101 20-CP Db	20040510	0,235	0,290	0,334	0,0033	5	1	9,62	1,73	MJ
Enzobact 04-101 20-CP Aa	20040511	0,207	0,258	0,308	0,0034	5	1	9,62	1,75	MJ
Enzobact 04-101 20-CP Ab	20040511	0,212	0,263	0,315	0,0034	5	1	9,62	1,77	MJ
Enzobact 04-101 20-CP Ba	20040511	0,219	0,275	0,330	0,0037	5	1	9,62	1,92	MJ
Enzobact 04-101 20-CP Bb	20040511	0,218	0,269	0,315	0,0032	5	1	9,62	1,68	MJ
Enzobact 04-101 20-CP Ca	20040511	0,218	0,294	0,314	0,0032	5	1	9,62	1,67	MJ
Enzobact 04-101 20-CP Cb	20040511	0,218	0,297	0,333	0,0039	5	1	9,62	2,00	MJ
Enzobact 04-101 20-CP Da	20040511	0,224	0,277	0,322	0,0032	5	1	9,62	1,69	MJ
Enzobact 04-101 20-CP Db	20040511	0,219	0,268	0,320	0,0033	5	1	9,62	1,73	MJ
Enzobact 04-101 20-CP Aa	20040513	0,203	0,252	0,286	0,0028	5	1	9,62	1,44	MJ
Enzobact 04-101 20-CP Ab	20040513	0,201	0,263	0,286	0,0028	5	1	9,62	1,47	MJ
Enzobact 04-101 20-CP Ac	20040513	0,201	0,268	0,281	0,0027	5	1	9,62	1,39	MJ
Enzobact 04-101 20-CP Ad	20040513	0,205	0,264	0,291	0,0029	5	1	9,62	1,49	MJ
Enzobact 04-101 20-CP Da	20040513	0,217	0,274	0,307	0,0030	5	1	9,62	1,56	MJ
Enzobact 04-101 20-CP Db	20040513	0,218	0,274	0,305	0,0029	5	1	9,62	1,51	MJ
Enzobact 04-101 20-CP Dc	20040513	0,220	0,267	0,311	0,0030	5	1	9,62	1,58	MJ
Enzobact 04-101 20-CP Dd	20040513	0,221	0,274	0,308	0,0029	5	1	9,62	1,51	MJ

Figur 7: Excel-blad för beräkning av den protolytiska aktiviteten i units/g Enzobact™.

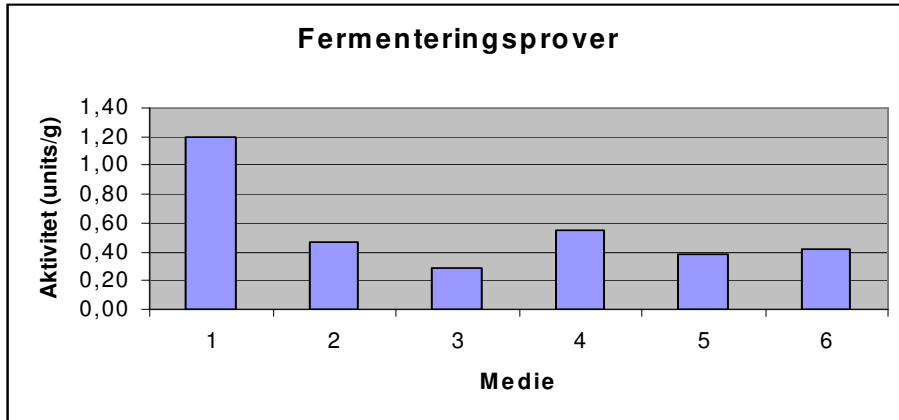
Vid analys av den protolytiska aktiviteten har följande RSD-värde påvisats; 6 %, 13 %, 9 %, 3 % och 2 % (se diagram i figur 8). Fyra av fem värden ligger under 10 %, vilket innebär att dessa analyser har en god precision. Trots att värdet som erhöles den 10 maj 2004 överstiger det rekommenderade 10 % kan man dra slutsatsen att reproducerbarheten för den analytiska metoden är god. Detta innebär att man kan applicera den vid analys av den protolytiska aktiviteten hos värmebehandlad *Lb. helveticus*.



Figur 8: Fördelning av RSD-värde.

3.6. Fermenteringsprover

Analys av fermenteringsproverna gav följande resultat som visas i diagrammet i figur 9. En låg protolytisk aktivitet önskas, eftersom en ostmognadskultur med dessa egenskaper ger en lågfetthaltig ost med en konsistens liknande en normalfetthaltig ost. Dessutom förbättras smaken. Det fermenteringsprov som odlats i Medie 3 uppvisar lägst aktivitet, prover odlade i Medie 2, 5 och 6 uppvisar även de låga aktiviteterna, medan provet odlat i Medie 1 uppvisar en mycket hög aktivitet i förhållande till de andra. Eftersom inga dubbelprover gjorts kan man inte utesluta att resultaten är slumpmässiga, men utifrån den befintliga analysen dras slutsatsen att fermenteringsprovet odlat i Medie 3 är lämpligast att använda sig av vid vidare utveckling av en ostmognadskultur som ska användas vid tillverkning av lågfetthaltiga ostar med en smak som ska efterlikna den hos Cheddar.



Figur 9: Den proteolytiska aktiviteten hos fermenteringsprover 1-6.

4. Fortsatt arbete

För att den framtagna analytiska metoden ska kunna valideras ytterligare är det lämpligt att ett annat laboratorie och annan personal utför analysen så att metodens repeterbarhet säkerställs. Det är även lämpligt att ytterligare tester utförs på prover från Medipharm AB's försöksfermenteringar, eftersom det fanns så lite prov att inga dubbelprov kunde göras i detta arbete. Det är inte säkert att den framtagna analysmetoden fungerar på de "våta" fermenteringsproverna eftersom den är framtagen på ett frystorkat material.

Det skulle vara intressant att veta om det är möjligt att analysera den protolytiska aktiviteten med andra syntetiska peptidderivat än N-succinyl-ala-ala-pro-phe-p-nitroanilide som används i detta arbete. Kan man då använda sig av samma metod med andra peptidderivat eller är det nödvändigt att utveckla en ny metod?

Referenser

- [1] Kenny, O., FitzGerald, R.J., O’Cuinn, G., och Jordan, K. (2003). Growth phase and growth medium effect on the peptidase activities of *Lactobacillus helveticus*. *International Dairy Journal*, 13, s. 509-516.
- [2] Ardö, Y., Spinner Madsen, J., och Tähtinen, H. (2003). Improvement of texture in low fat cheese by accelerated degradation of peptides to free amino acids. *Mælkeritidende*, 19, s. 444-448.
- [3] Technical data of Enzobact. Medipharm AB, Box 101, S-260 23 Kågeröd
- [4] Caira, S., Ferranti, P., Gatti, M., Fornasari, M. E., Barone, F., Lilla, S., Mucchetti, G., Picariello, G., Chianese, L., Neviani, E., och Addeo, F. (2003). Synthetic peptides as substrate for assaying proteolytic activity of *Lactobacillus helveticus*. *Journal of Dairy Research*, 70, s. 315-325.
- [5] Coolbear, T., Reid, J. R., och Pritchard, G. G. (1992). Stability and Specificity of the Cell Wall-Associated Proteinase from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* H2 Released by Treatment with Lysozyme in the Presence of Calcium Ions. *Applied and Environmental Microbiology*, 10, s. 3263-3270.
- [6] Personal communication with Ylva Ardö, professor på The Royal Veterinary and Agricultural University, Dep. Dairy and Food Science, till Kerstin Holmgren på Medipharm AB. (20040119).
- [7] Tykesson, E. (2003). Analys av LNA/PNA aktivitet Enzobact, version 7. Medipharm AB.
- [8] Garrett, R. H., Grisham, C. M. (1999). Biochemistry – 2nd edition. Orlando, United States of America. Harcourt College Publishers. Chapter 14, s. 426-459. ISBN 0-03-022318-0.
- [9] Switzer, R. L., Garrity, L. F. (1999). Experimental Biochemistry – 3rd edition. New York, United States of America. W. H. Freeman and Company. Section II, s. 95-104. ISBN 0-7167-3300-5.

- [10] Miller, J. N., och Miller, J. C. (2000). *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry* – 4th edition. Harlow, Essex, England. Pearson Education Limited. Chapter 2-3. ISBN 0-130-22888-5.
- [11] Prichard, E. (1997). *Quality in the Analytical Chemistry Laboratory*. Chichester, West Sussex, England. John Wiley & Sons Ltd. Chapter 5-6. ISBN 0-471-95470-5.
- [12] Bergman & Beving Instrument AB, Pipettens ABC.
- [13] Harris, D. C. (2003). *Quantitative Chemical Analysis* – 6^{ed}. United States of America. W. H. Freeman and Company. Chapter 3-4. ISBN 0-7167-4464-3.
- [14] Molin, Göran. (1998). *Livsmedelsmikrobiologi*. Lund, Sverige. Göran Molin Förlag AB. s. 128, 165-174.
- [15] Prescott, Lansing M., Harley, John P., och Klein, Donald A. (2002). *Microbiology* – 5th edition. New York, United States of America. McGraw-Hill. s. 526, 529. ISBN 0-07-112259-1.
- [16] Adams, M. R., och Moss, M. O. (2002). *Food Microbiology* – 2nd edition. Cambridge, England. The Royal Society of Chemistry. s. 315-318, 331-337. ISBN 0-85404-611-9.
- [17] Bendicho, S., Martí, G., Hernández, T. och Martín, O. (2002). Determination of proteolytic activity in different milk systems. *Food Chemistry* 79, s. 245-249.
- [18] Informationsbrev om forskningsmetodik. Sahlgrenska akademien, Göteborgs Universitet. 2005-04-19. <http://infovoice.se/fou/>

