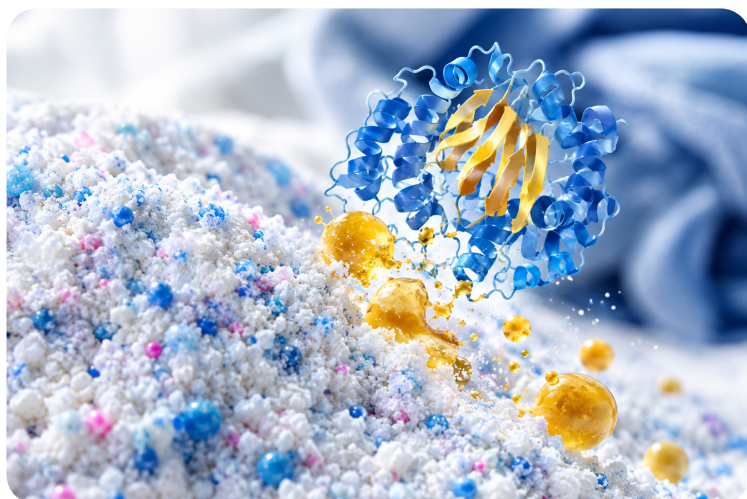


**Case 1**

Mere effektiv tøjvask ved lavere temperatur

Om Novonesis

I denne case skal I forestille jer, at I er en del af et forskerteam hos Novonesis. Hos Novonesis producerer vi blandt andet enzymer til industriel anvendelse, som kan hjælpe vores kunder med at producere mere med mindre miljøbelastning. Vi er verdens førende inden for biologiske løsninger. Sammen med vores kunder og partnere arbejder vi med at forbedre deres industrielle ydeevne for på den måde at kunne reducere deres CO₂-udledning, som er vigtig i forhold til bæredygtighed og klima.

Bæredygtighed er højt på vores agenda. Faktisk så højt, at vores strategi er inspireret af FN's Verdensmål for bæredygtig udvikling. I de senere år er det blevet tydeligere og tydeligere, at den måde, vi alle bruger vores planets naturlige ressourcer på, skal ændres.

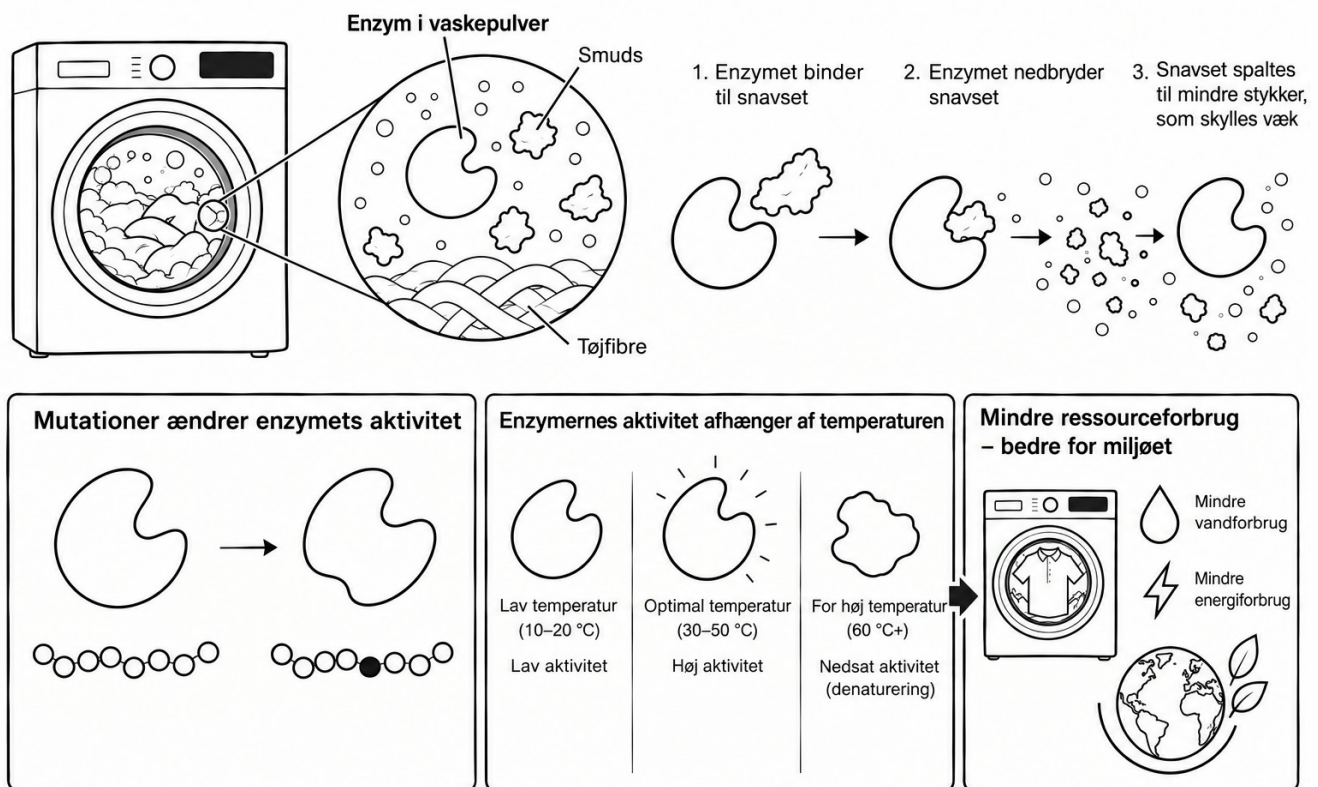
Vores ambition i Novonesis er at støtte op om verdensmålene og muliggøre ansvarligt forbrug og produktion samt nedbringe anvendelsen af vand og kemikalier. Vi er på en rejse mod CO₂-neutralitet i 2050 forpligtet til høje standarder og ambitiøse handlinger for at nedbringe vores aftryk på klima, vand og cirkulær affaldshåndtering.

I Novonesis mener vi, at innovation er vejen til kommerciel succes, og at det er vigtigt hele tiden at have de bedste og mest effektive enzymer på markedet. Udvikling af nye forbedrede enzymer er både komplekst og spændende. Vi samarbejder med mange forskellige industrier, f.eks. mad- og drikkevareindustrien, brændstofindustrien, vaskeindustrien samt landbrug- og dyrefoderindustrien.

Enzymer kan anvendes inden for mange forskellige områder, og kan f.eks. gøre vaskemiddel mere virksom ved lavere temperaturer eller sikre, at brødet i supermarkedet forbliver blødt og spiseligt i længere tid. Der er netop et større behov for en mere bæredygtig fødevare- og foderproduktion, eftersom vi bliver flere og flere mennesker på jorden, og dermed er der flere munde at mætte.

Case

I mange år har man anvendt enzymer i vaskemidler, men ved at mutere disse allerede kendte enzymeres aminosyresekvens håber forskerne at kunne optimere enzymernes effekt og derved minimere ressourceforbruget under tøjvask. I Danmark bruger en familie i gennemsnit ca. 50 liter vand om dagen alene til tøjvask. Samtidig varmes vandet op, da fedt og snavs ofte er lettere at fjerne ved høje temperaturer. Et stort vand- og strømforbrug er belastende for vores miljø, og derfor ønsker forskere at minimere dette forbrug. Da enzymeres kemiske opbygning og dermed også deres funktion ændres, når temperaturen eller substratkoncentration ændres, er det jeres opgave at undersøge effekten af en række mutationer på enzymernes aktivitet ved forskellige temperaturer og substratkoncentrationer. Med substratkoncentration menes den mængde fedt, som lipasen skal fjerne fra vasketøjet.



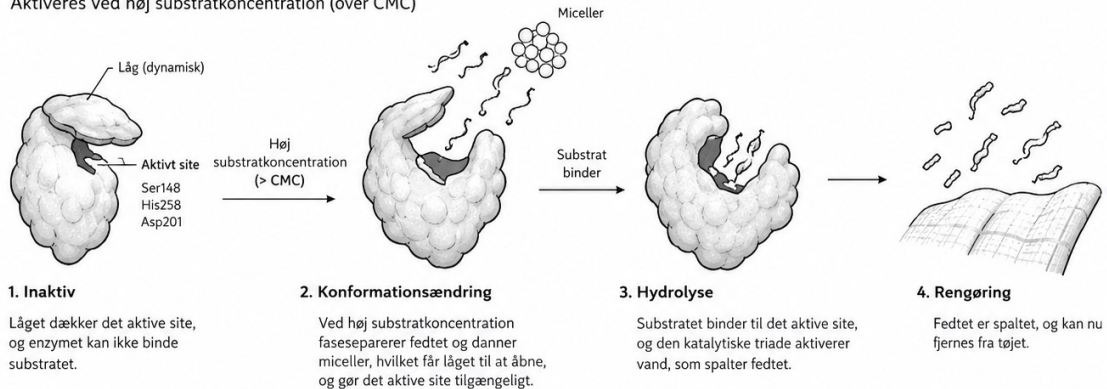
Figur 1: Forsimplet oversigt over funktionen af enzymer i vaskepulver. Nederst ses eksempler på mutationer og deres påvirkning af enzymaktiviteten. Billedet er AI-genereret.

Udviklingen af enzymer til vaskemidler handler hovedsageligt om at optimere dets substrataktivitet under tøjvasken (også kaldet performance) samt at stabilisere enzymet i detergentet således, at det har en lang "shelf-life" ved opbevaring i supermarkeder og hos forbrugeren.

Nogle Lipaser virker ved at de har et dynamisk låg der kan bevæge sig. Når dette låg dækker for det aktive site, kan enzymet ikke udføre sin funktion. Låget åbner når lipasen binder til overfladen på en fedtrig overflade, som fx snavset tøj. Dette gør at den katalytiske triade bliver tilgængelig for substratet, og at hydrolysen dermed kan finde sted (figur 2). Ved at lave bestemte mutationer i lipases låg, kan man ændre lipasens virkemåde og dermed påvirke ved hvilke substrat koncentrationer den bliver aktiveret ved. Det aktive site findes ved Ser148, His258 og Asp201. Ved vildttype (TLL) vil en høj substratkoncentration (meget fedt), over den såkaldte critical micelle koncentration (CMC), hvor det faseseparerer og danner miceller, forårsage en konformationsændring, som gør det lettere for lipasen at binde og spalte substratet og dermed rengøre tøjet. Forskerne håber at kunne tilføre en mutation, så denne ændring også forekommer ved lave substratkoncentrationer, se figur 2.

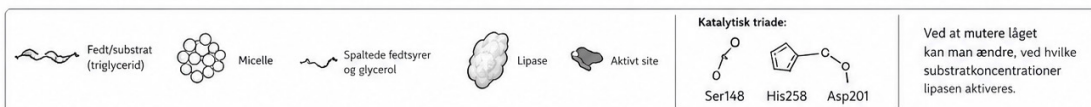
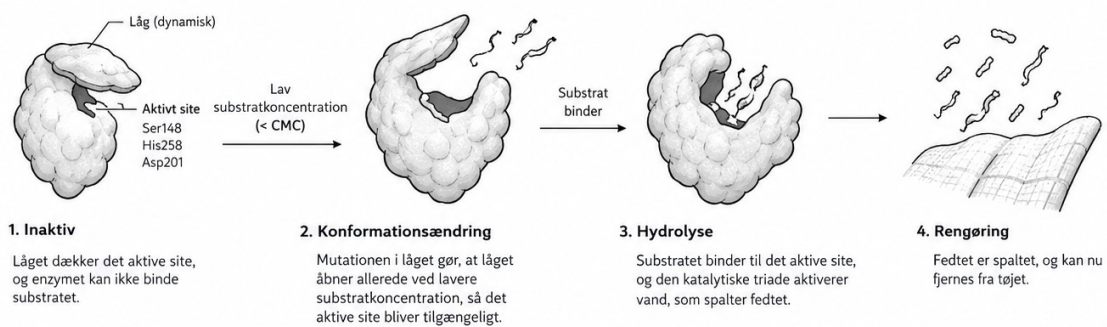
Vildtype (TLL)

Aktiveres ved høj substratkoncentration (over CMC)



Muteret lipase

Aktiveres ved lavere substratkoncentration (under CMC)



Figur 2: Skitse over lipasens dynamiske låg og dets funktion. Øverst ses vildttypen og nederst et fiktivt eksempel på en muteret version af lipasen. Billedet er AI-generet.

Der er allerede gennemført en række analyser på vildttypen og flere muterede versioner af lipasens aminosyresekvens og specifikke aktivitet, se figur 3-5 nedenfor. I kan bruge disse resultater samt sammenligne strukturen af to typer lipase for at blive klogere på enzymets opbygning og funktion. God fornøjelse!

Problemstilling

Som forskere i Novonesis skal I optimere et enzym til fjernelse af fedtpletter i tøjvask. Enzymet, der skal optimeres, er en lipase, hvor der allerede er lavet nogle forsøg med effekten af en række mutationer. Baseret på disse resultater, og jeres generelle viden om enzyvers opbygning og egenskaber, skal I komme med jeres bud på den optimale lipase.

Hjælpe spørgsmål

I jeres bestræbelse på at besvare ovenstående problemformulering kan I tage udgangspunkt i nedenstående spørgsmål, når I udformer jeres videnskabelige poster. Det er ikke nødvendigt at svare på alle spørgsmål.

1. Forklar overordnet set, hvorfor enzymer kan anvendes til at fjerne fedt og snavs fra vasketøj (inddrag evt. figur 1).
2. Forklar den specifikke katalytiske virkemåde af TLL (vildttype) på triglycerid substrater. Kom ind på, hvordan hydrolysen af triglycerid til diglycerid og fri fedtsyre bidrager til fjernelse af pletter på tekstil.
3. Sammenlign krystalstrukturerne for hhv. lukkede og åbne låg i pymol (PDB: 7APP , PDB: 6OR3), og diskutér konformationsændringen af låget i TLL lipasen, der kan bevæge sig mellem lukket og åben. Hvad forårsager åbningen/lukningen af denne mekanisme, og hvad er dens funktion?
4. Diskutér, hvordan/hvorfor låg-mutationerne i figur 4 har de givne effekter på substrataktiviteten som set i figur 5.
5. Konstruer en fiktiv Michaelis-Menten-kurve for vildttype lipase og en af de muterede lipaser. Angiv $V_{\max}$ og K_m på figuren.
6. Vurdér, hvad fordele/ulempen kan være ved mutationer i låget i forbindelse med lipaser til vaskemidler.
7. Med jeres viden om enzymer og deres mekanismer samt interaktioner med substrater foreslå en eller flere mutationer med henblik på at øge lipasens vaskeperformance. Beskriv også jeres eksperimentelle strategi for at teste, om jeres hypoteser har virket.

Figur 3: Vildttipe lipase (TIL) og en anden lipaseversions (CalB) stadier ved forskellige substratkoncentrationer. Kilde: Understanding the activation mechanism of *Thermomyces lanuginosus* lipase using rational design and tryptophan-induced fluorescence quenching, Skjold-Jørgensen (2016), *European Journal of Lipid Science and Technology*, Wiley Online Library

Figur 4: Alignment-analyse for domænet for lipasens låg for vildttipe (TIL) samt flere forskellige muterede lipase. Position 82-98 for aminosyreresterne. Farvekoder: grå = Gly, grøn = Ser eller Thr, gul = Pro, orange = Cys, pink = Asn og Gln, lilla = Phe, Tyr og Trp, rød = Asp og glu, blå = Arg og Lys og turkis = Iso, Ala og Leu. Stjernerne og prikkerne øverst indikerer graden af ændringer i for enzymet. Kilde: Altering the Activation Mechanism in *Thermomyces lanuginosus* Lipase | *Biochemistry*,

Figur 5: Den specifikke aktivitet af vildttype-lipase samt de ændrede versioner af lipasen fra figur 4, som funktion af substratkoncentrationen. Critical Micelle Concentration (CMC) for vildttypen kan her aflæses ved pilen. Kilde: Altering the Activation Mechanism in *Thermomyces lanuginosus* Lipase | Biochemistry),