

**Case 3**

Højere osteudbytte af samme mængde mælk

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.

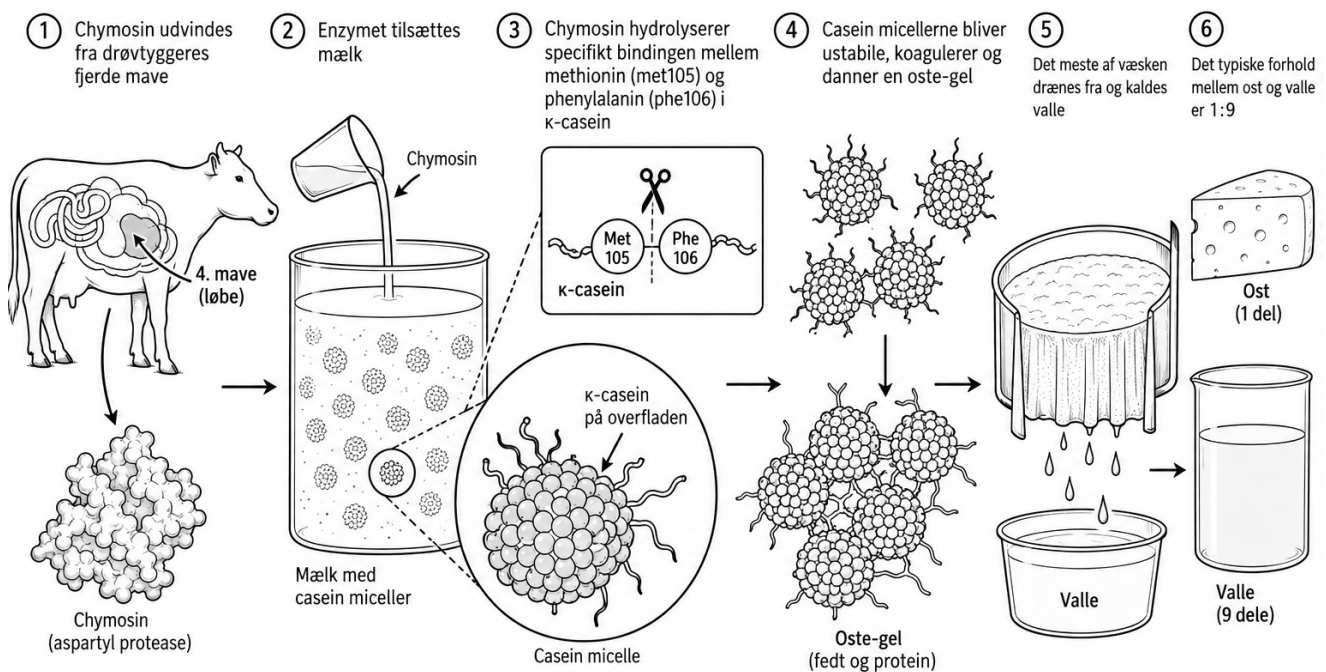
Vores ambition i Novonesis er at støtte op om verdensmålene og muliggøre ansvarligt forbrug og produktion samt nedbringe anvendelsen af vand og kemikalier. Vi er på en rejse mod CO₂-neutralitet i 2050 forpligtet til høje standarder og ambitiøse handlinger for at nedbringe vores aftryk på klima, vand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

Traditionel produktion af ost benytter sig af enzymer kaldet chymosiner (aspartyl proteaser), som er udvundet fra drøvtyggers fjerde mave. Casein er en gruppe af proteiner, der findes i mælken som en stabil suspension af miceller. Det er dem, der kan omdannes til ost. Ved produktion af ost tilsættes enzymet chymosin til mælk, hvor enzymet specifikt hydrolyserer en binding mellem en methionin (met105) og phenylalanin (phe106) i proteinet kappacasein på overfladen af caseinmicellerne. Ved denne reaktion frigives de meget hydrofile caseinmakroproteiner (CMP), mens den resterende del af kappacaseinmolekylet bliver til parakappacasein, som bliver siddende i caseinmicellen, der bliver mere hydrofob. Dette gør, at suspensionen af caseinmiceller bliver ustabil, koagulerer og danner en ostegel primært bestående af fedt og protein. Det er netop ændringen af caseinmicellernes overflade, der får micellerne til at flokkukere og danne ostegelen. Med andre ord: Jo mere casein, der fanges i gelen, jo højere osteudbytte. Det meste af væsken drænes fra, kaldes valle og vil primært indeholde vand, sukker og opløselige proteiner kendt som valleproteiner. Det typiske forhold mellem ost og valle vil være 1:9 (se figur 1). Da osteproduktion kræver store mængder mælk, er man selvfølgelig interesseret i det størst mulige udbytte.



Figur 1: Osteproduktion skitseret fra, at enzymet isoleres fra drøvtyggers mave, til det færdige osteprodukt. Billedet er AI-genereret.

Enzymer er som bekendt specifikke for deres substrat. Det viser sig, at der er en sammenhæng mellem, hvor meget *uspecifik* proteolyse chymosin udfører og osteudbyttet. Med andre ord: Hvis der brydes mange andre bindinger end de ønskede met-phe-bindinger, falder osteudbyttet.

Under et andet forskningsprojekt på kamelmælk og kamel chymosin blev det ved et tilfælde opdaget, at kamelens chymosin er mere specifikt end koens chymosin – også på komælk. Det giver derfor et højere osteudbytte end vist på figur 1, hvis der anvendes chymosin fra en kamels fjerde mave sammenlignet med chymosin fra koens mave. Det fik forskerne til at tænke, om man kunne gøre chymosin endnu mere specifikt ved at indføre en række mutationer, og derved opnå mere effektivt enzym – og dermed højere osteudbytte?

Der er allerede gennemført en række forsøg, bl.a. kinetiske analyser, som viser forskelle i enzymaktiviteten mellem bovintchymosin fra koens mave og kamelchymosin (tabel 1 og figur 2). I kan bruge disse resultater samt sammenligne strukturen af de to typer chymosin for at blive klogere på enzymets opbygning og funktion.

God fornøjelse!

Tabel 1: Tabellen viser forskellige kinetiske parametre for kamel- og bovin(ko)chymosin. Kcat/Km er svarende til turnover number. Yderst til højre ses et estimat af chymosins specifikke aktivitet, altså hvor mange bindinger af Met105-Phe106 der bliver brudt pr. minut pr. mg aktivt enzym. CN = Kasein og CMP = kaseinmakropeptid, som er det produkt, der frigives, når kasein hydrolyseres.

Figur 2: Andelen i procent af intakte alfa- og betacaseinmolekyler, som funktion af tiden ved forskellige enzymsubstrat-kombinationer.

Problemstilling

Som forskere hos Novonesis har I fået til opgave at designe en forbedret variant af kamelchymosin til osteproduktion fra komælk. Målet er at øge udbyttet, reducere spild og dermed gøre osteproduktionen mere bæredygtig.

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, hvorfor Novonesis er interesseret i at optimere chymosin. Inddrag FN's verdensmål i jeres begrundelse.
2. Hvilken enzymklasse tilhører chymosin? Begrund jeres svar.
3. Beskriv kort den generelle enzymatiske mekanisme, hvormed en aspartylprotease hydrolyserer en peptidbinding. Vurdér, hvilke faktorer der kan påvirke, om enzymet er specifikt eller uspecifikt.
4. Sammenlign de to enzyms struktur ved at anvende krystallografi. Angiv gerne både forskelle og ligheder i strukturen. Inddrag elementer fra såvel den primære, sekundære samt den tertiære struktur for de to enzymer. Dette kan f.eks. gøres ved at "aligne" de to enzymer i f.eks. PyMol (PDB for ko chymosin: 4AA8, PDB for kamel chymosin: 4AA9).
5. I jeres forskningsteam har laboranter målt de enzymkinetiske parametre for henholdsvis chymosin fra en ko (bovin) og en kamel (se tabel 1). Derudover er der lavet kinetiske målinger på den uspecifikke aktivitet, der kommer til udtryk som et fald i intakte alfa- og betacaseiner (se figur 3). Analysér tabel 1 og figur 3, og angiv forskelle og ligheder mellem de to enzymer (bovine- og kamelchymosin). Lav om muligt paralleller til forskelle og ligheder i deres struktur (spørgsmål 4).
6. På baggrund af jeres besvarelse af ovenstående spørgsmål: Foreslå én eller flere mutationer som vil øge kamelchymosinets specifikke enzymaktivitet.
7. Kom med forslag til eksperimentelle metoder til at undersøge, om disse mutationer rent faktisk har øget den enzymatiske aktivitet af kamelchymosin, og om der er øget specificitet.