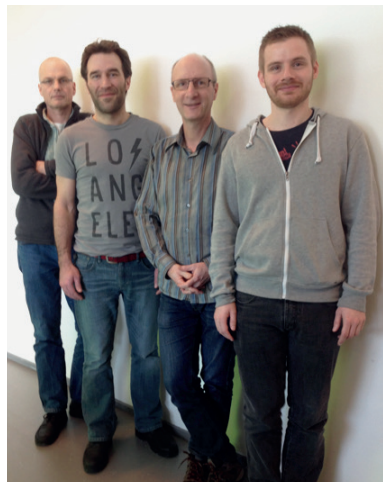


Enzymdesign i industriel anvendelse

Enzymet CasGase kan bruges til direkte fældning af kappa-kasein, hvorved udbyttet af protein kan øges. Aktiviteten skal dog forbedres for at gøre enzymet kommercielt interessant.



Af ph.d.-studerende Dennis K. Hansen (forrest), specialkonsulent Caspar Elo Christensen, professor Jakob R. Winther og lektor Martin Willemoës. Alle Linderstrøm-Lang Centeret for Proteinvidenskab, Biologisk Institut, Københavns Universitet.

Baggrund

Vi har tidligere i Mælkeritidende (nr. 9, 2015) beskrevet baggrunden for et projekt, der sigter på at levere et nyt enzym, CasGase, til mejeriindustrien til brug ved osteløbe-uafhængig fældning af kasein. Enzymet kan på denne måde generere mælkeprotein til erstatning for mælkefedt i fedtfattige mejeriprodukter, idet 10% mere protein fældes ved denne reaktion sammenlignet med osteløbeafhængig kløvning af kasein. Den nye designede enzymaktivitet fraspalter sure (negativt ladede) sukkerrester, som alle udelukkende er bundet til glykomakropeptid-delen på kasein-komponenten, κ -kasein. Derved fældes hele κ -kasein-komponenten. Der findes

ikke et naturligt forekommende enzym, der alene kan igangsætte denne reaktion. Så med udgangspunkt i en enzymaktivitet, der kan kløve en mindre bestanddel af den samlede sukkerrest, var det målet at udvide dette enzyms bindingsområde til at omfatte hele sukkerresten fra κ -kasein. Et enzym med den beskrevne aktivitet er blevet udviklet, omend det stadig har for svag aktivitet til at have en praktisk anvendelse.

Projektets udførelse

En fremgangsmåde i projektet har været at undersøge eksisterende enzymer for at forsøge at registrere bare en svag enzymaktivitet lig den ønskede. Selv en svag reaktion mellem enzymet og substratet giver en indikation af enzymets virkning og dermed, om det er relevant at arbejde videre i den retning. Ved at videreudvikle enzymet med genetiske og molekylærbiologiske teknikker kan man så at sige fremelske den svage aktivitet, så den bliver mere udtalt. Hertil skal der udvikles et genetisk selektionssystem eller alternativt en måde at måle enzymaktivitet hurtigt og på mange prøver samtidigt. Ved at introducere mutationer i det DNA, der koder for enzymet, kan man således fiske varianter af enzymet ud, som har forbedrede egenskaber i retning af den ønskede aktivitet. Desværre har sådan en svag 'sideaktivitet' fra enzymer, der fungerer på lignende substrater, ikke været muligt at identificere imellem de enzymer, vi har undersøgt i projektet.

Redesignprocessen

En anden fremgangsmåde har været at re-designe et enzym (Fig. 1), der som

sit naturlige substrat kløver det sukker-molekyle, vi gerne vil ende med at være i stand til at kløve κ -kasein, dog uden de omtalte sure grupper. I computeren kan vi med udgangspunkt i enzymernes molekylære struktur ændre sidekæderne på de aminosyrer, der udgør substratbindingsstedet på enzymet. Herefter kan vi teste, stadig i computeren, hvorvidt sukkerresterne fra κ -kasein kan placere i det ændrede bindingssted. Til sidst testes de fremkomne forslag i praksis. Ved denne sidste fremgangsmåde opnåede vi mod projektets slutning endelig at

Resume

Et projekt udført af forskere på Københavns Universitet i samarbejde med Chr. Hansen har haft til formål at designe et nyt enzym, CasGase, til mejeriindustrien. CasGase er tiltænkt brug ved fældning af ikke-hydrolyseret kasein. Enzymaktiviteten er designet til i sin endelige form at generere mælkeprotein til erstatning for mælkefedt i low-fat mejeriprodukter, da de 10% kasein, der normalt bliver i vallen, som glykomakropeptid fælder ud med kaseinet. Den nye, designede enzymaktivitet virker ved at fraspalte sure (negativt ladede) sukkerrester på kaseinkomponenten, κ -kasein. Et enzym med den beskrevne specificitet er blevet udviklet, men der tilbagestår en del arbejde med at hæve aktiviteten af enzymet, for at det kan finde kommerciel anvendelse i industrien.

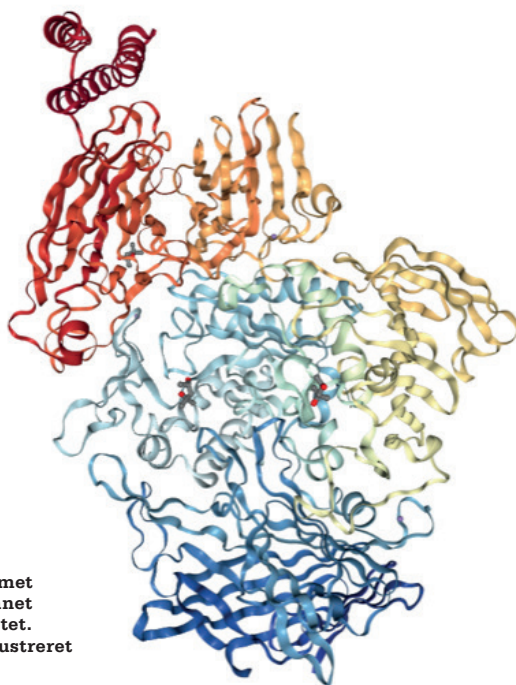
stå med en enzymaktivitet, der faktisk kunne udføre den reaktion, vi havde bestemt os for. Det nuværende enzym vil dog med sit nuværende aktivitetsniveau formentlig være flere måneder om at omsætte de kaseinmængder, der er relevante i mejeribrug. Tilbage står nu at videreudvikle enzymet, sådan at aktiviteten af enzymet øges til et niveau, der giver mening i mejeriindustrielle sammenhænge.

Samarbejde med industrien

Projektet er udført som et samarbejde med Chr. Hansen, der har vist interesse for at sidde med ved udviklingen af teknologierne bag designede enzymer. Tanken var også, at såfremt projektet havde resulteret i et enzym i løbet af projektperioden, der var så langt fremme i udviklingen, at det kunne bruges i mejerisammenhænge, skulle Chr. Hansen producere dette enzym. Dette skulle være i en opsætning, der simulerede betingelserne for enzymproduktion til brug i mejeriindustrien og videre demonstrerede anvendelsen af dette i mejeriforsøg. Denne del af projektet blev ikke til noget inden for projektets tidsramme, men Chr. Hansens deltagelse i dette og tidligere projekter med gruppen fra Københavns Universitet har givet en god samarbejdsrelation, der kan tænkes at resultere i nye projekter fremover. Således gav universitetsgruppen og Chr. Hansen et samlet oplæg om enzymdesign og udviklingen af enzymer til mejerisektoren ved Mejeribrugets Forskningsdag i Billund i 2017. En anden vigtig følgevirkning har været at møde mejeriindustrien og andre universitetsgrupper igennem MFF teknologistyregruppe, der samlede dette og andre projekter under Mejeribrugets ForskningsFond. Ved disse møder har vi opnået et kendskab til problemstillinger i mejerisektoren, der tjener som inspiration for fremtidige projektideer.

Foreløbig konklusion

Projektet har været udført som et ph.d.-projekt ved Biologisk Institut på Københavns Universitet, og det er første gang, at proteindesign-gruppen har været



Strukturen af enzymet EngBF som har dannet grundlag for projektet. PDB entry 2ZXQ illustreret med NGL viewer

involveret i et projekt finansieret af Mejeribrugets ForskningsFond. I løbet af projektperioden har projektgruppen bl.a. været kontaktet af et større udenlandsk mejeri med henblik på et samarbejde. Der har også været indsendt ansøgninger til diverse fonde for at skaffe finansiering til projektets forsættelse. Indtil videre har bestræbelserne i den retning ikke givet pote. Derfor er vi begyndt at kigge os om efter nye applikationer for det enzym, vi har udviklet, så vores resultater kan komme i spil. Dette skal forstås udover de videnskabelige publikationer og diverse ph.d.- og kandidatafhandlinger, som projektet har affødt. Vi har gjort os nogle vigtige erfaringer omkring det at indgå i projekter som dette, der er meget ambitiøse og

som starter ud med et stort element af usikkerhed. Set fra vores synspunkt er det at designe et enzym med en helt ny aktivitet, som ikke kan genfindes i naturen, ikke engang i en meget svag form, en kæmpesucces, og vejen frem mod en større aktivitet ligger åben. Ingen aktivitet – ingenting at forbedre på! Men ligeså indlysende er det, at for industrien er vores enzym i sin nuværende form på mange måder mindre interessant, fordi der kan synes at være langt til en endelig implementering. Projektet fortsætter nu for lavere blus i retning mod at videreudvikle enzymet til en højere aktivitet og evt. en anden applikation. Men hvem ved, om det i fremtiden kommer på leverandørernes produktlister. ■

Projektinfo

Titel: Øget udbytte af kasein ved low-fat mejeriproduktion

Projektleder: Lektor Martin Willemoës, Biologisk Institut, Københavns Universitet, willemoes@bio.ku.dk

Projektperiode: 1. januar 2015 - 31. juli 2018

Formål: Projektet har til formål at designe, fremstille og optimere et nyt enzym med en aktivitet, der gør det muligt at fjerne O-bundne glykaner fra κ -kasein i en simpel et-trins proces. Dette vil (1) forøge fældningen af kasein i mejeriproduktionen med 10% og dermed formindske spildet og (2) forbedre teksturen af fedtfattige mælkeprodukter.

Mejeribrugets Forskningsfond