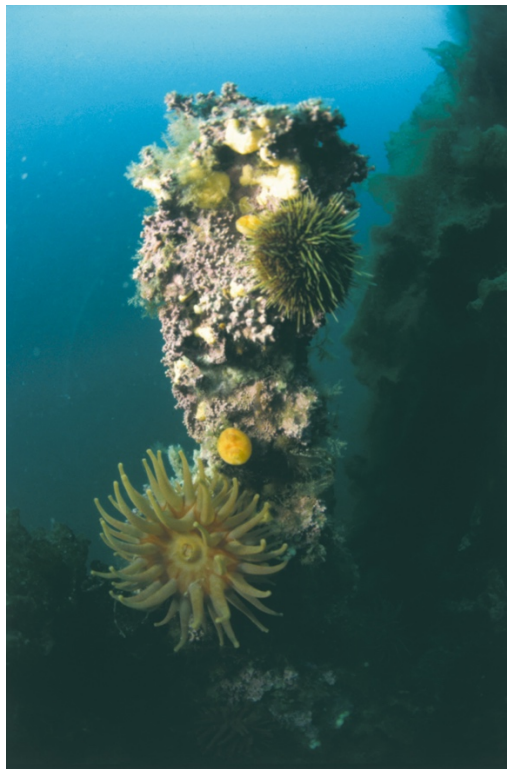


## ***NYE ENZYMER TIL BÆREDYGTIGT VASKEMIDDEL***



**Victoria Otzen**

**Aarhus Katedralskole**

**NAT Projekt forskerspirer 2022**

**Forskerkontakter: Peter Stougaard og Mariane Schmidt Thøgersen**



AARHUS KATEDRALSKOLE

**FØRSKERSPIRER**

## Indholdsfortegnelse

<b>Indledning .....</b>	<b>3</b>
<b>Problemformulering og formål .....</b>	<b>4</b>
<b>Afgrænsninger .....</b>	<b>5</b>
<b>Beskrivelse af forskningsfeltet .....</b>	<b>5</b>
<i>Kuldeaktive enzymer .....</i>	<i>5</i>
<b>Metoder .....</b>	<b>6</b>
<i>Funktionel metagenom bibliotek fremstilling.....</i>	<i>6</i>
<i>Microfluidics.....</i>	<i>7</i>
<b>Fremgangsmåde .....</b>	<b>7</b>
<i>Fase 1: Funktionel metagenom bibliotek fremstilling.....</i>	<i>7</i>
<i>Fase 2: Droplet-based Microfluidics .....</i>	<i>9</i>
<i>Fase 3: Plasmid oprensning og sekventering .....</i>	<i>10</i>
<b>Udførelse .....</b>	<b>10</b>
<i>Budget.....</i>	<i>10</i>
<i>Tidsramme: .....</i>	<i>11</i>
<b>Konklusion og Perspektivering .....</b>	<b>12</b>
<b>Tak .....</b>	<b>12</b>
<b>Litteraturliste: .....</b>	<b>13</b>
<i>Bilag 1: Produktion af det funktionelle metagenom bibliotek.....</i>	<i>15</i>
<i>Bilag 2: Model over vektor pCCIFOS.....</i>	<i>16</i>
<i>Bilag 3: Skematisk oversigt af screeningen af det funktionelle metagenom bibliotek i et microfluidic system.....</i>	<i>17</i>
<i>Bilag 4: Flow focusing droplet generation.....</i>	<i>18</i>
<i>Bilag 5: DNA oprensning .....</i>	<i>19</i>
<i>Bilag 6: Oversigt over FosmidMAX DNA oprensnings kit .....</i>	<i>20</i>

## Indledning

I 2005 blev der brugt mere end 51 milliarder kWh på at vaske tøj<sup>1</sup>. Dette var alene i de europæiske private husholdninger. Med stigende befolkningstal og økonomisk vækst kan energiforbruget kun formodes at være endnu større i dag. Af hver tøjvask udgør opvarmningen af vandet hele 90% af energiforbruget<sup>2</sup>. Derfor er der mulighed for at spare enorme mængder energi og penge ved at vaske tøj ved en lavere temperatur.

En normal tøjvask vaskes som regel ved ca. 30-50°C, men ved at sænke dette til 5-20°C kan energiforbruget sænkes med 70%, hvilket kan spare 25,5 milliarder kWh per år.<sup>3</sup> Det høje energiforbrug resulterer også i meget CO<sub>2</sub>-udledning. Tøjvask ved lavere temperaturer kan spare 18 millioner tons CO<sub>2</sub> årligt i Europa<sup>4</sup>, hvilket svarer til det gennemsnitlige årlige energiforbrug for mere end 2 millioner husstande, og kan derved bidrage kraftigt til den grønne omstilling.

Nogle af de vigtigste komponenter i vaskepulver er enzymer, der fjerner pletter ved at katalysere nedbrydning af fedt, kulhydrater og proteiner. De fleste enzymer, der bruges i vaskepulver, fungerer bedst omkring 37°C og derover, og har meget lav aktivitet ved 5-20°C. Det er derfor en god idé at lede efter enzymer i kolde miljøer, f.eks. i de polare egne. I Ikka fjorden i sydvest Grønland har mineralaflejringer dannet flere meter høje såkaldte Ikka-søjler, der indeholder store mængder unikke bakterier.<sup>5</sup> Den gennemsnitlige vandtemperatur i fjorden ligger lige over frysepunktet, og pH inden i søjlerne er meget høj (pH 10,4)<sup>6</sup>. Til trods for disse barske betingelser indeholder søjlerne en stor diversitet af unikke bakterier, der producerer kuldeaktive enzymer<sup>7</sup>, som er designet til at kunne fungere i søjlernes ekstreme miljø.

Vaskepulver er også basisk, og derfor har enzymer fra Ikka-søjlerne stort kommercielt potentiale i vaskepulver, men det er ikke enkelt at finde og producere dem. Hidtil har man screenet<sup>8</sup> dyrkede bakterier for nye enzymer, men da under 1% kan dyrkes, er det kun en brøkdelen af enzymerne, der opdages.<sup>9</sup> En anden metode, funktionel metagenomics, er at kloner alt DNA ind i *E. coli* og lade *E.*

---

<sup>1</sup> Josephy B, Bush E, Nipkow J, Kleeli K, Glanzmann S. (2013)

<sup>2</sup> ENERGY STAR® - Laundry best practices

<sup>3</sup> Josephy B, Bush E, Nipkow J, Kleeli K, Glanzmann S. (2013)

<sup>4</sup> Omregnet fra energiforbruget på 25,5 milliarder kWh. EPA - United States Environmental Protection Agency. (2022)

<sup>5</sup> Vester, J.K., Lylloff, J.E., Glaring, M.A., Stougaard, P. (2013)

<sup>6</sup> Buchardt, B., Israelson, C., Seaman, P., & Stockmann, G. (2001)

<sup>7</sup> Schmidt M, Stougaard P. (2010)

<sup>8</sup> Screening refererer til undersøgelsen af hver organisme i en prøvetagning for at finde de ønskede molekyler.

<sup>9</sup> Sleator RD, Shortall C, Hill C. (2008)

coli udtrykke generne. Her screenes alle gener, men da succesraten er meget lav, skal mange tusinde E. coli kloner undersøges, før man finder et enzym-kodende gen. Ved at kombinere funktionel metagenomics med microfluidics kan man øge succesraten betydeligt, idet alle gener screenes og samtidigt kan mange tusinde rekombinante E. coli kloner undersøges i én arbejdsgang

Mit projekt har til formål at gøre det lettere at finde disse kuldeaktive enzymer ved at udnytte microfluidics i screeningen for enzymer. Mit projekt har potentiale at gøre det langt lettere og hurtigere at opdage hidtil ukendte kuldeaktive enzymer. Microfluidics er yderst anvendelig til dette formål fordi det gør det muligt at producere en masse forskellige enzymer i parallel og derefter detektere deres aktivitet under de rette betingelser – i dette tilfælde ved lav temperatur og høj pH. Dette vil gøre det muligt at udvikle vaskemiddel til tøjvask i koldt vand, således at tøjvaskindustrien kan effektiviseres og optimeres i endnu højere grad.

En stor motivations faktor for mig personligt, var at bidrage med en grøn løsning til den klimaudfordring min generation står overfor, samtidig med at jeg kunne fordybe mig med noget jeg finder interessant i naturvidenskab. Og netop af denne grund lagde jeg mig fast på dette projekt, da det kombinerede min interesse for naturvidenskab samtidig få mulighed for at få en indflydelse på fremtidens grønne løsninger.

## **Problemformulering og formål**

Der er et stort behov for og efterspørgsel efter mere effektive og bæredygtige vaskemidler, og i den sammenhæng er det nødvendigt at finde flere og nye kuldeaktive enzymer.

Jeg vil derfor undersøge følgende problemstilling: *Hvordan kan udviklingen af et bæredygtigt vaskemiddel, der anvender kuldeaktive enzymer optimeres ved hjælp af microfluidics?*

Min hypotese er: Screening af metagenomet for bakterier fra Ikka-søjlerne via microfluidics vil lede til fund af hidtil ukendte kuldeaktive enzymer, der er velegnet til vaskepulver, som kan bruges i koldt vand.

Der er blevet forsket i at anvende kuldeaktive enzymer i vaskemiddel, men generelt har det fokuseret på identificering og karakterisering af individuelle enzymer<sup>10</sup>, snarere end screening efter mange på samme tid. Ligeledes er der blevet forsket meget i microfluidics og dets mange

---

<sup>10</sup> Kuddus M, Ramteke PW. (2009)

anvendelser<sup>11</sup>. Derfor er der et stort incitament for at kombinere disse teknikker for at finde nye kuldeaktive enzymer og det vil mit projekt forsøge at gøre. Min fremgangsmåde vil derved effektivisere indsatsen for at identificere lovende enzym-kandidater ud fra screening af et stort antal forskellige enzymer.

## Afgrænsninger

Jeg screener kun efter lipaser og proteaser, idet det ikke økonomisk kan lade sig gøre at screene efter flere slags enzymer, og disse er også to store enzym klasser, som anvendes meget i vaskepulver.<sup>12</sup>

Jeg fokuserer udelukkende på den indledende fase af udviklingen, idet de efterfølgende trin, der indebærer at enzymerne karakteriseres og testes for aktivitet, når de er blandet med de andre bestanddele af et vaskemiddel, hvilket er for tidskrævende og økonomisk omfattende.

## Beskrivelse af forskningsfeltet

### Kuldeaktive enzymer

Kuldeaktive enzymer afviger fra termofile og mesofile enzymer på flere måder, og bl.a. ved at være mere varme-sensitive. Dette kommer til udtryk ved at det aktive center i kuldeaktive enzymer er mere fleksibelt, hvilket forbedrer deres evne til at ændre struktur under katalysen. Derfor kan de bedre tolerere lave temperaturer, som ellers reducerer denne fleksibilitet<sup>13</sup>.

Det er et særligt kendetegn ved kuldeaktive enzymer, at deres aktivitet sænkes ved lavere temperaturer end temperaturen de denatureres ved. Dette grunder i at kuldeaktive enzymeres aktive site er mere fleksibelt end resten af enzymet. Dette kan gøre det lettere at kontrollere aktiviteten af enzymet uden at denaturere det, og forhindrer uønskede reaktioner, der kunne forekomme ved højere temperaturer.

---

<sup>11</sup> Hengoju S, Tovar M, Man DKW, Buchheim S, Rosenbaum MA. (2022)

<sup>12</sup> Kumar A, Mukhia S, Kumar R. (2021)

<sup>13</sup> Parvizpour S, Hussin N, Shamsir MS, Razmara J. (2021)

Der er mange fordele ved at anvende kuldeaktive enzymer, idet de også forbedrer hygiejnen, da organismene der fordærver organisk materiale, ikke vokser ved så lave temperaturer. Kuldeaktive enzymer har en højere  $k_{cat}$  værdi end termofile og mesofile ved lave temperaturer, hvilket vil sige at de kan omsætte flere substratmolekyler pr. sekund, og er dermed mere effektive. En anden fordel ved dette er at lavere enzymmængder skal bruges. På den anden side er deres Michaeliskonstant ( $K_m$ ) værdi højere, der betyder at substratet har sværere ved at binde sig til enzymet.<sup>14</sup>

## Metoder

Ved screeningen for hidtil ukendte, kuldeaktive enzymer benytter jeg mig af særligt to metoder:

### Funktionel metagenom bibliotek fremstilling

Metagenomics er studiet af environmental DNA, dvs. DNA isoleret direkte fra et givent naturligt miljø. DNA'et fra disse prøver består af genomisk DNA fra ofte flere tusinde forskellige organismer<sup>15</sup>. Selve metagenom biblioteket konstrueres ved shotgun metoden<sup>16</sup>, hvor det isolerede DNA tilfældigt klippes i mindre stykker, som klones ind i en vektor. Vektoren indsættes i en værtsbakterie såsom *E. coli*, der herefter kan dyrkes, således at generne kan udtrykkes. Funktionelle metagenom biblioteker kan således hjælpe med at udtrykke gener fra udyrkbare mikroorganismer.

Der er dog et problem ved kun at kloner DNA stykker fra de kuldeaktive enzymer ind i *E. coli*; der er stor risiko for at *E. coli* ikke er i stand til at udtrykke genet for enzymet, hvis enzymet kommer fra en bakterie, der er meget forskelligt fra *E. coli*, f. eks. hvis enzymet indeholder codons som *E. coli* ikke kan genkende eller udtrykke.

Jeg forsøger at imødekomme denne problematik og optimere bibliotek fremstillingen af metagenomet, ved ikke blot at kloner metagenom DNA-sekvenserne ind i kloningskittets TransforMax™ EPI300™ *E. coli* bakterier, men også i ArcticExpress (DE3). Denne *E. coli*-stamme er blevet optimeret til at kunne dyrkes ved lave temperaturer, forbedre proteinfoldning og

---

<sup>14</sup> Santiago M, Ramírez-Sarmiento CA, Zamora RA, Parra LP. (2016)

<sup>15</sup> Alma'abadi A, Behzad H, Alarawi M, Conchouso D, Saito Y, Hosokawa M, Nishikawa Y, Kogawa M, Takeyama H, Mineta K, Gojobori T. (2022)

<sup>16</sup> Robinson SL, Piel J, Sunagawa S. (2021)

overkomme codon bias, hvilket vil sige at den lettere kan oversætte flere ”fremmede” codons end en ”standard” E. coli-stamme.

### Microfluidics<sup>17</sup>

Jeg vil foretage screeningen af biblioteket for enzymaktivitet i et microfluidic system. Et microfluidic system er en chip, der er indrettet med mikroskopiske kamre og kanaler, ca 5-500 µm lange netværk<sup>18</sup>, hvor væsker løber igennem. Selve enheden er som et miniaturlaboratorie, da det er muligt at udføre mange forskellige slags reaktioner i systemet på en meget kontrolleret vis, samt forenkler håndtering af biologiske prøver. Jeg udfører en droplet-based microfluidics (DBM) high throughput screening i mit forsøg, fordi denne metode kan fremtvinge flere tusinde reaktioner i sekundet<sup>19</sup>. DBM udnytter væskers blandbarhed til at generere og behandle dråber, ved at der i kanalerne er en olie<sup>20</sup>- og en vandfase. Når disse to faser mødes ved en krydsning i systemet, vil der dannes vanddråber, og disse dråber har så lille volumen, mellem femtoliter og nanoliter, at i hver af disse mikroskopiske dråber vil der højst kunne være én bakterie celle, der så har mulighed for at producere et enzym, som kan reagere med et relevant substrat, der så igen udsender fluorescens, når det bliver nedbrudt af enzymet.

Vha. microfluidics er det muligt at udføre high throughput screening, hvorved man måler tusindvis af reaktioner i sekundet med mange forskellige bakterier, alt sammen udført i meget lille volumen. Derved er det både lettere og hurtigere at finde hidtil ukendte enzymer med denne metode. Når først microfluidics systemerne er blevet fremstillet, bliver screening efter enzymer også meget billigere, idet der kun bruges prøver og substrater af meget lille volumen i forsøgene. Selve reaktionerne foregår udelukkende på chippen, men hele systemet består af mange komponenter, som f.eks. en laser til at detektere fluorescens.

## Fremgangsmåde

Jeg vil i dette afsnit beskrive fremgangsmåden for mit forsøg.

### Fase 1: Funktionel metagenom bibliotek fremstilling

---

<sup>17</sup>Conchouso, David; Al-Ma'abadi, Amani; Behzad, Hayedeh; Alarawi, Mohammed; Hosokawa, Masahito; Nishikawa, Yohei; et al. (2021)

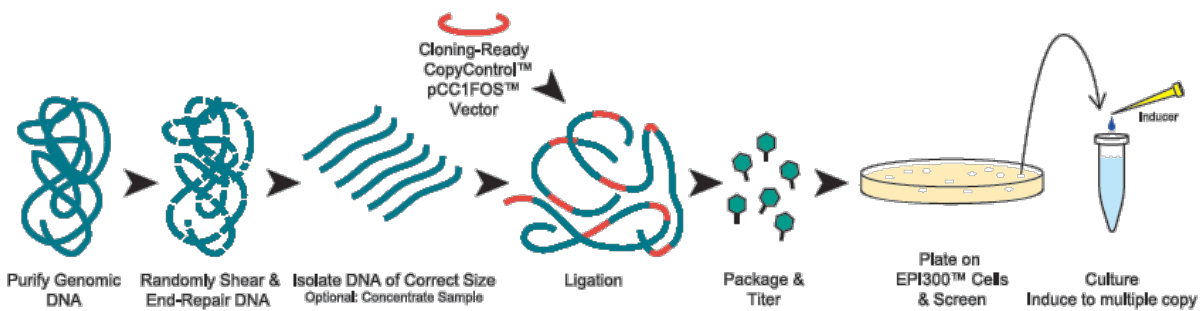
<sup>18</sup> Verma N, Prajapati P, Singh V, Pandya A. (2022)

<sup>19</sup> Hess D, Yang T, Stavrakis S. (2020)

<sup>20</sup> Tilsat fluor for at mindske blandbarhed mellem vand og olie og for at forhindre forurening eller andre uønskede reaktioner.

Først skal DNA fra Ikka-søjlerne oprenses (for uddybning af dette trin se bilag 5). Prøverne fra Ikka-søjlerne har jeg fået adgang til fra min ene forskerkontakt, Mariane Thøgersen Schmidt, der i øjeblikket også forsker i at finde kuldeaktive enzymer fra Ikka-søjlerne, men som ikke anvender microfluidics.

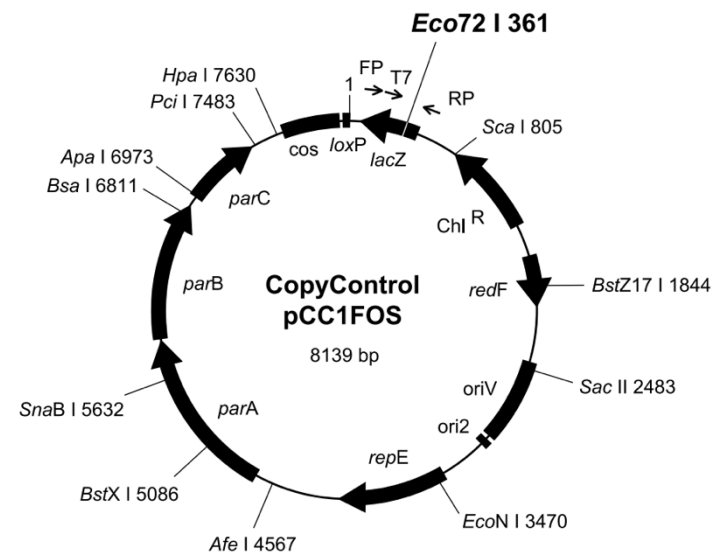
Jeg vil fremstille metagenom biblioteket vha. et kloningskit fra Biosearch Technologies<sup>21</sup>. De overordnede steps kan ses i figur 2.



Figur 1: Produktion af et CopyControl Fosmid Library

Allerførst dyrkes E. coli stammerne natten over på en agarplade med LB vækstmedium. Dernæst forberedes fosmid<sup>22</sup> biblioteket, hvor DNA-fragmenterne fra Ikka-søjlerne klones ind i en vektor. Det første trin er at klippe det isolerede DNA fra Ikka-søjlebakterierne i stykker af ca. 40.000 basepar, ved at føre det igennem en 200- $\mu$ L pipettespids og suge DNA'et ud og ind i pipettespidsen 50-100 gange. Derefter repareres enderne af DNA'et således, at det har en fosforyleret 5' ende, ved at tilsætte End-Repair Enzyme mix til opløsningen med DNA og lade det inkubere.

For at isolere det DNA, der har den rigtige længde, adskilles det efter størrelse vha. gelelektroforese



Figur 2: pCC1FOS vektor model. DNA-fragmenterne indsættes omkring Eco72 I sitet.

<sup>21</sup> CopyControl Fosmid Library Production kit med pCC1FOS vektor

<sup>22</sup> Et fosmid er en type plasmid der har kapacitet for at klon store DNA-stykker og kan blive overført mellem celler.



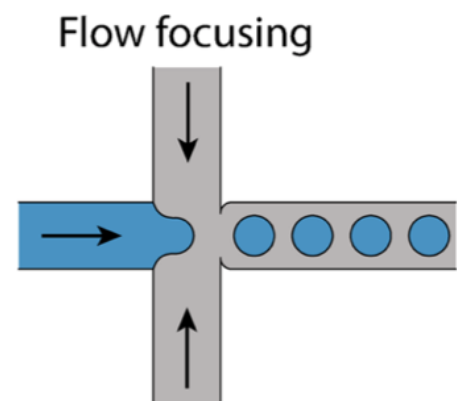
og oprenses. Herefter indsættes DNA-stykkerne i kloningskittet CopyControl pCC1FOS vektor (se figur 3), ved tilsætning af bl.a. DNA-ligase og ATP. Dette inkuberes ved stuetemperatur i 4 timer.

Den næste del omhandler indsætningen af fosmiderne i E. coli stammerne. Først pakkes fosmiderne ind i bakteriofager ved hjælp af en buffer og inkuberes i fire timer ved 30°C. Derefter blandes disse med de dyrkede E. coli bakterier og inkuberes i en time. Denne blanding spredes ud på en selektiv LB agarplade og inkuberes natten over. Næste dag overføres bakterierne fra agarpladen over i 2 mL brønde tilsat LB vækstmedium og CopyControl Fosmid Autoinduction Solution, således de rekombinante bakterier kan udvælges. De udvalgte bakterier er nu klar til microfluidics delen.

## Fase 2: Droplet-based Microfluidics

Microfluidics systemet er inddelt i to dele: den første genererer de mikroskopiske dråber og den anden del sorterer de fluorescerende dråber fra.<sup>23</sup> (For skematisk oversigt over denne fase se bilag 3).

Først fremstilles opløsninger af bakterier i vækstmedium, med en inducer, der sætter gang i proteinproduktionen på fosmidet. Der vil være to opløsninger: en til hver typer rekombinant E. coli stamme. Efterfølgende dannes microdroplet dråber for hver opløsning. Først indsættes fluorineret olie og opløsningen af rekombinant E. coli bakterie og vækstmedium. Når disse møder et T-kryds i systemet, hvor oliefasen løber den anden vej, vil dråber af vandfasen indeholdende kun én celle dannes, idet de to væsker ikke er blandbare. Dette er et eksempel på flowfocusing droplet generation mode (se figur 3).



Figur 3: Dannelse af microdroplet dråber vha. flow focusing. Den blå væske er vandfasen og den grå væske er oliefasen.

Efter nok dråber er dannet, inkuberes dråberne i et Eppendorfrør ved 20°C i 4 timer, så bakteriecellerne kan producere enzymer. Derefter køles opløsningen ned til 10°C og blandes med ét af substraterne, da både protease og lipase substratet frigiver grøn fluorescens når det kløves af enzymerne. Dette gør det muligt at detektere de dråber, hvori der produceres kuldeaktive enzymer. Derefter køres blandingen igennem den anden del af microfluidic systemet, der sorterer de dråber

<sup>23</sup> Chen J, Vestergaard M, Shen J, Solem C, Dufva M, Jensen PR. (2018)

fra, der har højest intensitet af fluorescens, ved at der på hver sin side af kanalen i på sorteringschippet sidder store elektroder. Disse elektroder skaber et inhomogent elektrisk felt, der gør det integrerede lasersystem i stand til at registrere intensiteten af dråbernes fluorescens. Elektroderne kan trække de mest intenst fluorescerende dråber over i en opsamlingskanal, og dernæst opsamles de sorterede bakterier i et Eppendorfrør for at gentage processen fra dråbedannelse til sortering for at skabe et mere rent produkt.

### Fase 3: Plasmid oprensning og sekventering

Efter dråberne er blevet sorteret skal de bedste enzymer udvælges og plasmidet oprenses, således det kan sekventeres og analyseres for at identificere de enzym-kodende gener. Først centrifugeres indholdet i Eppendorfrørene for at lysere cellerne. Efter supernatanten er fjernet centrifugeres og bundfældes DNA'et flere gange ved tilsætning af forskellige reagenser fx ethanol og isopropanol. For overblik og flere detaljer over trinnene, se bilag 6. For at undersøge enzymet nærmere skal DNA'et fra plasmidet sekventeres, men det har jeg ikke økonomiske nok midler til at kunne gøre.

## Udførsel<sup>24</sup>

### Budget

Det er en forudsætning for mit budget at hele microfluidic systemet er til rådighed. Jeg har fået adgang til et microfluidic system, som Peter Ruhdal Jensen, professor på DTU, har fremstillet. Derfor er størstedelen af mit budget hensat til reagenser til screeningkampagnen. Jeg køber fluorescerende substrater til screening for lipaser og proteaser.

Materiale	Pris i DKK	Reference
<b>Prøver fra Ikka-søjlerne</b>	0 kr.	Udleveres af Mariane Schmidt Thøgersen
<b>DNA oprensnings kit</b> Skaffes gennem AU	0 kr.	

<sup>24</sup> Alma'abadi A, Behzad H, Alarawi M, Conchouso D, Saito Y, Hosokawa M, Nishikawa Y, Kogawa M, Takeyama H, Mineta K, Gojobori T.. (2022)

<b>CopyControl™ Fosmid Library Production Kit</b> Fra Biosearch™ Technologies  I dette kit følger der TransforMax™ EPI300™ E. coli bakterier med.	6.508 kr	<a href="https://shop.biosearchtech.com/cloning-and-protein-expression/cloning-kits/difficult-or-large-fragment-cloning/copycontrol-fosmid-library-production-kits/p/CCFOS110">https://shop.biosearchtech.com/cloning-and-protein-expression/cloning-kits/difficult-or-large-fragment-cloning/copycontrol-fosmid-library-production-kits/p/CCFOS110</a>
<b>Lipase assay kit</b> Fra Thermo Fisher Scientific	3.065 kr.	<a href="https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/E33955?SID=srch-srp-E33955">https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/E33955?SID=srch-srp-E33955</a>
<b>Flourinated oil</b> Fra Darwin Microfluidics	253 kr.	<a href="https://darwin-microfluidics.com/products/fluorinated-oil-for-microfluidics?variant=36766353850532">https://darwin-microfluidics.com/products/fluorinated-oil-for-microfluidics?variant=36766353850532</a>
<b>Droplet microfluidic system</b>	0 kr.	Gratis adgang til Peter Ruhdal Jensens microfluidic system
<b>Arctic express E. coli</b> Fra Agilent	2144 kr.	<a href="https://www.agilent.com/store/productDetail.jsp?catalogId=230192&amp;catId=SubCat3ECS_228016">https://www.agilent.com/store/productDetail.jsp?catalogId=230192&amp;catId=SubCat3ECS_228016</a>
<b>Protease assay kit</b> Fra Thermo Fisher Scientific	4780 kr.	<a href="https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/E6638">https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/E6638</a>
<b>Alpha Luria Broth</b> Fra Alpha™ Biosciences	294 kr.	<a href="https://cobio.dk/product/alpha-luria-broth-millers-lb-broth-500-g-7261">https://cobio.dk/product/alpha-luria-broth-millers-lb-broth-500-g-7261</a>
<b>Plasmid preparation kit</b> Fra Biosearch™ Technologies	1808 kr.	<a href="https://shop.biosearchtech.com/nucleic-acid-sample-preparation/dna-rna-extraction-and-purification-kits/dna-and-rna-purification-kits-and-reagents/fosmidmax-dna-purification-kit/p/FMAX046">https://shop.biosearchtech.com/nucleic-acid-sample-preparation/dna-rna-extraction-and-purification-kits/dna-and-rna-purification-kits-and-reagents/fosmidmax-dna-purification-kit/p/FMAX046</a>
Uforudsete udgifter	1000 kr	
I alt	19.852 kr.	

### Tidsramme:

Procedure	Forventet tid
Metagenom bibliotek fremstilling	2 uger

Microfluidics	2 uger
DNA-sekventering og data analyse	5 uger
I alt	9 uger

## Konklusion og Perspektivering

Jeg forventer med mit forsøg at blive klogere på enzymindholdet i bakterier fra Ikka-søjlerne og finde ud af om microfluidics optimerer fund af hidtil ukendte kuldeaktive enzymer. I tilfældet af opdagelse af nye kuldeaktive enzymer, ville det næste skridt være at udføre kinetik målinger direkte under screeningen, som er muligt med microfluidics, da der kan måles på hvor hurtigt dråberne udsender fluorescens, der dermed siger noget om hvor aktive enzymerne er.

Derefter skal enzymerne beskrives nærmere, og undersøges hvordan de integreres i et vaskemiddel. De nærmere beskrivelser vil bl.a. skulle omfatte en karakterisering af de optimale forhold for enzymaktivitet, og om det er muligt at producere enzymerne i en relevant industriel stamme.

Fundet kunne også føres videre af Mariane Schmidt Thøgersen, i hendes forskning, idet hun har flere økonomiske midler end jeg, og hun også forsker i kuldeaktive enzymer fra Ikka-søjlerne og deres anvendelser.

På længere sigt har jeg en forhåbning at mit projekt kan være med til optimere og effektivisere udviklingen af vaskemiddel, og derved komme et skridt længere i klimakampen.

## Tak

Jeg vil gerne takke mine forskerkontakter Peter Stougaard, professor i molekylær mikrobiel økologi (Aarhus Universitet) og Mariane Schmidt Thøgersen, PhD forsker i mikrobiel økologi (Aarhus Universitet) for deres store hjælp med både rådgivning og relevant litteratur. Derudover vil jeg også takke Peter Ruhdal Jensen, professor i mikrobiel bioteknologi og bioraffinering på DTU, for adgang til hans microfluidics system. Også tak til det grønlandske selvstyre for tilladelse til at lede efter bakterier i Ikka-søjlerne. Til sidst vil jeg takke min familie og venner, og ikke mindst mine medspirer for deres interesse og kæmpe inspiration.

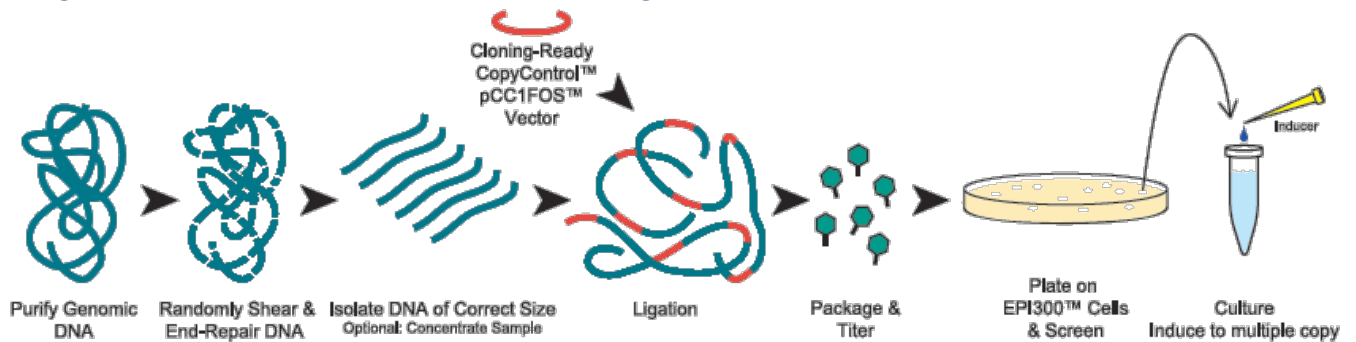
**Litteraturliste:**

- Alma'abadi A, Behzad H, Alarawi M, Conchouso D, Saito Y, Hosokawa M, Nishikawa Y, Kogawa M, Takeyama H, Mineta K, Gojobori T. Identification of lipolytic enzymes using high-throughput single-cell screening and sorting of a metagenomic library. *N Biotechnol.* 2022 Sep 25;70:102-108. doi: 10.1016/j.nbt.2022.05.006. Epub 2022 May 28. PMID: 35636700.
- Balasubramanian S, Chen J, Wigneswaran V, Bang-Berthelsen CH, Jensen PR. Droplet-Based Microfluidic High Throughput Screening of *Corynebacterium glutamicum* for Efficient Heterologous Protein Production and Secretion. *Front Bioeng Biotechnol.* 2021 May 7;9:668513. doi: 10.3389/fbioe.2021.668513. PMID: 34026744; PMCID: PMC8137953.
- Buchardt, B., Israelson, C., Seaman, P., & Stockmann, G. (2001). Ikaite Tufa Towers in Ikka Fjord, Southwest Greenland: Their Formation by Mixing of Seawater and Alkaline Spring Water. *Journal of Sedimentary Research*, 71, 176-189.
- Chen J, Vestergaard M, Shen J, Solem C, Dufva M, Jensen PR. Droplet-based microfluidics as a future tool for strain improvement in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Lett.* 2018 Dec 1;365(23). doi: 10.1093/femsle/fny258. PMID: 30357328.
- Conchouso D, Al-Ma'abadi A, Behzad H, Alarawi M, Hosokawa M, Nishikawa Y, Takeyama H, Mineta K, Gojobori T. Integration of Droplet Microfluidic Tools for Single-Cell Functional Metagenomics: An Engineering Head Start. *Genomics Proteomics Bioinformatics.* 2021 Jun;19(3):504-518. doi: 10.1016/j.gpb.2021.03.010. Epub 2021 Dec 21. PMID: 34952209; PMCID: PMC8864243.
- ENERGY STAR®. Laundry best practices. [https://www.energystar.gov/products/laundry\\_best\\_practices](https://www.energystar.gov/products/laundry_best_practices)
- EPA - United States Environmental Protection Agency. (2022). *Greenhouse Gas Equivalencies Calculator*. <https://www.epa.gov/energy/greenhouse-gas-equivalencies-calculator#results>
- Hengoju S, Tovar M, Man DKW, Buchheim S, Rosenbaum MA. Droplet Microfluidics for Microbial Biotechnology. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* 2022;179:129-157. doi: 10.1007/10\_2020\_140. PMID: 32888037.
- Hess D, Yang T, Stavrakis S. Droplet-based optofluidic systems for measuring enzyme kinetics. *Anal Bioanal Chem.* 2020 May;412(14):3265-3283. doi: 10.1007/s00216-019-02294-z. Epub 2019 Dec 18. PMID: 31853606.
- Josephy B, Bush E, Nipkow J, Kleeli K, Glanzmann S. Cold Wash - Do Prejudices Impede High Energy Savings? [www.topten.eu](http://www.topten.eu). (2013).

- Kuddus M, Ramteke PW. Cold-active extracellular alkaline protease from an alkaliphilic *Stenotrophomonas maltophilia*: production of enzyme and its industrial applications. *Can J Microbiol*. 2009 Nov;55(11):1294-301. doi: 10.1139/w09-089. PMID: 19940938.
- Kumar A, Mukhia S, Kumar R. Industrial applications of cold-adapted enzymes: challenges, innovations and future perspective. *3 Biotech*. 2021 Oct;11(10):426. doi: 10.1007/s13205-021-02929-y. Epub 2021 Sep 6. PMID: 34567931; PMCID: PMC8421504.
- Parvizpour S, Hussin N, Shamsir MS, Razmara J. Psychrophilic enzymes: structural adaptation, pharmaceutical and industrial applications. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2021 Feb;105(3):899-907. doi: 10.1007/s00253-020-11074-0. Epub 2021 Jan 11. PMID: 33427934.
- Robinson SL, Piel J, Sunagawa S. A roadmap for metagenomic enzyme discovery. *Nat Prod Rep*. 2021 Nov 17;38(11):1994-2023. doi: 10.1039/d1np00006c. PMID: 34821235; PMCID: PMC8597712.
- Santiago M, Ramírez-Sarmiento CA, Zamora RA, Parra LP. Discovery, Molecular Mechanisms, and Industrial Applications of Cold-Active Enzymes. *Front Microbiol*. 2016 Sep 9;7:1408. doi: 10.3389/fmicb.2016.01408. PMID: 27667987; PMCID: PMC5016527.
- Sleator RD, Shortall C, Hill C. Metagenomics. *Lett Appl Microbiol*. 2008 Nov;47(5):361-6. doi: 10.1111/j.1472-765X.2008.02444.x. PMID: 19146522.  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19146522/>
- Schmidt M, Stougaard P. Identification, cloning and expression of a cold-active beta-galactosidase from a novel Arctic bacterium, *Alkalilactibacillus ikkense*. *Environ Technol*. 2010 Sep;31(10):1107-14. doi: 10.1080/09593331003677872. PMID: 20718293.
- Verma N, Prajapati P, Singh V, Pandya A. An introduction to microfluidics and their applications. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2022;186(1):1-14. doi: 10.1016/bs.pmbts.2021.07.006. Epub 2021 Aug 3. PMID: 35033280.
- Vester, J.K., Lylloff, J.E., Glaring, M.A., Stougaard, P. (2013). Microbial Diversity and Enzymes in Ikaite Columns: A Cold and Alkaline Environment in Greenland. In: Seckbach, J., Oren, A., Stan-Lotter, H. (eds) *Polyextremophiles. Cellular Origin, Life in Extreme Habitats and Astrobiology*, vol 27. Springer, Dordrecht. [https://doi.org/10.1007/978-94-007-6488-0\\_15](https://doi.org/10.1007/978-94-007-6488-0_15)

**Bilagliste:**

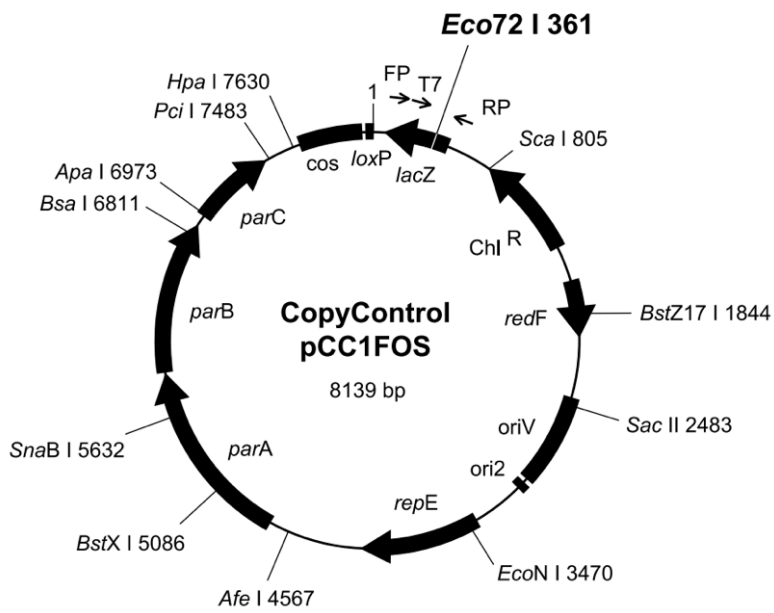
## Bilag 1: Produktion af det funktionelle metagenom bibliotek



Fra manualen til CopyControl Fosmid Library Production Kit:

[https://biosearchtech.a.bigcontent.io/v1/static/manual\\_AIS107F\\_CopyControl-Fosmid-library-production-kits](https://biosearchtech.a.bigcontent.io/v1/static/manual_AIS107F_CopyControl-Fosmid-library-production-kits)

## Bilag 2: Model over vektor pCC1FOS

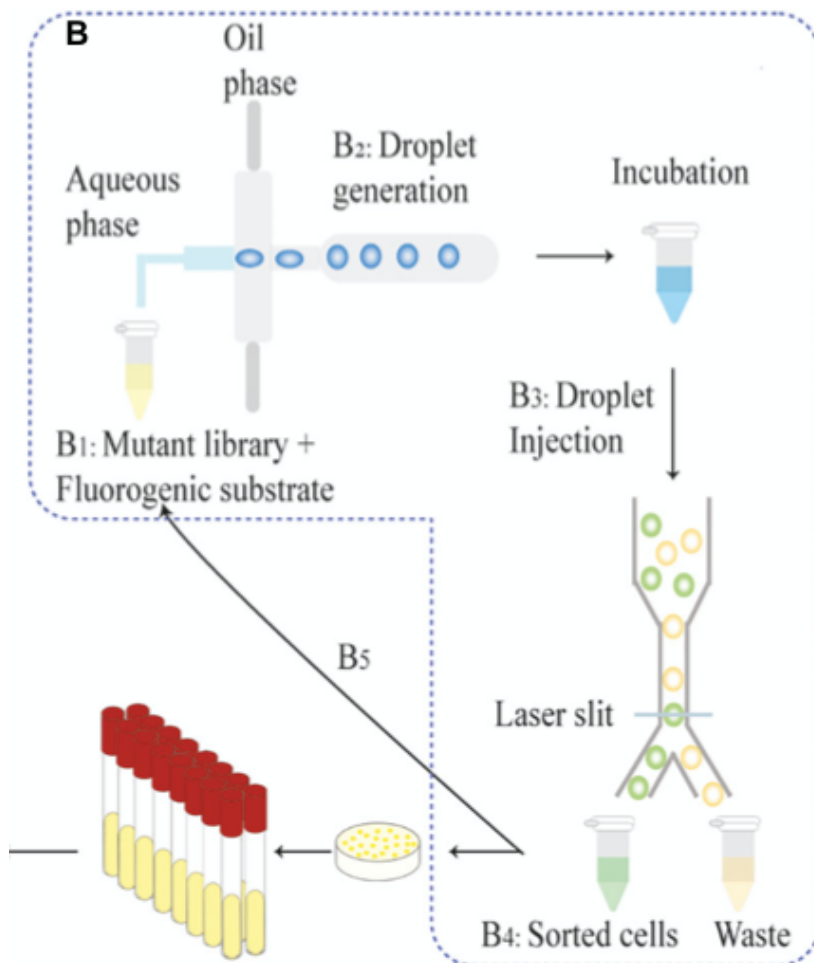


Fra manualen til CopyControl Fosmid Library Production Kit:

[https://biosearchtech.a.bigcontent.io/v1/static/manual\\_AIS107F\\_CopyControl-Fosmid-library-production-kits](https://biosearchtech.a.bigcontent.io/v1/static/manual_AIS107F_CopyControl-Fosmid-library-production-kits)



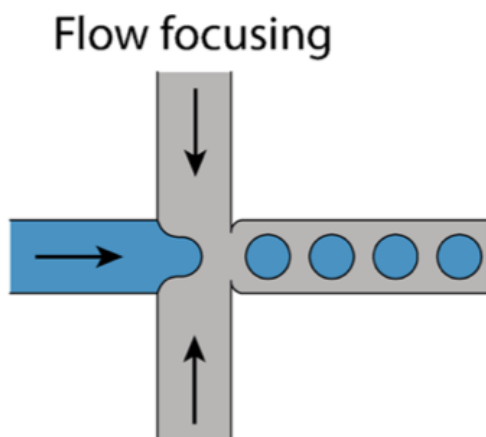
Bilag 3: Skematisk oversigt af screeningen af det funktionelle metagenom bibliotek i et microfluidic system



**Figur fra** Balasubramanian S, Chen J, Wigneswaran V, Bang-Berthelsen CH, Jensen PR. Droplet-Based Microfluidic High Throughput Screening of *Corynebacterium glutamicum* for Efficient Heterologous Protein Production and Secretion. *Front Bioeng Biotechnol.* 2021 May 7;9:668513. doi: 10.3389/fbioe.2021.668513. PMID: 34026744; PMCID: PMC8137953.

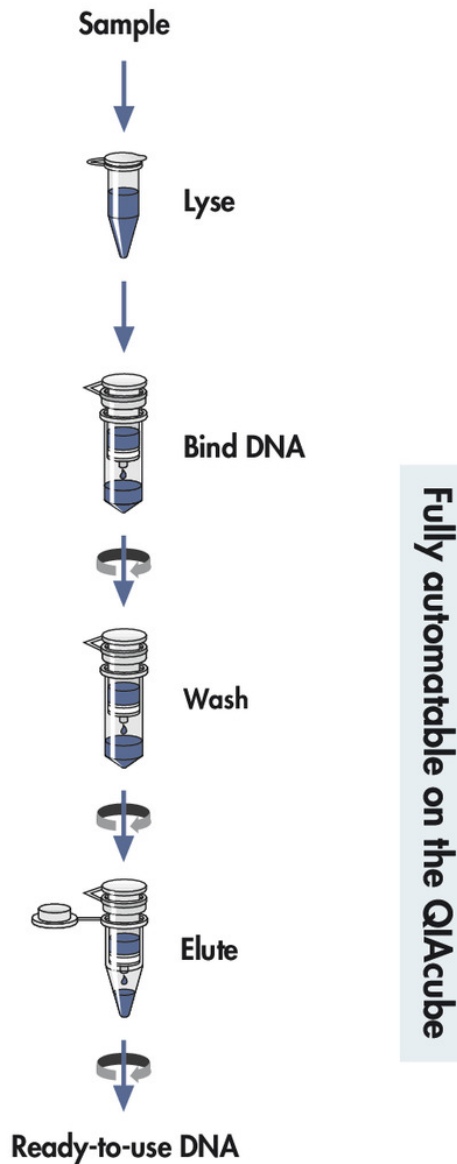
Figuren er et udsnit af flere trin, hvor jeg anvendte microfluidics udførslen i mit forsøg, idet systemet på figuren er microfluidic systemet jeg har adgang til, der er fremstillet af Peter Ruhdal Jensen (DTU).

## Bilag 4: Flow focusing droplet generation



**Figur fra** Hess D, Yang T, Stavrakis S. Droplet-based optofluidic systems for measuring enzyme kinetics. *Anal Bioanal Chem.* 2020 May;412(14):3265-3283. doi: 10.1007/s00216-019-02294-z. Epub 2019 Dec 18. PMID: 31853606.

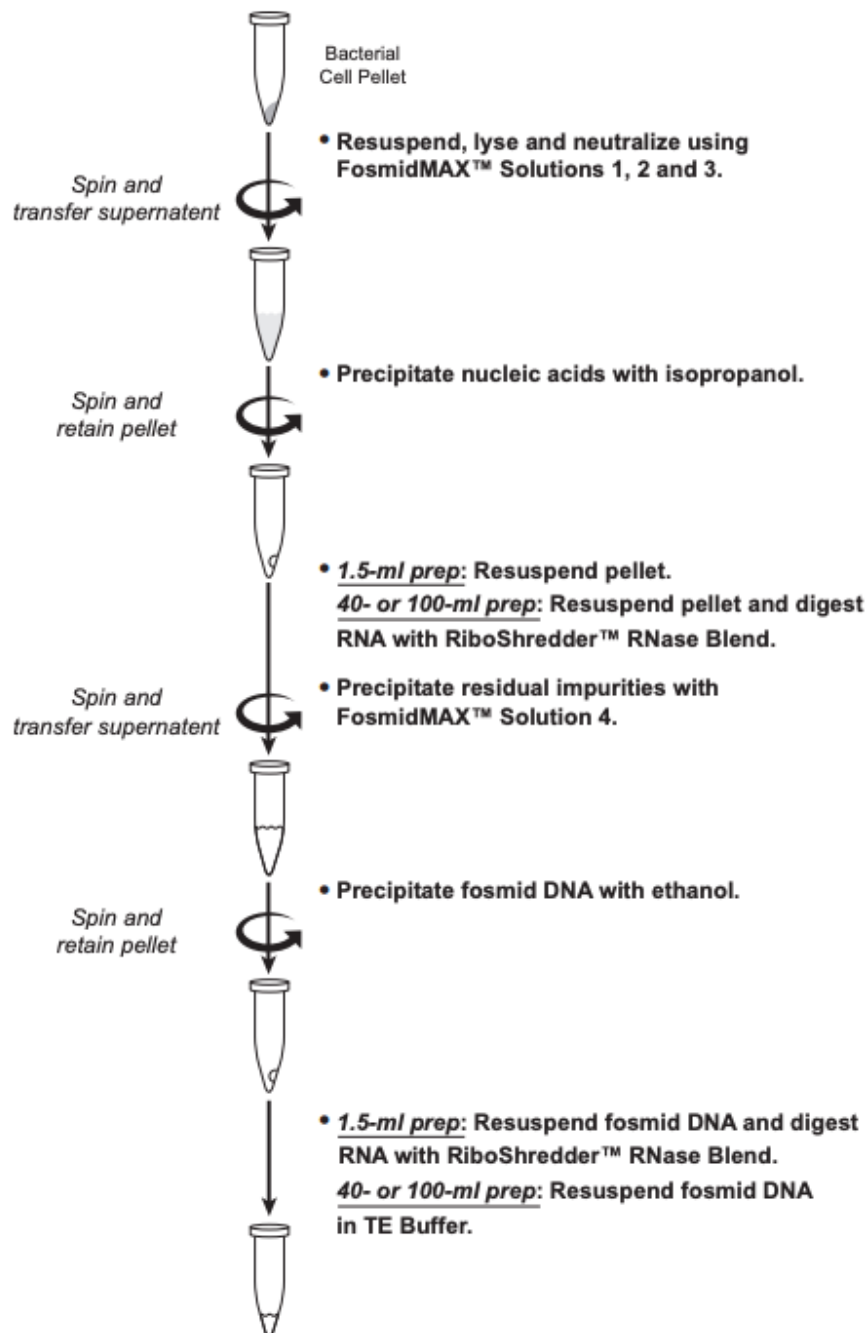
## Bilag 5: DNA oprensning

**QIAamp DNA Investigator Procedure**

Fra QiaGen kittet, QIAamp DNA Investigator Kit: <https://www.qiagen.com/us/products/human-id-and-forensics/investigator-solutions/qiaamp-dna-investigator-kit/>

DNA'et oprenses ved at lysere prøverne og tilsætte opløsningen til søjlen der binder DNA'et skyller alt andet væk, når søjlen skylles igennem. Det oprensede DNA elueres fra membranen af søjlen.

## Bilag 6: Oversigt over FosmidMAX DNA oprensings kit



Fra manualen til FosmidMAX DNA purification kit:

[https://biosearchtech.a.bigcontent.io/v1/static/manual\\_FMAX046\\_FosmidMAX-DNA](https://biosearchtech.a.bigcontent.io/v1/static/manual_FMAX046_FosmidMAX-DNA)