

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor č. 3: Chemie

Využití mikrofluidiky k ochraně životního prostředí pomocí metabolického inženýrství

**Lukáš Drdla
Jihomoravský kraj**

Brno 2022

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor č. 3: Chemie

**Využití mikrofluidiky k ochraně životního prostředí
pomocí metabolického inženýrství**

**Application of microfluidics to environmental pro-
tection by means of metabolic engineering**

Autor: Lukáš Drdla

Škola: Gymnázium Brno, třída Kapitána Jaroše, příspěvková organi-
zace, tř. Kpt. Jaroše 1829/14, 658 70 Brno

Kraj: Jihomoravský kraj

Konzultant: Mgr. Michal Vašina
prof. RNDr. Zbyněk Prokop, Ph.D.
Mgr. David Kovář, Ph.D.

Brno 2022

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem svou práci SOČ vypracoval samostatně a použil jsem pouze prameny a literaturu uvedené v seznamu bibliografických záznamů.

Prohlašuji, že tištěná verze a elektronická verze soutěžní práce SOČ jsou shodné.

Nemám závažný důvod proti zpřístupňování této práce v souladu se zákonem č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších předpisů.

V Brně dne 7.2.2022

Lukáš Drdla

Poděkování

Rád bych v první řadě poděkoval Mgr. Michalu Vašinovi za vedení této práce, cenné rady, připomínky, přínosné konzultace a velké množství vloženého času do zaškolení v laboratoři a tajů počítačových programů k práci s daty. Velký dík pak patří také prof. RNDr. Zbyňku Prokopovi, Ph.D. za konzultace a Mgr. Davidu Kovářovi, Ph.D. za technickou podporu na laboratorních přístrojích.

Rád bych poděkoval také Mgr. Veronice Kyasové a RNDr. Ivě Kubištové, Ph.D. za konzultace a korektury.

Dále přísluší taký velký dík celému týmu Loschmidtových laboratoří za rady, pomoc při práci s laboratorními přístroji a příjemný kolektiv a pracovní prostředí.

Na závěr bych chtěl poděkovat své rodině za podporu zejména při nekonečných analýzách dat a sepisování výsledků.

Práce byla provedena za podpory výzkumné infrastruktury RECETOX (ID LM2018121, MŠMT, 2020–2022).

Anotace

Metabolické inženýrství nabízí možnosti ochrany životního prostředí zapojením enzymů v biodegradčních kaskádách, které mohou být využity v odbourání toxických polutantů ze životního prostředí. V předložené práci se věnuji možnostem využití mikrofluidiky v metabolickém inženýrství. Mikrofluidní technologie je v tomto ohledu velice žádaná, neboť umožňuje provádět velké množství analýz ve velmi malých objemech, čímž nabízí obrovské úspory materiálu i času.

Teoretická část této práce vyzdvihuje současné trendy v environmentálním metabolickém inženýrství a mikrofluidice, přičemž se především zaměřuje na fungování enzymů, jakožto základních kamenů metabolických drah. Dále tato část představuje modelovou biodegradční enzymovou kaskádou k přeměně toxického 1,2,3-trichloropropanu (TCP) na neškodný glycerol.

Experimentální část této práce se zabývá vývojem citlivé detekce glycerolu (finálního produktu degradace TCP) pomocí mikrofluidiky. Konkrétně se práce zabývá optimalizací stechiometrie enzymů, které tvoří detekční kaskádu s fluorescenčním produktem. V návaznosti na tuto optimalizaci se práce snaží najít příčiny poklesu fluorescenčního signálu pomocí testování interakcí výsledného produktu detekční kaskády (resorufinu) s jednotlivými meziprodukty.

Klíčová slova

mikrofluidika, metabolické inženýrství, enzymatické kaskády, ochrana životního prostředí, biodegradace

Annotation

Metabolic engineering offers possibilities of environmental protection using enzymes in biodegradation cascades, which could be used in degrading toxic pollutants from the environment. In this study, I focus on application of microfluidics in metabolic engineering. Microfluidic technology is desirable as it allows to perform a higher number of analyses in small volumes and offers huge savings of both material and time.

Theoretical part of this study highlights the current trends in environmental metabolic engineering and microfluidics with a particular focus on the function of enzymes, as a basic building blocks of metabolic pathways. Furthermore, this part introduces the model biodegradation enzyme cascade for conversion of toxic 1,2,3-trichloropropane (TCP) to harmless glycerol.

Experimental part of this study describes the development of precise detection of glycerol (final product of TCP degradation pathway) using microfluidics. Specifically, it deals with optimization of enzyme stoichiometry in the detection pathway (converting glycerol into fluorometrically detectable resorufin). Following this optimization, this study tries to find causes of fluorescence signal decrease by testing interactions between resorufin and intermediates.

Keywords

microfluidics, metabolic engineering, enzymatic cascades, environmental protection, biodegradation

Obsah

Seznam použitých zkratk	6
1. Úvod	7
2. Teorie	9
2.1. Metabolické inženýrství	9
2.1.1. Enzymy jakožto základní kameny metabolických drah	9
2.1.2. Inženýrský cyklus	10
2.2. Mikrofluidika a laboratoře na čipu	11
2.2.1. Základy a principy mikrofluidiky	11
2.2.2. Aplikace mikrofluidiky v metabolickém inženýrství	12
2.3. Modelová metabolická dráha	13
3. Cíle práce	14
4. Materiál, metody	15
4.1. Materiál	15
4.1.1. Chemikálie	15
4.1.2. Reakční kity	15
4.1.3. Roztoky a pufry	15
4.1.4. Biologický materiál	15
4.1.5. Laboratorní přístroje	15
4.1.6. Mikrofluidní materiál	16
4.1.7. Software	16
4.2. Metody	16
4.2.1. Měření na mikrofluidní platformě	16
4.2.2. Měření na mikrotitrační destičce	18
5. Výsledky	19
5.1. Hledání vhodné detekce glycerolu	19
5.2. Testování a optimalizace vlastní detekční kaskády	20
5.3. Testování interakcí meziproduktů s resorufinem	24
5.3.1. Interakce resorufin – AUR	24
5.3.2. Interakce resorufin – H ₂ O ₂	24
5.3.3. Interakce resorufin – DHAP/H ₂ O ₂	26
6. Diskuze	27
7. Závěr	28
Použitá literatura a zdroje	29

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AUR	Amplex Ultra Red Reagent
DBTL	Design-Build-Test-Learn
DDT	1,1,1-trichlor-2,2-bis(4-chlorfenyl)ethan (dichlordifenyltrichlorethan)
DHAP	dihydroxyacetonfosfát
EC	Enzyme class (enzymmová třída)
FADS	Fluorescence-activated droplet sorting
GK	glycerolkinasa
GPO	glycerolfosfát oxidasa
HRP	křenová peroxidasa
LOC	lab-on-a-chip (laboratoř na čipu)
PDMS	poly(dimethyl siloxan)
RFJ	relativní fluorescenční jednotky
TCP	1,2,3-trichlorpropan
U	enzymatická jednotka

1. ÚVOD

V posledních několika desítkách let můžeme na naší planetě pozorovat řadu nežádoucích změn v životním prostředí, z nichž většinu v současnosti zahrnujeme do pojmu změna klimatu. Akumulují se skleníkové plyny (CO_2 , CH_4 , N_2O a jiné), roste průměrná teplota ovzduší (od průmyslové revoluce vzrostla o $1,2^\circ\text{C}$, z toho dokonce o $0,6^\circ\text{C}$ jen za posledních 20 let (WMO et al. 2021)), dochází k tání ledovců, rostou hladiny oceánů, usychají tisíce stromů a dochází i k významnému poklesu živočišné i rostlinné diverzity (Rockström et al. 2009). Alarmující skutečností je, že u většiny těchto změn lze pozorovat exponenciální vývoj a významnou roli v těchto změnách hraje člověk a jeho aktivity.

Jako pomyslný milník tohoto trendu můžeme označit průmyslovou revoluci. Jedním z mnoha důsledků průmyslového rozvoje je totiž vypouštění antropogenních a potenciálně nebezpečných látek do přírody. Závažnost tohoto problému podtrhuje fakt, že si lidé začali uvědomovat neblahé důsledky svého průmyslového rozvoje až během druhé poloviny 20. století. Právě toto uvědomění vedlo ke vzniku nového oboru chemie, a to chemie životního prostředí (environmental chemistry). Chemie životního prostředí je multidisciplinární obor zahrnující chemii, fyziku, humanitní vědy, zdravotnictví, inženýrství a mnoho dalších (De 2003). Otevírá nám spoustu možností a přináší podklady nejen pro zmírnění následků lidské činnosti, ale i ke změnám, kterými je možné problémům předcházet.

Roku 2001 byla podepsána Stockholmská úmluva o persistentních organických polutantech (ČR 2008), která zakazuje, případně omezuje výrobu některých látek, které jsou nebezpečné pro životní prostředí. Jako příklad je možné uvést 1,1,1-trichlor-2,2-bis(4-chlorfenyl)ethan (DDT). Jedná se o syntetickou látku, která byla poprvé syntetizována rakouským chemikem Otmarem Zeidlerem již v roce 1874 (Britannica [b.r.]). Ve třicátých letech 20. století švýcarský vědec Paul Hermann Müller objevil, že jej lze použít jako insekticid (Nobel Prize. [b.r.]). Časem se zjistilo, že ho lze dokonce použít jako ochranu před některými hmyzem přenášenými chorobami, například malárií. Na rizika této látky upozornila až americká biologka a spisovatelka Rachel Carson v knize *Silent Spring* (Carson 1965). Vydání této knihy lze považovat za jeden z impulsů k vzniku celosvětové iniciativy k ochraně životního prostředí. Stockholmská úmluva posléze výrobu DDT a dalších persistentních organických polutantů zakázala.

Lidstvo si tedy začalo uvědomovat problém znečištění životního prostředí a začalo vyvíjet způsoby, jak tyto látky z přírody odstraňovat. Těchto způsobů je celá řada. Na některé látky postačí například obyčejné mechanické filtry. Jako příklad mechanického oddělování lze uvést spalovny a filtry v jejich komínech, které nás ochraňují před uvolňováním kyselinotvorných oxidů do ovzduší a pomáhají eliminovat kyselý dešť. Na další skupinu látek známe metody jejich chemického odstraňování, například substitucí jednotlivých atomů a funkčních skupin ze sloučeniny může vzniknout jiná, člověku neškodná. Jsou zde však i látky, k nimž způsob jejich odstranění buď neznáme, nebo je zažitý způsob příliš drahý a neefektivní.

Jedna z možných zajímavých alternativ ke konvenčním metodám je biodegradace. Je to proces, při kterém se látky v přírodě rozkládají v látku jinou za pomoci biologických organismů.

Nejčastěji je při tomto procesu využíváno mikroorganismů (zpravidla bakterií). Praktická aplikace biodegradace v přírodě se nazývá bioremediace. Při použití bioremediace je ovšem nutné znát produkt biodegradace, aby z původního polutantu nevznikla ještě toxičtější látka.

Na molekulární úrovni probíhá biodegradace pomocí kaskád chemických reakcí, zpravidla katalyzovanými enzymy. Enzymové kaskády v přírodě se vyvíjely miliony let, jenže lidstvo nemůže čekat tak dlouho, než příroda sama vyvine nové biodegradační systémy. Za tímto účelem vznikl obor na pomezí biologie a biochemie, zvaný metabolické inženýrství, který se mimo jiné zabývá vývojem a optimalizací enzymových kaskád. Metaboličtí inženýři velmi úzce spolupracují s proteinovými inženýry, kteří se snaží vylepšit vlastnosti jednotlivých enzymů v metabolických drahách tím, že mění strukturu enzymů pomocí změn v sekvenci (mutagenezí) jednotlivých aminokyselin (Marcheschi et al. 2013).

Existuje astronomické číslo možných kombinací enzymů (popřípadě jejich mutantů), které by mohly být experimentálně testovány na možné využití v určité metabolické dráze. Problémem zůstává, že konvenční biochemické charakterizační techniky nenabízejí dostatečnou kapacitu a průchodnost pro tak velké množství kombinací enzymů/mutantů. Řešení přinášejí trendy miniaturizace a automatizace laboratorních postupů, které dramaticky zvyšují kapacitu experimentální charakterizace metabolických drah. Dominantní technologií v této oblasti je tzv. mikrofluidika, která dokáže provádět tisíce až miliony experimentů za den s výraznou úsporou jak materiálu, tak času. Vývoj mikrofluidních systémů pro optimalizaci biodegradačních metabolických drah tedy představuje jeden z potenciálních přístupů, jak pomoci lidstvu se vyrovnat s neblahými následky vypouštění antropogenních škodlivých látek do životního prostředí.

2. TEORIE

2.1. Metabolické inženýrství

Lidstvo již tisíce let využívá živé organismy k provádění užitečných biochemických reakcí, nejčastěji pro přípravu cenných látek pro zemědělství, potravinářství nebo medicínu (Nielsen a Keasling 2016). Až v 80. a 90. letech 20. století však byly objeveny klíčové vhledy, jak tyto reakce probíhají na molekulární úrovni. Tehdy vznikl obor metabolické inženýrství (Bailey 1991), který si klade za cíl přeprogramovat metabolické dráhy buněk ke zvýšení efektivity cílové biochemické reakce (Nielsen a Keasling 2016). Metabolické inženýrství tyto dráhy jednak studuje, optimalizuje, ale v posledních desetiletích také vyvíjí nové syntetické dráhy za pomoci technik syntetické biologie (Stephanopoulos 2012). Drtivá většina všech těchto biochemických reakcí je urychlená činností bílkovinných katalyzátorů, tzv. enzymů.

2.1.1. Enzymy jakožto základní kameny metabolických drah

Enzymy jsou proteinové katalyzátory, které zvyšují rychlost chemických reakcí v živých organismech (Kodíček et al. 2018). Role enzymů je v těchto reakcích nezastupitelná, neboť bez této katalýzy by reakce probíhaly až 10^{14} -krát pomaleji (Vodrážka et al. 1991). Enzymatická aktivita se běžně vyjadřuje pomocí tzv. enzymatických jednotek (U). Jedna enzymatická jednotka odpovídá množství enzymů, které dokáže přeměnit jeden μmol substrátu za jednu minutu (Anon. 2018).

Enzymy můžeme podle typu reakce jimi katalyzované rozdělit na 7 tříd nesoucí názvy těchto typů reakcí s příponou -asa. Tyto třídy se dále dělí na konkrétnější podtřídy:

EC1 – oxidoreduktasy (oxidačně redukční reakce)

EC2 – transferasy (přenosy funkčních skupin)

EC3 – hydrolasy (hydrolytické štěpení)

EC4 – lyasy (eliminace funkčních skupin za vzniku dvojných vazeb)

EC5 – izomerasy (izomerace)

EC6 – ligasy (tvorba vazeb spojená s hydrolýzou ATP)

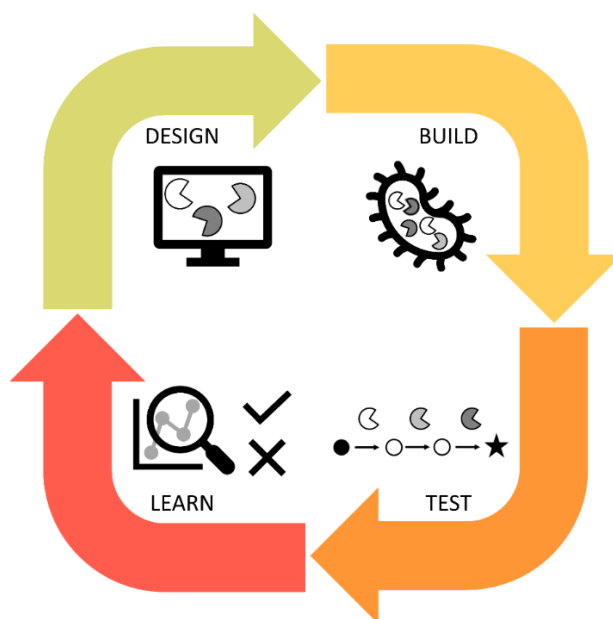
EC7 – translokasy (transport látek, často přes biologické membrány)

Přestože reakce katalyzované enzymy nabízejí v mnoha případech neuvěřitelnou selektivitu a specifitu, pro množství reakcí neposkytují enzymy dostatečnou katalytickou efektivitu a stabilitu (Reetz 2013). Proto se vyvinul obor proteinového inženýrství, které cíleně mění strukturu enzymů pomocí mutagenese, aby vlastnosti enzymů vylepšil (Bornscheuer et al. 2012). Ne všech žádoucích produktů lze dosáhnout pomocí jednokrokové biochemické reakce

katalyzovanou enzymem. V takovém případě je třeba využít kombinace více enzymů, podobně jako buňka, která využívá kaskády enzymů v rámci metabolických drah. Za tímto účelem existuje obor metabolické inženýrství, které se zabývá optimalizací kaskád reakcí katalyzovaných různými enzymy.

2.1.2. Inženýrský cyklus

Jako většina inženýrů i metaboličtí inženýři se drží postupu zvaného “cyklus Design-Build-Test-Learn” (DBTL) (Obr. 1), neboli cyklus designu, jeho následného zbudování, testování a vyhodnocení (Nielsen a Keasling 2016). Metaboličtí inženýři si tedy nejprve vytyčí problém, na který se snaží navrhnout řešení v podobě možné metabolické dráhy. V následném kroku tuto metabolickou dráhu nejčastěji vnesou do živých organismů ve formě genů, z nichž buněčná mašinerie dokáže vyrobit funkční enzymy, a tedy i celou metabolickou dráhu. Vlastnosti této dráhy jsou následně experimentálně testované a získaná data jsou vyhodnocena. Cyklus se uzavírá využitím poznatků z experimentální charakterizace pro úpravu designu v prvním kroku.



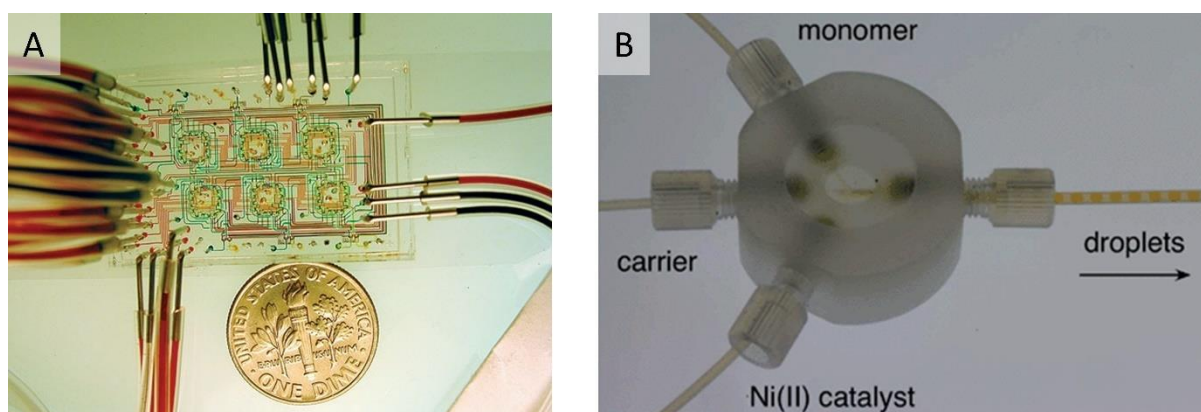
Obr. 1 Schéma cyklu Design – Build – Test – Learn pro metabolické inženýrství. Cyklus začíná designem metabolických drah a výběrem jednotlivých enzymů, následně jejich produkcí systémem bakterií a mikroorganismů, následného provedení reakce s těmito enzymy a vyhodnocení získaných dat. Na základě těchto dat je designován nový experiment a cyklus se opakuje.

Celý cyklus trvá za použití konvenčních metod měsíce až roky, navíc zpravidla jeden cyklus k dosažení kýžených výsledků nestačí (Guo et al. 2017). Lze však očekávat, že miniaturizace a automatizace běžných metod by mohla tuto periodu zkrátit řádově na dny až týdny (Nielsen a Keasling 2016). Testovací fáze by při vhodném návrhu experimentu byla možná stihnout během jediného dne. Jako nejslibnější experimentální technologií se v tomto ohledu jeví mikrofluidika, která nabízí vysokou experimentální průchodnost (high-throughput) pro experimentální testování v rámci DBTL cyklu (Bjork a Joensson 2019).

2.2. Mikrofluidika a laboratoře na čipu

Laboratoř na čipu (LoC) je koncept zabývající se miniaturizací a integrací běžných laboratorních procesů na malé, většinou silikonové, čipy (**Obr. 2A**). Mikrofluidika je v procesu LoC klíčovou, dominantní technologií. Jak název napovídá, většina laboratorních úkonů je integrována v rámci čipu o ploše v řádu jednotek čtverečních centimetrů. Takové LoC se nejčastěji vyrábějí z průsvitného biokompatibilního materiálu PDMS - poly(dimethylsiloxan) a tato výroba je rychlá a levná (Whitesides 2006) a zároveň ideální pro vysokokapacitní testování v rámci DBTL cyklu. Bohužel nelze PDMS čipy použít pro analýzu látek částečně nebo úplně hydrofobních (Courtois et al. 2009), protože unikají do olejné fáze a výroba čipů z chemicky inertnějších materiálů, jako např. Teflon, je technologicky výrazně náročnější a dražší.

Jako slibná alternativa se jeví kapilární mikrofluidika (**Obr. 2B**), která používá komerčních trubiček pro kapalinovou chromatografii dostupných v celé řadě inertních biokompatibilních materiálů (Bannock et al. 2014). Kapilární mikrofluidika sice pracuje s většími objemy než běžné LoC (a tedy i s nižší kapacitou), nicméně práce s trubičkami je výrazně snazší než s čipy.



Obr. 2 Příklady systémů LoC a kapilární mikrofluidiky. Mikrofluidní čip LoC (A) je daleko menší, komplexnější a technologicky náročnější v porovnání s kapilární mikrofluidní platformou (B) složenou z komerčně dostupných chromatografických fluidních spojů.. Obrázky byly převzaty a upraveny podle: A: Whitesides 2006, B: Bannock et al. 2014

Mikrofluidika má dvě hlavní výhody, a sice efektivitu - díky mikrofluidice je možné provést tisíce až miliony experimentů za den; a úspornost - na jeden experiment se spotřebuje objem vzorku v řádu nanolitřů až femtolitřů, což je s konvenčními metodami nesrovnatelné (Whitesides 2006).

2.2.1. Základy a principy mikrofluidiky

Slovo mikrofluidika je složené ze slov mikro (z řeckého mikros - malý) a fluidika (z latinského fluidum - tekutina), z čehož logicky vyplývá, že se zabývá malými objemy tekutin, nejčastěji kapalin. Jedním z hlavních odvětví mikrofluidiky je tzv. kapénková mikrofluidika (Seemann et al. 2011). Ta je založená na tvoření malých kapiček vodné fáze v olejové fázi. Každá jednotlivá kapka pak představuje samostatnou reakční komůrku.

Většina experimentů kapénkové mikrofluidiky zahrnuje tyto základní kroky: (i) generace kapének, (ii) manipulace s kapénkami a (iii) analýza kapének. Při generaci kapének jsou nejčastěji kapénky vodné fáze “odstříhávány” nemísitelnou olejovou fází principem Plateau-Rayleighovy nestability (Strutt 1879), tedy mechanismem připomínající kapající vodovodní kohoutek. Kapénkami se nejčastěji manipuluje za pomoci pump a vhodné geometrie mikrofluidních kanálků, která zaručuje běžně žádané procesy jako např. míchání, inkubace, či splnutí kapének (Haerberle a Zengerle 2007). Délka kanálku a rychlost proudění v něm pak určuje reakční čas enzymatické reakce.

Závěrečným krokem je analýza kapének. Nejčastěji je využíváno optických metod, jako je fluorescence, bioluminiscence, či absorbance, nicméně mikrofluidní systémy jsou propojovány i s pokročilejšími metodami detekce, jako je například hmotnostní spektrometrie či nukleární magnetická rezonance (Zhu a Fang 2013). Pestrůst analytických technik ve spojení s kapénkovou mikrofluidikou dokazuje potenciál mikrofluidiky jako technologie univerzálně aplikovatelné pro potřeby metabolického inženýrství.

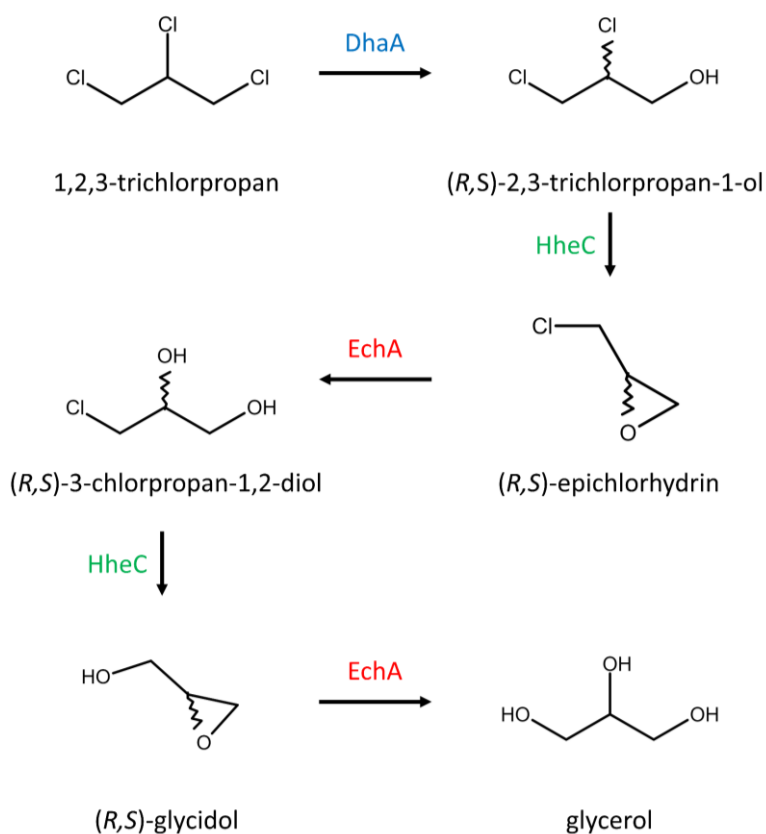
2.2.2. Aplikace mikrofluidiky v metabolickém inženýrství

V rámci DBTL cyklu metabolického inženýrství jsou nejčastěji mikrofluidní systémy použity ve fázích B (Build) a T (Test). V rámci fáze B byly například vyvinuty mikrofluidní čipy pro syntézu a seskupení fragmentů DNA do knihoven, které byly následně pomocí metody transformace vloženy do hostitelské buňky mikroorganismu (Shih et al. 2015). Tyto knihovny bývají poté ve fázi T podrobeny tzv. screeningu, tedy selekci nejvhodnějších kandidátů ať už na úrovni jednotlivých enzymů (nejčastěji mutantů v rámci proteinového inženýrství) či na úrovni metabolických drah. Velmi běžná je metoda průtokové cytometrie, která umožňuje třídění jednotlivých buněk podle signálu (Tracy et al. 2010). Mikrofluidní inženýři tento systém napodobili v tzv. třídění kapének (droplet sorting), čímž zvýšili výrazně experimentální průchodnost (Neun et al. 2020). Dominantním mikrofluidním systémem pro třídění kapének je tzv. fluorescencí aktivované třídění kapének (fluorescence-activated droplet sorting, FADS) (Baret et al. 2009).

Přestože se mikrofluidika zatím tolik nevyužívá pro inženýrství environmentálních metabolických drah, existuje nedávný příklad využití FADS pro třídění enzymů z rodiny PETas (Qiao et al. 2022). Tyto enzymy katalyzují rozklad syntetických plastů, konkrétně polyethylentereftalátu (PET), který se v hojné míře vyskytuje v odpadech všude kolem nás. Autoři zmiňované studie pomocí FADS úspěšně probrali vzorky odpadní vody z textilní továrny a odhalili mikroorganismy degradující PET z devíti různých rodů. V rámci této studie izolovali dva nové enzymy z rodiny PETas a předběžně u nich určili PETasovou aktivitu. Autoři této studie doufají, že by výzkum mohl pomoci využívat mikrofluidní systémy v mnohem větším měřítku k objevování nových biodegradčních organismů a enzymů, případně k vývoji nových biodegradčních kaskád pomocí metod syntetické biologie.

2.3. Modelová metabolická dráha

Syntetická biologie byla využita i pro vývoj modelové metabolické dráhy popsané v této práci. Tato dráha se zaměřuje na odbourávání 1,2,3-trichlorpropanu (TCP). TCP je potenciálně karcinogenní nepřírodní polutant znečišťující především odpadní vody, který je celosvětově produkován v množství přesahujícím 50 tisíc tun ročně (Dvorak et al. 2014a). První myšlenka na biodegradaci TCP byla představena Bosmou a spoluautory (Bosma et al. 1999), kteří zkombinovali tři enzymy – halogenalkandehalogenasu DhaA, haloalkoholdehalogenasu HheC a epoxid hydrolasu EchA (**Obr. 3**). Stechiometrie této enzymatické kaskády byla v rámci Loschmidových laboratoří dříve optimalizována ve zkumavce (Dvorak et al. 2014b) i v bakterii *Escherichia coli* (Kurumbang et al. 2014). Přístup matematické optimalizace stechiometrie enzymové kaskády vedl až k 56% úspoře celkového biologického materiálu při zachování stejné efektivity kaskády (Dvorak et al. 2014b). V současnosti probíhá v Loschmidových laboratořích vývoj mikrofluidních systémů pro další pokročilou optimalizaci detekční eseje pro tuto metabolickou dráhu. V rámci své středoškolské odborné činnosti přispívám k tomuto vývoji snahou optimalizovat detekci finálního produktu této degradační kaskády, glycerolu, v prostředí mikrofluidních kapének.



Obr. 3: Schéma syntetické metabolické dráhy k odbourávání 1,2,3-trichlorpropanu. TCP je nejprve za katalytického působení enzymu DhaA přeměněn na (R,S)-2,3-dichloropropan-1-ol substitucí hydroxylové skupiny za chlor na 1. uhlíku. Dále za katalýzy enzymem HheC na (R,S)-epichlorhydrin, což je meziprodukt ke vzniku (R,S)-3-chloropropan-1,2-diolu, kdy je již na dvou uhlících místo chloru hydroxylová skupiny, za katalýzy enzymem EchA. Dále již zbývá pouze substituce posledního chloru, čehož je docíleno katalýzou enzymy HheC a EchA přes meziprodukt (R,S)-glycidol na glycerol.

3. CÍLE PRÁCE

Tato práce navazuje na dlouhodobý cíl Loschmidtových laboratoří vyvíjet automatizované mikrofluidní systémy pro studium enzymů a enzymových kaskád v rámci proteinového a metabolického inženýrství. Jedním z projektů je konstrukce syntetické (umělé) metabolické dráhy odbourávající antropogenní polutant 1,2,3-trichlorpropan (TCP) na netoxický glycerol a optimalizace detekční eseje pro tuto dráhu. Cílem mého příspěvku v tomto dlouhodobém projektu, a zároveň i hlavním cílem této konkrétní středoškolské odborné práce bylo využít mikrofluidní systémy k vývoji a optimalizaci detekce glycerolu jakožto hlavního produktu syntetické metabolické dráhy k degradaci environmentálního polutantu TCP.

Dílčí cíle této práce byly:

- naučit se pracovat s mikrofluidním laboratorním zařízením pro studium enzymů a enzymových kaskád,
- naučit se analyzovat vícerozměrná data získaná mikrofluidními experimenty,
- sestavit a otestovat jednotlivé komponenty analytické eseje pro citlivé monitorování glycerolu v prostředí mikrofluidních kapének,
- ověřit stabilitu, možné negativní vzájemné interakce komponent analytické eseje a experimentálně nalézt jejich optimální kompozici,
- kalibrovat a validovat výslednou detekční metodu pro mikrofluidní využití.

4. MATERIÁL, METODY

4.1. Materiál

4.1.1. Chemikálie

- Peroxid vodíku (Penta)
- Resorufin (Biotium)
- Dihydroxyacetonfosfát (Merck)
- Ethanol (Merck)
- Deionizovaná voda
- Glycerol (Merck)
- Dimethylsulfoxid (Merck)
- Polyfluorovaný olej Fluorinert FC40 (AZK)
- Tris(hydroxymethyl)-aminomethane – TRIS (Merck)

4.1.2. Reakční kity

- Invitrogen™ Amplex™ UltraRed Reagent (Thermo Scientific)
- Free Glycerol Colorimetric/Fluorometric Assay Kit (Biovision)

4.1.3. Roztoky a pufr

- Tris-SO₄ pufr (50 mM Tris, 5 mM MgSO₄, pH 8,00)
- Amplex UltraRed Reagent v DMSO (10 mM roztok)

4.1.4. Biologický materiál

- Glycerolkinasa z *Cellulomonas* (Merck)
- Glycerol-3-fosfát oxidasa z *Aerococcus viridans* (Merck)
- Křenová peroxidasa (Merck)

4.1.5. Laboratorní přístroje

- fluorescenční/absorbanční/luminiscenční reader CLARIOstar® Plus (BMG Labtech)
- analytické váhy HR-120-EC (A&D)
- míchačka magnetická s vyhříváním US 152 (Bibby Scientific Ltd.)
- pH metr
- pH elektroda Hamilton (Thermo Scientific)
- ultrazvuková lázeň Ultrasonic Compact Cleaner PS0300 (Notus Powersonic)
- výrobek deionizované, čisté vody Neptune Ultimate (Purite)

4.1.6. Mikrofluidní materiál

Fluidika

- kapilára PFA High Purity 1/16" OD x .020" ID (IDEX Health & Science)
- fluidní konektory se závity 1/4-28 (vše IDEX Health & Science): ferule P-200; fitinky P-235, P-245; luer-adaptér P-658; Y-konektor P-512; křížová spojka P-722; vícecestné kapalinové spojky P-150, P-155
- pumpy NEMESYS Low pressure (Cetoni)
- stříkačky GASTIGHT® (Hamilton) Série 1000 (1-;2,5-;5-;10- a 25 mL) zakončení: Luer Lock a ChemSeal (závit 1/4"-28)

Optika

- LED dioda: M 530 L3 (530 nm, Thorlabs)
- Dichroické zrcátko: DMLP 567 R (567 nm, Thorlabs)
- Long pass filtr: 590 GY 25, SM1L05, (590 nm, Thorlabs)
- spektrofotometr QE Pro (OceanOptics)
- klecový systém a jiné optické komponenty (Thorlabs)

Ostatní technika

- měděný válec (průměr 1,5 cm, délka 8 cm) s drážkami pro kapiláru
- tepelná kartuše 6.5 x 40 mm, 100 W (Farnell)
- termočlánek Sensor, Thermoelement Type K - 0.5 mm (Farnell)
- PID teplotní kontrola CN7800 (Omega)
- motorizovaná posuvná plocha LTS150/M (Thorlabs)
- modul pro sběr teplotních údajů z termočláneků cDAQ-9171 (National Instruments)

4.1.7. Software

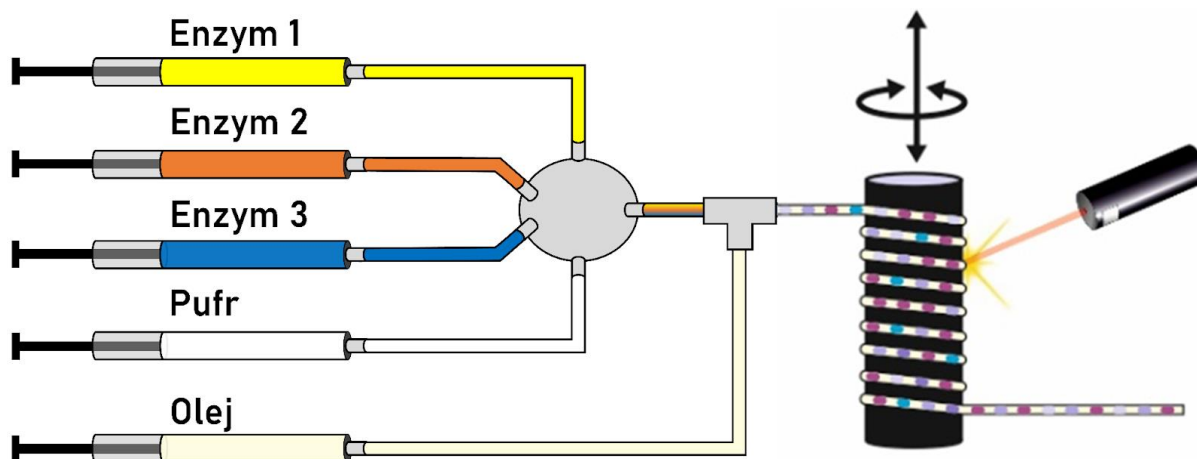
- MARS Data Analysis Software (BMG LABTECH)
- Reader Control Software (BMG LABTECH)
- LabView 2019 (National Instruments)
- Microsoft Office 365 (Microsoft)
- Origin 2021b (OriginLab Corporation)

4.2. Metody

4.2.1. Měření na mikrofluidní platformě

Mikrofluidní platforma, pracovně označovaná jako MAX (Microfluidic Assisted eXperiments) byla sestavena z jednotlivých komerčně dostupných komponent tak, aby spolu tvořily jeden funkční celek. Platforma využívá pumpy neMesys Low Pressure (Cetoni), které umožňují vysoce přesné dávkování vodných i olejových fází pomocí stříkaček GASTIGHT® (Hamilton, používané objemy 1; 2,5; 5; 10 a 25 mL). Zpravidla jedna pumpa dávkuje olejovou fází (polyfluorovaný olej Fluorinert FC40) a ostatní dávkují zbylé vodné fáze, např. enzymy nebo pufr.

Tlak pump pohání jednotlivé kapaliny kapilárami (vnější průměr 1,6 mm, vnitřní průměr 0,508 mm) z chemicky inertního materiálu perfluoralkoxyalkan (PFA, IDEX Health & Science), což je analog polytetrafluorethylenu (PTFE, známějšího pod svým obchodním názvem teflon). Vodné fáze se následně míchají ve vícecestných spojkách (všechny viz výše od IDEX Health & Science), přičemž poměr rychlostí toků jednotlivých pump určuje složení výsledné směsi fází.



Obr. 4: Schéma mikrofuidní části platformy. Pumpy, na nichž jsou připevněny stříkačky, určují rychlost toku olejové a vodných fází. Enzymy (žlutá, oranžová, modrá) jsou smíchány s pufrém (bílá) v manifoldu (šedé kolečko). Na T-konektoru (případně Y-konektoru) dochází k tvorbě kapének tím, že se vodné fáze setkají s nemísitelnou olejovou fází (světle žlutá). Kapénky následně putují k temperované reakční cívce, která se skládá z měděného válečku s vysoustruženým závitem, jehož rozměr odpovídá vnějšímu rozměru použité PFA hadičky. Při posunu reakční cívky v její podélné ose je možné z jednotlivých smyček postupně odečítat intenzitu fluorescence. Po kalibraci systému, zejména znalosti rychlosti průtoku kapének, lze přesně určit reakční čas v jednotlivých závitech reakční cívky a graficky tak zachytit vývoj fluorescence v čase, tedy vývoj koncentrace produktu v čase.

Na konektoru tvaru Y (případně T, jako na **Obr. 4**) se setkávají olejová a vodná fáze a dochází ke tvorbě kapének. Ty jsou následně vedeny kapilárou přes temperovanou reakční cívku. Tuto cívku je možné vyhřát až na 180 °C díky tepelné kartuši (Farnell) zabudované uvnitř cívky. Teplota je monitorována pomocí termočlánku Sensor typu K, Thermoelement - 0.5 mm (Farnell) a kontrolována pomocí PID regulátoru CN7800 (Omega). Reakční cívka je instalována na posuvném stolku poháněném krokovým motorem LTS150/M (Thorlabs), který umožňuje pohyb cívky v její podélné ose. Tím lze docílit měření fluorescence ve vícero bodech – v tzv. smyčkách, přičemž každá smyčka odpovídá určitému reakčnímu času. Excitační záření z LED diody M530L3 (530 nm, Thorlabs) je vedeno odrazem přes dichroické zrcátko DMLP567R (567 nm, Thorlabs) na povrch reakční cívky. Emitované fluorescenční záření je stejným zrcátkem a dále long-pass filtrem 590GY25 (590 nm, Thorlabs) propouštěno směrem na optovláknový CCD spektrofotometr QE Pro (OceanOptics) K vystředění optického svazku na optické vlákno je použita XY translační štěrbina s asférickou čočkou.

Pro každý poměr jednotlivých fází je nutné vygenerovat víc než 1500 kapének rychlostí generace přibližně 1 kapénka za sekundu (1 Hz), aby byly potlačeny nežádoucí vlivy disperze při míchání vodných fází a zajistila se reprodukovatelnost měření. Po této době (přibližně 20-30 minut) dochází k samotnému měření (6-12 minut) v závislosti na tom, ve kterých smyčkách je signál detekován. Měření probíhá směrem od smyčky s největším reakčním časem po smyčku

s nejmenším reakčním časem, aby nebyla jedna kapénka snímána vícekrát a nedocházelo k vysvěcování fluoroforu.

Každou z HW komponent lze ovládat pomocí příslušného originálního SW (např. OceanView pro QE Pro, Kinesis pro LTS150), nicméně pro automatizovanou kontrolu a sběr dat byl vyvinut vlastní ovládací SW – tzv. Virtual Instrument, který byl naprogramován v prostředí grafického programovacího jazyka LabVIEW (NI, USA). Tento program vyvinul Mgr. David Kovář, Ph.D. z Loschmidtových laboratoří. Program dále umožňuje nastavit všechny experimentální parametry, jako je objem stříkaček se vzorky, rychlost průtoku, sekvenci kombinací jednotlivých vodných fází (reakčních poměrů) experimentu, ve kterých smyčkách bude probíhat měření, v jaké teplotě má experiment probíhat apod.

Surová data z měření byla zpracována pomocí dalšího programu v LabView pro detekci píků. Analýza takto zpracovaných dat byla následně prováděna v Excelu (při variování jedné či dvou složek), nebo v programu Origin (při variování tří a více složek).

4.2.2. Měření na mikrotitrační destičce

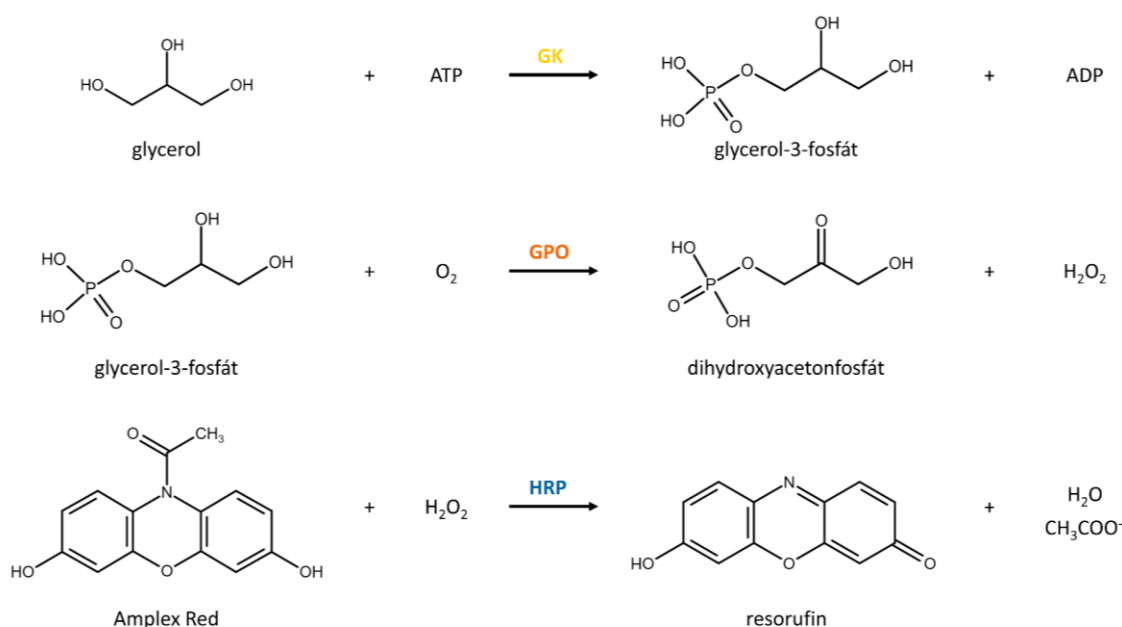
Část experimentů byla provedena měřením na mikrotitračních destičkách pomocí readeru CLARIOstar® Plus (BMG Labtech). Objem reakční směsi je však v každé jamce o několik řádů vyšší, pohybuje se od 100 do 150 μ l. Byly použity destičky s průhledným (OptiPlate 96, Perkin-Elmer) a neprůhledným (96-IsoPlate) dnem. V případě průhledného dna byla destička překryta hliníkovou fólií 96-well Microplate Aluminum Sealing Tape (Corning). Reader byl používán v módu měření fluorescenční intenzity (v čase i jednorázově) a měření fluorescenčních spekter.

Analýza dat je prováděna pomocí programu MARS (BMG Labtech), z nějž lze exportovat data do Excelu.

5. VÝSLEDKY

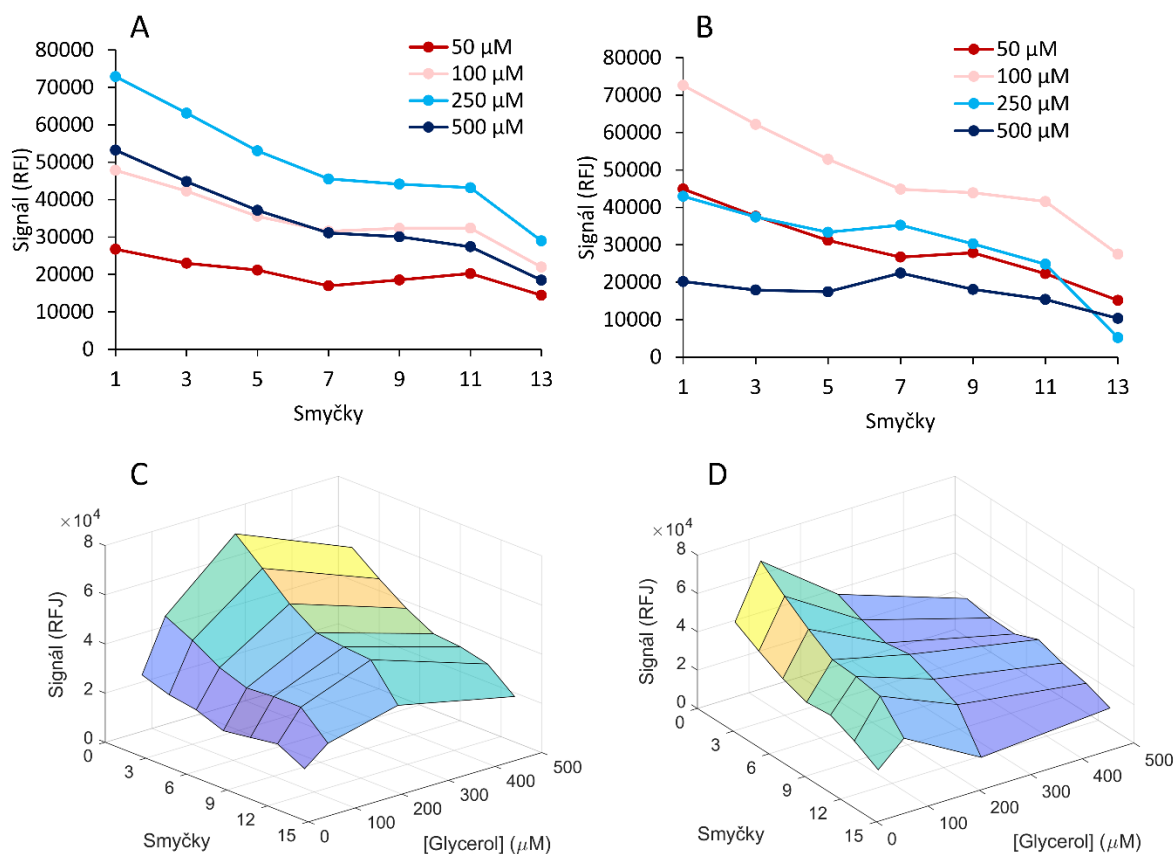
5.1. Hledání vhodné detekce glycerolu

Při hledání vhodného způsobu pro detekci glycerolu, jakožto hlavního produktu syntetické dráhy pro degradaci TCP, byla v první řadě snaha najít komerčně dostupný detekční kit. Nejlepší řešením se zdálo být využít kitu Free Glycerol Colorimetric/Fluorometric Assay Kit (Biovision), který deklaroval detekci glycerolu v rozmezí 1 μM až 10 mM. Tento kit využívá kaskádu enzymů, jejichž pravděpodobná identita byla zkoumána dříve v Loschmidtových laboratořích. Kit pravděpodobně využívá součinnosti tří enzymů, viz **Obr. 5**.



Obr. 5: Schéma enzymové kaskády pro detekci glycerolu. V této tříkrokové kaskádě je v prvním kroku glycerol v přítomnosti adenosintrifosfátu (ATP) oxidován za katalýzy glycerolkinasou (GK) na glycerol-3-fosfát za vzniku adenosindifosfátu. Glycerol-3-fosfát je dále v přítomnosti molekulárního kyslíku oxidován glycerolfosfát oxidasou (GPO) na dihydroxyacetonfosfát (DHAP) a peroxid vodíku H₂O₂. Ve třetím kroku reakční kaskády redukuje křenoá peroxidasa (HRP) vzniklý H₂O₂ na vodu a současně oxiduje Amplex Red na fluorescenční resorufin, který je spektrofotometricky detekovatelný. Vedlejším produktem je octanový aniont a proto musí být reakční prostředí pufrováno.

Během dřívějších experimentů v Loschmidtových laboratořích bylo zjištěno několik významných nevýhod tohoto kitu. Jednak byl relativně cenově nákladný, navíc však obsahoval detergent, který rozbaloval enzym HheC (**Obr. 3**). I po jeho vyloučení a nahrazení reakčního pufru kitu za 50mM Tris-SO₄ pufr (50 mM Tris, 5 mM MgSO₄, pH 8,00) bylo však pozorováno, že není možné spolehlivě detekovat glycerol. Během experimentu na mikrofluidní platformě nebylo dosaženo spolehlivé detekce u koncentrací glycerolu vyšších než 250 μM (**Obr. 6**).

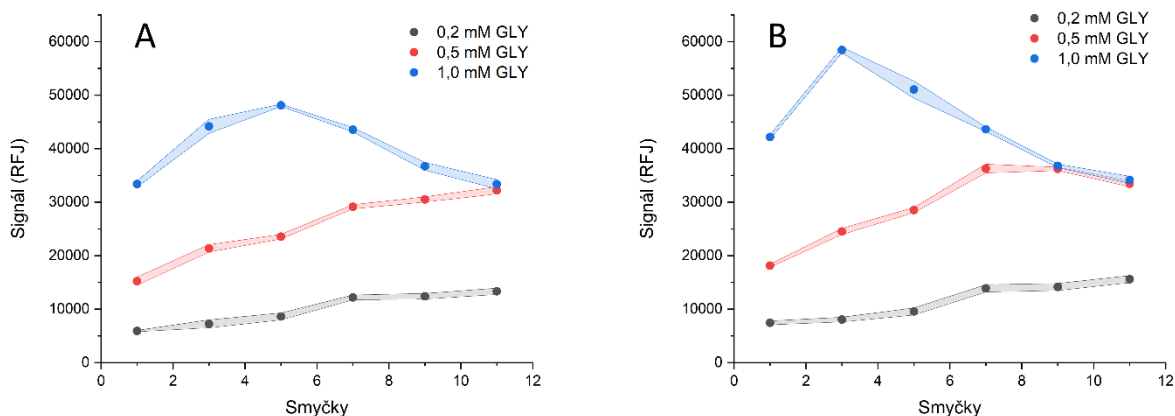


Obr 6: Experimentální testování kitu Biovision na detekci glycerolu. Grafy zobrazují relativní fluorescenční signál v závislosti na čase při různých koncentracích glycerolu. Zároveň části A, C zobrazují výsledky za použití 2% enzymového mixtu od BioVision, zatímco grafy B, D 3%. Na vodorovné ose u grafů A, B je čas vyjádřený jednotlivými smyčkami, v nichž docházelo k měření, na svislé pak hodnota fluorescenčního signálu (RFJ – relativní fluorescenční jednotky). Jednotlivé linie reprezentují různé koncentrace glycerolu. Grafy C, D zobrazují koncentrace glycerolu jako třetí rozměr.

Tyto poznatky vedly k myšlence vyvinout vlastní detekční esej za použití jednotlivých komerčně dostupných enzymů, tedy glycerolkinasy (GK), glycerolfosfát oxidasy (GPO) a křeňové peroxidasy (HRP). Substrátem pro poslední reakční krok byl zvolen Amplex Ultra Red (AUR), z něhož je produkován analog Resorufinu (**Obr. 5**). Přesná struktura této molekuly je nicméně tajná, proto se na **Obr. 5** mohou jednotlivé reagenty a produkty lišit od reality.

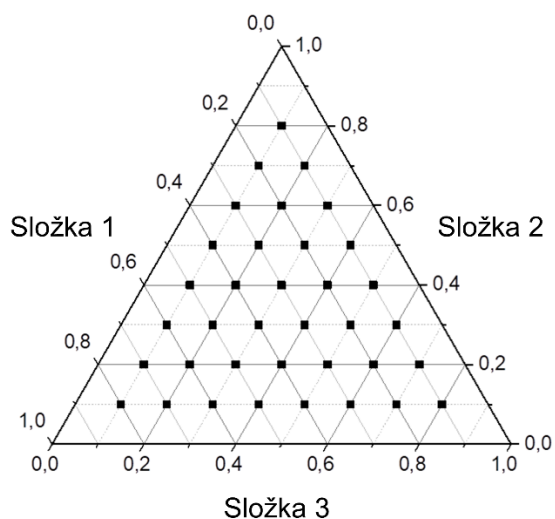
5.2. Testování a optimalizace vlastní detekční kaskády

Vlastní detekční kaskáda byla sestavena a experimentálně testována. V prvním kroku bylo otestováno jen několik stechiometrických kombinací všech tří enzymů pro konverzi tří různých koncentrací glycerolu (0,2; 0,5 a 1,0 mM). Některé z těchto kombinací nicméně ukázaly stabilní detekci glycerolu až do 0,5 mM (**Obr. 7**), což je dvakrát víc než u eseje od Biovision (**Obr. 6**). Z grafů je rovněž patrné, že signál začíná klesat při detekci 1 mM glycerolu, zatímco při nižších koncentracích roste dle očekávání.



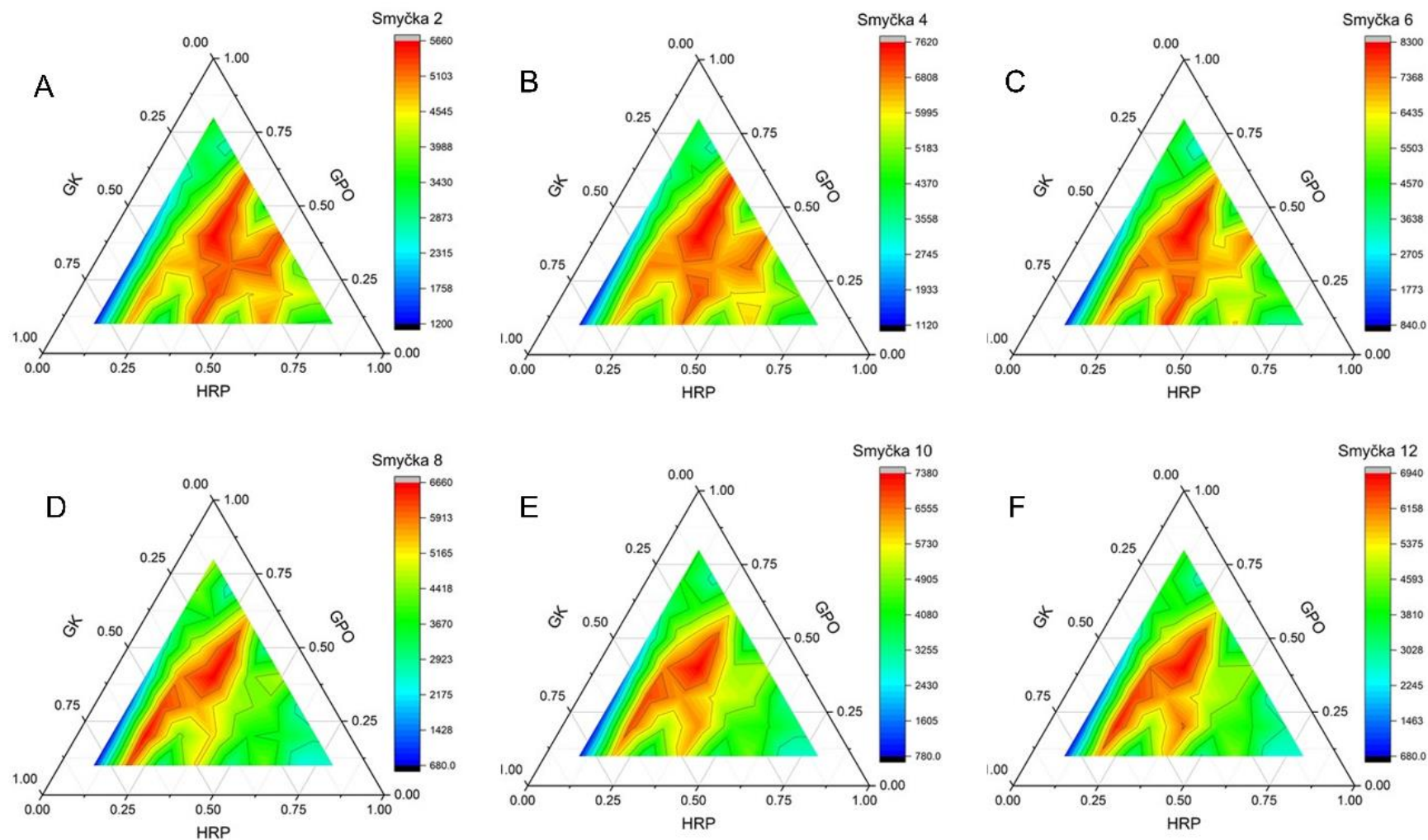
Obr. 7: První testování vlastní eseje na detekci glycerolu. Oba grafy znázorňují vývoj relativního fluorescenčního signálu (RFJ) v jednotlivých smyčkách při enzymatické konverzi 0,2; 0,5 a 1,0 mM Glycerolu (černá, červená a modrá, viz legenda vpravo nahoře). Graf A zobrazuje stechiometrickou kombinaci enzymů (GK, GPO a HRP) v poměru GK:GPO:HRP 0,75:0,125:0,125, graf B v kombinaci 0,8:0,1:0,1. Světlejší barva vyplňující plochu mezi body značí směrodatnou odchylku.

Následujícím krokem bylo systematicky prohledat kombinatorický prostor pro různé stechiometrie těchto tří enzymů s cílem najít jejich optimální poměr. Při designu tohoto experimentu byla zafixována koncentrace glycerolu na 0,5 mM a také součet koncentrací jednotlivých enzymů odpovídal 1 U/mL. Pro efektivní pokrytí kombinatorického prostoru stechiometrií GK, GPO a HRP bylo využito ternárního diagramu. Tento graf umožňuje ve dvou rozměrech vystihnout složení trojsložkového systému. Rovnoměrná distribuce bodů v tomto ternárním diagramu zaručí efektivní pokrytí kombinatorického prostoru (**Obr. 8**).

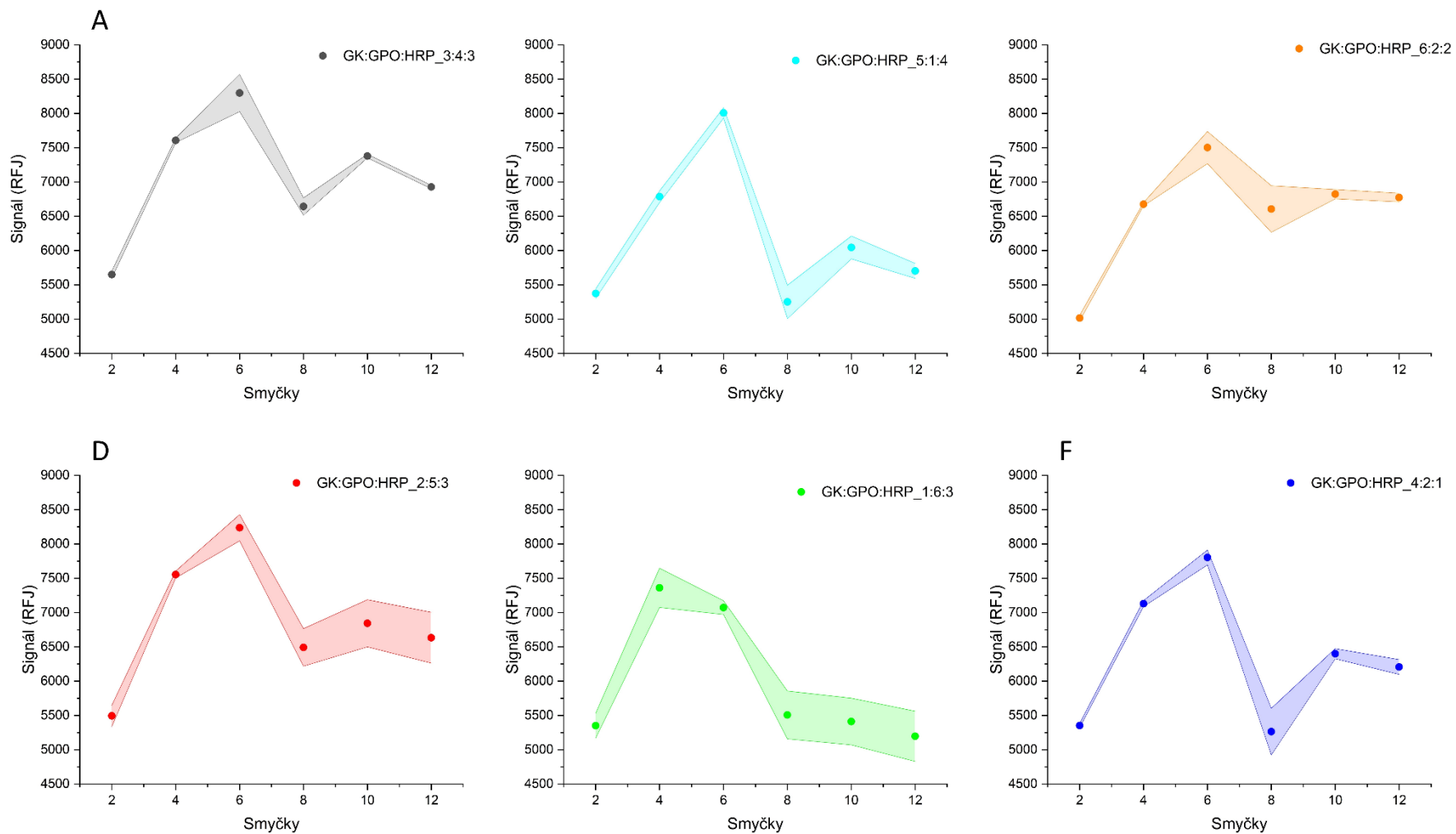


Obr. 8 Designování experimentů pomocí ternárního diagramu. Příklad rovnoměrného pokrytí kombinatorického prostoru 36 body (černé čtverečky).

Systematické prohledání vhodných stechiometrických kombinací bylo provedeno na mikroluidní platformě (**Obr. 9**). Oblasti s nejvyšším signálem jsou detailněji zobrazeny na **Obr. 10**. I zde byl však pozorován nežádoucí pokles signálu, a to konkrétně v osmé smyčce.



Obr 9: Systematické prohledání kombinatorického prostoru stechiometrie detekční kaskády. Ternární diagramy znázorňují vývoj fluorescenčního signálu v různých časech (A-F odpovídá smyčkám 2-12) pro 36 stechiometrických poměrů enzymů. Relativní fluorescenční signál je znázorněn na barevných škálách od modré po červenou (nejnižší po nejvyšší).



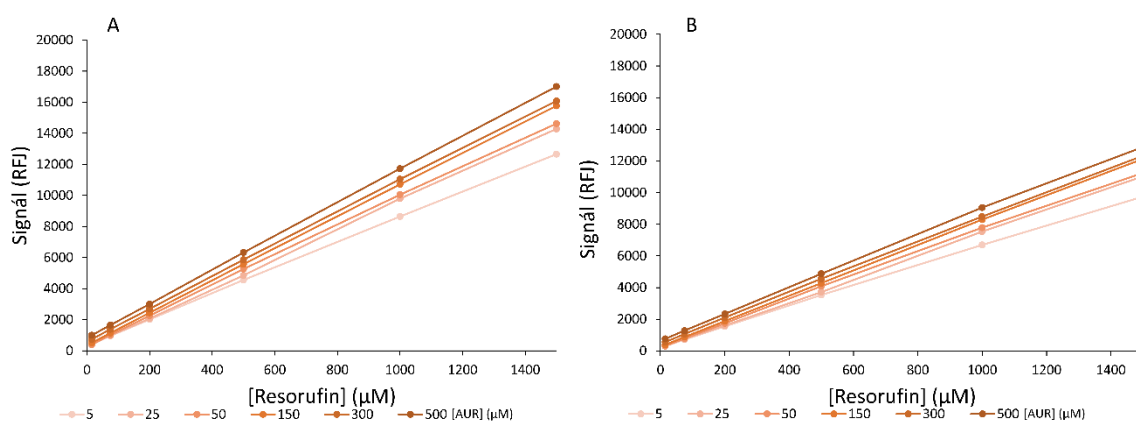
Obr. 10: Vývoj fluorescenčního signálu v čase pro vybrané stechiometrické poměry enzymů v detekční kaskádě. Grafy ukazují závislost relativního fluorescenčního signálu v čase. A-F zobrazují 6 vybraných kombinací enzymů, přičemž jejich poměr je uveden v pravém horním rohu jednotlivého grafu. Světlejší barva vyplňující plochu mezi body značí směrodatnou odchylku.

5.3. Testování interakcí meziproductů s resorufinem

Vzhledem k nežádoucímu poklesu signálu bylo dalším krokem snaha zjistit příčinu tohoto poklesu. Jako možná vysvětlení se jevila ovlivnění resorufinu některým z ostatních meziproductů. K otestování byly vybrány meziproducty AUR, H_2O_2 a dihydroxyaceton fosfát (DHAP). V reakcích byl použit komerčně dostupný resorufin, který nicméně pravděpodobně nemá identickou chemickou strukturu, jako produkt reakce AUR.

5.3.1. Interakce resorufin – AUR

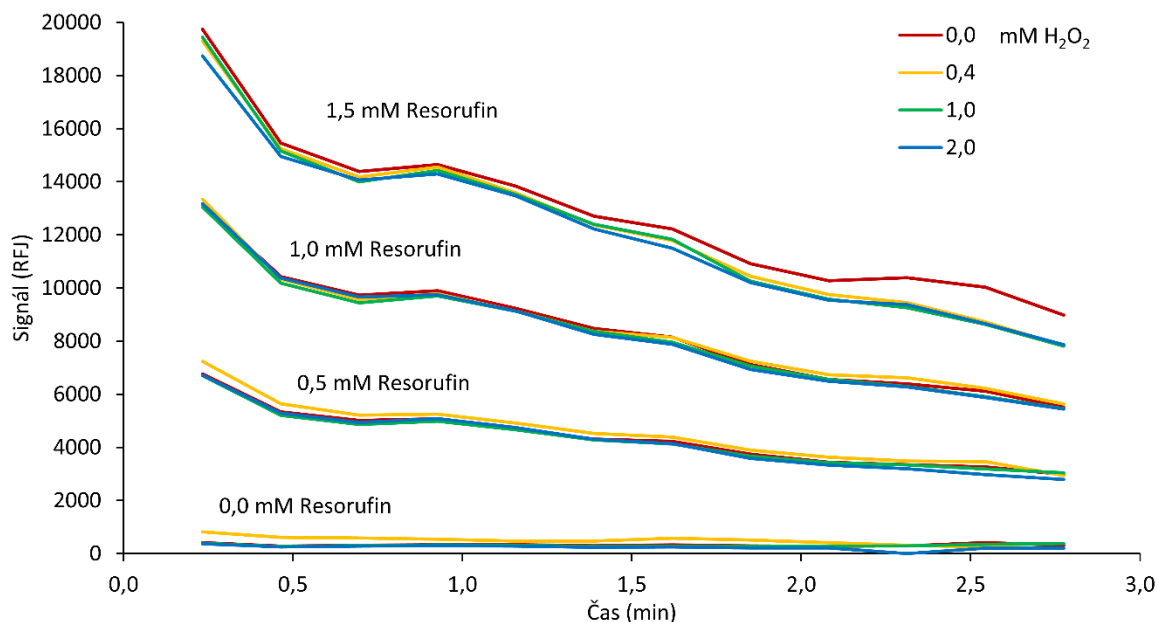
Na mikrofluidní platformě byla studována interakce resorufinu a AUR bez přítomnosti enzymu pro 6 koncentrací resorufinu (0-1,5 mM) a 6 koncentrací AUR (5-300 μM) (**Obr. 11**). Z grafů lze vyčíst, že přidavek AUR k resorufinu způsobil nárůst signálu. Pravděpodobně se jedná o samovolný rozklad molekuly AUR přispívající k falešně pozitivnímu signálu.



Obr. 11: Interakce resorufinu s AUR. Závislost relativního fluorescenčního signálu pro 6 koncentrací resorufinu v interakci se 6 různými koncentracemi AUR (odstíny oranžové, viz legenda pod grafy). Graf A zachycuje signál sesbíraný ve smyčce 1, graf B ve smyčce 3.

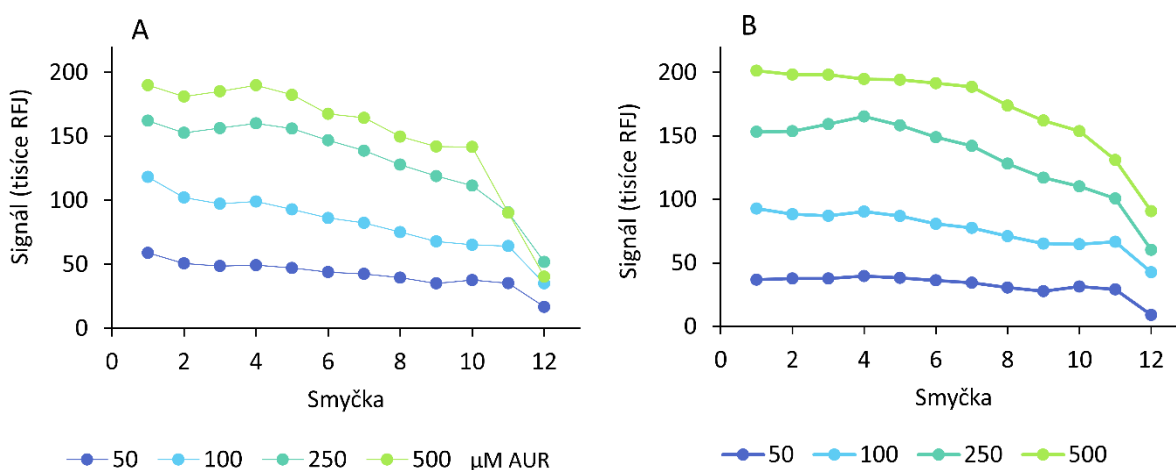
5.3.2. Interakce resorufin – H_2O_2

Interakce resorufinu a peroxidu vodíku byla experimentálně testována na mikrofluidní platformě ve dvou variantách, (i) přímá chemická interakce komerčně zakoupeného resorufinu s H_2O_2 (**Obr. 12**) a (ii) koncentračně závislá interakce enzymaticky vygenerovaného resorufinu AUR i H_2O_2 (**Obr. 13**). V případě přímé chemické interakce bylo zjištěno, že peroxid vodíku až do koncentrace 2 mM nemá výrazný vliv na fluorescenční signál resorufinu. Vliv koncentrace větší než 2 mM již bylo bezpředmětné studovat, protože v enzymové kaskádě degradace TCP jsou očekávány maximální koncentrace vyprodukovaného glycerolu v řádu stovek μM .



Obr. 12: Interakce komerčně zakoupeného resorufinu s H₂O₂ bez přítomnosti enzymu HRP. Graf ukazuje vývoj získaného signálu v čase pro čtyři koncentrace resorufinu (značeno textem v grafu) a čtyři koncentrace H₂O₂ (barevné linky, viz legenda grafu vlevo nahoře).

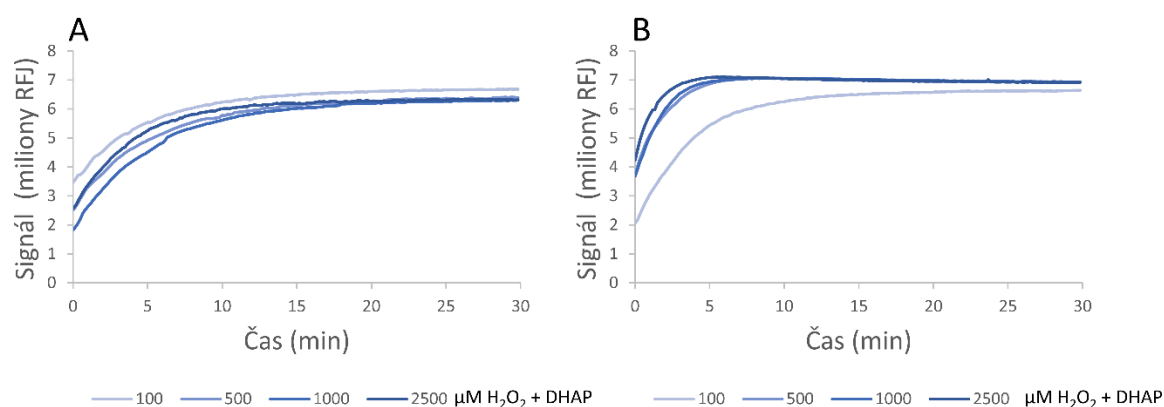
V případě enzymatické reakce HRP (tedy generaci resorufinu *in situ*) nebyl pozorován významný rozdíl mezi vlivem 0,4 mM a 2 mM peroxidu pro reakci se čtyřmi koncentracemi AUR za konstantní koncentrace enzymu HRP (1,0 U/mL) (**Obr. 13**). Tento vliv, který by byl jinak očekávaný, ukazuje nejspíš na určitý druh inhibice enzymatické reakce. Signál byl jinak relativně stabilní pro všechny koncentrace AUR. Mírně klesající tendence signálu je přičítána nedokonalému zarovnání měděného válce s optikou.



Obr. 13: Interakce *in situ* generovaného resorufinu s H₂O₂. Vývoj získaného signálu v čase pro koncentraci H₂O₂ 0,4 mM (A) a 2 mM (B). V obou grafech jsou jednotlivé koncentrace AUR značeny linkami a body podle barevného kódu v legendě pod grafy.

5.3.3. Interakce resorufin – DHAP/H₂O₂

Poslední zkoumanou interakcí byl vliv dihydroxyacetonfosfátu (DHAP) na enzymaticky generovaný resorufin. DHAP je meziproduktem předchozího enzymatického kroku detekční kaskády a je tedy molekulou, která se v reakci kumuluje. Experiment byl proveden na mikrotitrační destičce, aby se zmenšil mrtvý čas experimentu oproti mikrofluidní platformě. V designu experimentu byla respektována skutečnost, že z druhého enzymatického kroku detekční kaskády vzniká ekvimolární množství DHAP i H₂O₂. Byly testovány čtyři koncentrace DHAP/H₂O₂ (0,1 – 2,5 mM) oproti dvěma koncentracím AUR (100 a 200 μM) za konstantní koncentrace enzymu HRP (0,1 U/mL) (**Obr. 14**). Podobnost jednotlivých signálů pro všechny čtyři koncentrace DHAP/ H₂O₂ svědčí opět o určitém druhu inhibice enzymatické reakce, kterou bude potřeba v budoucnu prozkoumat.



Obr. 14: Interakce *in situ* generovaného resorufinu s DHAP/H₂O₂. Závislost fluorescenčního signálu v čase pro enzymatickou reakci HRP se 100 μM AUR (A) a 200 μM AUR (B). V obou grafech jsou průměrné signály pro jednotlivé koncentrace DHAP/ H₂O₂ značeny odstíny modré dle legendy pod grafy.

6. DISKUZE

Mikrofluidika začíná být atraktivním systémem při optimalizaci složení vícesložkových biochemických systémů, a to především díky její rychlosti a nízké spotřebě vzorků. Proto bylo nasnadě využít tuto technologii i v případě optimalizace detekční esej pro metabolickou dráhu k biodegradaci TCP. Prvním důležitým krokem je však vývoj a optimalizace metody detekce finálního produktu degradační kaskády, glycerolu. Tato detekční metoda sestava z kaskády enzymatických reakcí (**Obr. 5**) a její optimalizace je také viceprostorový problém, na který lze aplikovat princip mikrofluidního kombinatorického měření.

Komerční detekční esej od BioVision vykazovala závažné nedostatky, zejména při detekci koncentrací glycerolu přesahující 250 μM . Proto byla navržena vlastní detekční esej složená ze tří komerčně dostupných enzymů – glycerol kinasy, glycerolfosfát oxidasy a křenové peroxidasy. Efektivita reakce kriticky závisí na stechiometrickém poměru jednotlivých enzymů (Dvorak et al. 2014b). Proto byl tento druh optimalizace zvolen i pro testování vlastní detekční kaskády a to právě za využití mikrofluidiky.

Experimenty s vlastní detekční kaskádou ukázaly zlepšení v porovnání s Biovision esejí zejména co se týče zvýšeného detekčního rozsahu (z původních 250 μM na 500 až 1000 μM). I přes toto zlepšení stále docházelo k poklesu signálu v čase. Tento pokles je částečně ovlivněn nedokonalým zarovnáním optiky a detekčního válce, nicméně míra tohoto poklesu nemohla být plně vysvětlena touto technickou záležitostí. Proto byla zvážena možnost, že by finální produkt detekční kaskády, resorufin, mohl interagovat s některými meziprodukty, pravděpodobně v posledním kroku kaskády a tím docházelo k ovlivnění jeho fluorescenčních vlastností. Jako pravděpodobné meziprodukty se jevil AUR, H_2O_2 a DHAP. U žádného z těchto meziproduktů nebyl pozorován významný vliv na signál, nicméně v reakci katalyzované peroxidázou byly pozorovány určité náznaky inhibice.

V následujícím výzkumu se otevírají možnosti prostudovat tuto inhibici pomocí měření enzymatických kinetik, případně závislosti aktivity křenové peroxidasy na pH. Alternativně lze také uvažovat o získání detailnějšího pohledu na chemickou identitu produktů v reakci AUR například pomocí metody hmotnostní spektrometrie. Potenciál lze spatřovat také v jiných fluorescenčních substrátech pro peroxidasu, než je AUR. Prozkoumání těchto možností bude předmětem dalšího výzkumu na tomto projektu.

Po dokončení optimalizace detekční metody pak bude mikrofluidní platforma využita k výzkumu a inženýrství metabolické dráhy pro biologické odbourávání TCP.

7. ZÁVĚR

Tato práce se zabývá využitím mikrofluidních systémů pro optimalizaci biodegradačních metabolických drah. Navazuje tak na dlouhodobý projekt Loschmidtových laboratoří, který se zaměřuje na degradaci toxického polutantu TCP ze životního prostředí. Nejvyšší aktuální limitací v tomto projektu byla nedostatečně citlivá analytická esej pro detekci glycerolu. Hlavním cílem této práce proto bylo sestavit komponenty analytické eseje pro citlivé monitorování glycerolu v prostředí mikrofluidních kapének. Dílčími cíli pak bylo naučit se pracovat s mikrofluidním zařízením a analyzovat vícerozměrná data, dále experimentálně ověřit vliv meziproductů na výsledný produkt detekční kaskády resorufin a kalibrovat a validovat výslednou detekční metodu pro mikrofluidní využití.

Prvním krokem bylo otestovat na mikrofluidním zařízením komerčně dostupnou esej od Biovision pro detekci glycerolu. Kvůli nestabilitě signálu této eseje jsem přistoupil k testování vlastní detekční eseje složené ze tří komerčně dostupných enzymů – glycerol kinasy, glycerol-fosfát oxidasy a křenové peroxidasy. Ačkoli tato esej rozšířila maximální detekovatelnou koncentraci glycerolu na zhruba dvou až čtyřnásobek oproti eseji od Biovision, stále byla pozorována degradace signálu v čase. Následujícím krokem tedy byl pokus o zjištění, jestli by se dal tento pokles signálu vysvětlit interakcí produktu detekční kaskády, resorufinu, s některým z meziproductů reakce (H_2O_2 , DHAP či AUR) Ukázalo se, že substrát AUR vliv má, ovšem signál jen mírně zvyšuje svým pravděpodobným rozkladem. U posledního enzymatického kroku peroxidasy byl nicméně pozorován určitý druh inhibice enzymatické reakce, která pravděpodobně hraje určitou roli v pozorované nestabilitě signálu. Odhalení příčiny nestability signálu tedy zůstává předmětem dalšího výzkumu.

Touto prací se celkově snažím poukázat na výhody využití mikrofluidiky k optimalizačním experimentům vícesložkových systémů, jako jsou např. enzymatické kaskády. Konvenčními metodami by nebylo možné práci stihnout za tak krátký časový úsek a zároveň by bylo třeba využít několikanásobně větší množství vzorků. Věřím, že další rozvoj mikrofluidních metod přinese její systematictější využití v metabolickém inženýrství ať už pro environmentální aplikace či pro ostatní biotechnologie.

POUŽITÁ LITERATURA A ZDROJE

Anon., 2018. Terminology of bioanalytical methods (IUPAC Recommendations 2018). *Chemistry International* [online]. **40**(3), 34–34. ISSN 1365-2192. Dostupné z: doi:10.1515/ci-2018-0319

Anon., [b.r.]. *Othmar Zeidler | German chemist | Britannica* [online] [vid. 2021a-11-30]. Dostupné z: <https://www.britannica.com/biography/Othmar-Zeidler>

Anon., [b.r.]. The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1948. *NobelPrize.org* [online] [vid. 2021b-11-30]. Dostupné z: <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/1948/muller/biographical/>

BAILEY, James E., 1991. Toward a Science of Metabolic Engineering. *Science* [online]. **252**(5013), 1668–1675. Dostupné z: doi:10.1126/science.2047876

BANNOCK, James H., Siva H. KRISHNADASAN, Martin HEENEY a John C. de MELLO, 2014. A gentle introduction to the noble art of flow chemistry. *Materials Horizons* [online]. **1**(4), 373–378. ISSN 2051-6355. Dostupné z: doi:10.1039/C4MH00054D

BARET, Jean-Christophe, Oliver J. MILLER, Valerie TALY, Michaël RYCKELYNCK, Abdeslam EL-HARRAK, Lucas FRENZ, Christian RICK, Michael L. SAMUELS, J. Brian HUTCHISON, Jeremy J. AGRESTI, Darren R. LINK, David A. WEITZ a Andrew D. GRIFFITHS, 2009. Fluorescence-activated droplet sorting (FADS): efficient microfluidic cell sorting based on enzymatic activity. *Lab on a Chip* [online]. **9**(13), 1850–1858. ISSN 1473-0189. Dostupné z: doi:10.1039/B902504A

BJORK, Sara M a Haakan N JOENSSON, 2019. Microfluidics for cell factory and bioprocess development. *Current Opinion in Biotechnology* [online]. **55**, Analytical Biotechnology, 95–102. ISSN 0958-1669. Dostupné z: doi:10.1016/j.copbio.2018.08.011

BORNSCHEUER, U. T., G. W. HUISMAN, R. J. KAZLAUSKAS, S. LUTZ, J. C. MOORE a K. ROBINS, 2012. Engineering the third wave of biocatalysis. *Nature* [online]. **485**(7397), 185–194. ISSN 1476-4687. Dostupné z: doi:10.1038/nature11117

BOSMA, Tjibbe, Edwin KRUIZINGA, Erik J. DE BRUIN, Gerrit J. POELARENDS a Dick B. JANSSEN, 1999. Utilization of Trihalogenated Propanes by *Agrobacterium radiobacter* AD1 through Heterologous Expression of the Haloalkane Dehalogenase from *Rhodococcus* sp. Strain m15-3. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. **65**(10), 4575–4581. Dostupné z: doi:10.1128/AEM.65.10.4575-4581.1999

CARSON, Rachel, 1965. *Silent Spring*. London: Penguin Books in association with Hamish Hamilton. ISBN 978-0-14-118494-4.

COURTOIS, Fabienne, Luis F. OLGUIN, Graeme WHYTE, Ashleigh B. THEBERGE, Wilhelm T. S. HUCK, Florian HOLLFELDER a Chris ABELL, 2009. Controlling the Retention of Small Molecules in Emulsion Microdroplets for Use in Cell-Based Assays. *Analytical Chemistry* [online]. **81**(8), 3008–3016. ISSN 0003-2700. Dostupné z: doi:10.1021/ac802658n

ČR, MŽP, 2008. *Stockholmská úmluva o persistentních organických polutantech (2001)* [online] [vid. 2021-11-30]. Dostupné z: https://www.mzp.cz/cz/stockholmska_umluva_polutanty

DE, Anil K., 2003. *Environmental Chemistry*. B.m.: New Age International. ISBN 978-81-224-1488-2.

DVORAK, Pavel, Sarka BIDMANOVA, Jiri DAMBORSKY a Zbynek PROKOP, 2014a. Immobilized Synthetic Pathway for Biodegradation of Toxic Recalcitrant Pollutant 1,2,3-Trichloropropane. *Environmental Science & Technology* [online]. **48**(12), 6859–6866. ISSN 0013-936X. Dostupné z: doi:10.1021/es500396r

DVORAK, Pavel, Nagendra P. KURUMBANG, Jaroslav BENDL, Jan BREZOVSKY, Zbynek PROKOP a Jiri DAMBORSKY, 2014b. Maximizing the Efficiency of Multienzyme Process by Stoichiometry Optimization. *ChemBioChem* [online]. **15**(13), 1891–1895. ISSN 1439-7633. Dostupné z: doi:10.1002/cbic.201402265

GUO, Weihua, Jiayuan SHENG a Xueyang FENG, 2017. Mini-review: In vitro Metabolic Engineering for Biomanufacturing of High-value Products. *Computational and Structural Biotechnology Journal* [online]. **15**, 161–167. ISSN 2001-0370. Dostupné z: doi:10.1016/j.csbj.2017.01.006

HAEBERLE, Stefan a Roland ZENGERLE, 2007. Microfluidic platforms for lab-on-a-chip applications. *Lab on a Chip* [online]. **7**(9), 1094–1110. ISSN 1473-0189. Dostupné z: doi:10.1039/B706364B

KODÍČEK, M., O. VALENTOVÁ a HYNEK, R., 2018. *Biochemie, chemický pohled na biologický svět*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická.

KURUMBANG, Nagendra Prasad, Pavel DVORAK, Jaroslav BENDL, Jan BREZOVSKY, Zbynek PROKOP a Jiri DAMBORSKY, 2014. Computer-Assisted Engineering of the Synthetic Pathway for Biodegradation of a Toxic Persistent Pollutant. *ACS Synthetic Biology* [online]. **3**(3), 172–181. Dostupné z: doi:10.1021/sb400147n

MARCHESCHI, Ryan J., Luisa S. GRONENBERG a James C. LIAO, 2013. Protein engineering for metabolic engineering: current and next-generation tools. *Biotechnology Journal* [online]. **8**(5), 545–555. ISSN 1860-7314. Dostupné z: doi:10.1002/biot.201200371

NEUN, Stefanie, Paul J. ZUREK, Tomasz S. KAMINSKI a Florian HOLLFELDER, 2020. Chapter Thirteen - Ultrahigh throughput screening for enzyme function in droplets. In: Dan S. TAWFIK, ed. *Methods in Enzymology* [online]. B.m.: Academic Press, Enzyme Engineering

and Evolution: General Methods, s. 317–343 [vid. 2021-11-30]. Dostupné z: doi:10.1016/bs.mie.2020.06.002

NIELSEN, Jens a Jay D. KEASLING, 2016. Engineering Cellular Metabolism. *Cell* [online]. **164**(6), 1185–1197. ISSN 0092-8674. Dostupné z: doi:10.1016/j.cell.2016.02.004

QIAO, Yuxin, Ran HU, Dongwei CHEN, Li WANG, Zhiyi WANG, Haiyan YU, Ye FU, Chunli LI, Zhiyang DONG, Yun-Xuan WENG a Wenbin DU, 2022. Fluorescence-activated droplet sorting of PET degrading microorganisms. *Journal of Hazardous Materials* [online]. **424**, 127417. ISSN 0304-3894. Dostupné z: doi:10.1016/j.jhazmat.2021.127417

REETZ, Manfred T., 2013. Biocatalysis in Organic Chemistry and Biotechnology: Past, Present, and Future. *Journal of the American Chemical Society* [online]. **135**(34), 12480–12496. ISSN 0002-7863. Dostupné z: doi:10.1021/ja405051f

ROCKSTRÖM, Johan, Will STEFFEN, Kevin NOONE, Åsa PERSSON, F. Stuart CHAPIN, Eric F. LAMBIN, Timothy M. LENTON, Marten SCHEFFER, Carl FOLKE, Hans Joachim SCHELLNHUBER, Björn NYKVIST, Cynthia A. DE WIT, Terry HUGHES, Sander VAN DER LEEUW, Henning RODHE, Sverker SÖRLIN, Peter K. SNYDER, Robert COSTANZA, Uno SVEDIN, Malin FALKENMARK, Louise KARLBERG, Robert W. CORELL, Victoria J. FABRY, James HANSEN, Brian WALKER, Diana LIVERMAN, Katherine RICHARDSON, Paul CRUTZEN a Jonathan A. FOLEY, 2009. A safe operating space for humanity. *Nature* [online]. **461**(7263), 472–475. ISSN 1476-4687. Dostupné z: doi:10.1038/461472a

SEEMANN, Ralf, Martin BRINKMANN, Thomas PFOHL a Stephan HERMINGHAUS, 2011. Droplet based microfluidics. *Reports on Progress in Physics* [online]. **75**(1), 016601. ISSN 0034-4885. Dostupné z: doi:10.1088/0034-4885/75/1/016601

SHIH, Steve C. C., Garima GOYAL, Peter W. KIM, Nicolas KOUTSOUBELIS, Jay D. KEASLING, Paul D. ADAMS, Nathan J. HILLSON a Anup K. SINGH, 2015. A Versatile Microfluidic Device for Automating Synthetic Biology. *ACS Synthetic Biology* [online]. **4**(10), 1151–1164. Dostupné z: doi:10.1021/acssynbio.5b00062

STEPHANOPOULOS, Gregory, 2012. Synthetic Biology and Metabolic Engineering. *ACS Synthetic Biology* [online]. **1**(11), 514–525. Dostupné z: doi:10.1021/sb300094q

STRUTT, John William, 1879. VI. On the capillary phenomena of jets. *Proceedings of the Royal Society of London* [online]. **29**(196–199), 71–97. Dostupné z: doi:10.1098/rspl.1879.0015

TRACY, Bryan P, Stefan M GAIDA a Eleftherios T PAPOUTSAKIS, 2010. Flow cytometry for bacteria: enabling metabolic engineering, synthetic biology and the elucidation of complex phenotypes. *Current Opinion in Biotechnology* [online]. **21**(1), Analytical Biotechnology, 85–99. ISSN 0958-1669. Dostupné z: doi:10.1016/j.copbio.2010.02.006

VODRÁŽKA, Zdeněk, Pavel RAUCH a Jan KÁŠ, 1991. *Enzymologie*. 2. vyd. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická. ISBN 80-7080-124-7.

WHITESIDES, George M., 2006. The origins and the future of microfluidics. *Nature* [online]. **442**(7101), 368–373. ISSN 1476-4687. Dostupné z: doi:10.1038/nature05058

WMO, Taalas, Guterres PETERI, a ANTÓNIO, 2021. *State of the global climate 2020* [online] [vid. 2021-11-30]. ISBN 978-92-63-11264-4. Dostupné z: https://library.wmo.int/index.php?lvl=notice_display&id=21880

ZHU, Ying a Qun FANG, 2013. Analytical detection techniques for droplet microfluidics—A review. *Analytica Chimica Acta* [online]. **787**, 24–35. ISSN 0003-2670. Dostupné z: doi:10.1016/j.aca.2013.04.064