

DISS. ETH NO. 29119

High-throughput droplet sorting for enzyme evolution

A thesis submitted to attain the degree of
DOCTOR OF SCIENCES of ETH ZURICH
(Dr. sc. ETH Zurich)

presented by

ANKIT JAIN

MSc. in Micro- and Nanosystems, ETH Zurich

born on 27.08.1991

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Andrew deMello

Prof. Dr. André R. Studart

Dr. Stavros Stavrakis

2023

Abstract

The past few decades have seen a dramatic increase in the use of biocatalysts in commercial chemical processes, shifting the emphasis from energy-intensive traditional chemistry to sustainable chemistry. Unsurprisingly, significant effort has gone into modifying and improving the characteristics of naturally occurring enzymes for use in specific biotechnological applications. Current enzyme engineering techniques, such as directed evolution, require the production and testing of large libraries of mutations to identify commercially valuable variants. Unfortunately, traditional screening approaches are unable to screen such large mutagenesis libraries in a robust and timely manner. Droplet-based microfluidic systems are able to produce, process and sort picoliter droplets at kilohertz rates and have emerged as a potentially powerful and high-throughput tool for library screening. However, the reliance of these screening approaches on inline fluorescence detection either restricts their use to a limited number of natural substrates and enzyme classes or involves the use of surrogate substrates, which bias the enzyme optimization process.

This thesis describes both the development of novel enzyme screening assays and the implementation of existing assays in droplet-based microfluidic platforms, with the aim of eliminating the need to use surrogate substrates from certain enzyme classes. In addition, this work expands the existing droplet-based microfluidic toolbox by establishing a new and powerful droplet absorbance detection and sorting methodology, which has particular utility in the screening of natural substrates. To this end, three different assays and implementations of microfluidic technology are presented herein.

First, a universal NADH-based fluorescence assay focused on evolving a poorly-performing alcohol dehydrogenase from *Sphingomonas species A1* (*SpsADH*) was established. A library of 50,000 variants was screened against the non-native substrate L-gulonate using

fluorescence-activated droplet sorting (FADS). Significantly, we discovered an enzyme variant with a 2.6-fold increase in catalytic efficiency towards the non-native substrate after only one round of mutation.

Second, a miniaturized and ultra-sensitive halide detection assay was used to improve the performance of an ancestral haloalkane dehalogenase enzyme. A droplet-based microfluidic platform and miniaturized assay was used to screen a large library against three natural substrates (1,2-dibromoethane, 1-bromohexane and bromocyclohexane) to select the most active mutant in each case.

Finally, a novel absorbance-activated droplet sorting platform was developed for library screening. Direct absorbance measurements from picoliter-size droplets was achieved using a lithographic mask and refractive index matched fluid phases. Such an approach allowed the sensitive interrogation and sorting of droplets at kHz rates. The efficiency of the sorter was showcased through the rapid screening of a 10^5 -member aldehyde dehydrogenase library with approximately 2x coverage, successfully obtaining six mutant variants with improved enzymatic properties, with the most successful variant exhibiting a 51% improvement in catalytic efficiency towards D-glyceraldehyde.

Zusammenfassung

In den letzten Jahrzehnten hat der Einsatz von Biokatalysatoren in kommerziellen chemischen Prozessen drastisch zugenommen, wobei sich der Schwerpunkt von energieintensiver klassischer Chemie auf nachhaltigere Chemie verlagert hat. Daher ist es nicht überraschend, dass erhebliche Anstrengungen unternommen wurden, um Eigenschaften natürlich vorkommender Enzyme für den Einsatz in bestimmten biotechnologischen Anwendungen zu verändern und zu verbessern. Die derzeitigen Enzym-Engineering-Techniken, wie z. B. die gerichtete Evolution, erfordern die Herstellung und das Testen großer Bibliotheken von Enzym-Mutanten, um kommerziell wertvolle Varianten zu identifizieren. Leider sind herkömmliche Screening-Ansätze nicht in der Lage, solche großen Bibliotheken verlässlich und schnell zu untersuchen. Mikrofluidische Systeme auf Tröpfchenbasis sind in der Lage, Tröpfchen in Pikolitergrösse mit kHz-Raten zu erzeugen, zu verarbeiten und zu sortieren, und haben sich als potenziell leistungsfähiges und durchsatzstarkes Instrument für das Screening von Bibliotheken erwiesen. Da sich diese Screening-Ansätze jedoch auf die Inline-Fluoreszenzdetektion stützen, ist ihr Einsatz entweder auf eine begrenzte Anzahl natürlicher Substrate und Enzymklassen beschränkt oder es müssen Ersatzsubstrate verwendet werden, die den Prozess der Enzymoptimierung beeinträchtigen.

In dieser Arbeit wird sowohl die Entwicklung neuartiger Enzym-Screening-Assays als auch die Implementierung bestehender Assays in tropfenbasierte mikrofluidische Plattformen beschrieben, die es überflüssig machen sollen Ersatzsubstrate von bestimmten Enzymklassen nutzen zu müssen. Darüber hinaus erweitert die vorliegende Arbeit die bestehenden Tröpfchenbasierten mikrofluidischen Methoden durch die Etablierung einer neuen und leistungsstarken Tröpfchen-Absorptionsdetektions- und Sortiermethodik, die insbesondere für das Screening natürlicher Substrate von Nutzen ist. Zu diesem Zweck

werden hier drei verschiedene Assays und Implementierungen von Mikrofluidik-Technologie vorgestellt.

Zunächst wurde ein universeller NADH-basierter Fluoreszenztest entwickelt, der sich auf die Optimierung einer ineffizienten Alkoholdehydrogenase aus *Sphingomonas Species A1* (SpsADH) konzentriert. Eine Bibliothek mit 50.000 Varianten wurde mit Hilfe der fluoreszenzaktivierten Tröpfchensortierung gegen das nicht-native Substrat L-Gulononat getestet. Herausragend war die Entdeckung einer Enzymvariante mit einer 2.6-fach gesteigerten katalytischen Effizienz gegenüber dem nicht-nativen Substrat nach nur einer Mutationsrunde.

Zweitens wurde ein miniaturisierter und hochempfindlicher Halogenid-Detektionsassay verwendet, um die Umsatzrate eines ursprünglichen Halogenalkan-Dehalogenase-Enzyms zu erhöhen. Eine auf Tröpfchen basierende mikrofluidische Plattform und ein miniaturisierter Assay wurde verwendet, um eine große Bibliothek gegen drei natürliche Substrate (1,2-Dibromethan, 1-Bromhexan und Bromocyclohexan) zu screenen und die jeweils aktivste Mutante auszuwählen.

Schließlich wurde eine neuartige, durch Absorption aktivierte Tröpfchensortierplattform entwickelt, um Bibliotheken zu screenen. Mithilfe einer lithografischen Maske und an den Brechungsindex angepasster Flüssigkeitsphasen wurden direkte Absorptionsmessungen von Tröpfchen in Pikolitergröße durchgeführt. Ein solcher Ansatz ermöglichte das empfindliche Auslesen und die Sortierung von Tröpfchen mit kHz-Raten. Die Effizienz des Sortierers wurde durch das schnelle Screening einer Bibliothek mit 10^5 verschiedenen Aldehyd-Dehydrogenase-Enzymen zur Schau gestellt, wobei jedes Enzym in etwa zweifacher Ausführung vorlag. Dabei wurden sechs Mutanten mit verbesserten enzymatischen Eigenschaften gefunden, wobei die beste Mutante bezüglich D-Glyceraldehyd eine um 51 % gesteigerte katalytische Effizienz aufwies.