

Openbaar eindrapport “Back to Mono”

Gegevens project

Referentienummer:	TBBE218001
Projecttitel:	Back to Mono
Penvoerder en medeaanvragers:	Dutch DNA Biotech B.V. (Penvoerder) Universiteit Leiden
Projectperiode:	01-01-2019 t/m 30-09-2020
Publicatiedatum:	01-01-2022

Het project is uitgevoerd met subsidie van het Ministerie van Economische Zaken, Nationale regelingen EZ-subsidies, Topsector Energie uitgevoerd door Rijksdienst voor Ondernemend Nederland.

DUTCH DNA

a heartbeat ahead



**Universiteit
Leiden**

Uitgangspunten en doelstelling van het project en de samenwerkende partijen

De groeiende hoeveelheid plastic afval vormt een steeds grotere belasting voor terrestrische en aquatische ecosystemen. Stort, pyrolyse, verbranding of chemische en mechanische recycling kunnen de cirkel van gebruik-verwerking-hergebruik nog niet sluitend krijgen. Back to Mono (B2M) zet de eerste stappen op een weg die leidt tot duurzame industriële recycling van plastics. Door plastics met behulp van schimmel-enzymen om te zetten in eindeloos herbruikbare monomeren, wordt een vrijwel volledig circulair gebruik van plastics mogelijk.

De uiteindelijke doelstelling is om plastics op industriële schaal met behulp van schimmelenzymen in monomeren om te zetten – en gebruik te maken van de selectiviteit van enzymen. Het doel van dit project is het leveren van een Proof of Principle voor de omzetting van een aantal plastics tot monomeren/granulaat door enzymen uit en/of geproduceerd door schimmels.

Een door Leiden Universiteit ontwikkelde *Aspergillus niger* schimmelstammen-collectie van regulatormutanten en een aantal enzym-overproducerende stammen van Dutch DNA Biotech (DDNA) zijn gebruikt voor kweekexperimenten en het opzetten van een screeningmethode. Verrijkingsexperimenten zijn ingezet met de veelbelovende schimmel *Aureobasidium* van DDNA. Door de expertise van beide partners op het gebied van genomics, transcriptomics en proteomics zijn plastic-afbrekende enzymen en regulator genen geïdentificeerd. Verder droeg Leiden Universiteit met LC-MS/MS analyses bij aan dit onderzoek. DDNA gebruikte hun speciaal ontwikkelde *A. niger* productie-gastheer voor het maken van veelbelovende productiestammen die hoge hoeveelheden plastic-afbrekende enzymen kunnen produceren.

Resultaten

Op basis van beschikbare literatuur zijn een tweetal schimmelsoorten geselecteerd waarvan bekend is dat zij plastics omzetten met enzymen. Dit zijn *Aspergillus niger* en *Aureobasidium* sp. Het betreft enzymen die actief zijn op biopolymeren die chemisch verwant zijn aan plastics. Er is ook gebruik gemaakt van schimmelmutanten die geen inductor nodig hebben om bepaalde klassen enzymen tot expressie te brengen.

Met de geselecteerde schimmels zijn kweekexperimenten opgezet met de vier gekozen plastics en hun monomeren als substraat en ook verschillende inducerende moleculen. Als kunststofsubstraten werden polymelkzuur (PLA), polycaprolacton (PCL), polyurethaan (PUR) en polyamide6 (PA6) geselecteerd.

Functionele screeningsmethoden werden ontwikkeld voor zowel agarplaten als microtiterplaatkweekjes met behulp van de kunststof films, schuim, pellets, korrels, emulsies of met behulp van modelsubstraten.

Afbraak van plastics

Onoplosbare kunststoffen zijn niet erg geschikt voor het screenen van grote stammencollecties of veel condities. Impranil is een dispersie van PUR in water en kan gemakkelijk worden gebruikt voor het bereiden van agarplaten voor groei- en activiteits-screenings. Enzymactiviteit is direct zichtbaar door een duidelijke halo rond de kolonie. Alle geteste *A. niger* stammen vertoonden opheldering (clearance) op Impranil-platen (Fig. 1). Bij geen van de mutanten werd de clearance verder geïnduceerd door het toevoegen van mogelijk inducerende verbindingen.

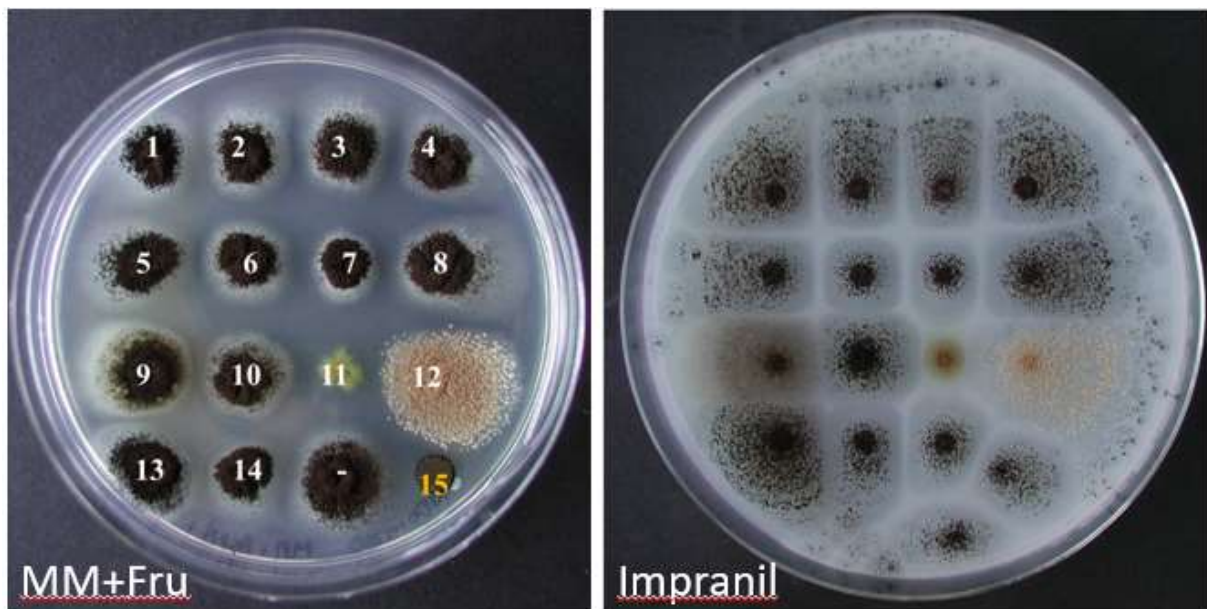


Fig. 1. Groei van *A. niger* stammen op media met Impranil (rechts) en groeiconrole-medium met fructose (links).

Aureobasidium sp.: een nieuwe bron van plastic-afbrekende enzymen

Aureobasidium is een zogenaamde zwarte gist, die een brede biotechnologische toepassing kent en tolerant is tegen diverse extreme groeiomstandigheden. In tegenstelling tot de meeste andere ascomycete schimmels produceert *Aureobasidium* een zeer divers spectrum van mogelijk plastic-afbrekende enzymactiviteiten, in het bijzonder laccases, lipases en esterase. Daarom is *Aureobasidium* ook voor ons onderzoek geselecteerd.

Over het algemeen is de expressie van lipases en esterases gereguleerd door de aanwezigheid van inducerende substraten in het kweekmedium. Daarnaast is ook van Tween (een vetzuur gebruikt als surfactant) bekend dat het dergelijke enzymactiviteiten induceert.

Een specifieke *Aureobasidium* stam is gebruikt voor ons onderzoek. Naast de wildtype stam zijn ook twee witte (melanine deficiënte) mutanten gebruikt, die met behulp van genetische modificatie zijn gegenereerd. Als eerste stap in ons onderzoek zijn de twee witte mutanten in een verrijkingsexperiment gebruikt, gericht op betere afbraak van een specifiek PUR model substraat, Impranil.

De wildtype stam kan alleen in de aanwezigheid van fructose en Tween Impranil afbreken (Fig. 2), maar na een aantal rondes van verrijking in de aanwezigheid van Impranil, zijn mutantstammen geïsoleerd die ook in de afwezigheid van fructose en Tween op Impranil kunnen groeien (Fig. 3).

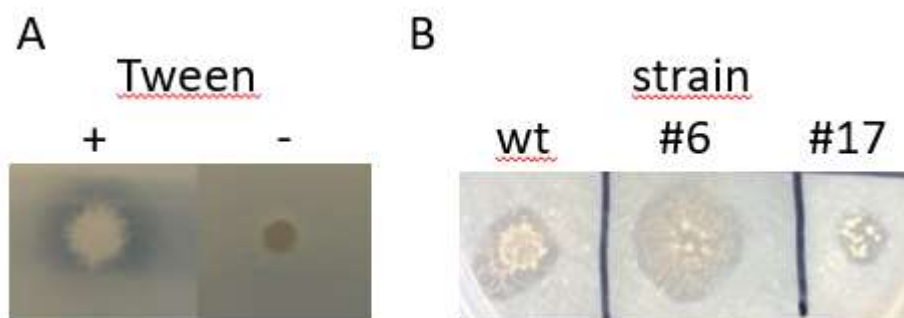


Fig. 2. Groei van *Aureobasidium* op Impranil. In de aanwezigheid van Tween wordt een helder halo gevormd.

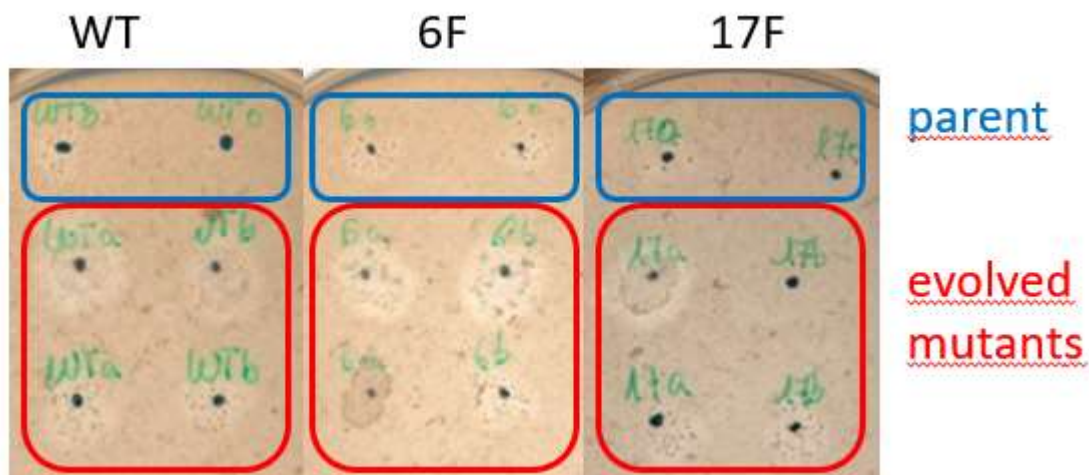


Fig. 3. Groei van de lab-evolutie stammen op agarplaten met Impranil. De mutanten vertonen groei op Impranil (opheldering van de plaat) in afwezigheid van fructose of Tween.

Genome mining

Voor een nadere moleculaire analyse is van *Aureobasidium* G5 (wildtype), de twee witte mutanten en de twee daaruit voortgekomen Impranil-geselecteerde stammen de genomesequentie bepaald. Op basis van de genom analyse is een geassembleerd genoom van ongeveer 28 Mbp verkregen, met daarop ongeveer 10.000 genen. *Aureobasidium* G5, blijkt een nieuw species te zijn binnen de groep bekende

Aureobasidium pullulans species. De twee witte mutanten blijken, zoals verwacht, een mutatie in het voor melanine synthese verantwoordelijke polyketide synthase gen *pksA* te bevatten. Ook de mutanten geselecteerd op Impranil bevatten een aantal unieke mutaties. Het verband tussen de mutaties en het Impranil groei-fenotype is echter (nog) niet eenduidig te verklaren op basis van deze mutaties.

Transcriptoom en proteoom analyse

Om geschikte condities voor de inductie van plastic afbrekende enzymen te ontdekken, zijn kweekexperimenten met Impranil, al of niet in de aanwezigheid van Tween, uitgevoerd met de verschillende *Aureobasidium* mutanten. Naast analyse van de uitgescheiden enzymen (activiteiten assays, proteoom analyse) is er met de verschillende monsters ook transcriptoom analyse uitgevoerd, om naast de eiwitten ook de genexpressie onder inducerende condities nader te analyseren.

De transcriptoom analyse heeft geleid tot de identificatie van ongeveer 1000 genen die in de Impranil mutanten ten opzichte van de ouderstam differentiële expressie lieten zien in één of meer van de gebruikte groeicondities. Ongeveer 30 van deze genen coderen voor eiwitten die behoren tot één van de enzymklassen die mogelijk verantwoordelijk zijn voor de afbraak van plastics (laccase, oxidase, esterase, amidase, protease).

Een aantal van deze genen komt specifiek hoger tot expressie in Impranil condities (Tabel 1). Met name in Impranil mutant 6F komen een aantal genen onder alle groeicondities sterker tot expressie, ook zonder Tween of Impranil. Dit betreft een amidase, cutinase, laccase en esterase gen.

Ook uit de proteoom analyse komen een aantal potentieel interessante enzymen naar voren. Eén daarvan betreft een laccase dat ook uit de transcriptoom analyse naar voren kwam. Daarnaast nog een lipase en een protease.

Uit de transcriptoom analyse zijn ook een aantal genen naar voren gekomen die verlaagd tot expressie komen onder Impranil en/of Tween condities in de Impranil geselecteerde mutanten. De enzymen die door deze genen worden gecodeerd spelen in de mutanten stammen waar ze lager tot expressie komen wellicht een rol in de resistentie tegen Impranil.

Samenvattend kan worden geconcludeerd dat ons onderzoek aan *Aureobasidium* in relatie tot diens plastic-afbrekende activiteiten, heeft geleid tot de bevestiging dat deze schimmel in staat is tot afbraak van de PUR dispersie Impranil. De in het onderzoek verkregen mutanten hebben geleid tot identificatie van een aantal nieuwe kandidaat plastic-afbrekende enzymen en hun corresponderende genen. Daarnaast zijn ook genen geïdentificeerd die wellicht een rol spelen bij de resistentie van *Aureobasidium* tegen mogelijk toxische plastic afbraakproducten. Nader onderzoek van de geïdentificeerde enzymen voor feitelijke toepassing en voor de afbraak van andere plastics is de logische volgende stap.

Tabel 1. De proteoom data worden weergegeven door peptidetellingen van MS-MS-analyse, terwijl de transcriptoom data worden weergegeven door fold change (log-waarden) vergeleken met de ouderstam in fructosemedium (groen voor hogere en rood voor lagere waarden dan de ouder). Gemiddelde genexpressieniveaus (in blauw) worden aangegeven als log-waarden van genormaliseerde read counts.

Proteome												Transcriptome															
Parent						6F						17F						Enzyme class	ID								
Fru	Tween	I+T	Imp	I+T	Imp	Fru	Tween	I+T	Imp	I+T	Imp	Fru	Tween	I+T	Imp	I+T	Imp										
1a	2a	3a	4a	5a	6a	7a	8a	9a	10a	11a	12a	1	2	3	4	5	6			7	8	9	10	11	12		
23	41	17	30	74	46	54	50	41	37	31	50	AmG5_009828	Amidase	AmG5_009828	0	-0.44	-0.46	-0.32	2.69	2.31	2.29	1.04	1.58	-0.19	0.19	-0.08	6.07
												AmG5_002718	Cutinase	AmG5_002718	0	-1.82	-0.21	-0.17	2.58	1.43	2	0.31	1.02	-0.16	-0.15	-0.43	1.13
												AmG5_003581	Esterase	AmG5_003581	0	0.62	0.13	1.02	2.49	2.93	2.84	2.42	1.68	1.2	1.2	0.43	1.18
9	41	17	30	74	46	54	50	41	37	31	50	AmG5_008147	Laccase	AmG5_008147	0	-0.19	-0.24	0.06	2.08	2.06	2.24	1.74	1.51	0.17	0.19	-0.29	13.44
												AmG5_007580	AB-hydrolase	AmG5_007580	0	-0.48	-0.22	0.11	1.7	1.2	0.98	0.57	1.2	-0.47	0.29	0.05	3.49
												AmG5_002169	Protease	AmG5_002169	0	-0.65	-0.4	-0.02	1.65	0.61	0.11	-0.4	1.63	-0.65	-0.19	-0.04	3.89
												AmG5_005084	AB-hydrolase	AmG5_005084	0	-0.05	-0.76	-0.29	1.43	0.67	0.31	-0.42	0.35	-0.18	-0.44	-0.15	3.00
												AmG5_003015	Lipase	AmG5_003015	0	-1.8	-0.83	-0.82	1.36	0.07	0.04	-0.39	1.08	-1.78	-0.52	-0.85	4.17
												AmG5_004688	Protease	AmG5_004688	0	-0.26	-0.14	0.31	1.26	0.4	0.25	0.51	1.29	-0.32	0.4	0.81	5.46
												AmG5_001770	Protease	AmG5_001770	0	-0.18	-0.31	0.64	1.17	1.28	0.7	1.3	1.4	-0.1	0.23	0.04	3.42
												AmG5_009315	Laccase	AmG5_009315	0	-1.55	-1.29	-0.38	1.08	-1.14	-1.06	-0.33	1.31	-0.74	-0.58	0.17	4.13
												AmG5_003848	Alcohol oxidase	AmG5_003848	0	-2.05	-1.61	-1.12	1.03	-1.65	-0.73	-1.82	2.74	-2.68	-0.42	-0.53	2.54
												AmG5_000228	Cellobiose dehydrog	AmG5_000228	0	0.43	0.9	0.34	1.02	1.49	1.87	1.96	0.83	1.74	1.09	0.14	9.95
												AmG5_003210	Laccase	AmG5_003210	0	-0.15	0.06	1.61	1.02	0.93	0.73	1.41	1.29	0.62	0.74	0.88	3.65
												AmG5_006378	AB-hydrolase	AmG5_006378	0	-0.4	-0.17	0.38	0.98	0.07	0.31	0.58	1.33	-0.15	0.29	0.62	8.54
												AmG5_003052	AB-hydrolase	AmG5_003052	0	-0.82	0.04	-0.41	0.85	-0.41	0.45	0.14	0.9	0.3	0.8	0.06	2.30
												AmG5_000703	Protease	AmG5_000703	0	0.31	0.69	0.11	0.82	1.41	1.69	0.96	0.81	0.68	0.9	0.25	6.49
												AmG5_002578	Protease	AmG5_002578	0	-1.87	-1.05	-0.47	0.57	-0.31	-0.37	-0.4	0.48	-1	-0.84	-1.82	2.41
												AmG5_002987	Protease	AmG5_002987	0	-0.6	-0.59	-0.08	0.49	0.17	0.04	0.29	0.44	-0.45	-0.43	-0.28	7.86
												AmG5_003503	Protease	AmG5_003503	0	-0.81	-0.76	1.89	0.07	-0.25	-0.38	1.61	0.7	-0.35	-0.81	0.24	4.43
												AmG5_006491	Protease	AmG5_006491	0	-0.27	-0.35	-0.61	-0.02	-0.4	-0.47	-1.09	-0.88	-1.11	-0.88	-1.11	3.71
												AmG5_005537	AA7 oxidase	AmG5_005537	0	-2.83	-8.82	-0.4	-0.08	-1.44	-1.89	0.03	1.11	-1.64	-2.75	-1.67	1.54
												AmG5_000133	Protease	AmG5_000133	0	0.97	0.53	0.18	-0.18	1.07	1.11	0.74	0.2	0.56	0.81	-0.3	2.41
												AmG5_008291	AB-hydrolase	AmG5_008291	0	0.18	0.37	-0.28	-0.47	-0.65	-0.36	-1.85	-0.4	-0.42	-0.45	0.64	5.00
												AmG5_009004	AB-hydrolase	AmG5_009004	0	0.4	-0.28	-0.13	-1.1	-0.4	-1.05	-0.88	-1.13	0	-0.41	-0.47	8.00
												AmG5_003840	AB-hydrolase	AmG5_003840	0	0.64	0.17	-1.04	-1.13	-0.37	-0.96	-1.87	-2.13	-0.14	-1.87	-0.35	1.20
												AmG5_002761	Alcohol oxidase	AmG5_002761	0	0.98	0.37	-0.45	-1.53	-1.28	-1.13	-1.88	-1.8	0.31	-0.57	0.48	6.70
												AmG5_005569	Peroxidase	AmG5_005569	0	-0.71	-1.25	-0.64	-2.02	-2.74	-2.35	-2.84	-1.8	-1.8	-1.89	-1.85	3.71
												AmG5_003263	AB-hydrolase	AmG5_003263	0	0.54	0.27	-0.54	-2.38	-2.13	-1.79	-2.03	-2.05	-1.78	-1.81	-1.84	3.11
												AmG5_005410	amidase	AmG5_005410	0	-0.3	-1.11	-0.74	-2.82	-2.66	-2.28	-4.52	-4.82	-4.06	-8.99	-5.81	-0.39
												AmG5_001689	Protease	AmG5_001689	0	0.08	-0.11	0.09	-1.6	-2.62	-2.63	-5.82	-7.88	-2.67	-1.89	-0.47	-0.67
												AmG5_008999	Protease	AmG5_008999	0	0.15	-1.58	-1.82	-8.21	-2.09	-2.36	-3.41	-8.85	-1.19	-5.41	-1.83	1.11

Detectiemethoden

LC-MS-detectiemethoden werden opgezet en geoptimaliseerd voor verschillende plastic afbraakproducten door monomeren te analyseren. Onverwacht vertoonden lineaire en cyclische vormen van de PCL-, PA6- en PLA-monomeren verschillende pieken, zoals getoond voor het voorbeeld van 6-HHA (Fig. 4). Niet alleen de monomeer werd gedetecteerd, maar de andere pieken konden worden geïdentificeerd als dimeren, trimeren en andere korte, oplosbare oligomeren die onzuiverheden of spontane oligomerisatie suggereren.

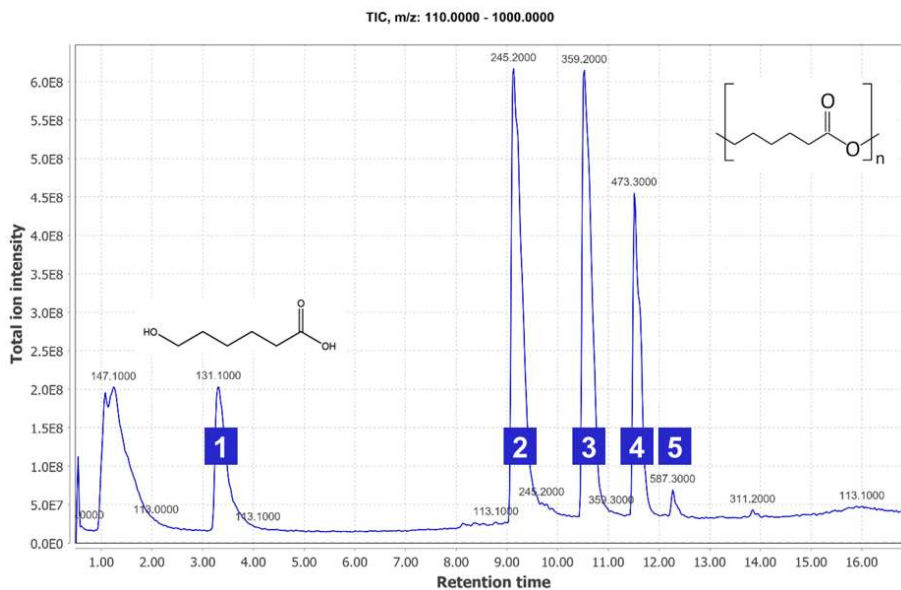


Fig. 4. LC-MS-analyse van het PCL-monomeer 6-HHA (1%). Pieken gelabeld met getallen komen overeen met de monomere (1) of oligomere vormen, dimeer (2), trimeer (3), tetrameer (4) en pentameer (5).

Onze opstelling leverde werkbare detectiemethoden op voor de lineaire monomeren van PLA, PCL en PA6. Hoewel de exacte chemische structuur van PUR onbekend was, konden verschillende veel voorkomende monomeren van PUR worden gedetecteerd als referentiemonsters.

Methodevalidatie

De aanwezigheid van oligomere vormen in de monomeeroplossingen werd gebruikt als een aanvullende methode om de enzymatische afbraak van kunststoffen te bestuderen. Om de afbraak te karakteriseren, werden de oligomere mengsels van monomeren en geëmulgeerde kunststoffen (waar mogelijk) gebruikt als substraten. Zowel geconcentreerde enzymextracten als commerciële enzymen werden gebruikt in afbraakexperimenten. Onze resultaten illustreren de afbraak van PCL 6-HHA-oligomeren door een gezuiverd enzym; langere oligomeren van 6-HHA werden bijna volledig afgebroken door de lipase tot monomeren (lineair en cyclisch) en dimeren.

De complexiteit en ongedefinieerde samenstelling van PUR bemoeilijkt de analyse van afbraakproducten met de ontwikkelde detectieopstelling. Er werd echter een alternatieve methode bedacht om specifiek urethanase-activiteit in monsters te detecteren. Kleine urethaan-bevattende moleculen, b.v. ethyl- en methylurethaan, werden gebruikt om urethaan-afbrekende activiteiten in monsters te detecteren.

Onze resultaten toonden aan dat een commercieel urease kan worden gebruikt als een positieve controle voor de afbraak van ethyl urethaan (EC). Door EC als modelsubstraat te gebruiken, kunnen kweekmonsters worden gescreend op urethanase activiteit. De eerste resultaten lieten een lage, maar detecteerbare activiteit zien in een 7 dagen oude *A. niger* kweek (Fig. 5).

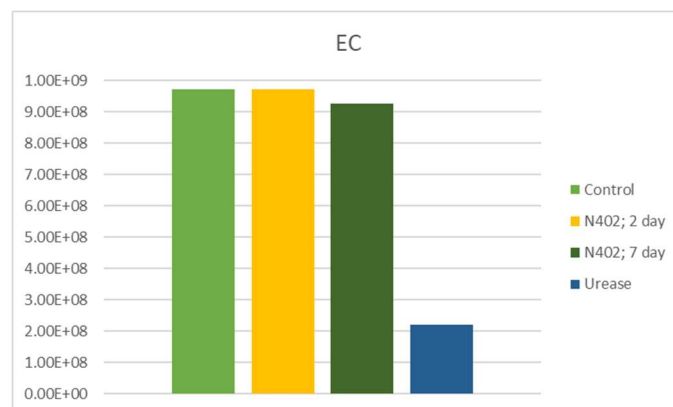


Fig. 5. Detectie van ethyl urethaan (EC) voor urease enzym of *A. niger* N402 kweek supernatants.

Omdat LC-MS geen geschikte methode is om een groot aantal monsters te screenen, zijn alternatieve methoden onderzocht. Voor PLA-afbraak werd een methode in microtiterplaten opgezet voor de specifieke kwantificering van het monomeer melkzuur. De minder specifieke TNBS-test werd geëvalueerd voor detectie van PA6-monomeren en afbraakproducten. Een proteasecocktail overproducerende *A. niger* stam werd gebruikt om grote hoeveelheden van verschillende proteasen te genereren. Verschillende soorten PA6 werden behandeld met dit proteasecocktail en het vrijkomen van monomeren en oligomeren werd onderzocht. Onze resultaten toonden aan dat de proteasen of andere enzymen die van nature aanwezig zijn in de cocktail uitgescheiden door *A. niger* niet in staat waren om in te werken op PA6 of om de materialen te depolymeriseren in een periode van 7 dagen bij 35 °C.

Overexpressie van veelbelovende genen in een schimmelgastheer

Microbiële enzymkandidaten met gerapporteerde activiteit op PUR en PA6 zijn geselecteerd voor overproductie. De door DDNA geoptimaliseerde *A. niger* productie-gastheer werd gebruikt voor het produceren van de enzymen. Een eerste generatie productiestammen werd succesvol gegenereerd voor esterases, lipases en amidases.

Samengevat zijn de binnen dit project verkregen resultaten veelbelovend. Dit project levert een proof of principle voor het gebruik van een schimmelscreeningsplatform en een selectieve verrijkingsbenadering voor het ontdekken van nieuwe enzymen voor plasticafbraak. De succesvolle overproductie van relevante enzymen en de mogelijkheid tot gedetailleerde kwantificering en karakterisering van het afbraakproces zet de eerste stap naar industriële enzymatische kunststofrecycling door kunststoffen om te zetten in monomeren en die vervolgens weer gebruikt kunnen worden om nieuwe kunststoffen te maken.

Bijdrage van het project aan de doelstellingen van de TKI BioBased Economy

In ons onderzoek is aan het licht gekomen dat *Aureobasidium* PUR plastics kan afbreken en een heel interessante en voor schimmels vrij unieke collectie van enzymen produceert. Deze door middel van laboratorium-evolutie verkregen mutanten vertoonden verbeterde Impranil-PUR afbrekende eigenschappen. Samen vormen deze resultaten een goede basis voor verdere, uitgebreidere screeningsexperimenten en onderzoek naar de geïdentificeerde enzymen en hun toepassing voor de afbraak van verschillende synthetische plasticverbindingen.

Het Back to Mono project resulteerde in een screeningsmethode die het mogelijk maakt om kandidaat enzymen te identificeren. Verder konden we laten zien dat de ontwikkelde detectiemethoden monomeren en oligomeren kunnen detecteren. Ook toonden wij de afbraak van plastics en modelsubstraten door schimmelenzymen aan. Dit project resulteerde in een aantal productiestammen die op laboratoriumschaal enzymen produceren die plastic polymeren kunnen knippen.

Eén van de doelstellingen van TKI BioBased Economy is duurzame energiehuishouding. Het Back to Mono project heeft aan deze doelstelling bijgedragen door een proof of principle voor het gebruik van enzymatische ontleding van de belangrijkste kunststofcomposieten te leveren. Hierdoor werd de basis gelegd voor het hergebruiken van plastic afbraakproducten wat bijdraagt aan de doelstelling circulair maken van grondstoffen. Enzymatische recycling heeft een kleinere milieu-impact door verminderde energieverbruik en CO₂ uitstoot.

Het project heeft tot significante kennisopbouw geleid met betrekking tot *Aureobasidium* als een nieuwe bron van plastic-afbrekende enzymen.

Daarnaast biedt het onderzoek een aantal veelbelovende aanknopingspunten voor verdere verbetering van het maken van plastic emulsies en het synthetiseren van model substraten.

Spin off binnen en buiten de sector

Een korte samenvatting van het Back to Mono project is gepubliceerd op de websites van de beide onderzoekspartners. Dit heeft o.a. geleid tot interesse van een iGEM studentenproject (Suckerspheres). Op basis van het onderzoek zoals is uitgevoerd in het Back to Mono project, is één van de onderzoekspartners (DDNA) benadert door complementaire onderzoeksgroepen met interesse in verwante onderzoeksvragen. Hierbij is een deel van de niet vertrouwelijke projectinformatie gedeeld om onze interesse in verdere samenwerking te ondersteunen. Dit heeft geleid tot de gezamenlijke indiening van het EU-onderzoeksvoorstel FRONTIERS (penvoerder AIT, Wenen, Oostenrijk) waarin gebruik kan worden gemaakt van de in Back to Mono verkregen resultaten voor duurzame oplossingen in de fabricage en verwerking van (synthetische) kleding. De resultaten verkregen uit het onderzoek aan *Aureobasidium* wordt voorbereid voor een wetenschappelijke publicatie. Ook de overige resultaten zullen zo mogelijk op termijn gebruikt worden voor publicatie in de wetenschappelijke literatuur.

Overzicht van openbare publicaties

Topsector energie webpagina: <https://projecten.topsectorenergie.nl/projecten/back-to-mono-00031715>

Project webpagina van Dutch DNA Biotech: <https://www.ddna-biotech.com/>

Studenten projecten uitgevoerd bij en met begeleiding door Dutch DNA Biotech:

Samenvattingen op <https://www.ddna-biotech.com/>

Antonio d'Errico. 2019. *Current and future perspectives for fungal enzymatic recycling of plastic waste*. MSc Science and Business Management Project Report, Universiteit Utrecht.

Cristina Berenguer Millanes. 2019. Development of a fungal screening system for enzyme discovery. MSc Research Project Report, Wageningen University.

Suna-Maria Köhler. 2020. *Depolymerization of Nylon 6 materials through fungal proteases*. Practical semester report, Dutch DNA Biotech.

Contactpersonen voor meer informatie

Dutch DNA Biotech B.V.

Cornelis Mijnders

Padulaan 8

3584 CH Utrecht

Tel: 088 0666194

Email: cornelis.mijnders@ddna-biotech.com

Universiteit Leiden

Arthur Ram

Instituut Biologie Leiden

Sylviusweg 72

2333 BE Leiden

Tel: +31 71 527 4914

Email: A.F.J.Ram@biology.leidenuniv.nl

Meer exemplaren van dit rapport zijn verkrijgbaar via Dutch DNA Biotech (info@ddna-biotech.nl).