

Slutrapport

Energimyndighetens titel på projektet – svenska

Förnybar produktion av isopren från CO₂ med hjälp av cyanobakterier

Energimyndighetens titel på projektet – engelska

Renewable production of isoprene from CO₂ using cyanobacteria

Organisation

Uppsala universitet

Institutionen för Kemi - Ångström

Box 256

751 05 Uppsala

Namn på projektledare

Pia Lindberg

Namn på eventuella övriga projektdeltagare

João Rodrigues, Kim Janssen, Paul Bolay

Nyckelord

Isopren, koldioxid-omvandling, cyanobakterier, fotosyntes, metabolic engineering

Förord

I detta projekt har vi arbetat med att utveckla isoprenproduktion i cyanobakterier. Två doktorander (en av dem nu disputerad) och en postdoktor har utfört det mesta av det laborativa arbetet, till viss del i nationella och internationella samarbeten. Projektets mål har uppnåtts. Arbetet har resulterat i åtta publikationer (varav en doktorsavhandling och ett ännu inte publicerat manuskript), och har lagt grunden för fortsatt arbete i ett nu pågående Horizon Europe-projekt med sikte på högre TRL-nivåer. Sammanfattningsvis ett mycket framgångsrikt projekt!

Innehållsförteckning

Sammanfattning	4
Summary	4
Inledning/bakgrund	5
Genomförande	5
Resultat	6
Diskussion	8
Publikationslista	8
Referenser, källor	10
Bilagor	11

Sammanfattning

Målet för projektet var att etablera sol-driven produktion av förnybara kolbaserade bränslen från koldioxid och vatten, katalyserat av cyanobakterier. Ett sådant system bidrar till ett hållbart energisystem på flera sätt. Bränslet är CO₂-neutralt och ersätter fossila bränslen, vilket bidrar till att motverka global uppvärmning. Det skulle också bidra till ett robust och flexibelt energisystem genom att tillhandahålla ett sätt att lagra solenergi i form av bränsle.

Vi har i projektet använt genteknik för att förändra metabolismen hos cyanobakterier, fotosyntetiska mikroorganismer med förmåga att använda energin i solljus för att omvandla koldioxid till användbara kolbaserade kemikalier. Målet för projektet var att tillverka isopren, ett flyktigt kolväte med många användningsområden. Vi har under projektet etablerat nya stammar av cyanobakterier kapabla till hög och stabil isopren-produktion, vi har visat att isopren kan användas till produktion av flygbränsle, och vi har arbetat med att optimera odlingsförhållanden för cyanobakterierna för maximal produktion.

Summary

The goal of the project was to establish solar-driven production of renewable carbon-based fuels from carbon dioxide and water, catalyzed by cyanobacteria. Such a system contributes to a sustainable energy system in several ways. The fuel is CO₂-neutral and replaces fossil fuels, which helps combat global warming. It would also contribute to a robust and flexible energy system by providing a way to store solar energy in the form of fuel.

In the project, we used genetic engineering to alter the metabolism of cyanobacteria, photosynthetic microorganisms with the ability to use the energy in sunlight to convert carbon dioxide into useful carbon-based chemicals. The aim of the project was to produce isoprene, a volatile hydrocarbon with many industrial applications. During the project, we established new strains of cyanobacteria capable of high and stable isoprene production, demonstrated that isoprene can be used as a raw material for jetfuel production, and worked on optimizing the cultivation conditions for cyanobacteria for maximum productivity.

Inledning/bakgrund

Cyanobakterier är fotosyntetiska mikroorganismer med förmågan att växa på vatten, koldioxid och mineraler, med ljus som sin energikälla. Denna förmåga gör dem extremt attraktiva för bioteknologiska tillämpningar, eftersom de kan fånga in solenergi och lagra den i kemisk form, samtidigt som de tar upp koldioxid från atmosfären. De är därför perfekta värdorganismer för förnybar produktion av bränslen, men effektiviteten i omvandlingen av solenergi och koldioxid till ett bränsle är ännu inte tillräckligt hög för kommersiell produktion.

En mängd olika molekyler har producerats i cyanobakterier av forskargrupper runt om i världen; allt från etanol, socker och sockeralkoholer till komplexa metaboliter från växter. Arbetet i min forskargrupp har ett fokus på produktion av terpener, en grupp av kolväteföreningar, och vi har kunnat visa att cyanobakterier kan modifieras för att producera flera olika terpener. Ett exempel är isopren, ett kolväte med fem kolatomer. Isopren används kommersiellt som råmaterial för tillverkning av syntetiskt gummi, men det skulle också kunna utgöra råmaterial för produktion av bränslen.

Från tidigare arbete (finansierat av STEM-bidrag nr 38334-1 och andra bidrag) hade jag redan tillgängliga ett antal stammar av *Synechocystis* PCC 6803 som kan producera isopren eller andra terpener (1). I det projekt som rapporteras här har vi utvecklat produktionen av isopren med utgångspunkt i dessa tidigare stammar. Projektets hade tre mål:

1. Identifiera, från våra egna studier och aktuell litteratur, nya reaktionsvägar och enzymer som kan modifieras genetiskt för att öka isoprenproduktionen i cyanobakterier, och designa och implementera de identifierade modifieringarna på ett systematiskt sätt.
2. Från resultaten av detta, välj de bästa stammarna och optimera odlingsförhållandena för dessa, för att uppnå produktionsnivåer på en skala av minst g/L kultur vid projektets slut.
3. Odlar stammar för kontinuerlig isoprenproduktion under längre tid och under simulerade industriella förhållanden. Samla in data för att kunna utvärdera potentialen hos isoprenproducerande cyanobakterier i större skala.

Genomförande

Under projektet har vi arbetat, enligt planen och mot de ovan beskrivna målen för projektet, med att utveckla nya cyanobakteriestammar för fotosyntetisk isoprenproduktion direkt från CO₂, och att testa dessa under

olika odlingsförhållanden. De första försöken i projektet ledde till etablering av mer stabila stammar av isoprenproducerande cyanobakterier, vilka sedan använts i flera delprojekt.

Ett arbete inom projektet har handlat om att modifiera reaktionsvägen som leder till produktion av terpenier (den grupp av ämnen som isopren tillhör), och att undersöka hur optimerade odlingsförhållanden kan öka produktionen, genom användande av en teknik för odling med hög celldensitet (2). Vidare har vi undersökt effekter av ljus, temperatur och isopren på isoprenproduktion och tillväxt hos cyanobakterier (3). Vi har också genomfört försök med nedreglering av konkurrerande reaktionsvägar i cellen med hjälp av antisense-RNA (4).

I ett samarbetsprojekt (STEM projektnr 52576-1, tidigare projekt 44728-1) har vi använt isopren från cyanobakterier för att i en fotokemisk process framställa dimerer av isopren, vilka efter hydrogenering kan användas som bio-jetbränsle (5).

Utöver dessa aktiviteter har vi gjort försök med isoprenproduktion i de snabbväxande cyanobakterierna *Synechococcus elongatus* UTEX 2973 och *Synechococcus* sp. PCC 11901. Under de sista två åren av projektet har vi fokuserat på att ytterligare utveckla isoprenproduktionen i *Synechocystis* genom att identifiera och implementera nya DNA-konstruktioner för att modifiera reaktionsvägar i cellerna och därigenom öka produktionen (6). Vi har också under 2024 genomfört en serie bioreaktorexperiment för att testa produktionen i större skala, med förhållanden som liknar de man kan förvänta sig vid uppskalning för industriell produktion (6).

Resultat

Arbetet med att modifiera reaktionsvägen som leder till produktion av terpenier och att undersöka hur optimerade odlingsförhållanden kan öka produktionen har redovisats i *Metabolic Engineering Communications*, 2021 (2). De viktigaste resultaten var att visa hur förstärkt uttryck av den nativa reaktionsväg som leder till terpenproduktion kunde öka produktionen, och hur optimerade odlingsförhållanden ledde till starkt ökad volumetrisk produktivitet.

I vår studie av effekter av ljus, temperatur och isopren kunde vi bland annat visa att isoprenproduktion ger bakteriecellerna förmåga att överleva och växa vid högre temperaturer, vilket är en intressant egenskap för uppskalad produktion in bioreaktorer. Isoprenproduktionen ökar också vid

högre temperaturer. Detta arbete är publicerat i *Bioresource Technology*, 2023 (3).

Från försök med nedreglering av konkurrerande reaktionsvägar i cellen med hjälp av antisense-RNA kunde vi visa att denna teknik är ett användbart verktyg för att kartlägga effekter av förändringar i metabolismen, och vi identifierade flera gener vilkas nedreglering hade positiv effekt på isoprenproduktion. Detta arbete är publicerat i *Microbial Cell Factories*, 2023 (4).

I bio-jetbränsle-projektet kunde vi visa att isopren kan användas i en fotokemisk reaktion för framställning av ett bio-jetbränsle. Vi använde i detta delprojekt våra nya stabila stammar från inledningen av projektet, visade att isopren kan fångas in från cyanobakteriekulturerna, och att isoprenproduktionen förbättras om man kontinuerligt skördar produkten från kulturerna. I studien gjordes också en preliminär livscykelanalys som visar på potentialen för hållbar flygbränsleproduktion med vårt system. Dessa resultat har publicerats i en artikel i *Green Chemistry*, 2022 (5).

Försök med isoprenproduktion i de snabbväxande cyanobakterierna *Synechococcus elongatus* UTEX 2973 och *Synechococcus* sp. PCC 11901 var inte framgångsrika, då vi inte kunde få fram genetiskt stabila isoprenproducerande stammar av dessa. Under de sista två åren av projektet har vi därför fokuserat på att ytterligare utveckla isoprenproduktionen i *Synechocystis*. Genom att identifiera och implementera nya DNA-konstruktioner för att modifiera reaktionsvägar i cellerna har vi kunnat öka produktionen (6). Vi har också under 2024 genomfört en serie bioreaktorexperiment för att testa produktionen i större skala, med förhållanden som liknar de man kan förvänta sig vid uppskalning för industriell produktion (6). Resultat från dessa försök uppnår målen i ansökan för projektet, och förbereds nu för publicering (Janssen et al, manuskript, 2025).

En doktorand i projektet disputerade i november 2022 (7). I september 2022 började en postdoktorstipendiat (Dr. Paul Bolay) att arbeta i projektet, och en ny doktorand (Kim Janssen) startade i juni 2023. Under projektets gång har fyra studenter genomfört masterarbeten inom projektet, och tre kortare studentprojekt har också genomförts.

Resultat från projektet har presenterats i vetenskapliga publikationer, se ovan och publikationslista nedan, och på internationella konferenser i form av posters och föredrag varje år under projekttiden. Utöver de vetenskapliga originalartiklar som nämns ovan har vi publicerat ett bokkapitel och en review-artikel inom projektet (8, 9).

Med utgångspunkt i arbetet i projektet har vi också, tillsammans med andra partners, kunnat erhålla ett Horizon Europe projekt, ALFAFUELS (GA nr 101122224, <https://alfafuels.eu/>, start 2024-01-01), där vår metod för att framställa jetbränsle från koldioxid via cyanobakterie-isopren utgör grunden för projektet. ALFAFUELS koordineras av RISE Processum AB och har en total budget om 4.8 MEUR, med en budget för vårt arbete om isoprenproducerande cyanobakterier om ca 400 kEUR.

Diskussion

Målen för projektet har uppnåtts. Den del av projektplanen som handlade om att testa alternativa cyanobakterier som värdstammar har inte genomförts, eftersom det visade sig svårt att få fungerande isoprenproduktion i dessa. Resultaten från projektet används vidare i ett nytt Horizon EU-projekt, ALFAFUELS, som är baserat på arbete i detta och tidigare STEM-finansierade projekt.

Publikationslista

I kronologisk ordning, författare från projektet i fet stil:

Rodrigues, J.S. and Lindberg, P. 2021. Metabolic engineering of *Synechocystis* sp. PCC 6803 for improved bisabolene production. *Metabolic engineering communications* 12, e00159.

Rodrigues, J.S. and Lindberg, P. 2021. Engineering Cyanobacteria as Host Organisms for Production of Terpenes and Terpenoids. In: Hudson, E.P. (Ed), *Cyanobacteria Biotechnology*, Wiley, 267-300.

Rana A, ..., **Rodrigues, J.S.**, ..., **Lindberg P.** Ottosson H. A combined photobiological–photochemical route to C10 cycloalkane jet fuels from carbon dioxide via isoprene. 2022. *Green Chemistry* 24, 9602-9619.

Rodrigues JS. Engineering *Synechocystis* sp. PCC 6803 for microbial terpenoid production. 2022. *Digital Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Science and Technology*, ISSN 1651-6214 ; 2197. URN: [urn:nbn:se:uu:diva-486274](https://nbn-resolving.org/urn:nbn:se:uu:diva-486274) ; ISBN: 978-91-513-1615-4 (tryckt).

Rodrigues JS, Bourgade B, Galle KR, Lindberg P. 2023. Mapping competitive pathways to terpenoid biosynthesis in *Synechocystis* sp. PCC 6803 using an antisense RNA synthetic tool. *Microbial Cell Factories* 22 (1), 35.

Rodrigues JS, Kovács L, Lukeš M, Hoepfer R, Steuer R, Červený J, **Lindberg P**, Zavřel T. 2023. Characterizing isoprene production in cyanobacteria – insights into the effects of light, temperature, and isoprene on *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Bioresource Technology*, 380, 129068.

Bolay P, Dodge N, **Janssen K**, Jensen PE, **Lindberg P**. 2024. Tailoring regulatory components for metabolic engineering in cyanobacteria. *Physiologia Plantarum* 176 (3), e14316

Janssen K, **Bolay P**, Tüllinghoff A, Töpel J, Bühler B, **Lindberg P**. Development of photosynthetic cell factories for sustainable isoprene production. 2025. *Manuscript in preparation*.

Referenser, källor

1. Englund, E., Shabestary, K., Hudson, E.P. and **Lindberg P.** 2018. Systematic overexpression study to find target enzymes enhancing production of terpenes in *Synechocystis* PCC 6803, using isoprene as a model compound. *Metabolic Engineering* 49:164-177. (Från tidigare projekt)
2. Rodrigues, J.S. and **Lindberg, P.** 2021. Metabolic engineering of *Synechocystis* sp. PCC 6803 for improved bisabolene production. *Metabolic engineering communications* 12, e00159.
3. Rodrigues JS, Kovács L, Lukeš M, Hoeper R, Steuer R, Červený J, **Lindberg P**, Zavřel T. 2023. Characterizing isoprene production in cyanobacteria – insights into the effects of light, temperature, and isoprene on *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Bioresource Technology*, 380, 129068.
4. Rodrigues JS, Bourgade B, Galle KR, **Lindberg P.** 2023. Mapping competitive pathways to terpenoid biosynthesis in *Synechocystis* sp. PCC 6803 using an antisense RNA synthetic tool. *Microbial Cell Factories* 22 (1), 35.
5. Rana A, ..., **Lindberg P**, Ottosson H. A combined photobiological–photochemical route to C10 cycloalkane jet fuels from carbon dioxide via isoprene. 2022. *Green Chemistry* 24, 9602-9619.
6. Janssen K, Bolay P, Tüllinghoff A, Töpel J, Bühler B, **Lindberg P.** Development of photosynthetic cell factories for sustainable isoprene production. 2025. *Manuscript in preparation*.
7. Rodrigues JS. Engineering *Synechocystis* sp. PCC 6803 for microbial terpenoid production. 2022. *Digital Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Science and Technology*, ISSN 1651-6214 ; 2197. URN: urn:nbn:se:uu:diva-486274 ; ISBN: 978-91-513-1615-4 (tryckt).
8. Rodrigues, J.S. and **Lindberg, P.** 2021. Engineering Cyanobacteria as Host Organisms for Production of Terpenes and Terpenoids. In: Hudson, E.P. (Ed), *Cyanobacteria Biotechnology*, Wiley, 267-300.
9. Bolay P, Dodge N, Janssen K, Jensen PE, **Lindberg P.** 2024. Tailoring regulatory components for metabolic engineering in cyanobacteria. *Physiologia Plantarum* 176 (3), e14316

Bilagor

Inga bilagor.