



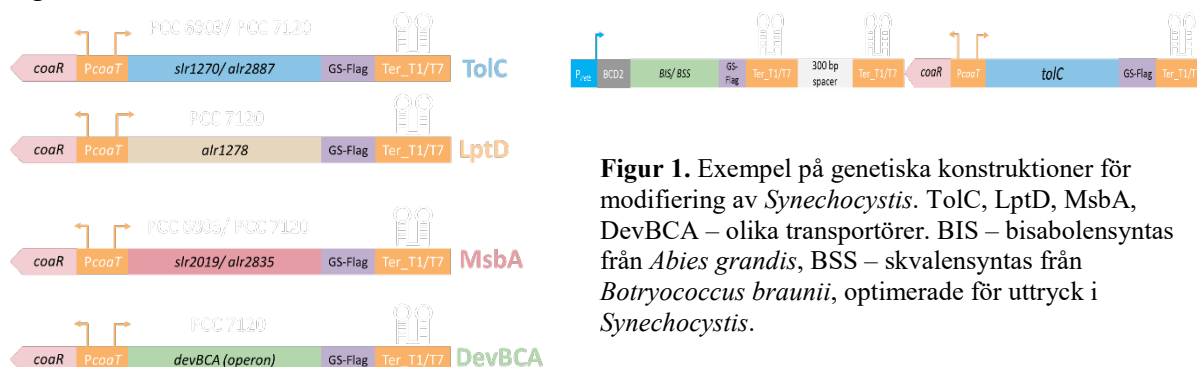
UPPSALA
UNIVERSITET

Slutrapport för ÅForsk anslag 16-538, 30 september 2019.

Detta är slutrapporten för projektet ”Utveckling av cyanobakterier som plattform för förnybar produktion av organiska ämnen”, ett projekt som syftar till att utveckla användningen cyanobakterier för förnybar produktion av industriellt intressanta kolväten som kan användas som bränslen eller för kemisk syntes, och där ersätta organiska ämnen framställda från olja. Ett problem med att använda mikroorganismer för produktion av kolväten är att om de ofta inte utsöndras spontant från cellerna, utan måste extraheras från biomassan. Syftet med detta projekt har därför varit att på olika sätt undersöka och förbättra transport av sådana ämnen ut ur cellerna. Modellorganismen vi valt att arbeta med är den encelliga cyanobakterien *Synechocystis* sp. PCC 6803 (*Synechocystis*).

Projektet utförs framför allt av en postdoc, Dr. Dennis Dienst. Under hösten 2018-våren 2019 har också en masterstudent, Oliver Mantovani, arbetat med projektet under handledning av Dennis Dienst.

I tidiga försök hade vi testat att uttrycka transportörproteinet MsbA från *Salmonella* i en stam av *Synechocystis* som modifierats till att producera kolvätet skvalen. Detta ledde dock inte till ökad transport av skvalen ut ur cellerna [1]. Vi expanderade därför urvalet av transportörer som vi uttrycker i *Synechocystis* till att inkludera den nativa MsbA från *Synechocystis*, och också flera andra transportörer (TolC, LptD, MsbA och DevBCA) från andra cyanobakterier, utvalda från litteratur och från genomsekvenser. Vi valde att fokusera på dessa cyanobakterieproteiner eftersom de kan förväntas fungera bättre än transportörer från andra mikroorganismer, då membranstrukturen skiljer sig åt och avstånden mellan yttre och inre membran är olika i olika organismer.

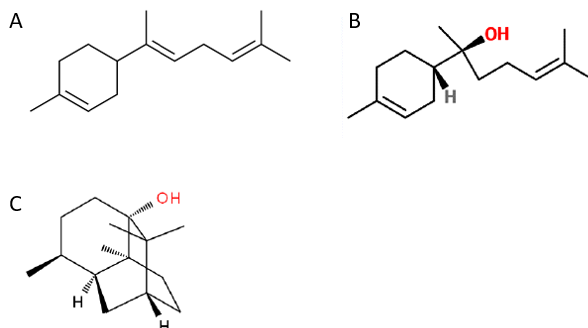


Figur 1. Exempel på genetiska konstruktioner för modifiering av *Synechocystis*. TolC, LptD, MsbA, DevBCA – olika transportörer. BIS – bisabolensyntas från *Abies grandis*, BSS – skvalensyntas från *Botryococcus braunii*, optimerade för uttryck i *Synechocystis*.

De olika transportörerna uttrycktes till att börja med dels tillsammans med skvalensyntas som bildar skvalen, och dels tillsammans med bisabolensyntas, ett enzym som katalyserar bildandet av (E)- α -bisabolen, en terpenoid med 15 kolatomer med hydrofob struktur (Figur 1). Under det senaste året har vi också studerat transport av några andra terpenoider; (-)- α -bisabolol, en alkohol strukturellt lik bisabolen, och (-)-patchoulol, en annan 15-kols alkohol (Figur 2). Eftersom dessa alkoholer inte är lika hydrofoba som bisabolen kan man förvänta sig att de ska partitioneras olika i cellen, cellmembranen, och i odlingsmediet, och också att de har olika egenskaper för transport i våra transportör-uttryckande stammar av cyanobakterier. Vi har

introducerat gener för bisabolol- och patchoulol-syntas för att producera dessa ämnen i *Synechocystis*, och verifierat att de fungerar och cellerna producerar respektive ämne [2]. Sedan har vi kombinerat dessa terpensyntaser med olika transportörer i samma cell.

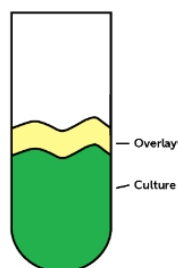
Vi har i de försök vi gjort inte kunnat observera någon signifikant effekt på export av terpenoider av att uttrycka enskilda transporter-proteiner. Vi arbetar därför också med att uttrycka de olika transportörerna i kombinationer med varandra, med komponenter som ska lokaliseras till inre (MsbA, DevBCA) respektive yttre (TolC, LptD) membran, för att på så sätt bygga upp komplex som kan ge transport över hela membranregionen i cellerna. Vi har nu flera sådana stammar av *Synechocystis* med olika transportörer i kombination, men det återstår ännu att undersöka effekterna på transport av terpenoiderna.



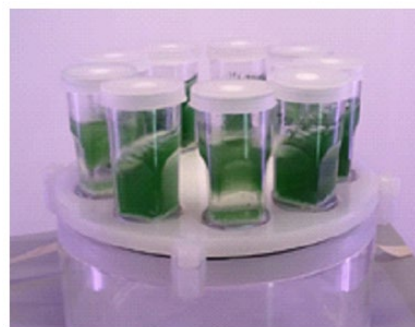
Figur 2. (A) (E)- α -bisabolen, (B) bisabolol, (C) patchoulol

För att studera bildande och transport av bisabolen, bisabolol och patchoulol har vi använt oss av en metod där kulturerna odlas med ett lager av dodekan uppe på odlingsmediet (Figur 3). De producerade terpenoiderna extraheras då kontinuerligt direkt i kulturen till den organiska fasen, och vi kan mäta mängden produkt i dodekanet med hjälp av gaskromatografi. Eftersom de tre terpenoiderna har olika struktur och hydrofobicitet studerar vi också, utöver försöken med transportörer, hur de fördelar sig i kulturen mellan cellerna, dodekan-fasen, och mediet utan dodekan. Vi har testat detta i vanliga kulturer, men också i en ny form av bioreaktorer där kulturerna kan växa till mycket högre täthet än under normala odlingsförhållanden (Figur 4)

[3]. Vi har funnit att i högdensitetskulturer får man en högre volumetrisk produktion av respektive terpenoid, men samtidigt blir den specifika produktiviteten per cell lägre än vid normal odling. Studierna av partitionering av produkterna i celler, medium och organisk fas är pågående.



Figur 3. Organisk fas ovanpå cyanobakteriekulturen



Figur 4. Högdensitetsodling av cyanobakterier (CellDeg)

Experimenten som beskrivits ovan kommer att publiceras i minst en artikel när de sista försöken är slutförda. Den första planeras att skickas in innan slutet av året [4]. Ett master-arbete finns också från projektet [2].

Referenser

- [1] Pattanaik, B, Lindberg, P, 2016. Unpublished data.
- [2] Mantovani, O. 2019. "Enhancing terpenoid production yields by over-expression of membrane proteins in Cyanobacteria", Masterarbete i Tillämpad bioteknik, Uppsala universitet.
- [3] Bähr, L. et al, 2016. J Appl Phycol (2016) 28: 783.
- [4] Dienst, D., Wichmann, J., Mantovani, O., Rodrigues, J., Lindberg, P. 2019. Manuscript in preparation.

Summary in English

Cyanobacteria are photosynthetic microorganisms, able to grow on water, carbon dioxide and sunlight. They are therefore interesting as host organisms for sustainable synthesis of chemicals and fuels, recycling carbon dioxide from the atmosphere or from industrial sources of carbon emissions. In the project “Developing cyanobacteria as a platform for renewable production of organic compounds” we are working to investigate and enhance export of hydrophobic organic compounds from cyanobacterial cells, with the aim of improving productivity and product recovery from bacterial cultures. We have from the literature and genome sequences identified several different transporter proteins that may facilitate export of organic compounds, and expressed these in cyanobacterial cells together with enzymes which catalyze formation of several different organic products from the terpenoid family. We are now investigating the effects of different combinations of transporters on export of the products from the cyanobacterial cells. Furthermore, we are studying the partitioning of the terpenoid products in cells and cultures, as well as effects of using a high-density cultivation system on production, product partitioning and recovery. Experiments are still ongoing to evaluate the different engineered cyanobacterial strains. A manuscript is in preparation, to be submitted at the end of this year.