



## UvA-DARE (Digital Academic Repository)

### Physiological and genetic studies towards biofuel production in cyanobacteria

Schuurmans, R.M.

**Publication date**

2017

**Document Version**

Other version

**License**

Other

[Link to publication](#)

**Citation for published version (APA):**

Schuurmans, R. M. (2017). *Physiological and genetic studies towards biofuel production in cyanobacteria*. [Thesis, fully internal, Universiteit van Amsterdam].

**General rights**

It is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), other than for strictly personal, individual use, unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

**Disclaimer/Complaints regulations**

If you believe that digital publication of certain material infringes any of your rights or (privacy) interests, please let the Library know, stating your reasons. In case of a legitimate complaint, the Library will make the material inaccessible and/or remove it from the website. Please Ask the Library: <https://uba.uva.nl/en/contact>, or a letter to: Library of the University of Amsterdam, Secretariat, P.O. Box 19185, 1000 GD Amsterdam, The Netherlands. You will be contacted as soon as possible.

# Summary

---

## Summary

The main aim of this thesis was to contribute to the optimization of the cyanobacterial cell factory and to increase the production of cellulose as a biofuel (precursor) via a physiological and a transgenic approach. The research described in the different chapters focusses on studies on photosynthesis for the purpose of improving photosynthetic efficiency and on cellulose production by natural or transgenic strains. This resulted in a versatile thesis with one main goal: optimizing solar biofuel production with cyanobacteria.

**Chapter 1** provides an overview of the current state of cyanobacterial biofuel research with particular focus on the photanol approach and the production of cellulose as a biofuel. It also contains a detailed description of bacterial cellulose synthesis and regulation.

**Chapter 2** introduces a novel technique to determine the *in vivo* redox state of the plastoquinone (PQ) pool. Several aspects of the light reactions of photosynthesis, including the redox state of the PQ pool, are then analyzed. Analysis occurred under different light- and carbon-limitation conditions and under the influence of several chemicals that inhibit photosynthesis at different points in the electron transport chain. Results show that, counterintuitively and in contrast with current theory, reducing conditions, like low carbon availability and illumination with PSII light, lead to an oxidized PQ pool. Concomitantly oxidizing conditions such as PSI illumination and high carbon conditions result in a more reduced PQ pool.

Current theories on PQ pool dynamics are largely based on data acquired with PAM fluorimetry, which measures PSII bound chl *a* fluorescence.

In **chapter 3** a comparative analysis of the PAM fluorimetry parameters and the photosynthetic efficiency based on biomass production and oxygen exchange rates of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 and the green alga *Chlorella sorokiniana* is given. This analysis revealed a large discrepancy between chl *a* fluorescence parameters and photosynthetic efficiency calculations for the cyanobacteria. The strong influence of respiratory electron flow and phycobilisome fluorescence on the chl *a* fluorescence signal of cyanobacteria, which is at the root of this discrepancy, is highlighted by the use of *Synechocystis* respiratory mutants and a mutant which lacks the phycobilisome harvesting antenna entirely.

**Chapter 4** describes the different growth phases of a typical cyanobacterial batch culture. These are: A lag phase, an exponential growth phase, the often overlooked light limited linear growth phase and the nutrient limited stationary phase. Analysis of photosynthetic parameters, such as chl *a* fluorescence, PQ pool redox state and the energy transfer distribution from the phycobilisomes, show marked changes in the photo-physiology of *Synechocystis* sp. PCC 6803. These changes include a clear reduction of the PQ pool in the linear growth phase, compared to the exponential phase. The importance and advantages of proper growth phase determination to both fundamental and applied research are discussed.

In **chapter 5** a study is conducted on the optimization of physiological conditions for cellulose production in the natural cellulose producing cyanobacteria *Crinallium epipsammum*. A maximal cellulose content of 40 % was achieved, using a combination of stress conditions. This is twice as high as the cellulose content previously reported for this strain. Additionally, growth of *C. epipsammum* was scaled up in a 300 L photobioreactor. The strain grew well in this device, proving that it is suitable for large scale biofuel production. Pros and cons for using natural strains like *C. epipsammum*, in particular for large scale biofuel production, are discussed.

In **chapter 6** genes for cellulose synthesis were introduced into *Synechocystis* sp. PCC 6803 with the aim of generating a cellulose overproducing strain. Although no cellulose was detected in the transgenic strains using a quantitative enzymatic assay, a change in phenotype indicative of the production of cellulose and its pre-cursor UDP-glucose is described. Also, analysis of fluorescence microscopy images of the different strains stained with the cellulose binding fluorescent dye Calcofluor White further implied low levels of cellulose production. Reasons why high-level cellulose overproduction in *Synechocystis* was not achieved are discussed.

**Chapter 7** discusses and combines conclusions and implications raised in the different chapters and places them in a broader context of both each other and of current scientific literature. Chapters 2 and 4 strongly indicate that the redox state of the PQ pool is not responsible for the regulation of energy transfer from the phycobilisomes to the different photosystems, in the processes also known as state transitions. While chapters 5

## Summary

and 6 raise questions on how best to produce cellulose as a biofuel and whether to use transgenic strains when high-level producing natural strains are available.

## Samenvatting

Het hoofddoel van dit promotieonderzoek was om bij te dragen aan de optimalisatie van de cyanobacteriële cel fabriek en om de productie van cellulose als biobrandstof te verhogen via zowel een fysiologische als transgene aanpak. De focus van het onderzoek beschreven in de verschillende hoofdstukken wordt of op de fotosynthese geplaatst, met als doel om de fotosynthetische efficiëntie te verbeteren, of op cellulose productie door natuurlijke of transgene stammen. Dit heeft geleid tot een diverse thesis, maar met één gericht doel: het optimaliseren van biobrandstof productie in cyanobacteriën.

**Hoofdstuk 1** geeft een overzicht van de huidige staat van het onderzoek naar biobrandstof productie in cyanobacteriën met specifieke aandacht voor de 'photanol approach' en de productie van cellulose als biobrandstof. Het hoofdstuk bevat ook een gedetailleerde beschrijving van cellulose synthese en haar regulatie in bacteriën.

**Hoofdstuk 2** introduceert een nieuwe techniek om de *in vivo* redox staat van de plastochinon (PQ) pool te bepalen. Verschillende aspecten van de licht reacties van de fotosynthese, waaronder de PQ pool redox staat, zijn vervolgens geanalyseerd. Deze analyse vond plaats onder verschillende licht- en koolstof-limitatie condities en onder invloed van chemicaliën die de fotosynthese inhiberen op verschillende punten in de elektron transport keten. De resultaten laten zien dat, hoewel contra-intuïtief en in strijd met de huidige theorie, reducerende condities, zoals koolstof limitatie en belichting met PSII specifiek licht, leiden tot een geoxideerde PQ pool. Gelijktijdig leiden oxiderende condities, zoals belichting met PSI specifiek licht en hoge beschikbaarheid van koolstof, tot een meer gereduceerde PQ pool.

De huidige theorie over de dynamiek van de PQ pool is grotendeels gebaseerd op PAM fluorimetrie metingen. Deze techniek bepaalt specifiek de chlorofyl *a* fluorescentie van PSII gebonden chlorofyl.

In **hoofdstuk 3** wordt een vergelijkende analyse gegeven van PAM fluorimetrie metingen en bepalingen van de fotosynthetische efficiëntie gebaseerd op biomassa productie en zuurstof uitwisseling. Deze vergelijking wordt gemaakt voor de cyanobacterie *Synechocystis* sp. PCC 6803 en de groene alg *Chlorella sorokiniana*. De analyse laat een grote discrepantie zien tussen chl *a* fluorescentie parameters en de fotosynthetische

efficiency bij de cyanobacterie. De grote invloed van de ademhalingsketen en fycobilisoom fluorescentie, die grotendeels verantwoordelijk is voor de beschreven discrepantie, wordt verder uitgelicht door middel van *Synechocystis* mutanten in de ademhalingsketen en de fycobilisoom antennes.

**Hoofdstuk 4** beschrijft de verschillende groeifases van een typische cyanobacteriële batch cultuur. Die bestaat uit een lag fase, de exponentiele fase, de vaak over het hoofd geziene, licht gelimiteerde, lineaire fase en de nutriënt gelimiteerde stationaire fase. Analyse van fotosynthese parameters, zoals chl a fluorescentie, de PQ pool redox staat en de distributie van energieoverdracht van de fycobilisomen naar de beide fotosystemen, laten zien dat de foto-fysiologie van *Synechocystis* sp. PCC 6803 duidelijk anders is in de verschillende groeifases. Deze veranderingen omvatten onder anderen een duidelijke reductie van de PQ pool in de lineaire fase, in vergelijking met de exponentiele fase. Het belang en de voordelen van een goede groeifase aanduiding in zowel fundamenteel als toegepast onderzoek worden besproken.

In **hoofdstuk 5** wordt onderzoek gedaan naar de optimalisatie van de fysiologische condities voor cellulose productie in de van nature cellulose producerende cyanobacterie *Crinallium epipsammum*. Een maximaal cellulose gehalte van 40 % is behaald door het toepassen van een combinatie van stress condities. Dit cellulose gehalte is twee keer zo hoog als voorheen beschreven voor deze stam. Daarnaast is de kweek van *C. epipsammum* opgeschaald naar een 300 liter fotobioreactor. De stam groeide goed in deze bioreactor wat in principe aantoont dat deze stam geschikt is voor biobrandstof productie op grote schaal. De voor- en nadelen van het gebruik van ongemodificeerde stammen, en met name *C. epipsammum* voor biobrandstof productie op grote schaal worden besproken.

In **hoofdstuk 6** zijn, om een cellulose over producerende stam te genereren, de genen die essentieel zijn voor cellulose synthese geïntroduceerd in *Synechocystis* sp. PCC 6803. Hoewel de aanwezigheid van cellulose niet gedetecteerd kon worden in de transgene stammen met een kwantitatieve enzymatische assay, is er wel een verandering in het fenotype zichtbaar die indicatief is voor de productie van cellulose en zijn precursor UDP-glucose. Daarnaast impliceert de binding van de cellulose bindende fluorescente stof Calcofluor White aan de verschillende stammen ook de productie van kleine hoeveelheden

cellulose. Verder wordt besproken waarom de overproductie van cellulose in *Synechocystis* niet meer succesvol was.

**Hoofdstuk 7** combineert en bediscussieert de conclusies en implicaties die voort zijn gekomen uit de verschillende hoofdstukken en plaatst deze in de bredere context van zowel elkaar als de huidige literatuur. Hoofdstuk 2 en 4 bevatten sterke indicaties dat de redox staat van de PQ pool niet verantwoordelijk is voor de regulatie van energieoverdracht van de fycobilisomen naar de verschillende fotosystemen, ook wel bekend als 'state transitions'. Daarnaast roepen hoofdstukken 5 en 6 vragen op over hoe cellulose het best geproduceerd kan worden als een biobrandstof en of het gebruik van transgene stammen wel nuttig is als er natuurlijke stammen met een hoog cellulose gehalte beschikbaar zijn.