

Energimyndighetens titel på projektet – svenska Utforskande av naturens platina	
Energimyndighetens titel på projektet – engelska Mining Nature's Platinum	
Universitet/högskola/företag Uppsala universitet	Avdelning/institution Inst. för kemi - Ångström
Adress Box 256, 751 05 UPPSALA	
Namn på projektledare Gustav Berggren	
Namn på ev övriga projektdeltagare Princess R. Cabotaje (doktorand)	
Nyckelord: 5-7 st Vätgas, solbränsle, bioteknologi, hydrogenas, artificiell fotosyntes, mikrobiell vätgasmetabolism	

Förord

Projektet har finansierats av Energimyndigheten, med medel från utlysningen: ”Energiriktad grundforskning 2019”.

Innehållsförteckning

Sammanfattning	1
Summary	2
Inledning/Bakgrund	3
Genomförande	3
Resultat	3
Diskussion.....	4
Publikationslista.....	5
Referenser, källor.....	5
Bilagor	5

Sammanfattning

Ett forskningsprojekt vid Uppsala universitet, finansierat av Energimyndigheten och genomfört mellan 2020 och 2024, har gjort betydande framsteg inom bioteknologisk produktion av vätgas, en potentiell nyckelkomponent i framtidens hållbara energisystem. Projektet fokuserade på att identifiera och utveckla mer effektiva varianter av hydrogenaser, de enzymer som producerar vätgas och använder basmetaller, vilket kan komplettera nuvarande teknologier beroende av ädelmetaller som platina.

Forskarna isolerade över tio nya hydrogenaser från bakterier och arkéer, där enzymer från *Thermoanaerobacter mathranii* och *Solobacterium moorei* fick

särskilt fokus. Sm M2HydA visade högre aktivitet än tidigare referenser, medan Tam M2eHydA imponerade med sin stabilitet och syreressistens. Dessutom identifierades lovande hydrogenaser från arkéer, som är särskilt intressanta för industriell användning, vilket resulterade i en patentansökan.

Projektet undersökte också hur dessa enzymer kunde integreras i cyanobakterier för biologisk vätgasproduktion. Sm M2HydA producerade högre mängder vätgas och var aktivt under längre tid än referensen HydA1. Forskarna utvecklade även ett artificiell hydrogenas med hög elektrokatalytisk kapacitet samt en solljusdriven apparat för vattenspjälkning. Även om effektiviteten och stabilitet som krävs för storskaliga applikationer ännu inte uppnåtts, ger resultaten nya riktlinjer för framtida forskning.

Flera av projektets resultat har redan publicerats i framstående vetenskapliga tidskrifter, och ytterligare publikationer förbereds. Med en patentansökan i ryggen och flera lovande upptäckter, ligger projektet väl till för att bidra till framtida hållbara energilösningar genom effektivare bioteknologisk vätgasproduktion.

Summary

A research project at Uppsala University, funded by the Swedish Energy Agency and conducted between 2020 and 2024, has made significant progress in biotechnological hydrogen production, a potential key component of future sustainable energy systems. The project focused on identifying and developing more efficient variants of hydrogenases, enzymes that convert molecular hydrogen and use base metals, which could complement current technologies dependent on precious metals like platinum.

The researchers isolated over ten new hydrogenases from bacteria and archaea, with particular focus on enzymes from *Thermoanaerobacter mathranii* and *Solobacterium moorei*. Sm M2HydA showed higher activity than previous reference enzymes, while Tam M2eHydA impressed with its stability and oxygen resistance. Additionally, promising hydrogenases from archaea were identified, which are especially interesting for industrial applications, resulting in a patent application.

The project also explored how these enzymes could be integrated into cyanobacteria for biological hydrogen production. Sm M2HydA produced higher amounts of hydrogen and remained active for longer periods compared to the reference enzyme HydA1. The researchers also developed an artificial hydrogenase with high electrocatalytic capacity, as well as a solar-powered device for water splitting. Although the efficiency and stability required for large-scale applications have not yet been achieved, the results provide new directions for future research.

Several of the project's results have already been published in prominent scientific journals, with additional publications in preparation. With a patent application

underway and several promising discoveries, the project is well-positioned to contribute to future sustainable energy solutions through more efficient biotechnological hydrogen production.

Inledning/Bakgrund

Målet med detta forskningsprojekt har varit att skapa nya verktyg för att förbättra bioteknologisk vätgasproduktion, en potentiellt viktig komponent i framtidens hållbara energisystem. En nyckel till detta är att hitta och utveckla mer effektiva varianter av hydrogenaser—enzymmer som katalyserar omvandlingen av molekylärt väte. Då dessa enzymmer använder basmetaller för att utföra reaktionen med hög effektivitet så erbjuder hydrogenaser ett alternativ till dagens mer etablerade teknologier som är beroende av ovanliga och dyra metaller som t.ex. platina. När projektet inleddes var ett fåtal hydrogenasenzymmer redan karakteriserade, men vi saknade en djupare insikt kring diversiteten hos denna enzymfamilj. För att nå vårt mål har vi systematiskt undersökt olika typer av hydrogenaser och deras potential inom bioteknologiska tillämpningar. Arbetet har utförts vid Uppsala universitet, inst. för kemi – Ångström under perioden 2020 – 2024 och finansierats av Energimyndigheten.

Genomförande

Projektet har bestått av tre huvuddelar:

1. **Isolering av nya hydrogenaser:** Vi har undersökt och isolerat nya hydrogenasenzymmer från en rad mikroorganismer, inklusive både bakterier och arkéer.
2. **Karakterisering av enzymatiska egenskaper:** Vi har noggrant studerat de biokemiska och katalytiska egenskaperna hos de isolerade enzymerna, detta arbete har använt en rad olika biokemiska och elektrokemiska samt spektroskopiska metoder.
3. **Utvärdering i bioteknologiska sammanhang:** Vi har utvärderat lovande hydrogenaser inom två olika bioteknologiska system: dels i fotosyntetiska cyanobakterier och dels i mer konventionella (foto)elektrokatalytiska apparater.

Arbetet har primärt utförts av en doktorand, som rekryterats specifikt för projektet, samt projektledaren, men flera akademiska samarbetspartners har bidragit till specifika aspekter av arbetet.

Resultat

Trots en försening i projektets start, orsakad av Covid-19-pandemin, har vi under perioden 2020-2024 gjort betydande framsteg inom alla tre delprojekten. Till exempel har vi identifierat och delvis karakteriserat över tio nya hydrogenaser, varav ett enzym har optimerats ytterligare genom riktade mutationer. Samt

sammanställt och testat en fotokatalytisk apparat för ljusdriven spjälkning av vatten till syrgas och vätgas.

Inom de första två delprojekten har vi identifierat flera nya och effektiva hydrogenaser. Bland annat har vi isolerat ett M2e hydrogenas från mikroorganismen *Thermoanaerobacter mathranii* (Tam M2eHydA) och ett M2-hydrogenas från *Solobacterium moorei* (Sm M2HydA). Våra biokemiska och elektrokemiska analyser visar att Sm M2HydA är mer aktivt än det tidigare referenzenzymet HydA1 från *Chlamydomonas reinhardtii*. Samtidigt har Tam M2eHydA visat sig vara betydligt mer stabilt och syreresistent än många andra hydrogenaser. Vi har även identifierat och karakteriserat tidigare helt okända typer av hydrogenaser identifierade i arkéer, denna första studie antyder att de är extremt lovande för bioteknologiska applikationer och en patentansökan är gjord för relevanta gener.

I det tredje delprojektet har vi undersökt hur dessa hydrogenaser fungerar när de introduceras i cyanobakterien *Synechocystis sp. PCC6803*. Våra experiment visar att Sm M2HydA är särskilt lovande, med högre och mer långvarig vätgasproduktion än referenzenzymet HydA1. Vi har även utvecklat ett artificiellt hydrogenas som visar hög elektrokatalytisk kapacitet, vilket har potential för framtida användning i ljusdrivna fotoelektroder. På ett liknande sätt har vi även sammanställt en komplett apparat för vattenspjälkning som fungerar enbart med solljus utan extern energitillförsel och använder ett hydrogenas för bildandet av vätgas. Effektiviteten i denna senare apparat är fortfarande för låg för industriella applikationer, men utgör en ny benchmark för fältet. Flera nya grepp användes i designen av apparaten, vilket gör att den också visar på nya alternativa vägar framåt för denna typ av teknologier.

Flera av våra resultat har redan publicerats i framstående vetenskapliga tidskrifter (med "open access" för att möjliggöra fri tillgång till resultaten), och ytterligare manuskript förbereds för publicering.

Diskussion

Trots vissa förseningar har projektet levererat lovande resultat. Vi har framgångsrikt isolerat och börjat karakterisera flera nya hydrogenaser, och vår metod för att hitta dessa enzymer fungerar som planerat. De första testerna av vätgasproduktion i cyanobakterier visar att valet av hydrogenas har en betydande påverkan på produktiviteten, vilket öppnar för vidare studier. Utöver ytterligare förbättringar av hydrogenasenzymernas hastighet och stabilitet är en viktig framtida forskningsfråga hur vi kan optimera integreringen av hydrogenasenzym i cellens elektronflöden, för att därigenom maximera mängden vätgas som produceras. Dessutom har våra studier av artificiella hydrogenaser gett positiva resultat, även om ytterligare optimering krävs. Vi behöver även utveckla metoder för storskalig framställning av relevanta hydrogenaser.

Sammanfattningsvis visar våra resultat att vi är på rätt väg för att utveckla nya verktyg för bioteknologisk vätgasproduktion, med potential att bidra till framtida hållbara energilösningar.

Publikationslista

Vetenskapliga publikationer:

Zamader et al *Sustain. Energy Fuels*, 2023

<http://dx.doi.org/10.1039/D3SE00409K>

Artikeln beskriver framställningen av ett artificiellt hydrogenas, samt utvärdering av materialet som en katalysator för elektrokemisk vätgasproduktion. Resultaten visar att strömtätheter över $10 \text{ mA} \cdot \text{cm}^{-1}$ kan uppnås, vilket var ett av de ursprungliga målen för projektet.

Chen et al *Nature Comm* 2024 <https://doi.org/10.1038/s41467-024-47517-9>

Artikeln beskriver framställningen av en komplett prototyp för en solljusdriven vätgasproduktion, och resultaten visar hur hydrogenaser kan användas som katalysatorer i denna typ av apparater.

Grinter et al *Nature* 2023 <https://doi.org/10.1038/s41586-023-05781-7>

Artikeln beskriver karakteriseringen av det första hydrogenasenzym som klarar av att generera elektricitet från de spårmängder av vätgas som finns naturligt i vår atmosfär.

Cabotaje et al *ACS Catalysis* 2023 <https://doi.org/10.1021/acscatal.3c02314>

Artikeln beskriver karakteriseringen av en ny typ av hydrogenas, och har ökat vår förståelse för hur specifika delar av enzymets struktur påverkar deras reaktivitet.

Greening & Cabotaje et al *Cell* 2024 <https://doi.org/10.1016/j.cell.2024.05.032>

Artikeln beskriver den första identifieringen och karakteriseringen av [FeFe] hydrogenaser i arkéer. Vissa av de identifierade enzymerna uppvisar egenskaper som gör dem högintressanta ur ett bioteknologiskt perspektiv – t.ex. väldigt låga molekylvikter. En patentapplikation är inskickad för utvalda gener.

Patent application Minimalistic [FeFe]-hydrogenases from archaea
PCT/AU2024/050777

Referenser, källor

-

Bilagor

- Administrativ bilaga
- Zamader et al *Sustain. Energy Fuels*, 2023
- Chen et al *Nature Comm* 2024

- Grinter *et al Nature* 2023
- Cabotaje *et al ACS Catalysis* 2023
- Greening & Cabotaje *et al Cell* 2024