

Diss. ETH No. 14263

**Isopropylamine degradation in strain
Pseudomonas sp. KIE171.**

A dissertation submitted to the
Swiss Federal Institute of Technology Zürich

for the degree of
Doctor of Natural Sciences

presented by
Susana Ivone de Azevedo Wäsch
Diplom in Biotechnologie
Ecole Supérieure de Biotechnologie Strasbourg (ESBS)
born May 20, 1969
in Porto, Portugal

accepted on the recommendation of
Prof. Dr. T. Leisinger, examiner
Prof. Dr. B. Witholt, co-examiner
Dr. J. van der Ploeg, co-examiner

Zürich 2001

1. Summary

Pseudomonas sp. KIE171, an organism enriched and isolated from the Lonza wastewater treatment plant, was able to grow with isopropylamine or with L-alaninol as the sole carbon source. To investigate the hypothesis that L-alaninol is an intermediate in the degradation pathway of isopropylamine, the degradation of isopropylamine was mutationally blocked and the mutants obtained were examined for L-alaninol formation from isopropylamine. Two mutants (KIE171-B and KIE171-BI), unable to utilize both L-alaninol and isopropylamine were isolated. They transformed isopropylamine into L-alaninol with an enantiomeric excess of more than 99%. However, both strains were unsuitable for the production of L-alaninol, since L-alaninol accumulated but transiently in the medium and was further metabolized.

Transposon mutagenesis was used to create mutants that could not grow on isopropylamine. Genes containing the transposon insertion were cloned and the DNA regions flanking the insertions were sequenced. Two clusters, one comprising eight *ipu* (isopropylamine utilization) genes (*ipuABCDEFGH*), the other encompassing two *ipu* genes (*ipuIJ*), were identified. Sequence comparisons of the deduced Ipu proteins to protein sequences stored in the database suggested that isopropylamine degradation is initiated by a putative permease, IpuG, which transports the compound into the cytoplasm. The next step, the formation of γ -glutamylisopropylamide from isopropylamine, ATP and L-glutamate, is catalyzed by IpuC, a γ -glutamylamide synthetase. This compound is then subjected to stereospecific monooxygenation by a hypothetical three-component system IpuABD, thereby yielding γ -glutamyl-L-alaninol. Enzymatic hydrolysis by a hydrolase, IpuF, finally liberates L-alaninol and regenerates L-glutamate. No gene(s) encoding an enzyme for the next step in the breakdown of isopropylamine was found in the *ipu*-clusters. Presumably L-alaninol is oxidized by an alcohol dehydrogenase to yield L-2-aminopropionaldehyde, or it is deaminated by an ammonia lyase to yield propionaldehyde. The aldehyde formed is probably further oxidized by the hypothetical aldehyde

dehydrogenases IpuI and IpuH to either L-alanine or propionic acid, compounds which can be processed by reactions of the intermediary metabolism.

Genes *ipuC* and *ipuF* were overexpressed in *Escherichia coli*. Their products were purified and partially characterized. IpuC was found to be a γ -glutamylamide synthetase with a broad substrate range, possibly of interest for the production of γ -glutamylethylamide (theanine) and other γ -glutamylamide compounds. Purified IpuF catalyzed the hydrolysis of various γ -glutamylamides.

To obtain strains that stably accumulate L-alaninol from isopropylamine, two approaches were followed. In a first approach, the effect of inactivating both genes, *ipuI* and *ipuH*, on the accumulation of L-alaninol was examined by construction of strain KIE171-BIII. L-Alaninol produced by biotransformation with this strain remained stable in growing cell cultures and in cell suspensions. The maximum concentration obtained was 1.2 g L-alaninol per liter. In the second approach, the genes required for L-alaninol formation from isopropylamine were expressed in *Escherichia coli*, a bacterium unable to grow with L-alaninol. The recombinant plasmid pME4755, which carries the genes *ipuABCDEFG*, conferred on *Escherichia coli* the ability to transform isopropylamine to L-alaninol without further degradation of the product. Results of the present study provide a starting point for the development of an industrial process for the production of L-alaninol by biotransformation of the cheap prochiral compound isopropylamine.

Zusammenfassung

Pseudomonas sp. KIE171 wurde mit Hilfe von Anreicherungskulturen aus industriellem Klärschlamm isoliert und war fähig, sowohl auf Isopropylamin als auch auf L-Alaninol als einziger Kohlenstoffquelle zu wachsen. Um die Hypothese zu untersuchen, L-Alaninol sei ein Metabolit im Isopropylamin-Abbau, wurden die enzymatischen Schritte im Isopropylamin-Metabolismus durch Mutationen unterbrochen. Die erhaltenen Mutanten wurden auf die Synthese von L-Alaninol aus Isopropylamin hin untersucht. Die Mutanten KIE171-B und KIE171-BI waren nicht mehr in der Lage, Isopropylamin sowie L-Alaninol als Kohlenstoffquelle zu verwenden, konnten aber Isopropylamin mit einem Enantiomer-Überschuss von mehr als 99% zu L-Alaninol umsetzen. Beide Stämme waren zur Produktion von L-Alaninol ungeeignet, da sie zwischenzeitlich akkumuliertes L-Alaninol wieder abbauten.

Um die Gene des Isopropylamin-Abbauwegs zu isolieren, wurde Transposon Mutagenese eingesetzt. Gene mit Transposon-Insertionen, die zum Verlust der Fähigkeit zu Wachstum auf Isopropylamin geführt hatten, wurden isoliert, und die DNA Regionen im Bereich der Insertionen wurden sequenziert. Wir fanden zwei Gruppen von *ipu* (*i*sopropylamine *u*t ilization) Genen. Eine Gruppe umfasst acht Gene (*ipuABCDEFGH*) und die andere zwei Gene (*ipuIJ*). Die Analyse der Translationsprodukte der *ipu* Gene liess folgenden Abbauweg für Isopropylamin vermuten: Isopropylamin wird mittels der hypothetischen Permease, IpuG durch die cytoplasmatische Membran in die Zelle transportiert. In der Zelle katalysiert die γ -Glutamylisopropylamid-Synthetase IpuC die Synthese von γ -Glutamylisopropylamid aus Isopropylamin, ATP und L-Glutamat. Diese Verbindung wird nachfolgend stereospezifisch durch den hypothetischen 3-Komponenten-Monooxygenase-Komplex IpuABD hydroxyliert, wobei das Produkt γ -Glutamyl-L-Alaninol entsteht. Dieses wird durch die Hydrolase IpuF hydrolytisch gespalten, wodurch L-Alaninol und L-Glutamat freigesetzt werden. Unter den *ipu* Genen konnten keine Gene für den Abbau von L-Alaninol gefunden werden. Es wird angenommen, dass L-Alaninol entweder von einer Alkohol-Dehydrogenase zu L-2-Aminopropionaldehyd oxidiert oder von einer

Ammonium-Lyase zu Propionaldehyd umgesetzt wird. Das dabei gebildete Aldehyd könnte dann durch die hypothetischen Aldehyd-Dehydrogenasen IpuL und IpuH zu den entsprechenden Produkten L-Alanin oder Propionsäure oxidiert werden - Produkte, die im Intermediärmetabolismus verwertet werden können. Die Gene *ipuC* und *ipuF* wurden in *Escherichia coli* überexprimiert, die Proteine wurden gereinigt, und es wurde eine erste Charakterisierung unternommen. IpuC ist eine γ -Glutamylamid-Synthetase mit einem breiten Substratspektrum, mit der eine Vielzahl von γ -Glutamylamiden hergestellt werden kann, zum Beispiel auch γ -Glutamylethylamid (Theanin). IpuF katalysiert die Hydrolyse verschiedener γ -Glutamylamid-Verbindungen in L-Glutamat und das entsprechende Amin.

Die Herstellung eines Stammes, der L-Alaninol produziert, es aber nicht abbaut, wenn es sich im Biotransformations-Medium angereichert hat, wurde auf zwei Wegen realisiert.

Einerseits wurde die Mutante KIE171-BIII hergestellt, in der die beiden Gene *ipul* und *ipuh* inaktiviert sind. L-Alaninol, das durch Biotransformationen mit diesem Stamm produziert wurde, erwies sich in wachsenden Zellkulturen und in Zellsuspensionen als stabil. Die maximale Ausbeute betrug 1.2 g L-Alaninol pro Liter. Andererseits wurden die Gene, welche für die Synthese von L-Alaninol aus Isopropylamin notwendig sind, in *Escherichia coli* exprimiert, einem Organismus, der nicht auf L-Alaninol wachsen kann. Dazu wurde das rekombinante Plasmid pME4755 konstruiert, das die Gene *ipuABCDEFG* trägt. Man konnte damit bestätigen, dass es möglich ist, in *Escherichia coli* L-Alaninol aus Isopropylamin herzustellen. Diese Ergebnisse eröffnen einen Weg zur Gewinnung von L-Alaninol mittels eines biokatalytischen Prozess.