



Doctoral Thesis

Physiological basis of polyhydroxyalkanoate metabolism in *Pseudomonas putida*

Author(s):

De Roo, Guy

Publication Date:

2002

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-004447095> →

Rights / License:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

Diss. ETH No. 14756

**PHYSIOLOGICAL BASIS OF POLYHYDROXYALKANOATE METABOLISM IN
*PSEUDOMONAS PUTIDA***

A dissertation submitted to the
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZÜRICH
For the degree of
Doctor of Natural Sciences

Presented by
GUY DE ROO
MSc. Bioprosesstechnology, Wageningen Agricultural University (NL)
born July 9, 1972
in Paramaribo, Surinam

Accepted on the recommendation of
Prof. Dr. B. Witholt, examiner
Prof. Dr. Y. Poirier, co-examiner
PD Dr. T. Egli, co-examiner

Zürich, 2002

► Summary

Medium-chain-length polyhydroxyalkanoates (mcl-PHAs) are bacterial polyesters which are produced by certain pseudomonads strains as a carbon and energy reserve. These versatile polymers are typically accumulated under environmental conditions in which there is a surplus of fatty acids but a limitation for vital nutrients (N, P or S). Conversely, these mcl-PHAs can be degraded when the nutrient limitation is released.

Mcl-PHAs are receiving considerable attention because of their potential application as renewable, biodegradable and elastomeric plastics. In addition, due to the wide variety of optically active monomers that can be incorporated, mcl-PHAs could be a feedstock of chiral synthons. Although mcl-PHAs have been produced in large amounts and are intensively studied because of their material properties, not much is known about the physiology of mcl-PHA metabolism. In order to understand the molecular basis of mcl-PHA metabolism in *Pseudomonas putida* at the enzymatic level, a biochemical analysis was done on enzymes involved in mcl-PHA accumulation and degradation.

Characterization of PHA synthases, the key enzymes in mcl-PHA biosynthesis required the synthesis of various *R*-3-hydroxyacyl-CoA substrates. A straightforward process for synthesis of these precursors was developed based on methanolysis of mcl-PHA, saponification of the purified methylesters and subsequent coupling with CoA. In addition, various PHA synthase activity assays were developed allowing determination of kinetic parameters and substrate specificity. In *P. putida (oleovorans)* GPo1, two PHA synthases have been described referred to as PhaC1 and PhaC2. In this study, several functional differences were found between both granule-bound synthases which related to differential release from the PHA granule and substrate spectrum. Granule-bound PhaC1 showed a strong preference for medium chain length (mcl-) fatty acid thioesters with highest affinity towards 3-hydroxydecanoyl-CoA (40 U/mg) whereas granule-bound PhaC2 preferred long chain length (lcl-) fatty acid thioesters with highest activity towards 3-hydroxytetradecanoyl-CoA (9 U/mg). Given this unique specificity, PhaC2 can be considered as a lcl-PHA synthase which represents a new class of PHA synthases.

Isolated PHA granules were demonstrated to have simultaneous PHA synthase and PHA depolymerase activity, thereby resulting in a futile cycle. The regulation of both activities was investigated by studying the effect of various physiological effectors. PHA synthase activity appeared to be sensitive to the ratio of $[R\text{-}3\text{-hydroxyacyl-CoA}]/[\text{CoA}]$ in which free CoA was found to be a competitive inhibitor. In contrast, PHA depolymerase activity appeared not to be influenced significantly by product inhibition nor by the tested physiological compounds. Fatty acid oxidation was regulated by the ratios of $[\text{acetyl-CoA}]/[\text{CoA}]$ and $[\text{NADH}]/[\text{NAD}]$ in which high ratios resulted in accumulation and low ratios led to oxidation of 3-hydroxyacyl-

CoA. Based on the findings, a model is proposed in which PHA metabolism is suggested to be controlled mainly by the ratio of [acetyl-CoA]/[CoA] and [NADH]/[NAD].

Another level of regulation could relate to changes in the microenvironment surrounding granule-bound PHA synthase and PHA depolymerase. It was observed that the specific activity of the PHA synthases decreased 5-fold upon exponential growth of *P. putida* U on octanoate. In contrast, the specific activity of PHA depolymerase increased 1.5 fold during growth. The change of specific activity of PHA synthases and PHA depolymerase could relate to a change of interaction with the granule-bound proteins PhaF and PhaI also referred to as phasins. It was observed that during growth of the granule, the ratio of [phasins] / [PHA] decreased. In addition, it was demonstrated that eliminating phasins from the granules decreased PHA synthase activity further. A model is proposed describing the relation between granule size, level of phasins and activity of PHA synthases and PHA depolymerase.

N-terminal sequencing of proteins associated with PHA granules isolated from *P. putida* (*oleovorans*) GPO1 confirmed the presence of PhaC1 and the structural proteins PhaF and PhaI. In addition, several other enzymes were identified; a leucine aminopeptidase, the role of which is as yet unknown and a long chain length acyl-CoA synthetase which could play a central role in mobilization of mcl-PHA. These results indicate that besides enzymes which are specifically involved in PHA formation, also a range of other activities might affect the amount of mcl-PHA that is accumulated.

The work of this thesis was embedded in the international EU-research project "sustainable production of biodegradable polyesters in starch storing crop plants". Successful implementation of transgenic mcl-PHA producers such as plants requires a detailed knowledge of the molecular physiology of mcl-PHA metabolism in *Pseudomonas* species.

This study shows that the regulation of PHA metabolism in *P. putida* is exerted at the physiological level through availability of metabolites, cofactors and control and maintenance of the surface of PHA granules. Another level of regulation could relate to transcriptional control by global regulators. This merits further research.

► Zusammenfassung

Mittel-langkettige Polyhydroxyalkanoate (mcl-PHAs) sind bakterielle Polyester, welche als Kohlenstoff- und Energiequelle von verschiedenen Pseudomonaden synthetisiert werden. Diese speziellen Polymere werden in der Regel bei einem Überschuss an Fettsäuren und einem Mangel an N, S, oder P angereichert. Unter den genannten Bedingungen wird mcl-PHA synthetisiert, welche zu einem späteren Zeitpunkt, d.h. bei Aufhebung der Mangelbedingungen, wieder abgebaut werden.

Mcl-PHAs sind wegen ihres möglichen Anwendungspotentials als erneuerbare, biologisch-abbaubare, elastische Polymere von Interesse. Ausserdem können durch den Einbau einer Vielfalt von optisch aktiven Monomeren, die Monomere als Bausteine für komplexe chirale Moleküle verwendet werden. Obwohl mcl-PHAs schon im grösserem Massstab produziert und aufgrund ihrer Materialeigenschaften intensiv untersucht wurden, ist die Physiologie des mcl-PHA-Stoffwechsels noch weitgehend ungeklärt. Um die molekularen Grundlagen des mcl-PHA-Stoffwechsels in *Pseudomonas putida* auf enzymatischer Ebene zu verstehen, wurde eine biochemische Analyse der Enzyme, welche an der Synthese und dem Abbau beteiligt sind, durchgeführt.

Die Charakterisierung der Synthese-Schlüsselenzyme, der sog. PHA-Synthasen, erfordert die Herstellung von verschiedenen *R*-3-Hydroxyacyl-CoA Substraten. Es wurde ein geeigneter Syntheseprozess für diese Substrate entwickelt, welcher auf der Methanolyse von mcl-PHA, Verseifung der gereinigten Methylester und anschliessender Kopplung mit Coenzym A (CoA) basiert. Zusätzlich wurden verschiedene PHA-Synthase-Aktivitäts-Assays entwickelt, welche die Bestimmung der kinetischen Enzymparameter und der Substratspezifität ermöglichen. In *P. putida (oleovorans)* GPo1 gibt es zwei PHA-Synthasen, welche PhaC1 and PhaC2 bezeichnet werden. Betreffend Substratspektrum und Ablösung von den PHA-Granülen konnten mehrere funktionelle Unterschiede der Granülen-assoziierten Synthasen festgestellt werden. Granülen-assoziierte PhaC1 bevorzugt mittel-langkettige Fettsäurethioester und zeigt die höchste Aktivität mit 3-Hydroxydecanoyl-CoA (40 U/mg). Granülen-assoziierte PhaC2 dagegen bevorzugt langkettige Fettsäurethioester und zeigt die höchste Aktivität mit 3-Hydroxytetradecanoyl-CoA (9 U/mg). Entsprechend kann PhaC2 aufgrund des einzigartigen Substratspektrums als langkettige- (lcl-) PHA-Synthase bezeichnet werden, welche eine neue Klasse von PHA-Synthasen repräsentiert.

Weiterhin wurde beobachtet, dass an isolierten PHA-Granülen die vorhandenen PHA-Synthasen und PHA-Depolymerasen gleichzeitig aktiv sind und somit ein Kreislauf existiert. Die Regulation der beiden gegensätzlichen Aktivitäten wurde anhand des Effekts von verschiedenen physiologischen Signalen untersucht. Die PHA-Synthase-Aktivität wird durch das Verhältnis $[R\text{-}3\text{-Hydroxyacyl-CoA}]/[\text{CoA}]$ beeinflusst, wobei gezeigt wurde, dass freies

CoA als kompetitiver Hemmstoff wirkt. Im Gegensatz zur PHA-Synthase, wird die Aktivität der PHA-Depolymerase nicht durch Produkthemmung reguliert oder andere getestete physiologische Signale signifikant beeinflusst. Die Fettsäureoxidation wird durch das Verhältnis $[\text{Acetyl-CoA}]/[\text{CoA}]$ und $[\text{NADH}]/[\text{NAD}]$ reguliert, wobei ein höhere Wert zur Anreicherung und ein niedriger Wert zur Oxidation von 3-Hydroxyacyl-CoA führt. Aufgrund dieser Erkenntnisse wird ein Modell vorgeschlagen, in dem der PHA-Stoffwechsel weitgehend durch das Verhältnis $[\text{Acetyl-CoA}]/[\text{CoA}]$ und $[\text{NADH}]/[\text{NAD}]$ reguliert wird.

Eine weitere Regulationsmöglichkeit könnte im Zusammenhang mit Veränderungen im ‚Mikroklima‘ der Granülen-assozierten PHA-Synthasen und PHA-Depolymerasen stehen. Es wurde gezeigt, dass sich die spezifische Aktivität der PHA-Synthasen in der exponentiellen Wachstumsphase von *P. putida* U um das 5-fache reduziert. Dagegen konnte eine 1,5-fache Steigerung der spezifischen Aktivität der PHA-Depolymerase während des Batch wachstums beobachtet werden. Die Veränderung der spezifischen Aktivität der PHA-Synthase und PHA-Depolymerase könnte durch eine geänderte Wechselwirkung mit den Granülen-assozierten Proteinen PhaF und Phal (auch Phasine genannt) bedingt sein. Es wurde ermittelt, dass das Verhältnis $[\text{Phasine}] / [\text{PHA}]$ während des bakteriellen Wachstums abnimmt und dass das Entfernen der Phasine von den Granülen die Aktivität der PHA-Synthase reduziert. Aufgrund dieser Ergebnisse wird ein Modell vorgeschlagen, welches das Verhältnis zwischen Granüलगrösse, Phasinkonzentration und Aktivität von PHA-Synthase und PHA-Depolymerase beschreibt.

Die amino-terminale Sequenzierung der Granülen-assozierten Proteine, welche aus *P. putida* (*oleovorans*) GPo1 isoliert wurden, bestätigten die Anwesenheit von PhaC1 und der Strukturproteine PhaF und Phal. Zusätzlich wurden noch andere Enzyme identifiziert, wie z.B. eine Leucin-Amino-peptidase, deren Rolle noch nicht bekannt ist und eine langkettige Acyl-CoA-Synthetase, welche eine zentrale Rolle in der Mobilisierung des mcl-PHAs einnehmen könnte. Diese Ergebnisse deuten an, dass neben den spezifischen Enzymen, die an der Anreicherung von PHA beteiligt sind, auch noch andere Aktivitäten die PHA-Menge beeinflussen könnten.

Die beschriebenen Arbeiten wurden im Rahmen des internationalen EU-Forschungsprojektes “Sustainable production of biodegradable polyesters in starch storing crop plants” durchgeführt. Erfolgreiche Realisierung von mcl-PHA produzierenden Pflanzen erfordern ein detailliertes Wissen über die molekularen Grundlagen der Physiologie des PHA-Stoffwechsels in *Pseudomonas* Bakterien. Diese Studie zeigt, dass in *P. putida* die Regulation des PHA-Stoffwechsels auf physiologischer Ebene stattfindet, insbesondere durch die Verfügbarkeit von Metaboliten, Cofaktoren sowie durch Kontrolle der PHA Granüloberfläche.