



Doctoral Thesis

Production of (R)-3-hydroxycarboxylic acids from bacterial polyhydroxyalkanoates (PHA) and investigation of the physiological role of PHA degradation

Author(s):

Ruth, Katinka Meike

Publication Date:

2008

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-005691856> →

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. 17884

**Production of (*R*)-3-hydroxycarboxylic acids
from bacterial polyhydroxyalkanoates (PHA)
and investigation of the physiological role of PHA degradation**

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

Presented by
KATINKA MEIKE RUTH
M.Sc. Chemistry, Technical University of Munich (D)
Born January 31, 1980
in Marburg, Germany

Accepted on recommendation of
Prof. Dr. T. Egli, examiner
Dr. M. Zinn, co-examiner
Prof. Dr. D. Jendrossek, co-examiner
Prof. Dr. S. Panke, co-examiner
Dr. Q. Ren, co-examiner

St. Gallen, 2008

Summary

Pseudomonas putida GPo1 can accumulate polyhydroxyalkanoates (PHA) as carbon and energy reserve when carbon is in excess and other vital nutrients are limited. PHA is a polyester derived from condensation of activated hydroxycarboxylic acids. Hydrolysis of PHA leads to enantio-pure hydroxycarboxylic acids, which are laborious to prepare by organic syntheses. In this study, *P. putida* GPo1 was exploited to produce various *R*-3-hydroxycarboxylic acids (HA). Being multi-functional chiral synthons, HA are valuable starting materials for synthesis of pharmaceuticals, vitamins, flavors, pheromones, or antibiotics. Since approximately 150 HA have been identified in bacterial PHA, the biotechnological processes developed in this thesis provide a potential new route for the production of various enantiomerically pure chemicals.

An environmentally friendly and highly efficient way to produce different HA has been accomplished. The process developed in this thesis involves PHA accumulation, e.g., under dual-nutrient-limited growth in chemostat culture, and subsequent *in vivo* depolymerization to HA. An alkaline pH is crucial for optimal *in vivo* depolymerization in order to enhance PHA depolymerase activity and excretion of HA into the medium. As an example, we produced eight different HA, including HAs with terminal double bonds. This practical method for the production of HA is described in **chapter 2**.

Producing a mixture of different HA requires a subsequent separation for obtaining the enantio-pure chemicals. *P. putida* GPo1 synthesizes PHA from alkanes or alkanooates via the β -oxidation pathway. Thus, the precursor compounds built into PHA consist of the alkan(oates) with the original chain length and β -oxidation degradation products that are shortened by one or more C_2 units. Monomers obtained from PHA consequently are a mixture of HA whose side chains differ in the length of ethylene subunits. An efficient method for separation and purification of these compounds was developed involving column chromatography and solvent extraction. The process provides pure HA in high yields suitable as fine chemicals for industrial applications. It is environmentally friendly because the used solvents can be recycled. **Chapter 3** presents the approach to isolate several HA, produced by *in vivo* depolymerization, from the culture broth.

To further improve the efficiency of HA production from chemostat cultured cells from *P. putida* GPo1, a continuous *in vivo* bioprocess was designed by exploiting both, its PHA-synthesizing and its PHA-degrading ability. The setup includes a chemostat culture for controlled PHA accumulation from where the cells are transferred into a second reactor where the pH is shifted into the alkaline range. This process design forces HA release to the medium. The number of steps in the procedure was reduced by four, e.g., rendering unnecessary tedious resuspension of cell pellets, which probably will simplify the scale-up of HA production. In combination with high cell density cultivation, this novel bioprocess is an economical and environmentally friendly way to produce chiral HA at a high degree of purity for further applications. This procedure was patented (patent application PCT/CH2007/000156) and is described in **chapter 4**.

In the next three chapters, the process of HA production by *in vivo* depolymerization of bacterial PHA was investigated with respect to its metabolic background. Regarding underlying mechanisms, the physiological advantage of HA excretion for the bacterial cell itself was investigated. Under alkaline conditions, *in vivo* depolymerization of PHA provides a way to neutralize pH in direct cellular surrounding. Thus, HA release enhances stress tolerance and cellular survival. The intracellular pH was maintained to a certain extent in PHA-degrading cells. A hypothesis for pH homeostasis and alkaline stress tolerance is proposed in **chapter 5**, involving a mechanism controlled by either enzymatic activities or genetic regulations of the general stress response.

In order to elucidate PHA degradation pathways in *P. putida* GPo1, PHA granule-associated proteins were examined. An acyl-coenzyme A synthetase (ACS1) was discovered and its *in vivo* localization at the surface of PHA granules was confirmed by fluorescence microscopy studies with ACS-fusions with the green fluorescent protein. ACS1 is assumed to activate HA with CoA for further utilization by the cells as a carbon and energy source. A second ACS (ACS2) was cytosolic or partially associated with cellular membranes and did not seem to be directly involved in PHA metabolism. Properties of the two ACS including their *in vivo* localizations are presented in **chapter 6**.

An ACS1 knockout mutant of *P. putida* GPo1 was constructed to block the metabolic re-utilization of HA by preventing their activation with coenzyme A. When grown on fatty acids, the mutant had a prolonged lag phase, which might indicate that ACS2 has to be induced first and then can assume the role of ACS1. Preliminary data showed that the mutant accumulated less PHA and its PHA degradation was not impaired. Studies with this ACS deletion mutant allowed new insights into the role of ACS in PHA metabolism; these are described in **chapter 7**.

Hence, this thesis demonstrates an efficient method to produce HA from bacterial PHA and provides new details about PHA degradation in *P. putida* GPo1.

Zusammenfassung

Der Mikroorganismus *Pseudomonas putida* GPo1 kann Polyhydroxyalkanoate (PHA) einlagern, wenn Kohlenstoffsubstrate im Überfluss vorhanden sind und gleichzeitig ein anderer lebenswichtiger Nährstoff das Wachstum limitiert. PHA ist ein Polyester, der durch die Kondensation von aktivierten Hydroxycarbonsäuren entsteht. Die Hydrolyse von PHA führt zu enantiomerenreinen Hydroxycarbonsäuren, die mittels chemischer Synthese nur schwer herzustellen sind. In dieser Studie wurde *P. putida* GPo1 zur Herstellung verschiedener *R*-3-Hydroxycarbonsäuren (HA) benutzt. HA sind multifunktionelle chirale Synthons und damit wertvolle Ausgangsstoffe für die Synthese von Arzneimitteln, Vitaminen, Aromen, Pheromonen oder Antibiotika. In bakteriellem PHA wurden bisher rund 150 HA identifiziert. Somit ermöglicht der in dieser Arbeit entwickelte biotechnologische Herstellungsprozess voraussichtlich einen neuen Weg zur Darstellung vieler enantiomerenreiner Feinchemikalien.

Als umweltfreundlicher und effizienter Ansatz zur Herstellung von HA erwies sich die Anreicherung von PHA in Bakterien, zum Beispiel durch deren Kultivierung in doppelt Nährstoff limitierten Chemostaten, und eine darauffolgende PHA Depolymerisation zu HA in lebenden Bakterienzellen. Für eine optimale *in vivo* Depolymerisation ist ein alkalischer pH-Wert nötig, der die PHA-Depolymerase Aktivität erhöht und das Ausschleusen der HA ins Medium verstärkt. In dieser Studie wurden exemplarisch 8 HA (einschliesslich Verbindungen mit endständigen Doppelbindungen) hergestellt. Die dazu entwickelte praktische Methode ist in **Kapitel 2** beschrieben.

Um Reinstoffe zu erhalten, muss das Gemisch aus verschiedenen HA einem Trennungsvorgang unterworfen werden. *P. putida* GPo1 wandelt Alkane und Fettsäuren über die β -Oxidation in PHA um. Darum können die PHA Vorstufen um ein oder mehrere C_2 -Körper verkürzt werden, sodass PHA aus einem Copolymer besteht, dessen Seitenketten sich um die Länge von ein oder mehreren Ethylen-Untereinheiten unterscheiden. Die aus PHA gewonnenen Monomere spiegeln diese Verteilung in ihrer Zusammensetzung wider. Zu ihrer Trennung und Reinigung wurde eine effiziente Methode entwickelt, die auf Anwendung von Säulenchromatographie und Lösemittel Extraktion beruht. Mit ihr können HA als Reinstoffe für industrielle Anwendungen gewonnen werden. Alle Lösemittel können wiederverwendet werden, was die Methode umweltfreundlich macht. Die Methode zur Isolation verschiedener HA aus einer Bakterienkultur wird in **Kapitel 3** vorgestellt.

Um die Effizienz der HA Herstellung aus Chemostatkulturen von *P. putida* GPo1 weiter zu erhöhen, wurde ein kontinuierlicher Bioprozess entwickelt, der die Fähigkeit von *P. putida* GPo1 ausnutzt PHA auf- und abzubauen. Der Aufbau umfasst einen Chemostaten zur kontrollierten PHA Anreicherung und einen daran angeschlossenen zweiten Reaktor in dem der pH-Wert im alkalischen gehalten wird, was eine Ausscheidung der HA ins Medium erzwingt. Durch diesen Bioprozess wird die Zahl der Arbeitsschritte reduziert, was ein Maßstabsvergrößerung der HA Herstellung erleichtern könnte. In Kombination mit Hochzelldichten ist dies ein wirtschaftlicher und umweltfreundlicher Weg chirale HA mit hohem Reinheitsgrad zu gewinnen. Der Prozess wurde patentiert (PCT/CH2007/000156) und wird in **Kapitel 4** erläutert.

In den folgenden drei Kapiteln wurde der metabolische Hintergrund untersucht, der der HA Herstellung durch Depolymerisation von bakteriellem PHA zugrunde liegt. Der physiologische Vorteil des HA-Ausschleusens für die Bakterienzelle wurde ermittelt. Im alkalischen bietet dieser Mechanismus einen Weg die direkte Umgebung zu neutralisieren. Die HA-Ausscheidung dient also der Stresstoleranz und dem Überleben. In PHA abbauenden Zellen kann der intrazelluläre pH bis zu einem gewissen Grade aufrecht erhalten werden. Ein möglicher Mechanismus der alkalischen Stresstoleranz und der pH-Homeostasis in *P. putida* GPo1, bei dem pH-abhängige Enzymaktivitäten oder die genetische Regulationen der allgemeinen Stressantwort eine Rolle spielen, wird in **Kapitel 5** erläutert.

Um die Abbauege vom PHA besser zu verstehen, wurden die Proteine an den intrazellulären PHA Einschlüssen untersucht. Eine Acyl-Coenzym A synthetase (ACS1) wurde entdeckt und ihr Auftreten an der Oberfläche der PHA Einschlüsse durch Fluoreszenzmikroskopiestudien mit Bakterien bestätigt, die Fusionen aus ACS und Grün fluoreszierenden Protein enthielten. Vermutlich aktiviert ACS1 die HA mit CoA, um sie der Zelle als Kohlenstoff- und Energiequelle zugänglich zu machen. Eine zweite ACS (ACS2) befindet sich im Zellplasma und zum Teil an der Zellmembran. Dieses Enzym schien nicht direkt am PHA Metabolismus beteiligt zu sein. Eigenschaften der zwei ACS, insbesondere ihr Aufenthaltsort innerhalb der Zelle, werden in **Kapitel 6** vorgestellt.

Um die Aktivierung von HA mit CoA zu blockieren und so deren Verwertung im Stoffwechsel zu unterbinden, wurde eine ACS1 Knockout Mutante von *P. putida* GPo1 entwickelt. Das Wachstum der Mutante zeigte eine verlängerte Lag-Phase, wenn Fettsäuren als Kohlenstoffsubstrat zugegeben wurden. Das deutet vermutlich darauf hin, dass ACS2 zuerst induziert wird und dann die Rolle von ACS1 übernehmen kann. Erste Experimente zeigten, dass die Mutante weniger PHA einlagert und dass der PHA Abbau nicht beeinträchtigt ist. Studien mit dieser Mutante erlauben neue Einblicke in die Rolle der ACS beim PHA Stoffwechsel; diese werden im **Kapitel 7** beschrieben.

Zusammenfassend zeigt diese Arbeit eine effiziente Methode zur Herstellung von HA aus bakteriellem PHA auf und liefert neue Erkenntnisse über den PHA Abbau in *P. putida* GPo1.