

Diss. ETH No. 12459

**Biosynthesis of Medium Chain Length Poly-3-
hydroxyalkanoates: from *Pseudomonas* to *Escherichia coli***

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

**Presented by
QUN REN
MSc. Microbiology University of Shandong
born Nov. 22, 1968
citizen of China**

**Accepted on the recommendation of
Prof. Dr. B. Witholt, examiner
PD Dr. H. Brandl, co-examiner
PD Dr. T. Egli, co-examiner**

Zürich 1997

Summary

Poly-3-hydroxyalkanoates (PHAs), accumulated by fluorescent pseudomonads as intracellular storage material, have potential applications as a sustainable substitute for petrochemical based plastics. The polymerization step is carried out by the PHA polymerases which are encoded by *phaC1* and *phaC2* genes.

In this thesis, the biochemical pathways leading to PHA formation are explored in *Escherichia coli*. The analysis of PHA production levels by using different expression systems and the analysis of PHA composition by using different *E. coli* strains and by modifying relevant enzymes are described in various chapters. The effect of nutrient conditions on PHA production is studied in native *Pseudomonas* hosts.

Various *E. coli phaC2*⁺ recombinants were investigated for their ability to accumulate PHA. PHA was formed only in *E. coli fadA/B*, *E. coli fadRfadA* or *E. coli fadRfadB* mutants which are defect in specific steps of the fatty acid β -oxidation pathway. This finding provides an interesting insight into the relationship between fatty acid flux through the β -oxidation cycle, and the accumulation of a storage compound such as PHA: in wild type *E. coli* strains, the β -oxidation intermediate levels seem to be too low for PHA accumulation, while in the fatty acid degradation mutants certain intermediates accumulate and the intermediate levels are clearly high enough to allow PHA synthesis. Furthermore, more 3-hydroxyhexanoate (C6) monomers in PHAs formed by *E. coli fadA* recombinant than by *E. coli fadB* recombinant revealed that there are more than one precursor sources for PHA polymerase in *E. coli* grown on fatty acids.

Further investigation of PHA formation in *E. coli fadA* or *E. coli fadB* recombinants suggested that the expression of *phaC1* is regulated in *Pseudomonas oleovorans*, whereas that of *phaC2* seems to be constitutive.

Based on these results, a novel system for fine tuned expression of *phaC1* was constructed by using the *Palk* promoter, which is derived from the *P. oleovorans* alkane degradation system and allows efficient and tightly regulated

gene expression both in *Pseudomonas* and in *E. coli*. A detailed study of *phaCI* expression and PHA formation showed that an increase of the PHA content in *E. coli* can be achieved by using heterologous promoters, but only to a certain degree.

The physiology of PHA accumulation in the native host *Pseudomonas* under different conditions was investigated. The reason that *P. oleovorans* GPo1 is not able to synthesize PHAs from carbohydrates was found to be the too low concentration of substrates for PHA polymerase. The limited PHA production under non-starvation conditions in *P. oleovorans* GPo1 was found to be caused by the low PHA polymerase level under these conditions.

Finally, mutants were generated to study the relevant factors involved in PHA synthesis in the native host *Pseudomonas*. These mutants might allow us to study the necessary elements for high PHA production, and therefore to improve the PHA productivity in *Pseudomonas*.

Zusammenfassung

Poly-3-hydroxyalkanoate (PHAs), welche als intrazelluläres Reservematerial von fluoreszenten Pseudomonaden angehäuft werden, können möglicherweise aufgrund ihrer einzigartigen Kombination von Eigenschaften Erdöl-basierende Kunststoffe ersetzen. Der Polymerisierungsschritt wird von PHA Polymerasen durchgeführt, welche von den *phaC1* und *phaC2* Genen kodiert werden.

In der vorliegenden Arbeit wird der biochemische Syntheseweg der PHA Bildung in *Escherichia coli* untersucht. In den verschiedenen Kapiteln werden PHA Produktion und Polymerzusammensetzung infolge Anwendung verschiedener *E. coli* Stämme und Expressionssysteme, sowie Modifizierung relevanter Enzyme diskutiert. Ausserdem wurde für den natürlichen Wirtsorganismus *Pseudomonas* der Einfluss der Nährstoffbedingungen auf die PHA Produktion untersucht.

Verschiedene rekombinante *E. coli phaC2⁺* Stämme wurden auf ihre Fähigkeit untersucht, ob sie PHA anreichern können. PHA konnte jedoch nur in *E. coli fadA/B*, *E. coli fadRfadA* und *E. coli fadRfadB* Mutanten, welche in bestimmten Schritten der Fettsäure β -Oxidation blockiert sind, nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis ermöglicht einen interessanten Einblick in den Zusammenhang von Fettsäureumsetzung durch den β -Oxidationszyklus und der Akkumulation von Speicherstoffen, wie z.B. PHA: In Wildtyp *E. coli* Stämmen ist die Konzentration der β -Oxidationsintermediate zu niedrig zur PHA Akkumulation, dagegen kommt es in den β -Oxidationsmutanten zur Anreicherung von bestimmten Intermediaten, was bei entsprechend hohen Konzentration zur PHA Synthese führt. Ausserdem deutet das Auffinden von mehreren 3-Hydroxyhexanoat (C6)-Monomeren im PHA der *E. coli fadA* Rekombinanten im Vergleich zu den *E. coli fadB* Rekombinanten darauf hin, dass es in *E. coli* mehr als eine Substratquelle für die PHA Polymerase gibt, wenn diese *E. coli* Stämme auf Fettsäuren wachsen.

Weitere Untersuchungen der PHA Bildung in rekombinanten *E. coli fadA* oder *E. coli fadB* weisen darauf hin, dass die Expression von *phaC1* in *Pseudomonas* reguliert ist, die von *phaC2* scheint dagegen konstitutiv zu erfolgen.

Um ein feinreguliertes System zur Expression von *phaC1* zu erhalten, wurde der *Palk* Promotor aus *P. oleovorans* angewendet, welcher eine effiziente und gut regulierte Expression in *Pseudomonas* und *E. coli* erlaubt. Eine detaillierte Studie der *phaC1* Expression und PHA Bildung zeigte, dass, bis zu einem gewissen Grad, ein erhöhter PHA Gehalt durch Anwendung eines heterologen Promotors erzielt werden kann.

Weiterhin wurde die Physiologie der PHA Akkumulation im natürlichen Wirtsorganismus *Pseudomonas* unter verschiedenen Bedingungen untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass aufgrund der niedrigen Substratkonzentration der PHA Polymerase *P. oleovorans* GP_{ol} nicht in der Lage ist, PHA aus Kohlenhydraten zu synthetisieren. Die geringe PHA Produktion in *P. oleovorans* GP_{ol}, wenn keine Nährstoff-Limitierungen vorliegen, konnte auf die geringe PHA Polymerasekonzentration zurückgeführt werden.

Ausserdem wurden Mutanten hergestellt, um die im natürlichen Wirtsorganismus *Pseudomonas* an der PHA Synthese beteiligten Faktoren zu untersuchen. Diese Mutanten ermöglichen eine Identifizierung der notwendigen Elemente für eine hohe PHA Produktion und tragen entsprechend zur Verbesserung der PHA Produktivität bei.