BIOSYNTHESIS OF POLYHYDROXYALKANOATE BIOPLASTIC FROM GLYCEROL BY ENGINEERED *ESCHERICHIA COLI*

CHITWADEE PHITHAKROTCHANAKOON

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY
(MOLECULAR GENETICS AND GENETIC ENGINEERING)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
2014

Copyright by Mahidol University

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

BIOSYNTHESIS OF POLYHYDROXYALKANOATE BIOPLASTIC FROM GLYCEROL BY ENGINEERED *ESCHERICHIA COLI*

CHITWADEE PHITHAKROTCHANAKOON 5137026 MBMG/D

Ph.D. (MOLECULAR GENETICS AND GENETIC ENGINEERING)

THESIS ADVISORY COMMITTEE : KUSOL POOTANAKIT, Ph.D., SUTIPA TANAPONGPIPAT, Ph.D., VERAWAT CHAMPREDA, Ph.D., WIPA CHUNGJATUPORNCHAI, Ph.D., APINUNT UDOMKIT, Ph.D.

ABSTRACT

Polyhydroxyalkanoates (PHAs) are potentially used as bio-plastics. However, the high cost of PHAs limits their use in the commodity market. Crude glycerol is an alternative carbon source for PHAs production. Engineered *Escherichia coli* strains were constructed to investigate their ability to synthesize poly(3-hydroxybutyrate) [P(3HB)] and Short-Chain-Length-*co*-Medium-Chain-Length PHAs (SCL-MCL-PHAs) from pure and crude glycerol. PHA biosynthesis-related genes: ß-ketothiolase (*phaA*), acetoacetyl-CoA reductase (*phaB*) and PHA synthase (*phaC*), were cloned into pETDuet-*ABC*s and co-expressed in *E. coli* for P(3HB) biosynthesis. The *phaA* and *phaB* genes were derived from *Ralstonia eutropha* whereas 3 different *phaCs* from 3 different bacteria (*Aeromonas hydrophila, R. eutropha and Pseudomonas putida*) were used. The results showed that the amount of P(3HB) is affected by the type of PhaCs (30 wt%, 24 wt%, and 2 wt% of cell dry weight (CDW), respectively). The stage of cell and the carbon: nitrogen ratio were also found to be the key parameters influencing the amount of P(3HB). To produce SCL-MCL-PHAs, three (*R*)-specific enoyl-CoA hydratase genes from *P. putida* (*phaJ1*$_{Pp}$ and *phaJ4*$_{Pp}$) and from *A. hydrophila* (*phaJ*$_{Ah}$) were cloned into pCDFDuet-*J*s and co-transformed with pETDuet-*ABC*s. Co-expression of PhaAB with each of PhaCs and PhaJs caused *E. coli* to produce SCL-MCL-PHAs with different monomer compositions, varying from C4 to C10 from pure glycerol supplemented with dodecanoate. The fractions of MCL-unit were in correlation with the concentration of dodecanoate. When 1% crude glycerol was used as a carbon source, *E. coli*-ABC$_{Ah}$ produced P(3HB) at 14 wt% of CDW; whereas, *E. coli*-ABC$_{Ah}$J$_{Ah}$ produced P(3HB-1 mol% 3HHx) at 3 wt% of CDW when dodecanoate was included in the culture media. The molecular weight of PHAs produced was in the range of 110 to 260 kDa and the thermal properties of P(3HB-*co*-3HHx) were superior to P(3HB).

KEY WORDS: POLYHYDROXYALKANOATE / GLYCEROL / *ESCHERICHIA COLI* / COPOLYMER / HYBRID PATHWAY

Copyright by Mahidol University

139 pages

การผลิตพลาสติกชีวภาพชนิด Polyhydroxyalkanoate จากกลีเซอรอล โดย *Escherichia coli* ดัดแปลง

BIOSYNTHESIS OF POLYHYDROXYALKANOATE BIOPLASTIC FROM GLYCEROL BY ENGINEERED *ESCHERICHIA COLI*

จิตวดี พิทักษ์โรจนกุล 5137026 MBMG/D

ปร.ด. (อณูพันธุศาสตร์และพันธุวิศวกรรมศาสตร์)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์: กุศล ภูธนกิจ, Ph.D., สุทิพา ธนพงศ์พิพัฒน์, Ph.D.,
วีระวัฒน์ แช่มปรีดา, Ph.D., วิภา จึงจตุพรชัย, Ph.D., อภินันท์ อุดมกิจ, Ph.D.

บทคัดย่อ

Polyhydroxyalkanoates (PHAs) มีศักยภาพที่จะใช้เป็นพลาสติกชีวภาพ อย่างไรก็ตามตลาดการใช้งานของ PHAs ยังถูกจำกัดด้วยราคาที่สูง กลีเซอรอลดิบคือแหล่งคาร์บอนทางเลือกสำหรับการผลิต PHAs *Escherichia coli* ดัดแปลงหลายสายพันธุ์จึงถูกสร้างขึ้นเพื่อศึกษาความสามารถในการผลิต poly(3-hydroxybutyrate) [P(3HB)] และ Short-Chain-Length-*co*-Medium-Chain-Length PHAs (SCL-MCL-PHAs) จากกลีเซอรอลบริสุทธิ์และกลีเซอรอลดิบ โดยยีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิต PHA ได้แก่ ß-ketothiolase (*phaA*) acetoacetyl-CoA reductase (*phaB*) และ PHA synthase (*phaC*) ถูกโคลนเข้า pETDuet-*ABC*s และถูกเหนี่ยวนำให้แสดงออกร่วมกันใน *E. coli* เพื่อผลิต P(3HB) โดยที่ยีน *phaA* และ *phaB* มาจาก *Ralstonia eutropha* ในขณะที่ *phaCs* 3 ชนิด มาจากแบคทีเรีย 3 ชนิดคือ *Aeromonas hydrophila R. eutropha* และ *Pseudomonas putida* ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าชนิดของ *phaCs* ส่งผลต่อปริมาณของ P(3HB) ที่ผลิตได้ (30% 24% และ 2% ของน้ำหนักเซลล์แห้งตามลำดับ) ระยะของเซลล์และสัดส่วนระหว่างคาร์บอนและไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงมีผลต่อปริมาณ P(3HB) เช่นกัน และเพื่อที่จะผลิต SCL-MCL-PHAs จึงโคลนยีน (*R*)-specific enoyl-CoA hydratase 3 ชนิด จาก *P. putida* (*phaJ1*$_{Pp}$ and *phaJ4*$_{Pp}$) และ *A. hydrophila* (*phaJ*$_{Ah}$) เข้า pCDFDuet-*J*s และส่งถ่ายพร้อมกับ pETDuet-*ABC*s พบว่าการแสดงออกร่วมกันของ PhaAB กับแต่ละชนิดของ PhaCs และ PhaJs ทำให้ *E. coli* ผลิต SCL-MCL-PHAs ที่ประกอบด้วยโมโนเมอร์ที่มีจำนวนคาร์บอนตั้งแต่ 4 ถึง 10 อะตอมจากการใช้กลีเซอรอลบริสุทธิ์ร่วมกับโดเดกคาร์โนเอต และสัดส่วนของโมโนเมอร์สัมพันธ์กับความเข้มข้นของโดเดกคาร์โนเอต นอกจากนี้เมื่อกลีเซอรอลดิบถูกใช้เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า *E. coli*-ABC$_{Ah}$ ผลิต P(3HB) ได้ 14% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ในขณะที่ *E. coli*-ABC$_{Ah}$J$_{Ah}$ ผลิต P(3HB-1 mol% 3HHx) ได้ 3% ของน้ำหนักเซลล์แห้งเมื่อมีการเติมโดเดกคาร์โนเอตลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ น้ำหนักโมเลกุลของ PHAs ที่ได้อยู่ในช่วง 110 ถึง 260 กิโลดาร์ลตัน และ P(3HB-*co*-3HHx) แสดงคุณสมบัติด้านความร้อนที่ดีกว่า P(3HB)

Copyright by Mahidol University