

**FEAST AND STARVATION:  
ACCUMULATION OF BIOPLASTIC IN  
*PSEUDOMONAS OLEOVORANS***

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

presented by  
ROLAND ALEXANDER DURNER  
Dipl. Natw. ETH  
born August 31, 1966  
in Melbourne, Australia  
citizen of Dietikon, ZH

accepted on the recommendation of  
Prof. Dr. B. Witholt, examiner  
Prof. Dr. A. Steinbüchel, co-examiner  
PD Dr. H. Brandl, co-examiner  
PD Dr. Th. Egli, co-examiner



1966

## SUMMARY

---

Life in all ecosystems depends on the availability of sufficient nutrients. No growth is possible when an essential element or substrate is lacking. Synthetic media which contain all nutrients in defined amounts allow physiological studies of microorganisms. It has become common knowledge that growth kinetics are usually controlled by a single nutrient under laboratory conditions, although the existence of clearly defined dual-nutrient-limited growth conditions has been proven in chemostat culture. It has been speculated that microorganisms whose cell composition differs if grown either under carbon or under nitrogen limitation should exhibit an extensive double-nutrient-limited growth regime in continuous culture. However, experimental data in the field of multiple substrate limitations are still scarce and few practical applications of this physiological phenomenon are known.

A potentially rewarding microorganism to study the concept of multiple-nutrient-limited growth with some technical relevance is *Pseudomonas oleovorans*. This gram-negative bacterium has the ability to accumulate medium-chain-length poly[(R)-3-hydroxy-alkanoates] (mcl-PHAs) as intracellular storage compounds if grown under certain nutrient limitations. Mcl-PHAs can be extracted and purified from the bacterial cells and the resulting polymers are hydrophobic and biodegradable and are currently considered potential alternatives to commercial petrochemical plastics because they have some similar physical and chemical characteristics.

As a first approach to dual-nutrient-limited growth of *P. oleovorans* the relationship of mcl-PHA accumulation with different single carbon substrates in various cultivation systems was investigated. *P. oleovorans* was grown with citrate and four different mcl-fatty acids in batch and chemostat culture (Section 2.1). It was found that in batch cultivations with octanoate and nonanoate some PHA formation occurred during the exponential growth phase without nutrient limitation but that the rate of PHA accumulation was higher after nitrogen was exhausted. In chemostat culture, three distinct kinds of nutrient limitation were detected depending on the relative concentration of nitrogen and carbon in the medium feed. Carbon-limited growth occurred at low carbon to nitrogen ratios ( $C_0/N_0$  ratios) in the medium feed, nitrogen limitation was found at high  $C_0/N_0$  ratios and a stable zone of dual-(C/N)-nutrient-limited growth was detected in-between the single-nutrient-limited growth conditions. Additional experiments showed that the composition of cells and the location and width of the dual-nutrient-limited growth zone does not only depend

on the kind and relative concentration of nutrients available for their growth but also on their growth rate (Section 2.2).

The monomeric composition of mcl-PHA accumulated from mcl-fatty acids was investigated and the influence of the extraction procedure on the purity and molecular weight of the polymer is discussed in Section 2.3. It was found that the chain-length of the monomers accumulated in mcl-PHA is equal to or shorter than the chain-length of the substrate fed to *P. oleovorans* and that the molecular weight decreases as the number of purification steps increases.

As a practical application of dual-nutrient-limited growth mixtures of carbon substrates were fed to *P. oleovorans* in chemostat culture (Chapter 3). Although feeding of mixtures of citrate and octanoate led to simultaneous utilization of both substrates in batch as well as in continuous culture, the efficiency of mcl-PHA accumulation from octanoate was only increased substantially in batch cultures (Section 3.1). When mixtures of octanoate and nonanoate were fed to *P. oleovorans* in chemostat culture, clearly dual-nutrient-limited growth conditions were detected and both carbon substrates were accumulated in PHA (Section 3.2). Also mixtures of nonanoate and octene led to the accumulation of mcl-PHA with monomers derived from both carbon substrates (Section 3.3).

The results obtained in this work indicate that dual-nutrient-limited growth occurs in chemostat culture and that the extension of dual-nutrient-limited growth conditions is directly correlated to the difference of the cell composition between two single-nutrient-limited growth regimes. Moreover, the concept of dual-nutrient-limited growth can be used as a biotechnological tool to produce mcl-PHA with defined monomeric composition in chemostat culture.

# ZUSAMMENFASSUNG

---

Alles Leben hängt von der Verfügbarkeit von genügend Nährstoffen ab. Kein Wachstum ist möglich, wenn es an einem essentiellen Element oder Wachstumssubstrat mangelt. Synthetische Nährmedien enthalten alle Nährstoffe in definierten Konzentrationen und erlauben physiologische Untersuchungen an Mikroorganismen. Es ist allgemein bekannt, dass die Wachstumskinetik unter Laborbedingungen normalerweise von einem einzigen Nährstoff kontrolliert wird, obwohl auch die Existenz von klar definierten Bedingungen im Chemostat bewiesen wurden, bei denen zwei Nährstoffe gleichzeitig wachstumslimitierend waren. Es wurde angenommen, dass Mikroorganismen, deren Zellzusammensetzung verschieden ist, je nachdem ob sie unter Kohlenstoff- oder unter Stickstofflimitation wachsen, ein ausgeprägt doppelt-limitiertes Wachstumsverhalten im Chemostaten zeigen sollten. Nun sind aber kaum experimentelle Daten betreffend Mehrfachlimitationen veröffentlicht worden und sehr wenige praktische Anwendungen dieses physiologischen Phänomens sind bekannt.

Ein potentiell interessanter Mikroorganismus, der auch eine gewisse technische Relevanz hat, um das Konzept von Mehrfachlimitationen zu studieren, ist *Pseudomonas oleovorans*. Dieses gram-negative Bakterium kann Poly[(R)-3-hydroxyalkanoate] mit mittellangen Seitenketten (mcl-PHAs) als intrazelluläre Speicherstoffe akkumulieren, wenn es unter bestimmten Nährstofflimitationen gezüchtet wird. Mcl-PHAs können aus den Zellen extrahiert und anschliessend gereinigt werden. Die resultierenden Polymere sind wasserabstossend sowie biologisch abbaubar und werden derzeit als mögliche Alternativen zu kommerziellen, petrochemisch hergestellten Kunststoffen diskutiert weil sie einige ähnliche physikalische und chemische Eigenschaften aufweisen.

Um doppelt-limitiertes Wachstum von *P. oleovorans* zu untersuchen wurde zuerst der Zusammenhang von mcl-PHA Akkumulation mit verschiedenen Wachstumssubstraten in verschiedenen Kultivationsystemen untersucht. Dazu wurde *P. oleovorans* mit Citrat sowie mit vier verschiedenen mittellangen Fettsäuren im Batch und Chemostaten kultiviert (Kapitel 2.1). Mit Caproat (Oktanoat) und Pelargonat (Nonanoat) als Kohlenstoffquelle wurde dabei mcl-PHA Akkumulation bereits während der exponentiellen Wachstumsphase, also ohne Nährstofflimitation entdeckt, doch war die Rate höher, nachdem die Kultur durch Stickstoff limitiert war. Im Chemostaten wurden drei Arten von Nährstofflimitation gefunden, je nach dem relativen Verhältnis der Stickstoff- und Kohlenstoffquelle im Nährmedium. Kohlenstofflimitiertes Wachstum trat bei tiefen

Kohlenstoff zu Stickstoff- ( $C_0/N_0$ ) Verhältnissen auf, Stickstofflimitation wurde bei hohen  $C_0/N_0$ -Verhältnissen gefunden und eine stabile Zone von doppelt-(C/N)-limitiertem Wachstum wurde zwischen den beiden Einfachlimitationen entdeckt. Zusätzliche Experimente zeigten, dass die Zellzusammensetzung und damit die Lage und Breite der doppelt limitierten Zone nicht nur von der Art und relativen Konzentrationen von Nährstoffen abhängt, sondern auch von der Wachstumsrate (Kapitel 2.2).

Die Zusammensetzung von mcl-PHA welches beim Wachstum auf mittellangen Fettsäuren gebildet wurde, und der Einfluss des Extraktionsverfahrens auf die Reinheit und das Molekulargewicht des Polymers wird im Kapitel 2.3 diskutiert. Es wurde gefunden, dass die Kettenlänge der Monomere gleich lang oder kürzer als die Kettenlänge des Wachstumssubstrates ist, und dass das Molekulargewicht des Polymers mit jedem Reinigungsschritt weiter abnimmt.

Als praktische Anwendung von doppelt-limitiertem Wachstum wurde *P. oleovorans* im Chemostaten auf mehreren Substratgemischen kultiviert. Obwohl Citrat und Capronsäure im Batch-, wie auch im Chemostatversuch gleichzeitig verwertet wurden, war die Effizienz des Einbaus von Caproat in mcl-PHA nur im Batchversuch wesentlich erhöht. Wenn *P. oleovorans* auf Gemischen von Capronsäure und Pelargonsäure im Chemostaten gezüchtet wurde, dann wurde eine doppelt-limitierte Wachstumszone gefunden und beide Fettsäuren wurden in das mcl-PHA eingebaut. Auch Mischungen von Pelargonsäure und Okten führten zu PHA mit Monomeren, die von beiden Substraten stammten.

Die Resultate dieser Arbeit zeigen, dass doppelt-limitiertes Wachstum im Chemostaten existiert und dass die Ausdehnung von doppelt-limitiertem Wachstum direkt mit dem Unterschied der Zellzusammensetzung zwischen den beiden Einfachlimitationen zusammenhängt. Zudem kann das Konzept der Mehrfachlimitationen als biotechnologischer Ansatz benutzt werden, um mcl-PHA mit definierter Monomerzusammensetzung zu produzieren.