



Doctoral Thesis

Synthesis of functionalized poly(3-hydroxyalkanoates)(PHAs) from organic solvents by *Pseudomonas oleovorans*

Author(s):

Jung, Kuno

Publication Date:

1999

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-003885781> →

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. 13495

**SYNTHESIS OF FUNCTIONALIZED POLY(3-HYDROXYALKANOATES) (PHAS)
FROM ORGANIC SOLVENTS BY *PSEUDOMONAS OLEOVORANS***

A dissertation submitted to the
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZÜRICH

for the degree of
Doctor of Natural Science

PRESENTED BY

Kuno Jung

Dipl. Lm.-Ing. ETH

born May 28, 1969

in Lucerne, Switzerland

citizen of Lucerne, LU

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. B. Witholt, examiner

Prof. Dr. A. Steinbüchel, co-examiner

PD Dr. T. Egli, co-examiner

Zürich, 1999

SUMMARY

During the past two decades the development of biodegradable plastics obtained from renewable resources has been a major topic of ongoing research. This work has led to a number of biopolymers, which have unique and interesting properties, which might be advantageous in future applications. Of these biopolymers, polyhydroxyalkanoates (PHAs) are considered to be among the most promising candidates to compete with non-degradable oil derived plastics. However, after a successful market-entry of a PHA used for the production of biodegradable shampoo bottles ten years ago, the manufacturing of this polymer has recently been stopped. It became evident that consumers are not yet willing to pay the price for environmentally friendly commodity plastics.

Present research focuses on applications where the polymer characteristics rather than the biodegradability of PHAs are the key features in competing with the petrochemical contenders. For these applications tailor-made PHAs are required, to meet the very defined properties demanded for sophisticated applications, such as for example as implantable materials in medicine. However, only a few PHAs have been made in quantities sufficient for conclusive material analysis and application studies. This is mainly due to the fact that the production of these special PHAs in sufficient amounts is difficult.

In this thesis the development and the application of a fermentative process for the synthesis of gram-amounts of functionalized, tailor-made PHAs is presented. Different

possibilities to circumvent limiting factors in production were investigated in detail and beneficial observations were introduced into the processes. First, a method for the cultivation of the bacterium *Pseudomonas oleovorans* on the toxic alkene 1-hexene was developed and 1-hexene based PHA was found in whole cell samples. A continuous two-stage cultivation system as well as a closed loop controlled fed-batch process, with for these PHAs relatively high volumetric PHA productivities of about $1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$, were developed for lab-scale fermentations. During investigations in chemostat cultures with organic solvents as carbon sources, dual-nutrient-limited growth was observed and found to be a helpful tool for efficient PHA production. Finally, two novel and potentially interesting functionalized PHAs containing oxo- or acetoxy-groups were produced in 24 litres scale processes. Of both polymers, more than 25 grams could be isolated and purified. The physical properties were investigated and the chemical structures of the polymers were resolved by NMR analysis.

The results obtained in this work indicate that functionalized PHAs can be produced efficiently from toxic organic substrates, in sufficient amounts for detailed application studies, thus allowing a thorough screening of the application potential of exotic PHA.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Entwicklung von biologisch-abbaubaren Polymeren (Biokunststoffen) aus erneuerbaren Ressourcen war in den letzten Jahrzehnten Ziel intensiver Forschung. Es wurden eine Anzahl von Materialien gefunden, die einzigartige und teilweise sehr vorteilhafte Eigenschaften hatten. Dazu gehören die Polyhydroxyalkanoate (PHAs), welche als mögliche zukünftige Konkurrenten zu den aus Erdöl hergestellten Kunststoffen gelten. Nach einem erfolgreichen Markteintritt vor zehn Jahren als biologisch-abbaubares Schampoflaschenmaterial, wurde die kommerzielle Herstellung von PHA allerdings kürzlich aufgegeben. Die Verbraucher zeigten sich nicht Willens, die Umweltfreundlichkeit eines Gebrauchsartikels in genügendem Masse zu entgelten.

Die laufende Forschung zieht nun auf Anwendungen ab, bei denen bestimmte Eigenschaften der PHAs ein Vorteil sind und bei denen es weniger petrochemische Konkurrenzmaterialien gibt. Für solche, zum Beispiel medizinische Anwendungen, sind massgeschneiderte PHAs, die klar definierte Anforderungen erfüllen, unabdingbar. Bis heute wurden jedoch nur ein paar Wenige dieser Materialien in Mengen produziert, die ernsthafte Analysen und Studien erlaubten, denn die Herstellung von speziellen PHAs hatte sich als ausserordentlich schwierig erwiesen.

In dieser Doktorarbeit wird die Entwicklung und die Anwendung eines Bioprozesses für die Synthese von Grammengen von funktionalisierten, massgeschneiderten Polymeren

beschrieben. Verschiedene Möglichkeiten zur Umgehung von Schwierigkeiten in der Produktion wurden untersucht und wenn vorteilhaft, in den Prozess integriert.

Erst wurde eine Methode zur Kultivierung von *Pseudomonas oleovorans* Bakterien auf giftigem Alken (1-Hexen) entwickelt. Bei der Analyse von ganzen Zellen wurde aus 1-Hexen gebildetes PHA gefunden. Es wurde sowohl ein kontinuierliches Zweistufen-Kultivierungssystem als auch ein geregelter "Fedbatchprozess" entwickelt. Beide erzielten im Laborversuch eine für diese PHA vergleichsweise hohe volumetrische Produktivität von $1 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. Bei Untersuchungen in Chemostatkulturen, bei denen organische Lösungsmittel als Kohlenstoffquellen dienten, wurde doppellimitiertes Wachstum beobachtet, welches sich bei der Herstellung von PHA als hilfreich erwies. Schliesslich wurden zwei neue und interessante mit Oxo- oder Acetoxygruppen funktionalisierte PHAs in einem 24 Liter Bioreaktor produziert. Von beiden Polymeren wurden über 25 Gramm Biokunststoff isoliert und die physikalischen Eigenschaften bestimmt. Die chemische Struktur der Materialien wurde mittels aufwendiger NMR-Analytik aufgeklärt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass von toxischen Substraten stammende funktionalisierte PHAs effizient und in genügenden Mengen für detaillierte Anwendungsstudien hergestellt werden können. Dies wird eine fundierte Suche nach Anwendungspotentialen von exotischen PHAs ermöglichen.