



Doctoral Thesis

Tailored medium-chain-length poly(R)-3-hydroxyalkanoates: biosynthetic and chemical approach

Author(s):

Hartmann, René

Publication Date:

2005

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-005068985> →

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. 16234

**Tailored Medium-Chain-Length
Poly[(*R*)-3-hydroxyalkanoates]:
Biosynthetic and Chemical Approaches**

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

presented by
RENÉ HARTMANN
Dipl. Microbiol. University of Zurich
born June 15, 1971
citizen of Ebnet-Kappel, SG

accepted on the recommendation of
Prof. Dr. B. Witholt, examiner
Prof. Dr. T. Egli, co-examiner
Dr. R. Hany, co-examiner
Dr. M. Zinn, co-examiner

2005

SUMMARY

Polyhydroxyalkanoates (PHAs) are polyesters accumulated in a wide variety of bacteria as reserve material, when bacteria are supplied with an excess of carbon substrates, whereas at the same time the supply of nitrogen limits growth. PHAs are stored in form of granules and serve as carbon and energy source. The so called medium-chain-length (mcl) PHAs, a group of PHAs with a monomer length of 6 to 12 carbon atoms, have not only interesting polymer characteristics but are in addition biodegradable and can be produced from renewable resources. Furthermore, mclPHAs exhibit a high biocompatibility which allows an application of these polyesters in the medical sector. Although mclPHAs are considered as alternative to commercial petrochemical plastics since a while, so far, they were not commercially successful. The main reason for this may be due by the high production costs for PHAs compared with synthetic plastics. Present research therefore focuses on applications of this material in the medical sector, where only few petrochemical competing materials exist. For that purpose, tailor-made PHAs are required that fulfill clearly defined properties. Although to date, more than 100 different mclPHA monomers were identified, only a few mclPHAs have been made in quantities sufficient for a detailed analysis and characterization.

This doctoral thesis deals in a first part with the biosynthetic production and characterization of functionalized, tailored mclPHAs. Thereby the synthesis of tailored mclPHAs containing unsaturated side chains was the primary goal. First of all, the production of olefinic mclPHAs from mixtures of octanoic acid and undecenoic acid in batch and dual (carbon, nitrogen) nutrient limited chemostat cultures of *Pseudomonas putida* GPo1 was investigated. It could be shown that the monomeric composition of the accumulated PHAs depend in both production systems to a certain extent on the growth rate. Since the growth rate can be set exactly in chemostat cultures, this production method was evaluated to be the best for the production of tailored, olefinic mclPHAs (chapter 2). In a next step it was investigated to improve the thermal properties of olefinic mclPHAs. Therefore carbon substrate mixtures of phenylvaleric acid, octanoic acid and undecenoic acid were fed to chemostat cultures of *Pseudomonas putida* GPo1. The carbon to nitrogen (C_0/N_0) ratios in the cultivation media were chosen in such a way that dual (carbon, nitrogen)

limited growth resulted in each case. Five new, tailored PHAs could be produced that all contained an olefinic monomer ratio of 10 mol% but differed in the ratio of aromatic and aliphatic monomers. Thermal analysis of these PHAs showed a linear correlation between the glass transition temperatures of these polymers and the amounts of aromatic monomers (chapter 3). Furthermore, a two-stage continuous culture system was evaluated for the production of block polymers (chapter 4). The PHAs produced from mixtures of octanoic acid and undecenoic acid were characterized by gel permeation chromatography, differential scanning calorimetry and by crosslinking experiments. It turned out that the accumulated PHAs were mainly blends composed of an aliphatic and an olefinic polymer.

In the second part of this doctoral thesis, olefinic mclPHAs produced from octanoic acid and undecenoic acid, were chemically modified in order to obtain novel mclPHAs with improved properties. Firstly comb polymers were produced by modifying the olefinic side chains by a two-step synthesis (chapter 5). In contrast to the starting polymers, the modified polymers were crystalline materials with a filamentary texture. Furthermore silica nanoparticles were coupled to the terminal side chain double bonds of different olefinic PHAs (chapter 6). This resulted in glass-like mclPHAs with clearly higher melting points than the unmodified starting polymers.

The results obtained in this doctoral thesis show that tailored mclPHAs can be produced by biosynthetic procedures as well as by chemical modifications efficiently and in sufficient amounts for detailed material studies. This know-how of production provides a basis for the identification of new applications of mclPHAs in medicine or industry.

ZUSAMMENFASSUNG

Polyhydroxyalkanoate (PHAs) sind Polyester, die in einer Vielzahl von Bakterien als Reservestoff akkumuliert werden, wenn den Bakterien Kohlenstoffsubstrate im Überschuss angeboten werden, gleichzeitig aber das Stickstoffangebot das Wachstum limitiert. Die in Form von Granula eingelagerten PHAs dienen dabei den Mikroorganismen als Kohlenstoff- und Energiespeicher. Die sogenannten medium-chain-length (mcl) PHAs, eine Polyestergruppe deren Monomerlänge zwischen 6 bis 12 Kohlenstoffatomen liegt, haben nicht nur interessante Polymereigenschaften, sondern zeichnen sich auch dadurch aus, dass sie biologisch abbaubar sind und mit Hilfe von nachwachsenden Rohstoffen produziert werden können. Darüber hinaus weisen mclPHAs eine hohe Bioverträglichkeit auf, was eine Anwendung dieser Polyester im medizinischen Bereich ermöglicht. Obwohl mclPHAs seit einiger Zeit als Alternative zu kommerziellen, petrochemisch hergestellten Kunststoffen gehandelt werden, haben sie sich bis heute kommerziell nicht durchgesetzt. Der Hauptgrund dafür dürfte wohl darin liegen, dass PHAs gegenüber synthetischen Kunststoffen einen höheren Preis aufweisen. Die heutige Forschung fokussiert sich denn auch auf einen Einsatz dieses Werkstoffs im Medizinalsektor, wo es nur wenige petrochemische Konkurrenzmaterialien gibt. Gefragt sind hier massgeschneiderte PHAs, die klar definierte Anforderungen erfüllen. Obwohl bis heute weit über 100 verschiedene mclPHA Monomere gefunden wurden, sind nur ein paar Wenige mclPHAs in Mengen produziert worden, die eine detaillierte Analyse und Charakterisierung erlaubten.

Die hier vorliegende Doktorarbeit beschäftigt sich im ersten Teil mit der biosynthetischen Herstellung und Charakterisierung von funktionalisierten, massgeschneiderten mclPHAs. Im Fokus stand dabei die Synthese von massgeschneiderten mclPHAs mit ungesättigten Seitenketten. Als erstes wurde die Produktion von olefinischen mclPHAs aus Oktansäure und Undecensäure in Batch und doppelt (Kohlenstoff, Stickstoff) limitierten kontinuierlichen Kulturen von *Pseudomonas putida* GPo1 untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass in beiden Produktionssystemen die Monomerzusammensetzung des gebildeten PHAs bis zu einem gewissen Masse von der Wachstumsrate abhängt. Da sich in kontinuierlichen Kulturen die Wachstumsrate genau einstellen lässt, wurde diese Produktions-

methode als geeignetes Verfahren zur Synthese von massgeschneiderten olefinischen mclPHAs evaluiert (Kapitel 2). In einem weiteren Schritt wurde dann versucht die thermischen Eigenschaften von olefinischen mclPHAs zu verbessern. Dazu wurden Kohlenstoffsubstratgemische aus Phenylvalerat, Oktansäure und Undecensäure kontinuierlichen Kulturen von *P. putida* GPO1 zugeführt. Die Kohlenstoff zu Stickstoff- (C_0/N_0) Verhältnisse im Kultivationsmedium wurde dabei so gewählt, dass jeweils doppelt (Kohlenstoff, Stickstoff) limitiertes Wachstum resultierte. Fünf neue massgeschneiderte PHAs konnten so produziert werden, die alle einen olefinischen Monomeranteil von 10 mol% aufwiesen, sich jedoch im Anteil an aromatischen und aliphatischen Monomeren unterschieden. Thermische Analysen dieser PHAs zeigten einen linearen Zusammenhang zwischen dem Glasspunkt der Polymere und deren Gehalt an aromatischen Monomeren (Kapitel 3). Im Weiteren wurde ein kontinuierliches Zweistufen-Kultivationsystem zur Produktion von Blockpolymere evaluiert (Kapitel 4). Die aus Oktansäure und Undecensäure gebildeten PHAs wurden mittels Gel-Permeations-Chromatographie, dynamischer Differenzkalorimetrie sowie durch Quervernetzungsexperimente charakterisiert. Es zeigte sich, dass die PHAs überwiegend Mischungen aus einem aliphatischen und einem olefinischen Polymer darstellten.

Im zweiten Teil dieser Doktorarbeit wurden olefinische mclPHAs aus Oktansäure und Undecensäure chemisch modifiziert, um neuartige mclPHAs mit verbesserten Eigenschaften zu entwickeln. Es wurden zunächst Kammpolymere hergestellt, indem die olefinischen Seitenketten über eine Zweistufensynthese modifiziert wurden. Die modifizierten Polymere waren im Gegensatz zum Ausgangspolymer kristallin und zeigten eine faserartige Textur (Kapitel 5). Des Weiteren wurden Siliziumnanoteilchen an die endständigen Doppelbindungen verschiedener olefinischer PHAs gekoppelt (Kapitel 6). Daraus resultierten glasartige mclPHAs mit deutlich höheren Schmelzpunkten als die Ausgangspolymere.

Die Resultate dieser Doktorarbeit zeigen, dass massgeschneiderte mclPHAs sowohl durch biosynthetische Verfahren als auch durch chemische Modifikationen effizient und in genügenden Mengen für detaillierte Materialstudien hergestellt werden können. Dieses Know-how bildet die Basis für die Identifizierung neuer Anwendungen von mclPHAs in der Medizin oder Industrie.