

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2010 年 6 月 17 日(17.06.2010)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2010/067542 A1

- (51) 国際特許分類:
C08G 63/06 (2006.01) *C08L 101/16* (2006.01)
C12P 7/62 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2009/006545
- (22) 国際出願日: 2009 年 12 月 2 日(02.12.2009)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2008-313330 2008 年 12 月 9 日(09.12.2008) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 株式会社カネカ (KANEKA CORPORATION) [JP/JP];
〒5308288 大阪府大阪市北区中之島三丁目 2 番
4 号 Osaka (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 滝田昌輝
(TAKITA, Masaki). 上野雅邦(UENO, Masakuni). 浅
井洋介(ASAI, Yousuke).
- (74) 代理人: 特許業務法人 有古特許事務所
(PATENT CORPORATE BODY ARCO PATENT

OFFICE); 〒6500031 兵庫県神戸市中央区東町 1 2
3 番地の 1 貿易ビル 3 階 Hyogo (JP).

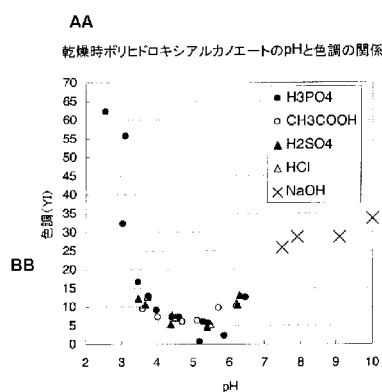
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[続葉有]

(54) Title: POLY-3-HYDROXYALKANOATE AND PROCESS FOR PRODUCTION THEREOF

(54) 発明の名称: ポリ-3-ヒドロキシアルカン酸及びその製造方法

[図1]



AA RELATIONSHIP BETWEEN pH OF POLYHYDROXYALKANOATE IN DRYING AND
COLOR TONE
BB COLOR TONE (YI)

(57) Abstract: Provided is a poly-3-hydroxyalkanoate which, when heat-melted, exhibits reduced discoloration even when other components of biological origin have not completely been removed therefrom. Also provided is a process for production of same. The discoloration of a poly-3-hydroxyalkanoate during heat -melting can be prominently reduced by drying the poly-3 -hydroxyalkanoate under acidic conditions of pH of 3.2 or above. The poly-3-hydroxyalkanoate thus obtained exhibits a YI of 25 or below as determined by subjecting 2g of the poly-3 -hydroxyalkanoate to melting at 170°C for 40 minutes and then curing at 60°C for 60 minutes.

(57) 要約:

[続葉有]

WO 2010/067542 A1



添付公開書類:

— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

ポリ-3-ヒドロキシアリカン酸以外の生物由来成分を完全に除去せずとも、加熱溶融時の着色が低減されたポリ-3-ヒドロキシアリカン酸とその製造法を提供する。本発明では、pH 3.2 以上の酸性条件下でポリ-3-ヒドロキシアリカン酸を乾燥させることにより、加熱溶融時の着色を顕著に低減することができた。このようにして得られるポリ-3-ヒドロキシアリカン酸 2 g を 170°C で 40 分間溶融させ、60°C で、60 分間硬化させて測定した YI は、25 以下であった。

明 細 書

発明の名称：ポリ－３－ヒドロキシアルカン酸及びその製造方法 技術分野

[0001] 本発明は、加熱溶融時の着色が低減されたポリ－３－ヒドロキシアルカン酸とその製造方法に関する。

背景技術

[0002] ポリ－３－ヒドロキシアルカン酸（以後、PHAと略す）は、多くの微生物種の細胞にエネルギー蓄積物質として生成、蓄積される熱可塑性ポリエステルであり、生分解性を有している。現在、環境への意識の高まりから石油由来のプラスチックが着目されている。中でも、自然界の物質循環に取り込まれ分解生成物が有害とならないPHAの様な生分解性プラスチックが注目されており、その実用化が切望されている。特に、微生物が菌体内で生成蓄積するPHAは、自然界の炭素循環プロセスに取り込まれることから生態系への悪影響が小さいと予想されている。

[0003] しかしながら、微生物から抽出したPHAは、ペレットやシートに加工する際に加熱溶融を行うと着色しやすく、外観が非常に悪くなることがあり、製品化の大きな障害となっている。そこで、その解決の手段として、着色原因として考えられる生物由来成分を、分解および／または除去する方法が提案されている。

[0004] PHA以外の生物由来成分を分解および／または除去する方法として、PHA以外の生物由来成分を物理的処理、化学的処理または生物学的処理によって可溶化させて除去する方法が提案されている。例えば、PHA含有微生物菌体を破碎する処理と界面活性剤処理を組み合わせる方法（特許文献１）、アルカリを添加し加熱処理を行った後に破碎処理を行う方法（特許文献２）などが挙げられる。その他、微生物菌体の水性懸濁液を次亜塩素酸ナトリウムや酵素などで処理してPHA以外の生物由来成分を可溶化し、PHAを得る方法（特許文献３）も提案されている。

[0005] これらの処理により達成できるPHAの精製度に関しては、PHAの純度による分析値が例示されている。例えば、酵素系ホモジナイザーおよび酸化剤を使う方法ではPHA純度が98%～99%と示されている（特許文献4）。また、破碎処理、分画、酸化剤処理を行う方法では純度が97.8%と示されている（特許文献5）。これらはクロロホルムに樹脂を溶解させ、ガスクロマトグラフィーで分析したときに得られるPHAピークの面積比や抽出前後の重量比によって求められている。

[0006] しかしながら、これらの処理を施しても、さらには組み合わせて施したとしても、PHA以外の生物由来成分を完全に除去することは困難を極める。またこれらの処理はコストの面からも工業化することが非常に困難である。従って、既存の工業的製法で製造したPHAをペレットやシートに加工する際に加熱溶融すると、PHAの着色が避けられなかった。

先行技術文献

特許文献

- [0007] 特許文献1：特表平08-502415号公報
特許文献2：国際公開第2004/065608号
特許文献3：特開2005-348640号公報
特許文献4：特開平7-177894号公報
特許文献5：特開2002-306190号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0008] このように、微生物を用いたPHAの製造において、PHA以外の生物由来成分を完全に除去することは難しく、PHAからシート作成やペレット作成、またプレス成型を実施する際の加熱溶融時に発生する着色を低減することは非常に困難であった。そこで、別のアプローチからの解決策が切望されていた。

[0009] 本発明は、PHA以外の生物由来成分を完全に除去せずとも、加熱溶融時

の着色が低減された P H A とその製造法を提供することを課題とする。

課題を解決するための手段

- [0010] 従来の製法では、残存する P H A 以外の生物由来成分を分解および除去するため、製法の過程で p H をアルカリ側にすることが一般的であった。
- [0011] 例えば、P H A 含有微生物菌体を破砕する処理と界面活性剤処理を組み合わせる方法（特許文献 1）や、アルカリを添加し加熱処理を行った後に破砕処理を行う方法（特許文献 2）は、p H をアルカリ側とすることで P H A 以外の生物由来成分の分解を促進させている。また、過酸化水素を用いた化学的分解処理により P H A 以外の生物由来成分を分解除去する方法も提示されているが、p H をアルカリ側に保ち処理することが推奨されている（国際公開第 0 4 / 0 2 9 2 6 6 号）。さらに、P H A 以外の生物由来成分を分解する方法として酵素を用いる方法も挙げられるが、用いる酵素がアルカリ性で活性を有するため、処理液をアルカリ性にせざるを得ない。総じて、従来の方法では、アルカリ側で処理するため、そこから得られた P H A もアルカリ性であった。
- [0012] 一方で、加熱溶融時に起こる P H A の着色に関するメカニズムは不明であり、P H A 以外の生物由来成分を分解および／または除去する以外、着色を回避する手段は報告されていない。
- [0013] 本発明者らは、予想外なことに、微生物から P H A を分離し、最終的に P H A を乾燥させて乾燥 P H A を得る際に、当該乾燥を酸性条件下で行うことが、加熱溶融時の P H A の着色の問題を克服するのに極めて有効であることを見出した。さらに、加熱溶融時の着色反応が最も抑制される p H 領域を見出し、本発明を完成させた。
- [0014] 本発明は、未乾燥ポリ－3－ヒドロキシアルカン酸を p H 3. 2 以上の酸性条件下で乾燥させて得られることを特徴とする乾燥ポリ－3－ヒドロキシアルカン酸に関する。
- [0015] 本発明では、乾燥ポリ－3－ヒドロキシアルカン酸が、ポリ－3－ヒドロキシアルカン酸重量当りの有機窒素量が 5 0 0 p p m 以下、4 0 0 p p m 以

下、または、300 ppm以下である未乾燥ポリ-3-ヒドロキシアルカン酸をpH 3.2以上の酸性条件下で乾燥させて得られることが好ましい。

[0016] 本発明では、乾燥ポリ-3-ヒドロキシアルカン酸が、下記(1)から(3)の中から少なくとも一つの工程を経て製造されたポリ-3-ヒドロキシアルカン酸水性懸濁液をpH 3.2以上の酸性条件下で乾燥させて得られることが好ましい。この際、前記乾燥ポリ-3-ヒドロキシアルカン酸は、脱水操作等により、前記水性懸濁液から未乾燥ポリ-3-ヒドロキシアルカン酸を回収し、当該未乾燥ポリ-3-ヒドロキシアルカン酸を乾燥させて得ることもできるし、未乾燥PHAを脱水(回収)せずに、スプレードライなどにより前記水性懸濁液を直接乾燥させて得ることもできる。

(1) ポリ-3-ヒドロキシアルカン酸を蓄積した細胞を破砕する工程、

(2) ポリ-3-ヒドロキシアルカン酸以外の生物由来成分を分解および／または除去する工程、

(3) 水および／または有機溶媒でポリ-3-ヒドロキシアルカン酸を洗浄する工程。

[0017] また本発明は、未乾燥ポリ-3-ヒドロキシアルカン酸をpH 3.2以上の酸性条件下で乾燥させることを特徴とするポリ-3-ヒドロキシアルカン酸の製造方法にも関する。

[0018] 本発明では、前記製造方法において、ポリ-3-ヒドロキシアルカン酸重量当りの有機窒素量が500 ppm以下、400 ppm以下、または、300 ppm以下である未乾燥ポリ-3-ヒドロキシアルカン酸をpH 3.2以上の酸性条件下で乾燥させることが好ましい。

さらに本発明は、ポリ-3-ヒドロキシアルカン酸であって、当該ポリ-3-ヒドロキシアルカン酸2gを170℃で40分間熔融させた後、60℃で60分間硬化させて得たポリ-3-ヒドロキシアルカン酸について測定したYIが25以下であることを特徴とするポリ-3-ヒドロキシアルカン酸にも関する。

[0019] 本発明では、前記ポリ-3-ヒドロキシアルカン酸において、ポリ-3-

ヒドロキシアルカン酸重量当りの有機窒素量が500ppm以下、400ppm以下、または、300ppm以下であるポリ-3-ヒドロキシアルカン酸2gを170℃で40分間溶融させた後、60℃で60分間硬化させて得たポリ-3-ヒドロキシアルカン酸について測定したYIが25以下であることが好ましい。

発明の効果

- [0020] 本発明によれば、PHA以外の生物由来成分を完全に除去する必要がなく、極めて簡便な手法により、加熱溶融時に発生する着色が低減されたPHAとその製造法を提供することができる。

図面の簡単な説明

- [0021] [図1]乾燥時ポリ-3-ヒドロキシアルカン酸のpHと、加熱溶融後のPHAの色調の関係を示すグラフ

発明を実施するための形態

- [0022] 本発明に用いる微生物は、細胞内にPHAを生成する微生物である限りにおいて、特に限定されない。天然から単離された微生物や菌株の寄託機関（例えばIFO、ATCC等）に寄託されている微生物、または、それらから調製し得る変異体や形質転換体等を使用できる。例えばカプリアビダス（*Cupriavidus*）属、アルカリゲネス（*Alcaligenes*）属、ラルストニア（*Ralstonia*）属、シュウドモナス（*Pseudomonas*）属、バチルス（*Bacillus*）属、アゾトバクター（*Azotobacter*）属、ノカルディア（*Nocardia*）属、アエロモナス（*Aeromonas*）属の菌等が挙げられる。特に、アルカリゲネス・リポリティカ（*A. lipolytica*）、アルカリゲネス・ラトゥス（*A. latus*）、アエロモナス・キャビエ（*A. caviae*）、アエロモナス・ハイドロフィラ（*A. hydrophila*）、カプリアビダス・ネケータ（*C. necator*）等の菌株がより好ましい。また、微生物が、本来PHAの生産能力を有しない場合、もしくは生産量が低い場合には、該微生物に目的とするPHAの合成酵素遺伝子および／またはその変異体を導入し

、得られる形質転換体を用いることもできる。このような形質転換体の作製に用いるPHAの合成酵素遺伝子としては特に限定されないが、アエロモナス・キャビエ由来のPHA合成酵素の遺伝子が好ましい。これら微生物を適切な条件で培養することで、菌体内にPHAを蓄積した微生物菌体を得ることができる。その培養方法については特に限定されないが、例えば特開平05-93049号公報等に記載された方法が用いられる。

[0023] 本発明におけるPHAとは、3-ヒドロキシアルカン酸をモノマーユニットとする重合体の総称である。構成する3-ヒドロキシアルカン酸としては特に限定されないが、具体的には、3-ヒドロキシブチレート(3HB)と他の3-ヒドロキシアルカン酸との共重合体、または、3-ヒドロキシヘキサノエート(3HH)を含む3-ヒドロキシアルカン酸の共重合体などが挙げられる。さらに、3-ヒドロキシプロピオネート、3-ヒドロキシブチレート、3-ヒドロキシバレレート、3-ヒドロキシヘキサノエート、3-ヒドロキシヘプタノエート及び3-ヒドロキシオクタノエートからなる群より選択される2種以上の3-ヒドロキシアルカン酸をモノマーユニットとする共重合体なども挙げられる。なかでもモノマーユニットとして3HHを含む共重合体、例えば、3HBと3HHとの2成分共重合体(PHBH)(Macromolecules, 28, 4822-4828(1995))、または、3HBと3-ヒドロキシバレレート(3HV)と3HHとの3成分共重合体(PHBVH)(特許第2777757号公報、特開平08-289797号公報)が、得られるポリエステルの物性の面からより好ましい。ここで3HBと3HHの2成分共重合体PHBHを構成する各モノマーユニットの組成比については特に限定されるものではないが、全モノマーユニットの合計を100モル%とした時に、3HHユニットが1~99モル%、好ましくは1~50モル%、より好ましくは1~25モル%といった組成比が好適である。また、3HBと3HVと3HHとの3成分共重合体PHBVHを構成する各モノマーユニットの組成比については特に限定されるものではないが、全モノマーユニットの合計を100モル%とした時に、例えば、3HBユニットの組成比は1~95モル

%、3HVユニットの組成比は1～96モル%、3HHユニットの組成比は1～30モル%といった範囲が好適である。

[0024] 本発明においてPHA以外の生物由来成分等の不純物を分解および／または除去する前に、予め、PHAを含有する細胞を物理的処理、化学的処理もしくは生物学的処理によって破碎することが好ましい。これにより、後の分解および／または除去工程を効率的に実施することができる。破碎の方法としては、特に限定されないが、従来公知のフレンチプレスやホモジナイザー、X-プレス、ボールミル、コロイドミル、DYNOMIL、超音波ホモジナイザーなどの、流体せん断力や固体せん断力、磨砕を利用した方法が使用しうる。また、酸やアルカリ、界面活性剤、有機溶剤、細胞壁合成阻害剤などの薬剤を用いる方法、リゾチーム、ペクチナーゼ、セルラーゼ、チモリアーゼなどの酵素を用いる方法、超臨界流体を用いる方法や、浸透圧破碎法、凍結法、乾燥粉碎法などが挙げられる。また、細胞自身に含まれるプロテアーゼやエステラーゼなどの作用を利用する自己消化法も破碎法的一种として挙げられる。上記破碎方法においては、一連の処理によるPHAの分子量低下を抑える方法を選択することが望ましい。また、これらの破碎方法は単独で用いても良いし、複数の方法を組み合わせても良い。また、バッチ処理でも良いし、連続処理を行っても良い。

[0025] 通常、上記方法にてPHA含有菌体を破碎して得たPHA水性懸濁液には、細胞中のタンパク質や核酸、脂質、糖成分およびその他の菌体構成成分や、培養基質残分などが混入している。以降に述べる分解および／または除去工程の前に、これらのタンパク質等の水溶性成分を含む水を分離する脱水工程を実施することが好ましい。これにより、PHA水性懸濁液に含まれる不純物の量を低減し、後の分解および／または除去工程を効率よく実施することができる。脱水の方法としては特に限定されないが、ろ過や遠心分離、沈降分離、電気泳動などによる方法が挙げられる。分解および／または除去工程に供する水性懸濁液中のPHAの濃度は特に限定されないが、50 g/L以上が好ましく、100 g/L以上がより好ましく、さらに好ましくは200 g

／L以上、さらにより好ましくは300g／L以上である。また、水性懸濁液中のPHAの濃度を調整することを目的に、上記脱水工程を実施してもよいし、また、新たに水を加えてもよい。

[0026] PHA以外の生物由来成分等の不純物を分解および／または除去する方法としては、特に限定されないが、例えば酵素を用いる方法を挙げることができる。使用する酵素としては、蛋白質分解酵素、脂質分解酵素、細胞壁分解酵素、核酸分解酵素等が挙げられる。これらの酵素の具体例としては下記のもの挙げられる。これらは、単独で用いてもよいし、2種以上を併用してもよい。

[0027] (1) 蛋白質分解酵素

エスペラーゼ、アルカラーゼ、ペプシン、トリプシン、パパイン、キモトリプシン、アミノペプチダーゼ、カルボキシペプチダーゼ等

(2) 脂質分解酵素

リパーゼ、ホスホリパーゼ、コリンエステラーゼ、ホスファターゼ等

(3) 細胞壁分解酵素

リゾチーム、アミラーゼ、セルラーゼ、マルターゼ、サッカラーゼ、 α -グリコシダーゼ、 β -グリコシダーゼ、N-グリコシダーゼ等

(4) 核酸分解酵素

リボヌクレアーゼ、デオキシリボヌクレアーゼ等

PHA以外の生物由来成分等の不純物の分解に用いられる酵素は、上記のものに限定されるわけではなく、工業的な製品に用いられ得るものであれば、生物由来成分を分解する活性を有する任意の酵素であってよい。また、一般に市販されている洗濯用酵素洗剤等も用いることができる。さらには、例えば、酵素の安定化剤や再汚染防止剤等と酵素とを含有する酵素組成物であってもよく、酵素のみには限定されない。好ましい蛋白質分解酵素としては、上記例示に含まれるもののうち、プロテアーゼA、プロテアーゼP、プロテアーゼN（以上、天野エンザイム社製）、エスペラーゼ、アルカラーゼ、ザビナーゼ、エバラーゼ（以上、ノボザイム社製）等が工業的に使用可能な

ものとして挙げられ、分解活性の点からも好適に使用できる。しかし、これらに限られるものではない。

[0028] 酵素処理時間は、所望の処理度を達成するまで行うのが好ましく、通常0.5～2時間である。酵素の使用量は、酵素の種類及び活性に依存し、特に制限はされないが、PHA100重量部に対して、0.001～10重量部が好ましく、さらにはコストの点から0.001～5重量部がより好ましい。

[0029] PHA以外の生物由来成分等の不純物を分解するその他の方法としては、次亜塩素酸や過酸化水素を用いる方法が挙げられる。次亜塩素酸を用いる際は、系のpHをアルカリ領域とし、熱や光、金属との接触を抑制した条件で実施することで、塩素残量の低いPHAを得ることができる。pHは8以上が望ましく、より望ましくは10以上、さらに望ましくは12以上である。処理温度は40℃以下が望ましく、より望ましくは30℃以下であり、さらに望ましくは20℃以下、確実に効果を発揮するためには10℃以下で実施することが望ましい。

[0030] 上述したように前記脱水工程では、PHAと、それ以外の生物由来成分等の不純物を含む水とを分離するために、ろ過や遠心分離等を実施することができる。ろ過の方法は特に制限がないが、ヌッチェなどを用いる方法や、吸引ろ過や加圧ろ過などの方法が望ましい。工業的にはフィルタープレス、チューブプレス、プレートプレス、ゲージプレス、ベルトプレス、スクリーンプレス、円板プレスなどの圧搾機能を有したろ過装置や、遠心脱水機、多室円筒ろ過機なども選択可能である。生産性を高める場合には多室円筒ろ過機などの連続式が望ましい。連続式ろ過機の粒子の除滓方法として、ストリング方式、スクレパー方式、プレコートスクレパー方式などが挙げられる。また、膜分離方式を用いてもよい。膜分離を含めたろ過の方法としては、デッドエンドろ過、クロスフローろ過を選択することができる。いずれもろ過性やろ材、膜などへの閉塞の程度などから選択できる。また減圧、あるいは真空にしてもよいし、加圧してもよい。また、遠心力を用いる方法であっても

良い。ろ材としては、紙、織布、不織布、スクリーン、焼結板、素焼、高分子膜、パンチングメタル、ウェッジワイヤーなど様々な素材を選択できる。いずれも生産性や閉塞の程度などから選択できる。また、ろ過助剤を用いてもよいし、用いなくともよい。ろ過助剤を用いる場合にも、ろ材に予めプレコートしておく方法（プレコート方式）、ろ過原液に予め添加しておく方法がある（ボディーフィード法）。

[0031] 前記脱水工程での遠心分離の方法は特に限定されないが、遠心沈降機や遠心脱水機等を使用できる。遠心沈降機であれば分離板型、円筒型、デカンター型が挙げられる。分離板型であれば、ディスク型、セルフクリーニング型、ノズル型、スクリュードカンター型、スキミング型などが挙げられる。それぞれ沈降成分の排出の方法により回分式と連続式がある。また遠心脱水機についても回分式と連続式が挙げられる。これらの機器によって比重差により、P H Aを含む沈降物と、培養液成分とを分離することが可能である。

[0032] 前記脱水工程で使用可能な他の方法としてはフローテーション法、電気泳動法、サイクロン処理などが挙げられる。ろ過や遠心分離、またフローテーションなどの方法を単独で用いてもよいし、組み合わせてもよい。また、P H Aのろ過性能や沈降性を向上させるために、凝集操作を実施しても良い。凝集操作に関して特に限定はされないが、例えば、国際公開第2004/033700号に記載の方法などが挙げられる。

[0033] 前記脱水工程でろ過や遠心分離などの方法でP H Aを回収した後、回収したP H Aを水等で洗浄することで、更に精製度を高めたP H Aを得ることができる。洗浄は水以外にも有機溶媒を使用してもよいし、水と有機溶媒を混合して用いても良い。また水のp Hを調整してもよい。有機溶媒を洗浄溶剤として用いる場合、好ましくは、親水性溶媒、具体的にはメタノール、エタノール、アセトン、アセトニトリル、テトラヒドロフラン、ケトン類、アミン類などを用いる。また界面活性剤などを水に添加してもよい。これらの有機溶媒や水を複数種類混合して用いてもよい。また、短時間であれば水やこれらの有機溶媒を加温あるいは蒸気として噴霧することで洗浄性を高めるこ

ともできる。

[0034] 洗浄方式は、バッチ、連続いずれの方法であってもよい。洗浄の方法は特に限定されるものではないが、攪拌による方法、ポンプなどを用いた循環による方法で洗浄液中にPHAを懸濁することで洗浄することができる。またろ過などで得られる湿状態のPHAに洗浄液を添加して洗浄することもできる。洗浄効果を高めるために、洗浄を繰り返すことは効果的である。洗浄液の使用量削減のため洗浄液に蒸留や静分離など当業者が考えうる一般的な再生処理を施した後、リサイクル使用することもできる。また洗浄液と洗浄対象PHAを向流接触させ、洗浄液使用量を削減することも有効である。

以上説明したとおり、本発明の最も好適な態様によると、細胞内にPHAを生成する能力を有する微生物を培養する培養工程、PHAを蓄積した前記微生物を破碎する破碎工程、破碎した微生物を含む水性懸濁液から水を分離する脱水工程、PHA以外の生物由来成分等の不純物を分解および／または除去する精製工程、水および／または有機溶媒でPHAを洗浄する洗浄工程、及び得られたPHA水性懸濁液から未乾燥PHAを回収する工程、未乾燥PHAをpH3.2以上の酸性条件下で乾燥させて乾燥PHAを得る乾燥工程を順次実施することにより、乾燥PHAを効率よく製造することができる。しかし本発明は必ずしも上記すべての工程を実施することを必要とするものではない。

[0035] 前記PHA水性懸濁液に含まれる溶媒は、水、水と相溶性のある有機溶媒、又は、水と前記有機溶媒との混合溶媒を含むものであってもよい。前記有機溶媒は1種類のみを使用してもよいし、2種類以上を併用してもよい。また、水と前記有機溶媒との混合溶媒中の前記有機溶媒の濃度としては、使用する有機溶媒の水への溶解度以下であれば特に限定されない。また、水と相溶性のある有機溶媒としては特に限定されるものではないが、例えばメタノール、エタノール、1-プロパノール、2-プロパノール、1-ブタノール、2-ブタノール、i s o-ブタノール、ペンタノール、ヘキサノール、ヘプタノールなどのアルコール類、アセトン、メチルエチルケトンなどのケト

ン類、テトラヒドロフラン、ジオキサンなどのエーテル類、アセトニトリル、プロピオニトリルなどのニトリル類、ジメチルホルムアミド、アセトアミドなどのアミド類、ジメチルスルホキシド、ピリジン、ピペリジンなどが挙げられる。なかでも、メタノール、エタノール、1-プロパノール、2-プロパノール、1-ブタノール、2-ブタノール、i s o-ブタノール、アセトン、メチルエチルケトン、テトラヒドロフラン、ジオキサン、アセトニトリル、プロピオニトリルなどが除去の容易さの面などから好適である。さらに、メタノール、エタノール、1-プロパノール、2-プロパノール、1-ブタノール、2-ブタノール、i s o-ブタノール、アセトンなどが入手容易であることからより好ましい。さらに好ましくは、メタノール、エタノール、アセトンである。なお、本発明の本質を損なわない限り、他の溶媒や菌体由来の成分および精製時に発生する化合物を含んでいても構わない。

[0036] P H A 水性懸濁液から未乾燥 P H A を回収するには、上述したろ過や遠心分離、フローテーション法、電気泳動法、サイクロン処理などの方法を使用できる。

[0037] 前記乾燥工程において、未乾燥 P H A を乾燥させる際の p H 条件を 3. 2 以上にする方法は特に限定されない。p H 3. 2 以上の酸性領域に調整した P H A の水性懸濁液を脱液して未乾燥 P H A を回収することで、未乾燥 P H A の p H を 3. 2 以上としてもよいし、P H A の水性懸濁液を脱液して未乾燥 P H A を回収した後に、当該未乾燥 P H A に p H を酸性に調整した水性溶液を添加することで、未乾燥 P H A の p H を 3. 2 以上としても良い。P H A の水性懸濁液の p H を 3. 2 以上の酸性領域に調整する方法は、特に限定されないが、例えば酸を添加する方法や、有機塩や無機塩を添加する方法などが使用できる。酸添加の方法を用いる場合、その酸は特に限定されず、有機酸、無機酸のいずれでもよく、揮発性の有無は問わない。また、例えば、硫酸、塩酸などの強酸、リン酸や酢酸などの弱酸いずれも使用でき、いずれでも同様の色調改善効果が得られる。また、P H A の水性懸濁液を脱液した後に、p H を酸性に調整した水性溶液を添加する際、その水性溶液の p H を

調整する際に用いる酸種は限定されず、例えば上記同様の酸が使用可能である。また、有機塩や無機塩の添加も適用でき、 pH 3.2 以上の酸性領域に調整可能な限り、 pH 水性溶液の添加と同様の効果が得られる。また、脱水洗浄の際に所定の pH に調整した水性溶液を用いて酸添加の代用とすることも可能である。

[0038] 酸性条件下で PHA を乾燥させる際、その pH の下限は 3.2 以上、好ましくは 3.3 以上、より好ましくは 3.4 以上、さらにより好ましくは 3.5 以上の酸性領域である。この pH 領域を逸脱すると、加熱溶融時の着色を促進してしまう。このメカニズムの詳細は未だに不明であるが、該 pH 領域では、加熱溶融時に起こる反応が抑制されているものと考えられる。 pH の上限は、加熱溶融時の着色を抑制する観点から、7 未満が好ましく、6.5 以下がより好ましい。乾燥の方法に関しては特に限定されず、気流乾燥機や振動乾燥機、流動層乾燥機、バンド乾燥機、回転乾燥機など当業者が考える乾燥方式を使用することができ、減圧下および加圧下での乾燥も適用できる。なお、本発明で乾燥 PHA とは実質的に揮発分が混入していない PHA を指し、これに対し、未乾燥 PHA とは、揮発分が混入しており、上述した乾燥手法により前記揮発分が除去され得る PHA を指す。

[0039] 特に微生物が産生した PHA には、タンパク質や多糖類や脂質成分などの不純物が多く付着している。少なくともこれら成分を現存する方法、例えば上記記載の方法において分解および／または除去することで、本発明の効果を顕著に得ることができる。 PHA に含まれる有機窒素量を PHA 重量当り好ましくは 500 ppm 以下、より好ましくは 400 ppm 以下、さらに好ましくは 300 ppm 以下、さらにより好ましくは 100 ppm 以下にすることで本発明の効果をより顕著に達成できる。なお、有機窒素成分は非揮発性であるので、 PHA に含まれる有機窒素量は PHA の乾燥工程の前後で変化しない。

[0040] また、乾燥工程における未乾燥 PHA の pH を酸性領域にする限りにおいて、 pH を調整する工程はどの段階に行っても良い。しかし、 PHA に付着

している生物由来成分を分解および／または除去した後に行うのが好ましく、より好ましくは、生物由来成分が十分除去された乾燥工程直前のPHAの水性懸濁液に対して行う。また、生物由来成分の分解および／または除去に関しては上記の方法を単独で行なっても良いし、それらを組み合わせて行なっても良い。これらの操作は連続式でもバッチ式でもよい。

[0041] 本発明により、YI値が25以下であるPHAを工業的に製造することが可能になった。さらに、YI値が20以下、10以下であるPHAを工業的に製造することが可能になった。ここでYI値とは、イエローインデックスのことで、最終的に得られる乾燥ポリ-3-ヒドロキシアルカン酸の色の指標であり、黄色度が低いほど良い。本発明におけるYI値は、加熱溶融を経て硬化したPHAについて測定した値を指し、具体的には、PHA 2 gを170℃で40分間溶融させた後、60℃で60分間硬化させて得たPHAについて測定した値をいう。この値が低いほど、加熱溶融による着色の程度が低いことを意味する。

[0042] 以上のようにして製造されたPHAは、色調に優れているため、フィルムやボトルなどの汎用品において、幅広い応用が期待できる。さらにPHA重量当りの有機窒素量を低減させたPHAは低アレルギーであるため医療用としての適用も期待できる。

実施例

[0043] 以下に実施例を掲げて本発明を更に詳しく説明するが、本発明はこれら実施例のみに限定されるものではない。

[0044] (実施例1)

国際公開第2008/010296号[0049]に記載のラルストニア・ユートロファKNK-005株を、同[0050-0053]に記載の方法で培養し、PHAを含有する菌体を含む菌体培養液を得た。なお、ラルストニア・ユートロファは、現在では、カプリアビダス・ネケータに分類されている。

[0045] 得られた菌体培養液を80℃で1時間滅菌した。そこに、0.2%のドデ

シル硫酸ナトリウムを添加した。さらに、pHが11.5になるように水酸化ナトリウムを添加した後、50℃で1時間保温した。その後、高圧破砕機（ニロソアビ社製高圧ホモジナイザーモデルPA2K型）で450～550 kgf/cm²の圧力で高圧破砕を行った。

[0046] 高圧破砕後の破砕液を遠心分離した後、上清を排除した。沈降したPHAに、排除した上清と同量の水を添加して、懸濁し、0.2%のドデシル硫酸ナトリウムと、PHAの1/100量のプロテアーゼ（ノボザイム社製、エスペラーゼ）を添加し、pH10で50℃に保持したまま、2時間攪拌した。得られた反応液からPHAを遠心分離により回収し、水、次いでメタノールで十分に洗浄した。得られたPHAの水性懸濁液を、PHAの濃度が10重量%になるように調整した。

[0047] その後、リン酸、酢酸、硫酸、または、塩酸を適量用いてPHA水性懸濁液のpHを図1の値に調整し、30分攪拌した後にPHAを回収した。回収した未乾燥PHAを45℃で12時間乾燥した。

[0048] 乾燥したPHA2gをスクリー管（マルエム社製No.3スクリー管21ラ45）に入れ、内温が170℃になるようにブロックヒーター（EYELA MG-2200）で40分間加温しPHAを溶融させた。溶融後のPHAを60℃の恒温槽で60分間硬化させた後、この硬化PHAについて色差計SE-2000（日本電色工業社製）によりYIを測定した。なお、色差計レンズのφ=10mmを用い反射光で測定した。また、測定は暗下で行なった。その結果、図1に示す結果が得られた。これより、PHAをpH3.2以上の酸性条件下で乾燥させることで好ましいYI値（25以下）を示すことが分かった。

[0049] また、上記で得られた乾燥PHAに対して5MのNaOHを添加し、95℃で加水分解反応を実施した。この加水分解液を等量の60%酢酸水溶液で中和し、酢酸緩衝液とニンヒドリン溶液を添加し100℃で呈色反応を行った。この呈色反応液の吸光度を日立製作所社製レシオビーム分光光度計U-1800形により測定した。この吸光度と、ロイシン試料を用いて作成した

検量線とを比較することで、加水分解前の P H A 中の P H A 重量当りの有機窒素量を算出した。加水分解前の P H A の重量あたりの有機窒素量は、概ね 5 0 0 p p m 以下であった。

[0050] (比較例 1)

実施例 1 と同じ菌体培養液を用いて、実施例 1 記載の方法で精製した P H A に対して、3 0 %水酸化ナトリウム溶液を添加して、p H がアルカリ領域 (p H 8) である 1 0 % P H A の水性懸濁液を作製した。続いて、P H A を回収し 4 5 °C で 1 2 時間乾燥した。乾燥した P H A について、実施例 1 記載の方法により Y I を測定したところ、2 9 であった。また、この P H A に含まれる P H A 重量当りの有機窒素量を実施例 1 記載の方法にて測定したところ、3 8 1 p p m であった。

請求の範囲

- [請求項1] 未乾燥ポリ－３－ヒドロキシアルカン酸をpH3.2以上の酸性条件下で乾燥させて得られることを特徴とする乾燥ポリ－３－ヒドロキシアルカン酸。
- [請求項2] ポリ－３－ヒドロキシアルカン酸重量当りの有機窒素量が500ppm以下である未乾燥ポリ－３－ヒドロキシアルカン酸をpH3.2以上の酸性条件下で乾燥させて得られることを特徴とする請求項1記載の乾燥ポリ－３－ヒドロキシアルカン酸。
- [請求項3] ポリ－３－ヒドロキシアルカン酸重量当りの有機窒素量が400ppm以下である未乾燥ポリ－３－ヒドロキシアルカン酸をpH3.2以上の酸性条件下で乾燥させて得られることを特徴とする請求項2記載の乾燥ポリ－３－ヒドロキシアルカン酸。
- [請求項4] ポリ－３－ヒドロキシアルカン酸重量当りの有機窒素量が300ppm以下である未乾燥ポリ－３－ヒドロキシアルカン酸をpH3.2以上の酸性条件下で乾燥させて得られることを特徴とする請求項3記載の乾燥ポリ－３－ヒドロキシアルカン酸。
- [請求項5] ポリ－３－ヒドロキシアルカン酸が、３－ヒドロキシプロピオネート、３－ヒドロキシブチレート、３－ヒドロキシバレレート、３－ヒドロキシヘキサノエート、３－ヒドロキシヘプタノエート、および３－ヒドロキシオクタノエートからなる群より選択される２種以上のモノマーから構成される共重合体である請求項1～4のいずれかに記載の乾燥ポリ－３－ヒドロキシアルカン酸。
- [請求項6] ポリ－３－ヒドロキシアルカン酸が、３－ヒドロキシヘキサノエートと３－ヒドロキシブチレートの２成分重合体である請求項5記載の乾燥ポリ－３－ヒドロキシアルカン酸。
- [請求項7] ポリ－３－ヒドロキシアルカン酸が、微生物により産生されたことを特徴とする請求項1～6のいずれかに記載の乾燥ポリ－３－ヒドロキシアルカン酸。

- [請求項8] 微生物が、カプリアビダス・ネケータであることを特徴とする請求項7記載の乾燥ポリ－3－ヒドロキシアルカン酸。
- [請求項9] 微生物が、アエロモナス・キャビエ由来のポリ－3－ヒドロキシアルカン酸合成酵素遺伝子および／またはその変異体を導入した形質転換体であることを特徴とする請求項7記載の乾燥ポリ－3－ヒドロキシアルカン酸。
- [請求項10] 下記（１）から（３）の中から少なくとも一つの工程を経て製造されたポリ－3－ヒドロキシアルカン酸水性懸濁液をpH3.2以上の酸性条件下で乾燥させて得られることを特徴とする請求項1～9のいずれかに記載の乾燥ポリ－3－ヒドロキシアルカン酸。
- （１）ポリ－3－ヒドロキシアルカン酸を蓄積した細胞を破碎する工程、
- （２）ポリ－3－ヒドロキシアルカン酸以外の生物由来成分を分解および／または除去する工程、
- （３）水および／または有機溶媒でポリ－3－ヒドロキシアルカン酸を洗浄する工程。
- [請求項11] 未乾燥ポリ－3－ヒドロキシアルカン酸をpH3.2以上の酸性条件下で乾燥させることを特徴とするポリ－3－ヒドロキシアルカン酸の製造方法。
- [請求項12] ポリ－3－ヒドロキシアルカン酸重量当りの有機窒素量が500ppm以下である未乾燥ポリ－3－ヒドロキシアルカン酸をpH3.2以上の酸性条件下で乾燥させることを特徴とする請求項11記載のポリ－3－ヒドロキシアルカン酸の製造方法。
- [請求項13] ポリ－3－ヒドロキシアルカン酸重量当りの有機窒素量が400ppm以下である未乾燥ポリ－3－ヒドロキシアルカン酸をpH3.2以上の酸性条件下で乾燥させることを特徴とする請求項12記載のポリ－3－ヒドロキシアルカン酸の製造方法。
- [請求項14] ポリ－3－ヒドロキシアルカン酸重量当りの有機窒素量が300p

p m以下である未乾燥ポリ－３－ヒドロキシアルカン酸をp H 3. 2以上の酸性条件下で乾燥させることを特徴とする請求項 1 3 記載のポリ－３－ヒドロキシアルカン酸の製造方法。

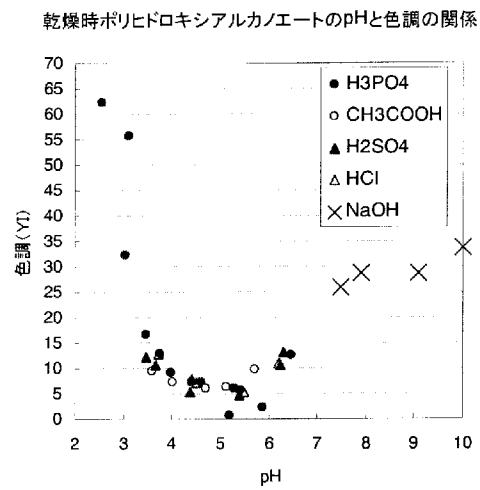
[請求項15] ポリ－３－ヒドロキシアルカン酸であって、
当該ポリ－３－ヒドロキシアルカン酸 2 g を 1 7 0 °C で 4 0 分間溶融させた後、6 0 °C で 6 0 分間硬化させて得たポリ－３－ヒドロキシアルカン酸について測定したY I が 2 5 以下であることを特徴とするポリ－３－ヒドロキシアルカン酸。

[請求項16] ポリ－３－ヒドロキシアルカン酸重量当りの有機窒素量が 5 0 0 p p m以下である請求項 1 5 記載のポリ－３－ヒドロキシアルカン酸。

[請求項17] ポリ－３－ヒドロキシアルカン酸重量当りの有機窒素量が 4 0 0 p p m以下である請求項 1 6 記載のポリ－３－ヒドロキシアルカン酸。

[請求項18] ポリ－３－ヒドロキシアルカン酸重量当りの有機窒素量が 3 0 0 p p m以下である請求項 1 7 記載のポリ－３－ヒドロキシアルカン酸。

[図1]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/006545

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C08G63/06(2006.01)i, C12P7/62(2006.01)i, C08L101/16(2006.01)n

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C08G63/00-64/42, C12P7/62, C08L101/16

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2010
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2010	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2010

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	WO 2006/025375 A1 (Riken, Japan), 09 March 2006 (09.03.2006), paragraphs [0001], [0006], [0008], [0011] to [0014], [0029]; claims; tables 1 to 4; fig. 1 to 12 & US 2008/0207870 A1 & EP 1785444 A1	1-7, 10-18 8, 9
Y	JP 2008-223002 A (Tokyo Institute of Technology, Kaneka Corp.), 25 September 2008 (25.09.2008), claims 1 to 9; paragraphs [0001], [0009], [0012], [0014], [0017] (Family: none)	8, 9

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date

“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
25 February, 2010 (25.02.10)

Date of mailing of the international search report
09 March, 2010 (09.03.10)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/006545

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2004/065608 A1 (Kaneka Corp.), 05 August 2004 (05.08.2004), entire text & US 2006/0084161 A1 & EP 1609868 A1 & CA 2512031 A & BR 406622 A & PL 376468 A & CN 1738904 A	1-18
A	WO 2005/049692 A1 (Kaneka Corp., The Procter & Gamble Co.), 02 June 2005 (02.06.2005), entire text & US 2005/0222373 A1 & EP 1693397 A1 & CA 2544588 A	1-18
A	JP 08-289797 A (Research Institute of Innovative Technology for the Earth, The Institute of Physical and Chemical Research), 05 November 1996 (05.11.1996), entire text (Family: none)	1-18

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. C08G63/06(2006.01)i, C12P7/62(2006.01)i, C08L101/16(2006.01)n

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. C08G63/00-64/42, C12P7/62, C08L101/16

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 1 0 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 0 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 0 年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X Y	WO 2006/025375 A1（独立行政法人理化学研究所）2006.03.09, 【0001】，【0006】，【0008】，【0011】～【0014】，【0029】，請求の 範囲，表1－表4，図1－図12 & US 2008/0207870 A1 & EP 1785444 A1	1-7, 10-18 8, 9
Y	JP 2008-223002 A（国立大学法人東京工業大学、株式会社カネカ） 2008.09.25, 【請求項1】～【請求項9】，【0001】，【0009】，【0012】， 【0014】，【0017】（ファミリーなし）	8, 9

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

2 5 . 0 2 . 2 0 1 0

国際調査報告の発送日

0 9 . 0 3 . 2 0 1 0

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁（I S A / J P）

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官（権限のある職員）

小出 直也

4 J

4 5 1 5

電話番号 03-3581-1101 内線 3457

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	WO 2004/065608 A1 (株式会社カネカ) 2004.08.05, 文献全体 & US 2006/0084161 A1 & EP 1609868 A1 & CA 2512031 A & BR 406622 A & PL 376468 A & CN 1738904 A	1-18
A	WO 2005/049692 A1 (株式会社カネカ、ザ プロクター アンド ギャンブル カンパニー) 2005.06.02, 文献全体 & US 2005/0222373 A1 & EP 1693397 A1 & CA 2544588 A	1-18
A	JP 08-289797 A (財団法人地球環境産業技術研究機構、理化学研究所) 1996.11.05, 文献全体 (ファミリーなし)	1-18