(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2013-521802
(P2013-521802A)
(43)公表日　平成25年6月13日(2013.6.13)

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード（参考）
C12P 7/62 (2006.01)	C12P 7/62	4B064

審査請求 未請求　予備審査請求 有　（全 28 頁）

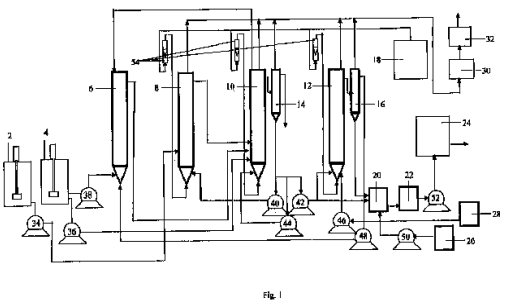
(21)出願番号	特願2013-500028 (P2013-500028)
(86)(22)出願日	平成23年3月10日 (2011.3.10)
(85)翻訳文提出日	平成24年11月12日 (2012.11.12)
(86)国際出願番号	PCT/SG2011/000094
(87)国際公開番号	WO2011/112154
(87)国際公開日	平成23年9月15日 (2011.9.15)
(31)優先権主張番号	1004096.2
(32)優先日	平成22年3月12日 (2010.3.12)
(33)優先権主張国	英国 (GB)

(71)出願人　512237084
ジーファイブ　インターナショナル　ホールディングス　プティ　リミテッド
シンガポール国、シンガポール　４１６０１９、シュン　リ　インダストリアル　パーク、ナンバー０１－００、カキ　ブキット　アベニュー　１、１６９
(74)代理人　100099324
弁理士　鈴木　正剛
(72)発明者　ボロディマイヤ　イヴァノブ
シンガポール国、シンガポール　６３９７９８、ナンヤング　アベニュー　５０、ヌトゥ、シー、エヌ１

最終頁に続く

(54)【発明の名称】ポリヒドロキシアルカノエートの製造

(57)【要約】
ポリヒドロキシアルカノエート（ＰＨＡ）を生産するためのプロセスが提供されており、該プロセスは、培地でＰＨＡ生産微生物を含むバイオマスを培養する工程と、ＰＨＡ含有微生物からＰＨＡを取り出すために選択された顕微微生物を使用して前記ＰＨＡ生産微生物を加水分解する工程と、を含む。
さらに、ＰＨＡ生産微生物とＰＨＡ非生産微生物を含む培地において、ＰＨＡ非生産微生物よりもＰＨＡ生産微生物の比率を高める方法およびＰＨＡ含有微生物からＰＨＡを抽出する方法が提供される。
【選択図】図１



【特許請求の範囲】
【請求項１】
ポリヒドロキシアルカノエート（ＰＨＡ）を生産するためのプロセスであって、
ＰＨＡ生産微生物含有バイオマスを培地で培養する工程と、
ＰＨＡ含有微生物から選択した顕微微生物を使用して前記ＰＨＡ生産微生物を加水分解する工程と、を含むプロセス。
【請求項２】
前記培地は水素ガスを含む、請求項１記載のプロセス。
【請求項３】
前記培地に水素ガス流を注入する工程を含む、請求項２記載の方法。
【請求項４】
前記培地に揮発性有機化合物を供給する工程を含む、前述の請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項５】
揮発性有機化合物を含むガスを前記培地に注入する工程を含む、請求項４記載のプロセス。
【請求項６】
生産されるＰＨＡの量に対して、質量比０．５～５で前記培地への揮発性有機化合物の供給を維持する工程を含む、請求項４または５に記載のプロセス。
【請求項７】
前記培地は炭素栄養源を含む、前述の請求項のいずれかに記載のプロセス。
【請求項８】
前記炭素栄養源は炭水化物を含む、請求項７記載のプロセス。
【請求項９】
生産されるＰＨＡの量に対して、質量比０．０１～０．１で前記培地への水素供給を維持する工程を含む、請求項２または３に記載のプロセス。
【請求項１０】
生産されるＰＨＡの量に対して、質量比１～５で前記培地への炭水化物供給を維持する工程を含む、前述の請求項のいずれかに記載のプロセス。
【請求項１１】
生産されるＰＨＡの質量に対して、質量比０．５～５で前記培地への有機酸および脂質のうちの少なくとも一方の供給を維持する工程を含む、前述の請求項のいずれかに記載のプロセス。
【請求項１２】
前記培地のｐＨを６～８の範囲に維持する工程を含む、前述の請求項のいずれかに記載のプロセス。
【請求項１３】
前記培地のｐＨを維持する工程は、前記培地に有機酸を供給する工程を含む、請求項１２記載のプロセス。
【請求項１４】
前記培養工程の間、前記培地を通常の好気状態に維持する工程を含む、前述の請求項のいずれかに記載のプロセス。
【請求項１５】
前記培養工程の間、前記培地は０．１ｍｇＬ$^{-1}$～１ｍｇＬ$^{-1}$の溶存酸素を含む、請求項１４記載のプロセス。
【請求項１６】
前記培養工程の間、前記培地を１００ｍｇＬ$^{-1}$～１０００ｍｇＬ$^{-1}$の有機炭素に維持する工程を含む、前述の請求項のいずれかに記載のプロセス。
【請求項１７】
前記培養工程は、培養ゾーンで前記ＰＨＡ生産微生物を培養する工程を含み、前記水素

ガスは前記培地にわたって実質的に均一に分散される、前述の請求項のいずれかに記載のプロセス。
【請求項１８】
前記培養工程の前に、前記プロセスは微生物発酵ゾーンにおいてＰＨＡ生産微生物集団を発酵させる工程を含む、前述の請求項のいずれかに記載のプロセス。
【請求項１９】
前記微生物発酵ゾーンはＰＨＡ生産微生物含有の微生物の天然源で満たされる、請求項１８記載のプロセス。
【請求項２０】
前記微生物発酵ゾーンは実質的に嫌気状態に維持される、請求項１８または１９記載のプロセス。
【請求項２１】
前記微生物発酵ゾーンにおいて水素ガスを生産する工程を含む、請求項１８から２０のいずれかに記載のプロセス。
【請求項２２】
前記微生物発酵ゾーンから前記揮発性有機化合物を得る工程を含む、請求項１８から２１のいずれかに記載のプロセス。
【請求項２３】
前記揮発性有機化合物を得る工程は、前記発酵ゾーン上方の気相を除去する工程を含む、請求項２２記載のプロセス。
【請求項２４】
前記微生物発酵ゾーンをｐＨ５～８に維持する工程を含む、請求項１８から２１のいずれかに記載のプロセス。
【請求項２５】
前記微生物発酵ゾーンを－５０ｍＶ～－４００ｍＶの還元電位に維持する工程を含む、請求項１８から２３のいずれかに記載のプロセス。
【請求項２６】
前記培養工程後、前記プロセスは前記培養されたＰＨＡ生産微生物からＰＨＡを抽出する工程を含む、前述の請求項のいずれかに記載のプロセス。
【請求項２７】
前記抽出工程は、前記ＰＨＡを取り出すために、前記ＰＨＡ生産微生物を加水分解する工程を含む、請求項２５記載のプロセス。
【請求項２８】
前記加水分解工程は、バクテリア細胞壁を加水分解する酵素を放出する顕微微生物を使用することを含む、請求項２６記載のプロセス。
【請求項２９】
前記バクテリア細胞壁を加水分解する酵素を放出する顕微微生物は、アブシディア（Ａｂｓｉｄｉａ）属、アガリクス（Ａｇａｒｉｃｕｓ）属、アスペルギルス（Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ）属、Ｃｈａｅｔｐｍｉｕｍ属、フザリウム（Ｆｕｓａｒｉｕｍ）属、ニューロスポーラ（Ｎｅｕｒｏｓｐｏｒａ）属、ペニシリウム（Ｐｅｎｉｃｉｌｌｉｕｍ）属、Ｐｈａｎｅｒｏｐｔｉａｅｔｅ属、フィアロフォラ（Ｐｈｉａｌｏｐｈｏｒａ）属、Ｐｌｅｕｒｏｔｕｓ属、Ｒｈｉｚｏｃｔｏｎｉａ属、およびトリコデルマ（Ｔｒｉｃｈｏｄｅｒｍａ）属からの菌よりなる群から選択される、請求項２７記載のプロセス。
【請求項３０】
前記加水分解工程の前に、前記ＰＨＡ生産微生物は前記バイオマスから実質的に分離される、請求項２６から２９のいずれかに記載のプロセス。
【請求項３１】
前記抽出工程は、抽出ゾーンで通常の酸性条件で行われる、請求項２６から２９のいずれかに記載のプロセス。
【請求項３２】

前記抽出ゾーンの酸性条件とは、ｐＨが２～５の範囲内である、請求項３０記載のプロセス。
【請求項３３】
前記微生物から前記取り出されたＰＨＡを分離する工程をさらに含む、請求項２８から３１のいずれかに記載のプロセス。
【請求項３４】
前記抽出工程は前記分離工程と同時に行われ、これにより前記加水分解酵素と前記取り出されたＰＨＡとの接触時間が短縮される、請求項３２記載のプロセス。
【請求項３５】
前記抽出ゾーンに酸化剤を導入する工程を含む、請求項２９記載のプロセス。
【請求項３６】
ＰＨＡ含有微生物からＰＨＡを抽出する方法であって、該方法は、前記ＰＨＡ含有微生物からＰＨＡを取り出すために前記ＰＨＡ含有微生物の前記細胞壁を加水分解する工程と、前記取り出されたＰＨＡを前記微生物から分離する工程と、を含む方法。
【請求項３７】
前記加水分解工程は、バクテリア細胞壁を加水分解する酵素を放出する顕微微生物を用いる工程を含む、請求項３６記載の方法。
【請求項３８】
前記バクテリア細胞壁を加水分解する酵素を放出する顕微微生物は、アブシディア（Ａｂｓｉｄｉａ）属、アガリクス（Ａｇａｒｉｃｕｓ）属、アスペルギルス（Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ）属、Ｃｈａｅｔｐｍｉｕｍ属、フザリウム（Ｆｕｓａｒｉｕｍ）属、ニューロスポーラ（Ｎｅｕｒｏｓｐｏｒａ）属、ペニシリウム（Ｐｅｎｉｃｉｌｌｉｕｍ）属、Ｐｈａｎｅｒｏｐｔｉａｅｔｅ属、フィアロフォラ（Ｐｈｉａｌｏｐｈｏｒａ）属、Ｐｌｅｕｒｏｔｕｓ属、Ｒｈｉｚｏｃｔｏｎｉａ属、およびトリコデルマ（Ｔｒｉｃｈｏｄｅｒｍａ）属からの菌よりなる群から選択される、請求項３７記載の方法。
【請求項３９】
前記加水分解工程は前記分離工程と同時に行われ、これにより前記加水分解酵素と前記取り出されたＰＨＡとの接触時間が短縮される、請求項３６から３８のいずれかに記載の方法。
【請求項４０】
前記分離工程は、浮上分離法、遠心分離法、膜分離法のうちの少なくとも１つを用いる、請求項３６から３８のいずれかに記載の方法。
【請求項４１】
ポリヒドロキシアルカノエート（ＰＨＡ）を生産するためのプロセスであって、
（ａ）ＰＨＡ生産微生物とＰＨＡ非生産微生物とを含む培地を、前記ＰＨＡ非生産微生物よりも前記ＰＨＡ生産微生物を高速に増殖できる条件下で選択ゾーンにおいて培養する工程であって、前記培養工程は前記ＰＨＡ非生産微生物よりも多くのＰＨＡ微生物を有する培地を生産するために一定期間行われるものであり、
（ｂ）水素ガス含有の培地に前記ＰＨＡ生産微生物を培養するために、前記培養工程（ａ）で生産された前記培地を培養ゾーンに供給する工程と、
（ｃ）前記供給工程（ａ）で生産された前記ＰＨＡを抽出ゾーンに供給する工程であって、前記ＰＨＡ生産微生物は前記ＰＨＡ含有微生物からＰＨＡを取り出すために顕微微生物により加水分解されるものであって、
（ｄ）前記ＰＨＡを前記培地から分離する工程と、を含むプロセス。
【請求項４２】
前記（ａ）から（ｄ）の工程のうちの少なくとも１つの工程は非無菌状態で行われる、請求項４１記載のプロセス。
【請求項４３】
前記工程（ｂ）で生産された前記ＰＨＡ生産微生物の少なくとも一部を前記選択ゾーンに戻す工程を含む、請求項４１または４２に記載のプロセス。

【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本願は、ポリヒドロキシアルカノエートあるいはポリヒドロキシアルカン酸塩（ＰＨＡ：polyhydroxyalkanoate）の製造プロセスに関する。
【背景技術】
【０００２】
ポリヒドロキシアルカノエート（ＰＨＡ）は、増殖制限条件下で多くの種類のバクテリアのバイオマスに蓄積されるポリエステルである。ＰＨＡは生分解性であり再生可能資源から生産可能なことから、生分解性ではない石油由来のプラスチックの代替物として使用される。周知のプロセスでは、ＰＨＡの無菌培養を導入している。しかし、そのようなプロセスでは、選択された、つまり遺伝子組み換えされたバクテリア菌株を培養する必要がある。さらに、そのようなプロセスでは、専用装置の他に材料や器具も加熱殺菌する必要がある。無菌培養は非無菌培養よりも数倍の費用がかかる。
【発明の概要】
【発明が解決しようとする課題】
【０００３】
ＰＨＡを生産するための安価な炭素源やエネルギー源が検討される。そのような炭素源やエネルギー源となるのは、都市下水、都市下水処理場の活性汚泥、製紙工場廃水、コーンスティープリカー、モラセス、ヤシ油工場廃水の活性スラッジ、デンプンおよびデンプン含有廃棄物、工場廃水含有脂肪酸、である。いくつかの周知プロセスでは、有機廃棄物を酸発酵し、生産された有機酸をＰＨＡ生産微生物種により重合してＰＨＡを生産している（つまり、２ステージシステムである）。
【０００４】
炭素源やエネルギー源が多すぎるとグリコーゲン蓄積顕微微生物が増殖してしまうことがあるが、これについては、揮発性脂肪酸の混合物を使って培地を酸性化することで解決することができる。ＰＨＡ合成物の脂肪酸は有機廃棄物から生産されうる。通常、有機廃棄物をＰＨＡ生産バクテリアによりさらに利用されうる脂肪酸に変換する際の第１工程が加水分解および酸発酵である。しかし、様々な有機廃棄物を使って発酵を行う場合は、残留溶存有機物および粒子によりバイオマス中のＰＨＡ生産量が減少してしまうことが多く、さらに生産されるＰＨＡの質も低下してしまう。
【０００５】
他の公知となっているプロセスでは、有機物を一酸化炭素および水素を使って熱によりガス化し、続いてこのガスを細胞物質へバクテリア吸収あるいは細菌同化することでＰＨＡが生産される。しかし、このような方法は、光合成細菌に対して嫌気条件のもとでしか適用できず、これが１つの難点となっている。従って、このような方法では、適用可能な、ＰＨＡの生産に使用されうる有機物の種類が限定されてしまうことが多い。
【０００６】
ＰＨＡを生産するうえで、いくつかの周知技術でも特異的選択法を導入し、ＰＨＡ生産顕微微生物を選択するようにしている。ＰＨＡ生産顕微微生物を選択する１つの周知の選択方法では、まず細胞が栄養制限なく所望の濃度にまで増殖され、その後、必須栄養素を制限してＰＨＡを合成する、というフィースト－ファミンサイクル(FF：Feast-Famine cycle)が発酵リアクタに適用される。しかし、このような方法を用いることができるのはバッチ処理とセミバッチ処理とに限られる。さらに、このような方法では、ＰＨＡ非生産顕微微生物が、滞留ＰＨＡ生産顕微微生物の増殖に有害となりうる好ましくないレベルにまで蓄積しないようにするためにオペレーション条件を制限する必要がある。このような方法では、顕微微生物は飢餓状態にある間、細胞飢餓に起因して本来の細胞挙動を頻繁に長期間変化させる傾向がある。このことがＰＨＡ生産顕微微生物などの顕微微生物の増殖率に悪影響を及ぼすおそれがある。顕微微生物が「細胞飢餓モード」に切り替わると、ＰＨＡ生産顕微微生物のＰＨＡ生産能力にも悪影響を及ぼすおそれがある。加えて、多くのフ

ィーストーファミンサイクルが実行されると、上述のようにＰＨＡを生産しない顕微微生物やＰＨＡ収率の低い顕微微生物が蓄積されることで、細胞濃度が高まることにより、滞留ＰＨＡ生産顕微微生物の増殖に悪影響を及ぼすおそれがある。さらに、起動期間が長いことから、バッチ生産には高額な起動費がかかる。

【０００７】

さらに、ＰＨＡグラニュール（PHA粒体）及び細胞バイオマスが固体であることから、ＰＨＡの回収は技術的に難しい。現在の技術によれば、ＰＨＡ含有バイオマスは、乾燥バイオマスをＰＨＡの有機溶剤で抽出することにより、あるいは、細胞破壊物質を添加して化学的に、あるいは、酵素により処理される。一般に、細胞をミリングしたり還元剤で処理した後に抽出が可能になる。

【０００８】

ＰＨＡを化学的に抽出する際に可燃性の毒性有機溶剤を使用せずに済むように、より安全な溶剤を用いたその他の方法が開発されている。例えば、タンパク質分解酵素を用いることができる。しかし、そのようなプロセスは費用がかかるだけでなく、大規模なオペレーションに対しては修正することができず、さらに該プロセスから得られるＰＨＡの割合は相対的に少ない。換言すれば、ＰＨＡを抽出する周知技術は相対的に非効率的であり、望ましいスループットを得ることができない。

【０００９】

つまり、ＰＨＡを生産する現在の周知技術には、いくつかの難点がある。以下にそれらの難点を記載する。

１）選択された、つまり遺伝子組み換えされた菌株を無菌培養する必要があり、これには装置や培地を殺菌するために、さらにＰＨＡを生合成する間、無菌状態に保つために高額な費用がかかること、

２）比較的高額な栄養素、例えば、純粋な無機塩やグルコース、あるいはその他の炭素源やエネルギー源を使用する必要があること、

３）パッチ処理に限定され、さらにＰＨＡ生産顕微微生物の通常の細胞挙動を破壊するおそれがある選択技術を用いる必要があること、

４）バクテリア細胞からＰＨＡを抽出するために、高額で可燃性の毒性有機溶剤を用いたり、エネルギーを消費するような方法を用いる必要があること。

【００１０】

さらに、ＰＨＡを合成し抽出する周知の方法は費用がかかり、環境を汚染し、さらに工業化するのが難しいという問題がある。従って、上述した難点を克服するか、少なくとも改善することができるＰＨＡの生産方法を提供することが求められている。さらに、上述した難点を克服するか、少なくとも改善することができるＰＨＡ生産顕微微生物を選択する方法を提供することが求められている。さらに、上述した難点を克服するか、少なくとも改善することができるＰＨＡ生産顕微微生物からＰＨＡを抽出するための方法を提供することが求められている。

【課題を解決するための手段】

【００１１】

第１の態様によれば、ポリヒドロキシアルカノエート（ＰＨＡ）を生産するためのプロセスが提供される。該プロセスは、培地でＰＨＡ生産微生物含有バイオマスを培養する工程と、前記ＰＨＡ含有微生物からＰＨＡを取り出すために選択される微生物により前記ＰＨＡ生産微生物を加水分解する工程と、を含む。上記プロセスでは溶剤を使用せずにＰＨＡを抽出することができるという点で有利であり、多くの利点を有する。まず、微生物（マイクローブ)を使用してＰＨＡを抽出することで、生産コストが削減される。これは、化学溶剤を使用せずにＰＨＡを得ることができるので化学溶剤を購入する必要がなくなることから、溶剤が材料費ではなくなるためである。従って、ここに開示したプロセスを用いてより経済的にＰＨＡを生産することができる。次に、顕微微生物を使用してＰＨＡを抽出することで溶剤を使用せずに済むことから、廃棄が必要となる有毒物が産出されない。

【００１２】
さらに有利なことに、該プロセスでは、ＰＨＡを抽出する際に可燃性の毒性有機毒性溶剤を使用せずに済む。該プロセスは、ＰＨＡの生産コストを削減でき、さらに可燃性の毒性有機溶剤の使用により生じるおそれのある環境への悪影響を和らげることができ、よって石油由来のプラスチックよりもＰＨＡプラスチックの経済的実行可能性を高めることができる。一実施形態では、培地は水素ガスを含む。別の実施形態では、該プロセスはさらに水素ガス流を前記培地に注入する工程を含む。好適には、この水素ガスを前記培地全体に実質的に均一に分散する。水素ガス流を前記培地に注入することで、前記培地に水素ガスを注入しない場合よりもＰＨＡの収率が増加する。
【００１３】
一実施形態では、培地は炭水化物源などの炭素栄養源を含む。炭水化物源の存在により顕微微生物にエネルギー源が供給され、これによりＰＨＡが生産できるようになる。該プロセスはさらに、生産されるＰＨＡの質量に対する質量比が０．０１～０．１の範囲で培地への水素供給を維持する工程を含むようにしてもよい。特定の質量比を維持することにより、相対的に高水準のＰＨＡを生産できることが知得されている。該プロセスはさらに、生産されるＰＨＡの質量に対する質量比が１～５の範囲で培地への炭水化物供給を維持する工程を含むようにしてもよい。さらに、生産されるＰＨＡの質量に対する、存在する炭水化物の質量比は、ＰＨＡの一定の有効生産量を維持するうえで極めて重要であることが知得されている。該プロセスはさらに、生産されるＰＨＡの質量に対する質量比が０．５～５の範囲で培地への有機酸と脂質の少なくとも一方の供給を維持する工程をさらに含みうる。同様に、有機酸や脂質の量により生産されるＰＨＡのコンシステンシーや水準が決定されることも知得されている。
【００１４】
一実施形態では、該プロセスは前記培地に揮発性有機化合物（ＶＯＣ）を供給する工程を含む。別の実施形態では、該プロセスはさらに、揮発性有機化合物を含むガスを前記媒体に注入する工程を含む。さらに該プロセスは、生産されるＰＨＡの量に対して０．５～５の範囲の質量比で培地へのガス状揮発性有機化合物の供給を維持する工程を含みうる。生産されるＰＨＡの質量に対する、供給される揮発性有機化合物の質量比は、ＰＨＡの一定の有効生産量を維持するうえで極めて重要である。意外にも、前記培地に揮発性有機化合物を注入しない場合よりも揮発性有機化合物を含むガスを前記培地に注入する場合のほうがＰＨＡの生産収率が増加することが知得されている。揮発性有機化合物を培地に添加すると、側鎖に置換基を導入することによってＰＨＡの合成が強化される。有利なことに、揮発性有機化合物の使用を導入したプロセスを広範囲の微生物に対して好気条件下で用いることができる。このことは嫌気条件下で用いる場合よりもバクテリアの増殖およびＰＨＡの生産により効果的である。揮発性有機化合物はＰＨＡ生産のために炭素源とエネルギー源とを供給しうる。有利なことに、ＶＯＣをガス状態で培地に供給することで高純度のＶＯＣを供給することができる。これは、液体のＶＯＣには不純物が含まれていることがあるが、ガス状態のＶＯＣには不純物が含まれていないためである。
【００１５】
一実施形態では、該プロセスは、培地のｐＨを６～８の範囲に維持する工程を含む。有利なことに、ｐＨを特定の範囲に維持することでＰＨＡの生産量が全体的に増加する。培地のｐＨを維持する工程は、前記培地に有機酸を供給する工程を含みうる。
【００１６】
一実施形態では、該プロセスは、前記培養工程の間、前記培地を通常の好気状態に維持する工程を含む。前記培養工程の間、該培地は０．１ｍｇＬ$^{-1}$～１ｍｇＬ$^{-1}$の溶存酸素を含みうる。
【００１７】
別の実施形態では、該プロセスは、前記培養工程の間、１００ｍｇＬ$^{-1}$～１０００ｍｇＬ$^{-1}$の有機炭素を含むように培地を維持する工程を含みうる。
【００１８】

該プロセスは前記培養工程の前に、微生物発酵ゾーンにＰＨＡ生産微生物集団を発酵させる工程をさらに含みうる。この微生物発酵ゾーンをＰＨＡ生産微生物を含む微生物の天然源で満たすようにしてもよい。揮発性有機化合物と水素とを生産するために前記発酵ゾーンで使用されうる微生物や顕微微生物としては、アセトバクター（Ａｃｅｔｏｂａｃｔｅｒ）属、バクテロイデス（Ｂａｃｔｅｒｏｉｄｅｓ）属、クロストリジウム（Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ）属、シトロバクター（Ｃｉｔｒｏｂａｃｔｅｒ）属、エンテロバクター（Ｅｎｔｅｒｏｂａｃｔｅｒ）属、ムーレラ（Ｍｏｏｒｅｌｌａ）属、プロピオニバクテリウム（Ｐｒｏｐｉｏｎｉｂａｃｔｅｒｉｕｍ）属、ルミノコッカス（Ｒｕｍｉｎｏｃｏｃｃｕｓ）属、サーモアナエロビウム（Ｔｈｅｒｍｏａｎａｅｒｏｂｉｕｍ）属などの種が挙げられうるが、これらに限定されない。

【００１９】

一実施形態では、微生物発酵ゾーンは実質的に嫌気状態に維持される。一実施形態では、該プロセスは前記微生物発酵ゾーンで水素を生産する工程を含む。有利なことに、上述のように、生産される水素を培地への注入に使用してもよい。

【００２０】

一実施形態では、前記発酵ゾーンは、液相および気相から構成される。別の実施形態では、該プロセスは、前記微生物発酵ゾーンから揮発性有機化合物を得る工程を含む。一実施形態では、この揮発性化合物を得る工程は、前記発酵ゾーンに隣接するかその上方の気相を除去する工程を含む。有利なことに、上述のように、生産される揮発性有機化合物を培地への注入に使用してもよい。微生物発酵ゾーンは５～８の範囲のｐＨに維持されうる。さらに、微生物発酵ゾーンは、－５０ｍＶ～－４００ｍＶの還元電位に維持されうる。

【００２１】

第２の態様によれば、ＰＨＡ生産微生物とＰＨＡ非生産微生物とを含む培地において、ＰＨＡ非生産微生物よりもＰＨＡ生産微生物の比率を高める方法が提供されている。該方法は、ＰＨＡ非生産微生物よりも多くのＰＨＡ微生物を有する培地を生産するために、ＰＨＡ非生産微生物よりもＰＨＡ生産微生物を高速に増殖することを可能にする条件のもとで、一定期間、前記培地を選択ゾーンで培養する工程（ａ２）を含む。有利なことに、該方法は正の選択を与えるものであり、ＰＨＡ生産微生物は増殖率を高めるために「選択」される。さらに有利なことに、該方法によって細胞飢餓により生じる微生物の細胞挙動が不利に変更されることはない。これにより、ＰＨＡ生産微生物は、全体の増殖率やＰＨＡの生産率をそれほど低下させずに、ＰＨＡを継続的に増殖、繁殖および生産できる。このＰＨＡ生産微生物としては、アシネトバクター（Ａｃｉｎｅｔｏｂａｃｔｅｒ）属、アルカリゲネス（Ａｌｃａｌｉｇｅｎｅｓ）属、アルカニボラクス（Ａｌｃａｎｉｖｏｒａｘ）属、アゾトバクター（Ａｚｏｔｏｂａｃｔｅｒ）属、バチルス（Ｂａｃｉｌｌｕｓ）属、ブルクホルデリア（Ｂｕｒｋｈｏｌｄｅｒｉａ）属、デルフチア（Ｄｅｌｆｔｉａ）属、クレブシエラ（Ｋｌｅｂｓｉｅｌｌａ）属、マリノバクター（Ｍａｒｉｎｏｂａｃｔｅｒ）属、シュードモナス（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）属、ラルストニア（Ｒａｌｓｔｏｎｉａ）属、リゾビウム（Ｒｈｉｓｏｂｉｕｍ）属などの種が挙げられるが、これらに限定されない。

【００２２】

一実施形態では、工程（ａ２）の前に、該方法は、ＰＨＡ生産微生物中のＰＨＡ量を増やすために培地に炭素源を供給する工程（ａ１）をさらに含む。有利なことに、この工程によりＰＨＡ生産微生物が高速に繁殖できるようになり、さらに該工程により、これらの顕微微生物中のＰＨＡ量を回復し増やすことができる。

【００２３】

別の実施形態では、供給工程（ａ１）と培養工程（ａ２）とは別々のチャンバで行われる。このようにすることで、供給工程（ａ１）と培養工程（ａ２）とを２つのそれぞれ別のオペレーション条件で同時に行うことができる。このため、該方法を連続プロセスに用いることができ、その結果、膨大なオペレーション時間を節約することができ、さらに、プロセスの全体効率を高めることができ、有利である。

【００２４】
一実施形態では、該方法は、培養工程（ａ２）が行われるチャンバから培地を渡し、供給工程（ａ１）が行われている他のチャンバに（ａ２）に戻す工程（ａ３）をさらに含む。上記工程により、炭素源の存在下で、「正の選択」が行われたＰＨＡ生産微生物が炭素源を高速に吸収できるようになり、その結果、ＰＨＡの生産量を全体的に増やすことができる。好適には、工程（ａ１）、（ａ２）、および（ａ３）の各々を連続して行う。これにより、供給工程と培養工程間の培地サイクルを連続的に行うことを可能とし、ＰＨＡの生産に加えて、「正の選択」を高速に行うことができるという点で有利である。さらに有利なことに、該方法を連続プロセスに組み込むことができ、また、該方法はバッチ処理における使用だけに限定されない。したがって全体のスループットを高めることができる。

【００２５】
一実施形態では、培地は供給工程（ａ１）が行われるチャンバに約６～２４時間滞留する。培地は培養工程（ａ２）が行われるチャンバに０．５～２時間滞留しうる。一実施形態では、培地が培養工程（ａ２）が行われるチャンバに滞留する時間に対して、供給工程（ａ１）が行われるチャンバに滞留する時間の比率は５～１５である。培養工程（ａ２）において、溶存酸素は１ｍｇＬ$^{-1}$～１０ｍｇＬ－に維持されうる。有利なことに、上記条件の各々は、該方法の全体の成功と有効性に関係する。

【００２６】
第３の態様によれば、ＰＨＡ含有微生物からＰＨＡを抽出する方法が提供されている。該方法は、ＰＨＡ含有微生物からＰＨＡを取り出すためにＰＨＡ含有微生物の細胞壁を加水分解する工程と、前記取り出されたＰＨＡを前記微生物から分離する工程と、を含む。有利なことに、該方法はＰＨＡ含有微生物からＰＨＡを抽出するための費用効果的かつ実効的な方法である。

【００２７】
一実施形態では、この加水分解工程は、バクテリア細胞壁を加水分解する酵素を放出する微生物を使用する工程を含む。この、バクテリア細胞壁を加水分解する酵素を放出する微生物は、アブシディア（Ａｂｓｉｄｉａ）属、アガリクス（Ａｇａｒｉｃｕｓ）属、アスペルギルス（Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ）属、Ｃｈａｅｔｐｍｉｕｍ属、フザリウム（Ｆｕｓａｒｉｕｍ）属、ニューロスポーラ（Ｎｅｕｒｏｓｐｏｒａ）属、ペニシリウム（Ｐｅｎｉｃｉｌｌｉｕｍ）属、Ｐｈａｎｅｒｏｐｔｉａｅｔｅ属、フィアロフォラ（Ｐｈｉａｌｏｐｈｏｒａ）属、Ｐｌｅｕｒｏｔｕｓ属、Ｒｈｉｚｏｃｔｏｎｉａ属、およびトリコデルマ（Ｔｒｉｃｈｏｄｅｒｍａ）属からの菌よりなる群から選択される菌を含みうる。

【００２８】
一実施形態では、この加水分解工程は分離工程と同時に行われる。これにより、加水分解酵素と前記取り出されたＰＨＡとの接触時間を短縮することができる。有利なことに、このために、加水分解酵素によってＰＨＡが不適切に加水分解されてしまう可能性を低くすることができる。上記分離工程は、浮上分離法、遠心分離法、膜分離法のうちの少なくとも１つの方法を用いる工程を含みうる。

【００２９】
第４の態様によれば、以下の各工程を含むポリヒドロキシアルカノエート（ＰＨＡ）を生産するための工程が提供されている。各工程は、（ａ）ＰＨＡ非生産微生物よりもＰＨＡ生産微生物を高速に増殖することができる条件下で、ＰＨＡ生産微生物およびＰＨＡ非生産微生物を含む培地を選択ゾーンにおいて培養する工程であって、該培養工程は一定期間、ＰＨＡ非生産微生物よりも多くのＰＨＡ微生物を有する培地を生産するために行われる工程、
（ｂ）培地にＰＨＡ生産微生物を培養するために前記培養工程（ａ）で生産された培地を培養ゾーンに供給する工程、
（ｃ）前記供給工程（ｂ）で生産された前記ＰＨＡを抽出ゾーンに供給する工程であって、前記ＰＨＡ生産微生物は前記ＰＨＡ含有微生物からＰＨＡを取り出すために微生物によ

り加水分解される工程、および
（ｄ）前記培地から前記ＰＨＡを分離する工程、である。一実施形態では、該プロセスの工程（ａ）～（ｄ）のうちの少なくとも１つの工程は非無菌条件下で行われる。
【００３０】
別の実施形態では、該プロセスは、工程（ｂ）で生産されたＰＨＡ生産微生物の一部を選択ゾーンに戻す工程をさらに含む。
【００３１】
[定義]
本文で用いる次の単語および用語は以下に示す意味を有するものとする。
【００３２】
本明細書で用いる「ポリヒドロキシアルカノエート」（ＰＨＡ）は、広義には、再生可能で熱可塑性の脂肪族ポリエステルおよび／または共ポリエステルのことを指し、それぞれのモノマーのヒドロキシ脂肪酸の重合（ヒドロキシ脂肪酸の二重体を含む）により、あるいは、デンプン、砂糖、脂質などの細菌発酵により生産されうるものである。ＰＨＡポリマーは、ポリ-β-ヒロドキシ酪酸（ＰＨＢ）（３－ヒドロキシ酪酸としても周知である）、ポリ－α-ヒロドキシ酪酸（２－ヒドロキシ酪酸としても周知である）、３－ポリ乳酸、３－ヒドロキシバレラート、４－ヒドロキシ酪酸、４－ヒドロキシバレラート、５－ヒドロキシバレラート、６－ヒドロキシヘキサン酸、ポリヒドロキシ酪酸吉草酸（ＰＨＢＶ）、ポリグリコール酸（ＰＬＡ）などを含み、さらに、ＰＨＡの共重合体、ブレンド、混合物、これらの組合せを含みうる。
【００３３】
本明細書の文脈において使用されているように、用語「バイオマス」は、天然のＰＨＡ生産バクテリア、遺伝子組み換えＰＨＡ生産バクテリア、あるいはこれらの混合物を含みうる。さらに、前記バイオマスは大腸菌とアエロモナス細菌との混合培養などの様々な種類のＰＨＡ生産バクテリアの混合物を含みうる。バイオマスはさらに、植物バイオマス、バクテリアバイオマス、および／あるいはいずれのＰＨＡ含有バイオマスの混合物を含みうる。
【００３４】
本明細書の文脈において使用されているように、「非無菌」との用語は、培地や器具を実質的に滅菌、殺菌していないことを指し、従って、対象物以外の微生物の存在を容認するものである。また、対象となる微生物を不純培養することも包含しうる。これに対応して「無菌」との用語も同様に理解されたい。
【００３５】
本明細書との関連で用いられているように、「嫌気性の」との用語は、酸素、硝酸塩、および／または硫酸塩などの電子受容体が全く存在しないか、実質的に存在しない状態を指す。
【００３６】
本明細書との関連で用いられているように、「好気性の」との用語は、酸素、硝酸塩、および／または硫酸塩などの最終電子受容体が少なくとも１つ存在する状態を指す。
【００３７】
本明細書との関連で用いられているように、「バッチ処理」との用語は、反応物質の全てあるいは一部をリアクタに添加し、所定の反応過程に従って処理し、この間はリアクタから生産物は除去されない処理を言う。
【００３８】
本明細書との関連で用いられているように、「連続処理」との用語は、使用時に、あるいはオペレーション時に反応物質を連続的に導入し、生産物を同時に連続的に回収する処理を言う。
【００３９】
本明細書との関連で用いられているように、「栄養素」との用語は、微生物を増殖させるか微生物の増殖に関わる物質を含むものと解される。

【００４０】
「微生物」（マイクローブ；ｍｉｃｒｏｂｅｓ）との用語は、「顕微的微生物」（マイクロオーガニズム；ｍｉｃｒｏｏｒｇａｎｉｓｍｓ）などの、例えば、バクテリア、菌類、ウイルス、生物学的存在のようなもの、および、これらバクテリアや菌類、ウイルスの組合せを指す。本文において、微生物および顕微的微生物は互換的に使用されるものとする。
【００４１】
「天然源」との用語は自然環境に発生する物質のことを言い、１以上の生物学的存在を含みうるものである。例えば、顕微的微生物の天然源を土壌、排水、および食品廃棄物から得ることができる。
【００４２】
本明細書において使用されている「揮発性有機化合物」との用語には該用語の通常の意味が与えられるものとする。さらに該用語は、高蒸発性炭素系化学物質、室温で容易に蒸発し炭素を含む化合物、および／または大気中の光化学反応に関与する炭素を含む化合物を含むものとするが、これらに限定されない。ＶＯＣはＰＨＡを生産する微生物集団を含む密閉された醗酵チャンバの気相から発見されうる。典型的な揮発性有機化合物としては、アルコールおよび脂肪酸が挙げられ、具体的には炭素数の少ないアルコールおよび脂肪酸が挙げられる。
【００４３】
特に明記しない限り、「含む（comprising）、（comprise）」及びこれらが文法的に変化したものは、列挙された要素を含むと共に、列挙されていない更なる要素を包含することも許容するような「オープン」又は「包含的」な表現を意図している。
【００４４】
本明細書で用いる「約」は、処方における構成要素濃度との関連において、一般には表示値の±５％を意味し、より一般的には表示値の±４％を意味し、更に一般には表示値の±３％を意味し、更に一般には表示値の±２％を意味し、更に一般には表示値の±１％を意味し、更に一般には表示値の±０．５％を意味する。
【００４５】
本明細書の開示の全体を通して、ある実施形態は範囲形式で開示される。範囲形式による記載は、主に便宜上且つ簡潔さのためであり、開示された範囲に対する柔軟性のない限定として解釈されるべきでないことは理解されたい。従って、ある範囲の記載の場合には、その範囲内における全ての可能な部分的範囲と共に、個々の数値も具体的に開示されていると考慮すべきである。例えば、１～６等の範囲の記載の場合、１～３や１～４、１～５、２～４、２～６、３～６等の部分的範囲と共に、その範囲内の個々の数、例えば、１、２、３、４、５及び６も具体的に開示されていると考慮すべきである。これは範囲の広さとは関係なく適用される。
【００４６】
[任意の実施例]
ポリヒドロキシアルカノエート（ＰＨＡ）を生産するためのプロセスの例示的で非限定的実施形態であって、ＰＨＡ生産微生物とＰＨＡ非生産微生物とを含む培地において、ＰＨＡ非生産微生物よりもＰＨＡ生産微生物の比率を高める方法と、ＰＨＡ含有微生物からＰＨＡを抽出する方法と、を以下に開示する。
【００４７】
ポリヒドロキシアルカノエート（ＰＨＡ）の生産プロセスは、ＰＨＡ生産微生物含有バイオマスを培地で培養する工程と、前記バイオマスを抽出ゾーンに供給する工程と、を含み、前記ＰＨＡ生産微生物は、ＰＨＡ含有微生物からＰＨＡを取り出すために顕微微生物により加水分解される。加水分解工程は、バクテリア細胞壁を加水分解する酵素を放出する顕微微生物を使用する工程を含む。バクテリア細胞壁を加水分解する酵素を放出する顕微微生物は、アブシディア（Ａｂｓｉｄｉａ）属、アガリクス（Ａｇａｒｉｃｕｓ）属、アスペルギルス（Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ）属、Ｃｈａｅｔｐｍｉｕｍ属、フザリウム（

Ｆｕｓａｒｉｕｍ）属、ニューロスポーラ（Ｎｅｕｒｏｓｐｏｒａ）属、ペニシリウム（Ｐｅｎｉｃｉｌｌｉｕｍ）属、Ｐｈａｎｅｒｏｐｔｉａｅｔｅ属、フィアロフォラ（Ｐｈｉａｌｏｐｈｏｒａ）属、Ｐｌｅｕｒｏｔｕｓ属、Ｒｈｉｚｏｃｔｏｎｉａ属、およびトリコデルマ（Ｔｒｉｃｈｏｄｅｒｍａ）属からの菌よりなる群から選択される菌を含みうる。

【００４８】

一実施形態では、ＰＨＡ生産プロセスは、ＰＨＡ生産微生物含有バイオマスを水素含有培地で培養する工程を含む。一実施形態では、該プロセスは前記培地に水素ガス流を注入する工程をさらに含む。一実施形態では、バイオマスは、アシネトバクター（Ａｃｉｎｅｔｏｂａｃｔｅｒ）属、アルカリゲネス（Ａｌｃａｌｉｇｅｎｅｓ）属、アルカニボラクス（Ａｌｃａｎｉｖｏｒａｘ）属、アゾトバクター（Ａｚｏｔｏｂａｃｔｅｒ）属、バチルス（Ｂａｃｉｌｌｕｓ）属、ブルクホルデリア（Ｂｕｒｋｈｏｌｄｅｒｉａ）属、デルフチア（Ｄｅｌｆｔｉａ）属、クレブシエラ（Ｋｌｅｂｓｉｅｌｌａ）属、マリノバクター（Ｍａｒｉｎｏｂａｃｔｅｒ）属、シュードモナス（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）属、ラルストニア（Ｒａｌｓｔｏｎｉａ）属、リゾビウム（Ｒｈｉｓｏｂｉｕｍ）属からなる属から選択されるＰＨＡ生産バクテリアを含む。一実施形態では、培地は揮発性有機化合物（ＶＯＣ）を含む。ＶＯＣは揮発性脂肪酸およびアルコールのうちの１つ以上を含みうる。

【００４９】

一実施形態では、培地は炭水化物などの炭素栄養源を含む。該方法はさらに、生産されるＰＨＡ量に対する水素の質量比が約０．０１～約０．１、約０．０２～約０．０９、約０．０３～約０．０８、約０．０４～約０．０７、約０．０５～約０．０６の範囲で培地への水素供給を維持する工程を含みうる。好適には、生産されるＰＨＡ量に対する水素の質量比は約０．０２である。別の実施形態では、該プロセスは、生産されるＰＨＡ量に対する炭水化物の質量比が約１～約５、約２～約４、あるいは約２～約３の範囲で培地への炭水化物供給を維持する工程を含みうる。好適には、生産されるＰＨＡ量に対する炭水化物の質量比は約２である。該プロセスはさらに、生産されるＰＨＡ量に対する有機酸あるいは脂質の質量比が約０.５～約５、約１～約４．５、約１．５～約４、約２～３．５、あるいは約２．５～約３の範囲で培地への有機酸あるいは脂質の供給を維持する工程を含みうる。好適には、生産されるＰＨＡ量に対する有機酸あるいは脂質の質量比は約１である。

【００５０】

一実施形態では、該プロセスは、生産されるＰＨＡ量に対する揮発性有機酸の質量比が約１～約５、約２～約４、あるいは約２～約３の範囲で培地への有機酸あるいは脂質の供給を維持する工程を含みうる。好適には、生産されるＰＨＡ量に対する有機酸あるいは脂質の質量比は約２である。

【００５１】

該プロセスはさらに、培地のｐＨを約６～約８、約６．５～約７．５、あるいは約６．５～約７の範囲に維持する工程を含みうる。一実施形態では、培地のｐＨを維持する工程は、有機酸を前記培地に供給することを含む。該プロセスは、前記培養工程の間、前記培地を通常の好気状態に維持する工程をさらに含みうる。

【００５２】

一実施形態では、該プロセスは前記培養工程の間、培地の溶存酸素を約０．１ｍｇＬ$^{-1}$～約１ｍｇＬ$^{-1}$、約０．２ｍｇＬ$^{-1}$～約０．９ｍｇＬ$^{-1}$、約０．３ｍｇＬ$^{-1}$～約０．８ｍｇＬ$^{-1}$、約０．４～約０．７ｍｇＬ$^{-1}$、あるいは約０．５ｍｇＬ$^{-1}$～約０．６ｍｇＬ$^{-1}$に維持する工程を含む。好適には、前記培養工程の間、培地は約０．５ｍｇＬ$^{-1}$の溶存酸素を含む。

【００５３】

別の実施形態では、該プロセスは前記培養工程の間、培地の有機炭素を約１００ｍｇＬ$^{-1}$～約１０００ｍｇＬ$^{-1}$、約２００ｍｇＬ$^{-1}$～約９００ｍｇＬ$^{-1}$、約３００ｍｇＬ$^{-1}$～約

８００ｍｇＬ$^{-1}$、約４００ｍｇＬ$^{-1}$～約７００ｍｇＬ$^{-1}$、あるいは約５００ｍｇＬ$^{-1}$～約６００ｍｇＬ$^{-1}$に維持する工程を含む。好適には、培地の有機炭素は約５００ｍｇＬ$^{-1}$に維持される。

【００５４】

一実施形態では、培養ゾーンの水素ガスは培地にわたって実質的に均一に分散される。水素ガスは培地にわたって実質的に水平及び垂直に均一に分散されうる。

【００５５】

一実施形態では、培養ゾーンのガス状揮発性有機化合物は前記培地にわたって実質的に均一に分散される。このガス状揮発性有機化合物は実質的に水平及び垂直に均一に培地に分散されうる。一実施形態では、前記培養工程の前に、該プロセスは微生物発酵ゾーンにおいてＰＨＡ生産微生物集団を発酵させる工程を含む。この微生物発酵ゾーンは、ＰＨＡ生産微生物含有の微生物の天然源で満たされうる。

【００５６】

一実施形態では、有機化合物は微生物発酵ゾーンで発酵される。発酵された有機化合物は、炭水化物、液体脂質および固体脂質、微生物バイオマス、および廃棄された有機化合物であって、アセトバクター（Ａｃｅｔｏｂａｃｔｅｒ）属、バクテロイデス（Ｂａｃｔｅｒｏｉｄｅｓ）属、クロストリジウム（Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ）属、シトロバクター（Ｃｉｔｒｏｂａｃｔｅｒ）属、エンテロバクター（Ｅｎｔｅｒｏｂａｃｔｅｒ）属、ムーレラ（Ｍｏｏｒｅｌｌａ）属、プロピオニバクテリウム（Ｐｒｏｐｉｏｎｉｂａｃｔｅｒｉｕｍ）属、ルミノコッカス（Ｒｕｍｉｎｏｃｏｃｃｕｓ）属、サーモアナエロビウム（Ｔｈｅｒｍｏａｎａｅｒｏｂｉｕｍ）属（これらに限定されない）などの属から選択されるバクテリアにより発酵されるもの、のうちの少なくとも１つを含みうる。微生物発酵ゾーンに供給される発酵炭水化物と発酵微生物バイオマスとの質量比は約１～約１０、約２～約９、約３～約８、約４～約７、および約５～約６に維持されうる。好適には、微生物発酵ゾーンに供給される発酵炭水化物と発酵微生物バイオマスとの質量比は３に維持される。

【００５７】

一実施形態では、微生物発酵ゾーンは実質的に嫌気状態に維持される。微生物発酵ゾーンは嫌気性顕微微生物の天然源で接種されうる。一実施形態では、嫌気性顕微微生物の天然源は土壌、利水システムの底質、あるいは嫌気性スラッジである。

【００５８】

該プロセスは、前記微生物発酵ゾーンで水素ガスを生産する工程を含みうる。該プロセスは、前記微生物発酵ゾーンでガス状揮発性有機化合物を生産する工程を含みうる。この揮発性有機化合物は微生物発酵ゾーンから抽出されて前記培養ゾーンに移されうる。典型的には、発酵ゾーンは密閉容器内に含まれ、液体発酵相と、その上方に揮発相とを有する。揮発相はチャンパ内に含まれる。従って、真空を利用してチャンバから揮発性有機化合物を抽出することができる。抽出された揮発性有機化合物はＰＨＡ生産微生物培養のために培地に渡される。一実施形態では、該プロセスは、微生物発酵ゾーンのｐＨを５～８の範囲に維持する工程を含む。該プロセスは、微生物発酵ゾーンの還元電位を約－５０ｍＶ～約－４００ｍＶ、約－１００ｍＶ～約－３５０ｍＶ、約－１５０ｍＶ～約－３００ｍＶ、あるいは約－２００ｍＶ～約－２５０ｍＶに維持する工程をさらに含む。

【００５９】

別の実施形態では、前記培養工程後に、該プロセスは前記培養したＰＨＡ生産微生物からＰＨＡを抽出する工程を含む。一実施形態では、この抽出工程は、前記ＰＨＡを取り出すために前記ＰＨＡ生産微生物を加水分解する工程を含む。加水分解する工程は、バクテリア細胞壁を加水分解する酵素を放出する微生物の使用を含みうる。一実施形態では、バクテリア細胞壁を加水分解する酵素を放出する顕微微生物は、アブシディア（Ａｂｓｉｄｉａ）属、アガリクス（Ａｇａｒｉｃｕｓ）属、アスペルギルス（Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ）属、Ｃｈａｅｔｐｍｉｕｍ属、フザリウム（Ｆｕｓａｒｉｕｍ）属、ニューロスポーラ（Ｎｅｕｒｏｓｐｏｒａ）属、ペニシリウム（Ｐｅｎｉｃｉｌｌｉｕｍ）属、Ｐｈａｎ

ｅｒｏｐｔｉａｅｔｅ属、フィアロフォラ（Ｐｈｉａｌｏｐｈｏｒａ）属、Ｐｌｅｕｒｏｔｕｓ属、Ｒｈｉｚｏｃｔｏｎｉａ属、およびトリコデルマ（Ｔｒｉｃｈｏｄｅｒｍａ）属からの菌よりなる群から選択される菌である。

【００６０】

一実施形態では、前記加水分解工程の前に、前記ＰＨＡ生産微生物はバイオマスから実質的に分離される。この抽出工程は、抽出ゾーンで、通常の酸性条件で行われうる。前記抽出ゾーンの酸性条件とは、約２～約５、あるいは約３～約４の範囲のｐＨであってよい。

【００６１】

一実施形態では、該プロセスは、前記取り出したＰＨＡを前記微生物から分離する工程をさらに含む。さらに、この抽出工程を分離工程と同時に実行することもできる。このようにすることで加水分解酵素と前記取り出したＰＨＡとの接触時間を短縮することができる。一実施形態では、該プロセスは酸化剤、例えば過酸化水素や次亜塩素酸ナトリウム（sodium hypochlorate）を前記抽出ゾーンに導入する工程を含む。バクテリア細胞壁および非ＰＨＡポリマーを溶解するために、約０．５～約２％（ｗ／ｖ）あるいは約１～約１．５％（ｗ／ｖ）の次亜塩素酸ナトリウムの溶液を用いてバクテリアバイオマスを処理するようにしてもよい。この、次亜塩素酸ナトリウムを用いて行うバクテリア細胞壁と非ＰＨＡポリマーを溶解するためのバクテリアバイオマスの処理は、約１時間～約８時間、約２時間～約７時間、約３時間～約６時間、あるいは約４時間～約５時間実行されうる。この、次亜塩素酸ナトリウムを用いて行うバクテリア細胞壁と非ＰＨＡポリマーを溶解するためのバクテリアバイオマスの処理は、約１１～約１２、あるいは約１０．５～約１１．５のｐＨで同様に実行されうる。

【００６２】

一実施形態では、本文に開示されている炭水化物、有機酸、脂質、栄養素は以下の供給源のうちの少なくとも１つから供給されてよく、それらは、都市下水処理場で処理できない水（リジェクトウォーター）、グルコースあるいはグルコース含有廃棄物、糖あるいは糖含有廃棄物、ラクトースあるいはラクトース含有廃棄物であって、例えば乳清、酢酸塩、酢あるいは酢酸塩含有廃棄物、吉草酸あるいは吉草酸含有廃棄物、ステビア抽出物、レバウディオサイドＡ（ＲＡ；ｒｅｂａｕｄｉｏｓｉｄｅ）ステビア抽出物、カッサバ澱粉、トウモロコシ澱粉、ジャガイモ澱粉、及び澱粉含有廃棄物、ヤシ油、植物油、その他トマト、ジャガイモ、チーズ、大豆、植物油、サトウキビ（モラセス）処理場からの排水、および、都市下水処理場や工業排水処理場からの食品廃棄物、固体有機性廃棄物、廃棄バイオマス、である。

【００６３】

ＰＨＡ生産微生物とＰＨＡ非生産微生物を含む培地において、ＰＨＡ非生産微生物によりもＰＨＡ生産微生物の比率を高める方法は、ＰＨＡ非生産微生物よりも多くのＰＨＡ微生物を有する培地を生産するために、ＰＨＡ非生産微生物よりもＰＨＡ生産微生物を高速に増殖することを可能にする条件のもとで一定期間、前記培地を選択ゾーンで培養する工程（ａ２）を含む。一実施形態では、選択ゾーンの条件は、ＰＨＡ非生産微生物よりもＰＨＡ生産微生物を高速に増殖することができるだけでなく、細胞飢餓により生じる微生物の細胞挙動に実質的にマイナスの生理学的変化をもたらさないものとする。

【００６４】

一実施形態では、工程（ａ２）の前に、該方法はＰＨＡ生産微生物中に存在するＰＨＡの量を増やすために炭素源を前記培地に供給する工程（ａ１）をさらに含む。この供給工程（ａ１）と培養工程（ａ２）とは、別々のチャンバで行われてよい。

【００６５】

一実施形態では、該方法は、培養工程（ａ２）が行われるチャンバから培地を渡し、供給工程（ａ１）が行われている他のチャンバに（ａ２）に戻す工程（ａ３）をさらに含む一実施形態では、工程（ａ１）、（ａ２）、および（ａ３）の各々を連続して行う。

【００６６】

培地は供給工程（ａ１）が行われるチャンバに約６時間～約２４時間、約８時間～約２２時間、約１０時間～約２０時間、約１２時間～約１８時間、あるいは約１４時間～約１６時間滞留しうる。培地は培養工程（ａ２）が行われるチャンバに約０．５時間～約２時間、あるいは、１時間～約１．５時間滞留しうる。培地が培養工程（ａ２）が行われるチャンバに滞留する時間に対して、供給工程（ａ１）が行われるチャンバに滞留する時間の比率は、約５～約１０、約６～約１０、約７～約１０、約８～約１０、あるいは約９～約１０である。

【００６７】

一実施形態では、培養工程（ａ２）において溶存酸素は、約１ｍｇＬ$^{-1}$～約１０ｍｇＬ$^{-1}$、約２ｍｇＬ$^{-1}$～約９ｍｇＬ$^{-1}$、約３ｍｇＬ～約８ｍｇＬ$^{-1}$、約４ｍｇＬ$^{-1}$～約７ｍｇＬ$^{-1}$、約５ｍｇＬ$^{-1}$～約６ｍｇＬ$^{-1}$、に維持される。好適には、培養工程（ａ２）において、溶存酸素は３ｍｇＬ$^{-1}$に維持される。

【００６８】

ＰＨＡ含有微生物からＰＨＡを抽出する方法であって、該方法は、ＰＨＡ含有微生物からＰＨＡを取り出すためにＰＨＡ含有微生物の細胞壁を加水分解する工程と、前記微生物から前記取り出したＰＨＡを分離する工程と、を含む。

【００６９】

一実施形態では、この加水分解工程は、バクテリア細胞壁を加水分解する酵素を放出する顕微微生物を用いる工程を含む。バクテリア細胞壁を加水分解する酵素を放出する顕微微生物は、アブシディア（Ａｂｓｉｄｉａ）属、アガリクス（Ａｇａｒｉｃｕｓ）属、アスペルギルス（Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ）属、Ｃｈａｅｔｐｍｉｕｍ属、フザリウム（Ｆｕｓａｒｉｕｍ）属、ニューロスポーラ（Ｎｅｕｒｏｓｐｏｒａ）属、ペニシリウム（Ｐｅｎｉｃｉｌｌｉｕｍ）属、Ｐｈａｎｅｒｏｐｔｉａｅｔｅ属、フィアロフォラ（Ｐｈｉａｌｏｐｈｏｒａ）属、Ｐｌｅｕｒｏｔｕｓ属、Ｒｈｉｚｏｃｔｏｎｉａ属、およびトリコデルマ（Ｔｒｉｃｈｏｄｅｒｍａ）属からの菌よりなる群から選択される菌であってよい。この加水分解工程を分離工程と同時に実行することもでき、このようにすることで、加水分解酵素と前記取り出したＰＨＡとの接触時間を短縮することができる。

【００７０】

一実施形態では、この分離工程は、浮上分離法、遠心分離法、膜分離法のうちの少なくとも１つの方法を用いる工程を含む。

【００７１】

開示のプロセス及び／または方法は非無菌状態でも同様に実行されてもよい。

【図面の簡単な説明】

【００７２】

【図１】ＰＨＡ生産プロセスのプロセスフロー図の概略図。

【図２ａ】図１の嫌気リアクタ６での時間変化（日で測定）に対するｐＨの変化を示すグラフ。

【図２ｂ】図１の嫌気リアクタ６での時間変化（日で測定）に対する酸化還元電位（ＯＲＰ；Ｏｘｉｄａｔｉｏｎ Ｒｅｄｕｃｔｉｏｎ Ｐｏｔｅｎｔｉａｌ）（ミリボルト（ｍＭＶ）測定）の変化を示すグラフ。

【図３】図１の嫌気リアクタ８での時間変化（時間で測定）に対するバイオマス濃度（ｇ／ｌで測定）の変化を示すその他のグラフ。

【発明を実施するための形態】

【００７３】

添付の図面は開示した実施形態を示すとともに、開示の実施形態の原理を説明するものである。しかし、各図面は単に例示を目的とするものであって、本発明の範囲を定義することを目的としたものではない。

【００７４】

図１を参照すると、ＰＨＡの生産に使用するためのシステム１００が示されている。システム１００は、攪拌層（２、４）、嫌気リアクタ６、好気リアクタ（８、１０、１２）

、沈殿槽（１４、１６）、エアコンプレッサ１８、貯蔵タンク（２０、２２、２４、２６、２８）、セパレータ３０、粒状活性炭（ＧＡＣ；Ｇｒａｎｕｌａｔｅｄ　Ａｃｔｉｖａｔｅｄ　Ｃａｒｂｏｎ）フィルタ３２、ポンプ（３４、３６、３８、４０、４２、４４、４６、４８、５０、５２）、空気流量計５４から構成される。

【００７５】

２つの攪拌層（２、４）は無機栄養素と有機栄養素とを貯蔵するためにそれぞれ提供される。攪拌層２は無機培地（以下、「Ｍ２」と称する）を収容する。この無機培地は嫌気リアクタ８に供給される。リアクタ８では、ＰＨＡの生産に適した微生物の繁殖が好適に刺激される。

【００７６】

以下のように攪拌槽２の無機培地Ｍ２が準備される。１５Ｌの水道水に３００ｇのグルコースを溶かす。リジェクトウォーター、無機栄養素溶液、発酵後の有機酸溶液、その他の溶液、酢酸、吉草酸、塩素酸、および水酸化ナトリウムからなる群より選択されるその他の溶液５Ｌをこの溶液に加え、培地中の炭水化物の最終濃度が２０ｇ／Ｌとなるようする。約１ｇ／Ｌの揮発性酢酸を含む、都市の下水処理場から得た（都市排水処理場を）拒絶する水５Ｌをさらに培地に加える。揮発性酢酸の最終濃度は約５ｇ／Ｌである。都市下水処理場を拒絶する水を使用しないのであれば無機栄養素を手動で加えて、各々の最終濃度を実現するようにしてもよい。

【表１】

化合物	濃度(gL^{-1})
$(NH_4)_2Cl$	2g
KH_2PO_4	0.5
$CaCl_2.2H_2O$	0.1
$MgCl_2.6H_2O$	0.1
フェリEDTAナトリウム塩ヒドレート (Ferric EDTA sodium salt hydrate)	0.1
$MnCl_2.4H_2O$	0.01
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.001

【００７７】

無機培地Ｍ２のｐＨは６．５～８．２の範囲に維持される。次いで、この無機培地Ｍ２を１Ｌ／時間（２４Ｌ／日）の割合でリアクタ８にポンプ供給する。

【００７８】

以下のように攪拌槽４の有機培地Ｍ１を準備する。１０Ｌの水道水に３００ｇのグルコースを溶かす。この溶液に（ＰＨＡが抽出された状態の）バイオマス懸濁液１０Ｌをさらに加え、本培地中の炭水化物の最終濃度が約２０ｇ／Ｌ、タンパク質の最終濃度が約０．８ｇ／Ｌ（つまり、窒素の最終濃度は約０．１２ｇ／Ｌ）となるようにする。次いで、この有機培地Ｍ１を１Ｌ／時間（２４Ｌ／日）の割合で嫌気リアクタ６にポンプ供給する。さらに、この有機栄養培地を１Ｌ／時間（２４Ｌ／日）の割合でリアクタ１０にポンプ供給する。

【００７９】

嫌気リアクタ６は主として有機酸、揮発性有機化合物及び水素ガスを生産するために発

酵リアクタとしての役割を果たす。嫌気リアクタ６のオペレーションボリュームは１３Ｌである。嫌気リアクタ６を起動するために、リアクタ６を攪拌槽４からの６Ｌの有機培地と１Ｌの嫌気性土壌懸濁液で満たす。この土壌懸濁液は、湿地帯や湖岸堤から得た０．５ｋｇの湿式嫌気性土壌を１Ｌの水道水と混合することにより作られる。次にこの土壌混合物を１時間沈殿させ、０．１ｍｍのふるいでろ過し、土壌堆積物を除去する。次に、このろ過した土壌懸濁液を嫌気リアクタ６に加える。

【００８０】

リアクタ６は酸化還元電位（ＯＲＰ）を－５０ｍＶ以下に維持した状態で、嫌気状態に維持されている。この後、バッチ培養が４日間続く。この間、ｐＨは約６～８に維持される。この時間の間、有機化合物はリアクタ６に供給された１以上のバクテリア種により発酵され、水素、揮発性有機化合物及び有機酸が生産される。

【００８１】

連続オペレーションの間、有機媒体（以下「Ｍ１」と称する）が１Ｌ／時間の割合で攪拌槽４からリアクタ６に供給される。リアクタ１２から排出される溶解(lysed)バイオマス及び／または無傷(intact)バイオマスは１Ｌ／時間（２４Ｌ／日）の割合で嫌気性リアクタ１２中にリサイクルされる。リアクタ１０から排出される揮発性有機化合物は、１０Ｌ／時間（２４０Ｌ／日）のガスレートで嫌気性リアクタ６中にリサイクルされる。嫌気的発酵による生産物であって、主として有機酸、揮発性有機化合物、及び水素はリアクタ１０に送られる。

【００８２】

リアクタ８のオペレーションボリュームは６Ｌである。リアクタ８は栄養素が不足した段階であり、ＰＨＡを十分に生産あるいは保存できない微生物よりもＰＨＡの生産および／または保存が可能な微生物を優先的に選択してこの段階を切り抜けるようにしている。

【００８３】

リアクタ８を起動するために、３Ｌの有機媒体Ｍ１と、２．５Ｌの無機媒体Ｍ２と、０．５Ｌの嫌気性土壌懸濁液とをリアクタ８に加える。土壌が嫌気性であるという点では異なるものの、この土壌懸濁液は上記と同様の方法により得られる。次いで、２日間バッチ培養を行う。

【００８４】

連続オペレーションの場合、リアクタ８には１Ｌ／時間の割合で攪拌槽２から無機媒体Ｍ２が供給される。さらに、リアクタ８は３Ｌ／時間の割合でリアクタ１０からポンプ供給されるバイオマスを受け取る。２Ｌ／分の割合で空気がリアクタ８に供給される。これにより通気速度が０．３３Ｌ／分となる。空気は、リアクタ８、１０、および１２と流体連結しているコンプレッサ１８からが供給される。このエアフローはフローメーター５４により監視される。ＰＨＡ生産微生物が豊富にされたリアクタ８中の微生物懸濁液は４Ｌ／時間の割合でリアクタ１０内にポンプで送り返される。

【００８５】

リアクタ１０のオペレーションボリュームは１３Ｌである。リアクタ１０はＰＨＡの生産および貯蔵が可能な微生物の培養を介してＰＨＡ生産を行うためのメインリアクタである。リアクタ１０を起動するために、リアクタ１０を攪拌槽４からの１０Ｌの有機培地Ｍ１、攪拌槽２からの２Ｌの無機培地Ｍ２、および１Ｌの好気性土壌懸濁液で満たす。土壌懸濁液はリアクタ８の場合と同様の方法で得られる。その後、２日間バッチ培養を行う。

【００８６】

連続オペレーションの場合、リアクタ１０には１Ｌ／時間の割合で有機培地Ｍ１が攪拌槽２から供給される。有機培地がリアクタ１０に供給される割合は、全有機炭素（ＴＯＣ；Ｔｏｔａｌ　Ｏｒｇａｎｉｃ　Ｃａｒｂｏｎ）濃度が約５００ｍｇ／Ｌとなるように調整することができる。リアクタ６からの有機酸、揮発性有機化合物、水素、および反応生成物が２Ｌ／時間の割合でリアクタ１０にポンプ供給される。リアクタ１０に水素ガスを渡すことによりＰＨＡ含有微生物の増殖が著しく高まることが認められている。リアクタ１０に揮発性有機化合物を渡すことによりＰＨＡ含有微生物の増殖が著しく高まることが

認められている。リアクタ８からのバイオマスは３Ｌ／時間の割合でリアクタ１０にポンプ供給される。リアクタ１０中の通気速度はリアクタ８中の通気速度の１０分の１以下である。つまり、空気は約０．４Ｌ／分で供給され、通気速度は０．０３Ｌ／分である。溶存酸素濃度が約０．５ｍｇ／Ｌとなるよう必要に応じてエアフローレートを調整してもよい。揮発性有機化合物が豊富な、リアクタ１０から排出されるガスの一部は１０Ｌ／時間（２４０Ｌ／日）のガスレートでリアクタ６に戻され、リサイクルされる。

【００８７】

リアクタ１０の上部からの懸濁液は、６Ｌ／時間の割合で沈殿槽１４に排出される。沈殿槽１４の上部からの液体は重力により下水管に排出される。沈殿槽１４の底部の沈殿したバイオマスは、３Ｌ／時間の割合でリアクタ８に、３Ｌ／時間の割合でリアクタ１０に、および０．５Ｌ／時間の割合でリアクタ１２にポンプ供給される。

【００８８】

リアクタ１２には微生物からのＰＨＡ抽出物が供給される。リアクタ１２のオペレーションボリュームは１３Ｌである。リアクタ１２を起動するために、沈殿槽１４からの沈殿バイオマス１１Ｌおよび好気性酸性森林土壌懸濁液２Ｌをリアクタ１２に加える。この土壌懸濁液は１ｋｇの好気性酸性森林土壌懸濁液を２Ｌの水道水と混合することにより得られる。この混合物を１時間１時間沈殿させ、１ｍｍのふるいでろ過し、土壌堆積物を除去する。次に、この結果得られる土壌懸濁液をリアクタ１２に加える。リアクタ内容物のｐＨは０．１Ｍの塩酸溶液を用いて約４．５に調整される。バッチ培養を４日間行う。その後、リアクタ１２は、バクテリア細胞壁を加水分解するために細胞外酵素を放出可能な顕微微生物で満たされる。

【００８９】

この連続工程の間、リアクタ１２には、攪拌槽からポンプ供給されるバイオマスが２Ｌ／時間の割合で供給される。ｐＨを４．３～４．６の範囲に維持すべく、リアクタ１２には貯蔵タンク２８から、０．０１～０．１Ｌ／時間の割合で０．１Ｍの塩酸を連続的に加える。この段階で、微生物の一部を溶解し、ＰＨＡがグラニュール形態、つまり粒状の形態で細胞から抽出される。

【００９０】

リアクタ１２の上部の泡は分離槽１６に排出される。この分離槽１６ではＰＨＡグラニュールと細胞残屑とが分離される。加水分解酵素とＰＨＡグラニュールとの相互作用を最小に抑えるために、ＰＨＡ生産微生物の細胞からのＰＨＡの抽出と、細胞残屑からのＰＨＡグラニュールの分離とは同時に行われる。ＰＨＡグラニュールは約３．５のｐＨで浮遊させることで細胞残屑から分離される。分離槽１６から流出される液体の一部は、１Ｌ／時間の割合でリアクタ６に戻され、リサイクルされる。

【００９１】

次いで、加工していない生のＰＨＡが０．５Ｌ／時間の割合で槽２０に渡される。ここでは、槽２６からポンプ供給される漂白溶液により、該ＰＨＡがさらに浄化処理される。浄化されたＰＨＡは槽２２に渡され、乾式造粒装置２４にポンプ供給されるまで該槽２２に貯蔵される。乾燥は６０度で、造粒は１８０度で行われうる。

【００９２】

好気性リアクタ８、１０、１２から流出する空気は０．４４Ｌ／分の割合でこれらのリアクタの上部から流出される。その後、流出された空気はセパレータ３０とグラニュール活性炭素ろ過器３２に送られて処理され、周辺環境に排出される。

【００９３】

図２ａおよび図２ｂを参照する。図２ａにはリアクタ６で生じている、時間に対するｐＨの変化を示したグラフが、図２ｂにはリアクタ６で生じている、時間に対するＯＲＰの変化を示したグラフが描かれている。図２ａから明らかなように、ｐＨは９日間にわたって７．５から５．５へと漸減した。また、１０日目はｐＨのさらなる変化は見られなかった。発酵プロセスによりさらに多くの有機酸が生産されると、これに応じて、リアクタ中の正味の有機酸濃度が実質的に一定となるまでｐＨ値が低下すると仮定される。ｐＨが一

定したのはｐＨが定常状態に達したことによるものであり、定常状態においては、リアクタ１０に送られる有機酸の量が、有機酸濃度の正味の増減なしに、発酵リアクタで新たに合成される有機酸に置換される。

【００９４】

第２グラフでは、酸化還元電位は最初の８日間にわたって急激に減少しており、その後２日間にわたっては、ほぼ－２２０ｍＶでほぼ一定している。酸化還元電位の陰性が強いということは、発酵および有機酸と水素の生産に不可欠な嫌気状態であることを示す。リアクタ内は定常値に達するまで、時間とともにより嫌気状態になったことが分かる。

【００９５】

図３を参照すると、リアクタ１０における、時間に対するバイオマスの濃度変化を示したグラフが描かれている。想定した通り、バイオマス濃度はほぼ一定のペースで成長し、ピークは４０時間目の約５ｇ／Ｌであった。その後、バイオマス濃度は約５ｇ／Ｌの値に維持されている。この濃度において微生物集団を最大に維持することができ、さらなる増殖は有機栄養素の吸収率のような阻害要因により阻止される。

【産業上の利用可能性】

【００９６】

開示の方法およびプロセスの各々を様々な産業に利用することができ、特に包装材料としての、および、従来の医療機器および再生医療に応用するための生体材料としての生分解性プラスチックの生産に利用することができる。

【００９７】

開示の方法およびプロセスの各々により、ＰＨＡをＰＨＡ含有バイオマスに効率的かつ経済的に合成することができる。さらに、開示の方法およびプロセスの各々は廃水や固体有機性廃棄物をＰＨＡ生産のための培地として用いることを可能にするので、これらの方法により使用する原材料費を抑えることができる。

【００９８】

一実施形態では、嫌気的発酵、好気性バイオマスの増殖、ＰＨＡの微好気的生合成、バイオマス含有ＰＨＡの微生物加水分解、およびＰＨＡの浮選濃度(flotative concentration)を独自に組合せることで、 開示の方法によりＰＨＡを確実に連続生産することができる。

【００９９】

さらに、各々の開示の方法では、ＰＨＡの化学的抽出を行う際に可燃性の毒性有機溶剤を使用する必要がない。有利なことに、開示の方法により環境汚染を最小に抑えることができる。

【０１００】

さらに、開示の方法およびプロセスの各々は、バクテリアの純粋培養の使用だけに限定されない。有利なことに、該方法およびプロセスの各々を無菌状態で実行することができる。さらに有利なことに、多くの資源を浪費する必要なく、外来微生物のいない無菌状態にプロセス条件を維持することができる。

【０１０１】

ＰＨＡ生産微生物とＰＨＡ非生産微生物とを含む培地でＰＨＡ非生産微生物よりもＰＨＡ生産微生物の比率を高めるための開示の方法は、バッチ処理での使用だけに限定されない。有利なことに、開示の方法の各々は細胞飢餓に起因する、顕微微生物本来の細胞挙動の変化を頻繁に招くものではなく、これが生じた場合は、ＰＨＡ生産顕微微生物などの顕微微生物の増殖率に悪影響を及ぼすおそれがある。従って、本明細書に開示の方法を用いることで、周知のプロセスで実行されるファミン－フィーストサイクルの間、細胞生理学における妨害が存在しないためにＰＨＡ生産率を高めることができる。

【０１０２】

さらに有利なことに、開示の方法を全体のプロセス効率を高める連続プロセスで用いるようにしてもよい。

【０１０３】

本文に開示された内容を読めば、本発明の精神および範囲から逸脱することなく、本発明をその他様々に変形したり適応させることができることは当業者には明らかであり、また、そのような変形や適応は添付の請求項の範囲内においてなされるものとする。

【図１】

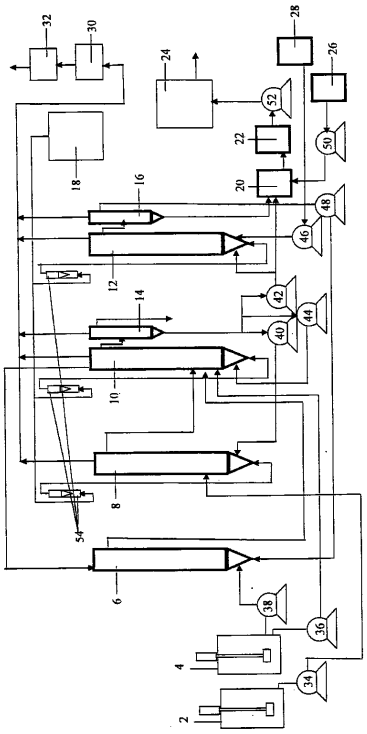
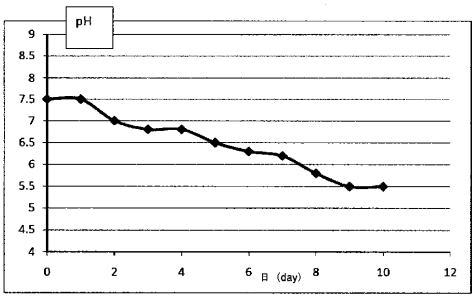
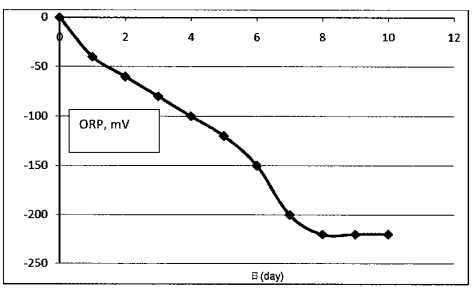


Fig. 1

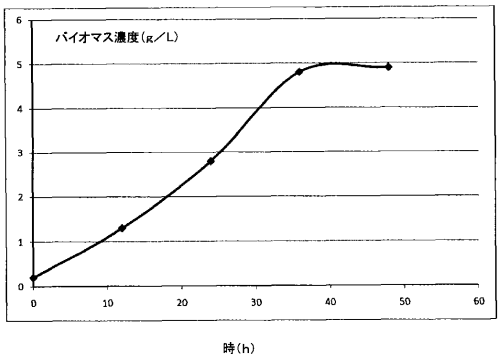
【図２ａ】



【図２ｂ】



【図３】



【手続補正書】
【提出日】平成24年1月10日(2012.1.10)
【手続補正１】
【補正対象書類名】特許請求の範囲
【補正対象項目名】全文
【補正方法】変更
【補正の内容】
【特許請求の範囲】
【請求項１】
ポリヒドロキシアルカノエート（ＰＨＡ）を生産するためのプロセスであって、
ＰＨＡを蓄積するＰＨＡ生産微生物を含むバイオマスを供給された水素ガスと揮発性有機化合物とを含有する培地において培養する工程と、
前記ＰＨＡ含有微生物から選択した顕微微生物を使用して前記ＰＨＡ生産微生物を加水分解する工程と、を含むプロセス。
【請求項２】
前記培地に水素ガス流を注入する工程を含む、請求項１記載の方法。
【請求項３】
揮発性有機化合物を含むガスを前記培地に注入する工程を含む、請求項１記載のプロセス。
【請求項４】
生産されるＰＨＡの量に対して、０．５～５の範囲の質量比で前記培地への揮発性有機化合物供給を維持する工程を含む、請求項１または３に記載のプロセス。
【請求項５】
前記培地は炭素栄養源を含む、前述の請求項のいずれかに記載のプロセス。
【請求項６】

前記炭素栄養源は炭水化物を含む、請求項５記載のプロセス。
【請求項７】
生産されるＰＨＡの量に対して、０．０１～０．１の範囲の質量比で前記培地への水素供給を維持する工程を含む、請求項１または２に記載のプロセス。
【請求項８】
生産されるＰＨＡの質量に対して、１～５の範囲の質量比で前記培地への炭水化物供給を維持する工程を含む、前述の請求項のいずれかに記載のプロセス。
【請求項９】
生産されるＰＨＡの質量に対して、０．５～５の範囲の質量比で前記培地への有機酸および脂質のうちの少なくとも一方の供給を維持する工程を含む、前述の請求項のいずれかに記載のプロセス。
【請求項１０】
前記培地のｐＨを６～８の範囲に維持する工程を含む、前述の請求項のいずれかに記載のプロセス。
【請求項１１】
前記培地のｐＨを維持する工程は、前記培地に有機酸を供給する工程を含む、請求項１０記載のプロセス。
【請求項１２】
前記培養工程の間、前記培地を通常の好気状態に維持する工程を含む、前述の請求項のいずれかに記載のプロセス。
【請求項１３】
前記培養工程の間、前記培地は０．１ｍｇＬ$^{-1}$～１ｍｇＬ$^{-1}$の溶存酸素を含む、請求項１２記載のプロセス。
【請求項１４】
前記培養工程の間、前記培地を１００ｍｇＬ$^{-1}$～１０００ｍｇＬ$^{-1}$の有機炭素に維持する工程を含む、前述の請求項のいずれかに記載のプロセス。
【請求項１５】
前記培養工程は、培養ゾーンで前記ＰＨＡ生産微生物を培養する工程を含み、前記水素ガスは前記培地にわたって実質的に均一に分散される、前述の請求項のいずれかに記載のプロセス。
【請求項１６】
前記培養工程の前に、前記プロセスは微生物発酵ゾーンにおいてＰＨＡ生産微生物集団を発酵させる工程を含む、前述の請求項のいずれかに記載のプロセス。
【請求項１７】
前記微生物発酵ゾーンはＰＨＡ生産微生物含有の微生物の天然源で満たされる、請求項１６記載のプロセス。
【請求項１８】
前記微生物発酵ゾーンは実質的に嫌気状態に維持される、請求項１６または１７記載のプロセス。
【請求項１９】
前記微生物発酵ゾーンにおいて水素ガスを生産する工程を含む、請求項１６から１８のいずれかに記載のプロセス。
【請求項２０】
前記微生物発酵ゾーンから前記揮発性有機化合物を得る工程を含む、請求項１６から１９のいずれかに記載のプロセス。
【請求項２１】
前記揮発性有機化合物を得る工程は、前記発酵ゾーン上方の気相を除去する工程を含む、請求項２０記載のプロセス。
【請求項２２】
前記微生物発酵ゾーンを５～８のｐＨに維持する工程を含む、請求項１６から１９のい

ずれかに記載のプロセス。
【請求項２３】
前記微生物発酵ゾーンを－５０ｍＶ～－４００ｍＶの還元電位に維持する工程を含む、請求項１６から２１のいずれかに記載のプロセス。
【請求項２４】
前記培養工程後、前記プロセスは前記培養されたＰＨＡ生成微生物からＰＨＡを抽出する工程を含む、前述の請求項のいずれかに記載のプロセス。
【請求項２５】
前記抽出工程は、前記ＰＨＡを取り出すために、前記ＰＨＡ生産微生物を加水分解する工程を含む、請求項２３記載のプロセス。
【請求項２６】
前記加水分解工程は、バクテリア細胞壁を加水分解する酵素を放出する顕微微生物を使用することを含む、請求項２５記載のプロセス。
【請求項２７】
前記バクテリア細胞壁を加水分解する酵素を放出する顕微微生物は、アブシディア（Ａｂｓｉｄｉａ）属、アガリクス（Ａｇａｒｉｃｕｓ）属、アスペルギルス（Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ）属、Ｃｈａｅｔｐｍｉｕｍ属、フザリウム（Ｆｕｓａｒｉｕｍ）属、ニューロスポーラ（Ｎｅｕｒｏｓｐｏｒａ）属、ペニシリウム（Ｐｅｎｉｃｉｌｌｉｕｍ）属、Ｐｈａｎｅｒｏｐｔｉａｅｔｅ属、フィアロフォラ（Ｐｈｉａｌｏｐｈｏｒａ）属、Ｐｌｅｕｒｏｔｕｓ属、Ｒｈｉｚｏｃｔｏｎｉａ属、およびトリコデルマ（Ｔｒｉｃｈｏｄｅｒｍａ）属からの菌よりなる群から選択される、請求項２６記載のプロセス。
【請求項２８】
前記加水分解工程の前に、前記ＰＨＡ生産微生物は前記バイオマスから実質的に分離される、請求項２４から２６のいずれかに記載のプロセス。
【請求項２９】
前記抽出工程は、抽出ゾーンで通常の酸性条件で行われる、請求項２４から２７のいずれかに記載のプロセス。
【請求項３０】
前記抽出ゾーンの酸性条件とは、ｐＨが２～５の範囲内である、請求項２８記載のプロセス。
【請求項３１】
前記微生物から前記取り出されたＰＨＡを分離する工程をさらに含む、請求項２６から２９のいずれかに記載のプロセス。
【請求項３２】
前記抽出工程は前記分離工程と同時に行われ、これにより前記加水分解酵素と前記取り出されたＰＨＡとの接触時間が短縮される、請求項３０記載のプロセス。
【請求項３３】
前記抽出ゾーンに酸化剤を導入する工程を含む、請求項２７記載のプロセス。
【請求項３４】
ＰＨＡ含有微生物からＰＨＡを抽出する方法であって、該方法は、前記ＰＨＡ含有微生物からＰＨＡを取り出すために前記ＰＨＡ含有微生物の前記細胞壁を加水分解する工程と、前記取り出されたＰＨＡを前記微生物から分離する工程と、を含み、
前記加水分解工程は、バクテリア細胞壁を加水分解する酵素を放出する顕微微生物を用いる工程を含み、
前記バクテリア細胞壁を加水分解する酵素を放出する顕微微生物は、アブシディア（Ａｂｓｉｄｉａ）属、アガリクス（Ａｇａｒｉｃｕｓ）属、アスペルギルス（Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ）属、Ｃｈａｅｔｐｍｉｕｍ属、フザリウム（Ｆｕｓａｒｉｕｍ）属、ニューロスポーラ（Ｎｅｕｒｏｓｐｏｒａ）属、ペニシリウム（Ｐｅｎｉｃｉｌｌｉｕｍ）属、Ｐｈａｎｅｒｏｐｔｉａｅｔｅ属、フィアロフォラ（Ｐｈｉａｌｏｐｈｏｒａ）属、Ｐｌｅｕｒｏｔｕｓ属、Ｒｈｉｚｏｃｔｏｎｉａ属、およびトリコデルマ（Ｔｒｉｃｈｏｄｅ

ｒｍａ）属からの菌よりなる群から選択される、方法。
【請求項３５】
前記加水分解工程は前記分離工程と同時に行われ、これにより前記加水分解酵素と前記取り出されたＰＨＡとの接触時間が短縮される、請求項３４に記載の方法。
【請求項３６】
前記分離工程は、浮上分離法、遠心分離法、膜分離法のうちの少なくとも１つを用いる、請求項３４から３５のいずれかに記載の方法。
【請求項３７】
ポリヒドロキシアルカノエート（ＰＨＡ）を生産するためのプロセスであって、
（ａ）ＰＨＡ生産微生物と非ＰＨＡ生産微生物とを含む培地を、前記非ＰＨＡ生産微生物よりも前記ＰＨＡ生産微生物を高速に増殖できる条件下で選択ゾーンにおいて培養する工程であって、前記培養工程は前記非ＰＨＡ生産微生物よりも多くのＰＨＡ微生物を有する培地を生産するために一定期間行われるものであり、
（ｂ）水素ガス含有の培地に前記ＰＨＡ生産微生物を培養するために、前記培養工程（ａ）で生産された前記培地を培養ゾーンに供給する工程と、
（ｃ）前記供給工程（ｂ）で生産された前記ＰＨＡを抽出ゾーンに供給する工程であって、前記ＰＨＡ生産微生物は前記ＰＨＡ含有微生物からＰＨＡを取り出すために顕微微生物により加水分解されるものであって、
（ｄ）前記ＰＨＡを前記培地から分離する工程と、を含むプロセス。
【請求項３８】
前記（ａ）から（ｄ）の工程のうちの少なくとも１つの工程は非無菌状態で行われる、請求項３７記載のプロセス。
【請求項３９】
前記工程（ｂ）で生産された前記ＰＨＡ生産微生物の少なくとも一部を前記選択ゾーンに戻す工程を含む、請求項３７または３８に記載のプロセス。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/SG2011/000094

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl.

C12P 7/62 (2006.01) ***C08L 67/04*** (2006.01) ***C08G 63/89*** (2006.01)

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)

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

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
WPI, EPODOC, CAPLUS, BIOSIS, Keywords: polyhydroxyalkanoate, PHA, hydrolysis, hydrolyse, lysis, lytic culture, digest, enzymatic, enzyme, separate, extract, harvest, produce, hydrogen, fungi, fungal, mold

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2006/103699 A1 (COUNCIL OF SCIENTIFIC & INDUSTRIAL RESEARCH) 5 October 2006 (abstract; page 4, line 15 – page 7, line 20; page 9, lines 15-25; page 15, lines 8-20; Examples; claims)	1-43
X	KSHAMA LAKSHMAN, T. RAMACHANDRIAH SHAMALA, "Extraction of polyhydroxyalkanoate from *Sinorhizobium meliloti* cells using *Microbispora sp.* culture and its enzymes" *Enzyme and Microbial Technology*, Volume 39, Issue 7, 3 November 2006, pages 1471-1475 (abstract; chapters 2.2, 2.7, 2.8, 2.10. 3.3; Table 1; Figures 1 and 2)	1-43
X	DIVYASHREE, M.S. et al. "Isolation of polyhydroxyalkanoate from hydrolysed cells of *bacillus flexus* using aqueous two-phase system containing polyethylene glycol and phosphate" *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 2009, 14: 482-489 (abstract; discussions under headings: Polyhydroxyalkanoate Production, *Selection of ATPS, Hydrolysis by Microbispora sp. Culture Filtrate)*	1-43

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C [X] 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	Date of mailing of the international search report
11 April 2011	21 APR 2011
Name and mailing address of the ISA/AU AUSTRALIAN PATENT OFFICE PO BOX 200, WODEN ACT 2606, AUSTRALIA E-mail address: pct@ipaustralia.gov.au Facsimile No. +61 2 6283 7999	Authorized officer **GIUSEPPE ZAGARI** AUSTRALIAN PATENT OFFICE (ISO 9001 Quality Certified Service) Telephone No : +61 2 6283 3130

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2009)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/SG2011/000094

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 4910145 A (HOLMES et al.) 20 March 1990 (whole document)	
A	MOHANNAD, H.H. and STEINBUCHEL, A. " Poly(3-Hydroxybutyrate) Production from glycerol by Zobella denitrificans MW1 via High-Cell-Density Fed-Batch Fermentation and Siplified Solvent Extraction" *Applied and Environmental Microbiology*, Oct. 2009, p, 6222-6231 (whole document)	
A	ANDERSON. A,J. and DAWES. E,A. "Occurrence, metabolism, metabolic rate and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates" *Microbiological Reviews*, Dec. 1990, Vol. 54, No. 4. p. 450-472 (whole document)	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.
PCT/SG2011/000094

This Annex lists the known "A" publication level patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent Document Cited in Search Report	Patent Family Member				
US	4910145	EP	0145233	JP	60145097

Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001.

END OF ANNEX

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AL,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,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),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,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 テット シオン オング
シンガポール国、シンガポール ５４３１１７、ナンバー１０－５０、ドライブ、ビー１ケイ １１７シー リバーベール

Ｆターム(参考) 4B064 AD83 CA01 CE02 DA16