

(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
2024年8月15日(15.08.2024)



(10) 国際公開番号

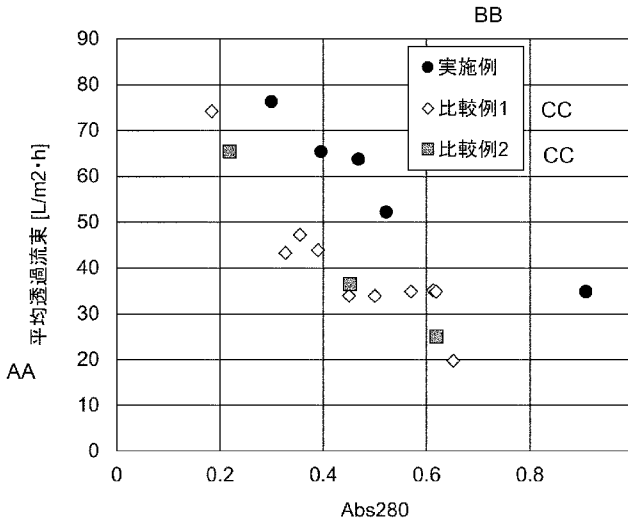
WO 2024/166803 A1

- (51) 国際特許分類:
C12P 7/625 (2022.01) C08L 101/16 (2006.01)
C08G 63/06 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2024/003416
- (22) 国際出願日: 2024年2月2日(02.02.2024)
- (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 2023-016309 2023年2月6日(06.02.2023) JP
- (71) 出願人: 株式会社カネカ (KANEKA CORPORATION) [JP/JP]; 〒5308288 大阪府大阪市北区中之島二丁目3番18号 Osaka (JP).
- (72) 発明者: 迫 郁弥(SAKO, Fumiya); 〒6768688 兵庫県高砂市高砂町宮前町1-8 株式会社カネカ内 Hyogo (JP). 西中 智哉(NISHINAKA, Tomoya); 〒6768688 兵庫県高砂市高砂町宮前町1-8 株式会社カネカ内 Hyogo (JP). 安成 竜輝(YASUNARI, Ryuki); 〒6768688 兵庫県高砂市高砂町宮前町1-8 株式会社カネカ内 Hyogo (JP).
- (74) 代理人: 弁理士法人 H A R A K E N Z O W O R L D P A T E N T & T R A D E M A R K (HARAKENZO WORLD PATENT & TRADEMARK); 〒5300041 大阪府大阪市北区天神橋2丁目北2番6号 大和南森町ビル Osaka (JP).

(54) Title: METHOD FOR PRODUCING POLYHYDROXYALKANOIC ACID

(54) 発明の名称: ポリヒドロキシアルカン酸の製造方法

[図1]



AA Average permeation flux [L/m²·h]
BB Example
CC Comparative example

(57) Abstract: The present invention addresses the problem of providing a method for producing a PHA, the method making it possible to easily suppress lowering in the permeability of a membrane caused by a microorganism-derived component. The problem is solved by a method for producing a PHA, the method including: (a) a step of maintaining a culture medium containing PHA-containing microbial cells at 40-80 °C; (b) a step of enzymatically treating the culture medium obtained in step (a); (c) a step of adding an oxidant to the culture medium obtained in step (b); (e) a step of

(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, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, 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, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

一 国際調査報告 (条約第21条(3))

centrifuging the aqueous suspension obtained in step (c); and (f) a step of membrane filtering the aqueous suspension obtained in step (e).

(57) 要約: 菌体由来成分による膜の透過性の低下を簡便に抑制し得る、PHAの製造方法を提供することを課題とする。(a) PHAを含有する菌体を含む培養液を40~80℃で維持する工程、(b) 前記工程(a)で得られた培養液を酵素処理する工程、(c) 前記工程(b)で得られた培養液に、酸化剤を添加する工程、(e) 前記工程(c)で得られた水性懸濁液を、遠心分離する工程、(f) 前記工程(e)で得られた水性懸濁液を、膜ろ過する工程、を含むPHAの製造方法により上記課題を解決する。

明 細 書

発明の名称：ポリヒドロキシアルカン酸の製造方法

技術分野

[0001] 本発明は、ポリヒドロキシアルカン酸の製造方法に関する。

背景技術

[0002] ポリヒドロキシアルカン酸（以下、「PHA」と称する場合がある。）は、生分解性を有することが知られている。微生物が生成するPHAは、微生物の菌体内に蓄積されるため、PHAをプラスチックとして利用するためには、微生物の菌体内からPHAを分離・精製する工程が必要となる。PHAを分離・精製する工程では、PHA以外の生物由来成分を可溶化した後、得られた水性懸濁液からPHAを取り出す。このとき、例えば、遠心分離、ろ過、乾燥等の分離操作が行われる。特に、PHAを分離、精製する工程では膜分離を行う方法が知られている（例えば、特許文献1、2）。

先行技術文献

特許文献

[0003] 特許文献1：国際公開第2004/029266号

特許文献2：日本国特表2016-524926号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0004] しかしながら、特許文献1、2に記載されているような技術は、膜分離を行う場合に菌体由来成分が膜を閉塞させ、膜の透過性を低下させるため、生産性の観点から改善の余地があった。

[0005] また、膜分離の前に不純物を低減することを目的として、遠心分離および洗浄等を十分に実施する方法もあるが、作業量および洗浄水の廃棄量が増加するという問題もあった。

[0006] そこで、本発明の一態様は、菌体由来成分による膜の透過性の低下を抑制し得る、簡便なPHAの製造方法を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0007] 本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意検討を行った結果、P H Aの製造工程において、特定の工程を特定の順序で含むことにより、菌体由来成分による膜の透過性低下を簡便に抑制し得る、P H Aの製造方法を提供し得ることを見出し、本発明を完成させるに至った。

[0008] 本発明の一態様によれば、(a) P H Aを含有する菌体を含む培養液を40～80℃で維持する工程、(b) 前記工程(a)で得られた培養液に、酵素を添加して前記菌体を酵素処理する工程、(c) 前記工程(b)で得られた培養液に、酸化剤を添加する工程、(e) 前記工程(c)で得られた培養液を、遠心分離する工程、(f) 前記工程(e)で得られた懸濁液を、膜ろ過する工程、を含む、P H Aの製造方法(以下、「本製造方法」と称する。)である。

発明の効果

[0009] 本発明の一態様によれば、菌体由来成分による膜の透過性の低下を簡便に抑制し得る、P H Aの製造方法を提供することができる。

図面の簡単な説明

[0010] [図1]実施例1、比較例1および比較例2の平均透過流束の測定結果をプロットしたグラフである。

[図2]実施例1および比較例1の上清に含まれる不純物の分子サイズを測定した結果を示すグラフである。

[図3]実施例でろ過に使用したろ過装置の模式図である。

発明を実施するための形態

[0011] [1. 本発明の概要]

微生物の生体内からP H Aを分離および精製する方法として、膜分離を行う方法が知られている。しかしながら、精製度が低いP H A水性懸濁液に対して膜分離を実施すると、微生物の菌体由来の不純物により膜が閉塞するため、生産性が低下するという問題があった。膜の閉塞を防ぐ方法として、膜

分離を実施する前に遠心分離および洗浄を十分に実施して、精製度を高くすることにより、PHA以外の不純物の含有量を低下させる方法がある。しかしながら、この場合作業工程が増加するだけでなく、洗浄水の廃棄量も増加するため、経済的な観点から問題があった。

[0012] 上述した特許文献1の技術は、高純度の3-ヒドロキシアルカン酸を高収率で得られる優れた技術であるが、微生物から分離した3-ヒドロキシアルカン酸に酸化剤を添加しているため、菌体由来成分による膜の閉塞を十分に防ぐことは困難であった。また、特許文献2の技術はろ過後に酸化剤を添加する漂白工程を行っているため、同様にろ過時の膜の閉塞を十分に防ぐことは困難であった。

[0013] そこで、本発明者らは、上記問題を解決すべく鋭意検討を行った結果、PHAの製造方法において、膜ろ過を行う前のPHA水性懸濁液に酸化剤を添加することにより、菌体由来成分を低分子化させて、膜の閉塞を防ぎ、膜の透過性の低下を簡便に抑制し得ることを初めて見出した。本製造方法によれば、精製度が低いPHA水性懸濁液を使用したとしても、当該PHA水性懸濁液中の不純物が低分子化されているため、膜の閉塞が発生しにくい。

[0014] また、上述したような構成によれば、ろ過に使用する膜の洗浄に使用する廃水量を低減できるため、例えば、目標14「持続可能な開発のために、海・海洋資源を保全し、持続可能な形で利用する」等の持続可能な開発目標（SDGs）の達成に貢献できる。以下、本製造方法の構成について詳説する。

[0015] [2. PHAの製造方法]

本製造方法は、以下の工程（a）、（b）、（c）、（e）、（f）を含む方法である：

・工程（a）：（a）PHAを含有する菌体を含む培養液を40～80℃で維持する工程
・工程（b）：前記工程（a）で得られた培養液に、酵素を添加して前記菌体を酵素処理する工程

・工程（c）：前記工程（b）で得られた培養液に、酸化剤を添加する工程

- ・工程（e）：前記工程（c）で得られた水性懸濁液を、遠心分離する工程
- ・工程（f）：前記工程（e）で得られた水性懸濁液を、膜ろ過する工程。

[0016] 本製造方法により製造されるPHAは、水性懸濁液、または粉体のいずれの形態であってもよい。すなわち、本製造方法は、「上記工程（a）～（c）および（e）～（f）を含むPHA水性懸濁液の製造方法」であってもよいし、「上記工程（a）～（c）および（e）～（f）を含むPHA粉体の製造方法」であってもよい。

[0017] （工程（a））

本製造方法における工程（a）は、PHAを含有する菌体を含む培養液を40～80℃で維持する工程である。工程（a）により、PHA生産菌を不活化することができる。また、工程（a）により、あらかじめ培養液中の菌体を不活化温度に供して不活化しておくことにより、後述する精製工程等を容易に行うことができる。

[0018] <不活化温度>

本明細書において、「不活化温度」とは、培養液中の微生物を死滅させ得る温度を意味する。換言すれば、「不活化温度」とは、微生物が有する酵素であるカタラーゼを失活させ得る温度を意味する。本発明の一実施形態において、不活化温度は、微生物が死滅し、カタラーゼが不活化される温度である40℃～80℃であり、好ましくは、50℃～80℃であり、より好ましくは、60℃～80℃である。

[0019] <PHA>

本明細書において、「PHA」とは、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。PHAを構成するヒドロキシアルカン酸としては、特に限定されないが、例えば、3-ヒドロキシブタン酸、4-ヒドロキシブタン酸、3-ヒドロキシプロピオン酸、3-ヒドロキシペンタン酸、3-ヒドロキシヘキサン酸、3-ヒドロキシヘプタン酸、3-ヒドロキシオクタン酸等が挙げられる。これらの重合体は、単独重合体でも、2種以上のモノマーユニットを含む共重合体でもよい。

[0020] より詳しくは、PHAとしては、例えば、ポリ（3-ヒドロキシブチレート）（P3HB）、ポリ（3-ヒドロキシブチレート-コ-3-ヒドロキシヘキサノエート）（P3HB3HH）、ポリ（3-ヒドロキシブチレート-コ-3-ヒドロキシバリレート）（P3HB3HV）、ポリ（3-ヒドロキシブチレート-コ-4-ヒドロキシブチレート）（P3HB4HB）、ポリ（3-ヒドロキシブチレート-コ-3-ヒドロキシオクタノエート）（P3HB3HO）、ポリ（3-ヒドロキシブチレート-コ-3-ヒドロキシオクタデカノエート）（P3HB3HOD）、ポリ（3-ヒドロキシブチレート-コ-3-ヒドロキシデカノエート）（P3HB3HD）、ポリ（3-ヒドロキシブチレート-コ-3-ヒドロキシバリレート-コ-3-ヒドロキシヘキサノエート）（P3HB3HV3HH）等が挙げられる。中でも、工業的に生産が容易であることから、P3HB、P3HB3HH、P3HB3HV、P3HB4HBが好ましい。

[0021] また、繰り返し単位の組成比を変えることで、融点、結晶化度を変化させ、結果として、ヤング率、耐熱性等の物性を変化させることができ、かつ、ポリプロピレンとポリエチレンとの間の物性を付与することが可能であること、および上記したように工業的に生産が容易であり、物性的に有用なプラスチックであるという観点から、3-ヒドロキシ酪酸と3-ヒドロキシヘキサノ酸の共重合体であるP3HB3HHがより好ましい。

[0022] 本発明の一実施形態において、P3HB3HHの繰り返し単位の組成比は、柔軟性および強度のバランスの観点から、3-ヒドロキシブチレート単位／3-ヒドロキシヘキサノエート単位の組成比が、80／20～99.9／0.1（mol／mol）であることが好ましく、85／15～97／3（mol／mol）であることがより好ましい。3-ヒドロキシブチレート単位／3-ヒドロキシヘキサノエート単位の組成比が、99.9／0.01（mol／mol）以下であると、十分な柔軟性が得られ、80／20（mol／mol）以上であると、十分な硬度が得られる。

[0023] 本発明の一実施形態において、前記工程（a）で得られたPHAの重量平

均分子量（以下、「Mw」と称する場合がある。）は、好ましくは、150万～250万であり、より好ましくは、160万～240万であり、さらに好ましくは、170万～230万である。PHAの重量平均分子量が前記範囲であれば、培養生産性に優れる。PHAの重量平均分子量は、ゲル浸透クロマトグラフィー（GPC）（昭和電工製「Shodex GPC-101」）によって、カラムにポリスチレンゲル（昭和電工製「Shodex K-804」）を用い、クロロホルムを移動相とし、ポリスチレン換算した場合の分子量として求めることができる。

[0024] 本発明の一実施形態において、前記工程（a）で得られた培養液の固形分濃度は、好ましくは、20～40重量%であり、より好ましくは、25～40重量%であり、さらに好ましくは、30～40重量%である。前記工程（a）で得られた培養液の固形分濃度が前記範囲であれば、十分な量のPHAを得ることができる。

[0025] <菌体>

工程（a）で用いられる菌体は、細胞内にPHAを生成し得る微生物である限り、特に限定されない。例えば、天然から単離された微生物および菌株の寄託機関（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および形質転換体等を使用できる。例えば、PHAの一例であるP3HBを生成する菌体としては、1925年に発見された*Bacillus megaterium*が最初で、他にもカプリアビダス・ネカトル（*Cupriavidus necator*）（旧分類：アルカリゲネス・ユートロファス（*Alcaligenes eutrophus*）、ラルストニア・ユートロファ（*Ralstonia eutropha*）、アルカリゲネス・ラタス（*Alcaligenes latus*）等の天然微生物が挙げられる。これらの微生物ではPHAが菌体内に蓄積されることが知られている。

[0026] また、PHAの一例である、ヒドロキシブチレートとその他のヒドロキシアルカノエートとの共重合体を生成する菌体としては、P3HB3HVおよ

びP3HB3HH生産菌であるアエロモナス・キャビエ (*Aeromonas caviae*)、P3HB4HB生産菌であるアルカリゲネス・ユートロファス (*Alcaligenes eutrophus*) 等が挙げられる。特に、P3HB3HHに関し、P3HB3HHの生産性を上げるために、PHA合成酵素群の遺伝子を導入したアルカリゲネス・ユートロファス AC32株 (*Alcaligenes eutrophus* AC32, FERM BP-6038) (T. Fukui, Y. Doi, J. Bacteriol., 179, p4821-4830 (1997)) 等がより好ましい。また、菌体は、上記以外にも、生産したいPHAに合わせて、各種PHA合成関連遺伝子を導入した遺伝子組換え微生物であっても良い。

[0027] なお、本明細書において、上述した細胞内にPHAを生成し得る微生物を、「PHA生産菌」と称する場合もある。

[0028] (工程 (b))

本製造方法における工程 (b) は、前記工程 (a) で得られた培養液に酵素を添加して、前記菌体を酵素処理する工程である。工程 (b) により、前記菌体由来の不純物 (細胞壁、タンパク質等) を破壊および除去することで、前記菌体からPHAを効率的に回収できる。

[0029] 本発明の一実施形態において、工程 (b) の酵素処理は、溶菌酵素処理および／またはアルカリ性タンパク質分解酵素処理であり得る。溶菌酵素処理およびアルカリ性タンパク質分解酵素処理は、少なくとも1回ずつ行うことが好ましく、必要に応じて、溶菌酵素処理および／またはアルカリ性タンパク質分解酵素処理は、2回以上行ってもよい。

[0030] 本発明の一実施形態において、溶菌酵素処理および／またはアルカリ性タンパク質分解酵素処理を行う順序は特に限定されない。

[0031] 工程 (b) において、酵素処理 (例えば、溶菌酵素処理およびアルカリ性タンパク質分解酵素処理) を行う際には、使用する酵素の至適pHおよび至適温度に合わせて前記培養液のpHおよび温度を調整することが好ましい。前記培養液のpHおよび温度の調整方法は特に限定されず、公知の方法を用

いることができる。

[0032] 工程（b）において、界面活性剤を添加する工程を含んでもよい。工程（b）において界面活性剤の添加は、アルカリ性タンパク質分解酵素の添加前、添加と同時、添加後のいずれにおいても行うことができる。好ましくは、アルカリ性タンパク質分解酵素の添加後である。工程（b）において界面活性剤を添加することにより、菌体由来の不純物（核酸、タンパク質等）を分散および溶解させ、高純度のPHAを菌体から分離することができる。

[0033] <溶菌酵素処理>

本発明の一実施形態において、溶菌酵素処理とは、溶菌酵素を前記培養液に添加し、前記菌体を酵素処理する工程である。

[0034] 本明細書において、「溶菌酵素」とは、菌体の細胞壁（例えば、ペプチドグリカン）を分解する（溶菌する）活性を有する酵素を意図する。

[0035] 本発明の一実施形態において、溶菌酵素は特に限定されず、例えば、リゾチーム、ラビアー、 β -N-アセチルグルコサミニダーゼ、エンドリシン、オートリシン等が挙げられる。経済的に有利であるとの観点から、リゾチームが好ましい。これらの1種類を単独で使用してもよく、2種類以上を組み合わせ使用してもよい。

[0036] 溶菌酵素としては、市販品を用いることもでき、例えば、富士フィルム和光純薬株式会社製「リゾチーム」、「アクロモペプチダーゼ」等が挙げられる。

[0037] 本発明の一実施形態において、溶菌酵素の至適pHは、当該溶菌酵素が細胞壁分解活性を有する限り特に限定されないが、例えば、5.0～11.0であり、好ましくは6.0～9.0であり、より好ましくは6.0～8.0である。

[0038] 本発明の一実施形態において、溶菌酵素の至適温度は特に限定されないが、過度の加温を必要とせず、PHAの熱変化（熱分解）を防ぐことができるとの観点から、60℃以下が好ましく、50℃以下がさらに好ましい。至適温度の下限は特に限定されないが、過度の冷却操作が必要なく、経済的であ

るとの観点から、室温（例えば25℃）以上であることが好ましい。

[0039] <アルカリ性タンパク質分解酵素処理>

本明細書において、「アルカリ性タンパク質分解酵素」とは、アルカリ環境下（例えばpH8.5の溶液中）でタンパク質を分解する活性を有するタンパク質分解酵素を意図する。

[0040] また、本明細書において、「アルカリ性タンパク質分解酵素処理」とは、前記アルカリ性タンパク質分解酵素を前記培養液に添加し、菌体を酵素処理する工程を意図する。

[0041] 本発明の一実施形態において、アルカリ性タンパク質分解酵素は、アルカリ環境下でタンパク質を分解する活性を有する限り特に限定されず、例えば、セリン特異的タンパク質分解酵素（例えば、サブチリシン、キモトリプシン、トリプシン）、システイン特異的タンパク質分解酵素（例えばパパイン、プロメライン、カテプシン）、アスパラギン酸特異的タンパク質分解酵素（例えば、ペプシン、カテプシンD、HIVプロテアーゼ）等が挙げられる。経済的に有利であるとの観点から、セリン特異的タンパク質分解酵素、とりわけ、サブチリシン（例えば、アルカラゼ）が好ましい。これらの1種類を単独で使用してもよく、2種類以上を組み合わせ使用してもよい。

[0042] アルカリ性タンパク質分解酵素としては、市販品を用いることもでき、例えば、Novozyme社製「アルカラゼ2.5L」；天野エンザイム株式会社社製「プロチンSD-A Y10」および「プロテアーゼP「アマノ」3SD」；ダニスコジャパン株式会社製「マルチフェクトPR6L」および「オプチマーゼPR89L」；新日本化学工業株式会社製「スミチームMP」；ディー・エス・エムジャパン株式会社製「デルボラーゼ」；ナガセケムテックス株式会社製「ビオプラーゼOP」、「ビオプラーゼSP-20FG」および「ビオプラーゼSP-4FG」；HBI株式会社製「オリエンターゼ22BF」；ヤクルト薬品工業株式会社製「アロアーゼXA-10」；Novozyme社製「エスペラーゼ」等が挙げられる。

[0043] 本発明の一実施形態において、アルカリ性タンパク質分解酵素の至適pH

は、当該アルカリ性タンパク質分解酵素がアルカリ環境下で活性を有する限り特に限定されないが、例えば8.0～14.0であり、好ましくは8.0～12.0であり、より好ましくは8.0～10.0であり、さらに好ましくは8.0～9.0であり、最も好ましくは8.5である。

[0044] 本発明の一実施形態において、アルカリ性タンパク質分解酵素の至適温度は、特に限定されないが、過度の加温を必要とせず、P3HAの熱変化（熱分解）を防ぐことができるとの観点から、60℃以下が好ましく、50℃以下がさらに好ましい。至適温度の下限は、特に限定されないが、過度の冷却操作が必要なく、経済的であるとの観点から、室温（例えば、25℃）以上であることが好ましい。

[0045] 本発明の一実施形態において、工程（b）の酵素処理は、リゾチームおよびアルカラゼの組み合わせにより行われ得る。

[0046] （工程（c））

本製造方法における工程（c）は、前記工程（b）で得られた培養液に酸化剤を添加する工程である。なお、本明細書において、「低分子化」とは、実施例に記載の方法により測定した場合に「上清に含まれる不純物のうち、80重量%以上が3kDa以下である」ことを意図する。また、本明細書において、工程（c）およびそれ以降の工程で得られる、PHAを含む水性懸濁液を、「PHA水性懸濁液」または「水性懸濁液」と略して表記する場合がある。

[0047] 工程（c）により、培養液に含まれる菌体由来の不純物を低分子化させることができる。培養液に含まれる不純物を低分子化させることにより、後述する工程（f）において、膜の閉塞を抑制することができるため、PHAの生産性が向上する。また、PHAの重量平均分子量を調整することにより、所望の重量平均分子量のPHAを製造することが可能となる。

[0048] 前記酸化剤としては、特に限定されないが、例えば、過酸化水素（ H_2O_2 ）、オゾン；過酸化ナトリウム（ Na_2O_2 ）、過ホウ酸ナトリウム（ $Na_2H_4B_2O_8$ ）、過炭酸ナトリウム（ $Na_2H_3CO_6$ ）、過硫酸ナトリウム（ Na

S_2O_8) 等の他の無機過酸化物；亜塩素酸塩、塩素酸塩、メタクロロ過安息香酸 ($C_7H_5ClO_3$) 過塩素酸塩、過塩素酸 (ClO_4)、二酸化塩素 (ClO_2) 等の類似のハロゲン化合物；過ギ酸 (CH_2O_3)、過酢酸 (CH_3CO_3H) 等の過酸；過マンガン酸カリウム等の過マンガン酸化合物；過ホウ酸ナトリウム；硝酸カリウム (KNO_3)；ビスマス酸ナトリウム；硝酸セリウムアンモニウム、硫酸セリウム等のセリウム (IV) 化合物等が挙げられる。この中でも、入手が容易である観点から、酸化剤は、過酸化水素またはオゾンであることが好ましい。

- [0049] 工程 (c) において、培養液中の過酸化水素の濃度は、例えば、0.2～30重量%であり、好ましくは、0.2～15重量%であり、より好ましくは、0.2～10重量%である。0.2重量%以上であれば、培養液に含まれる菌体由来の不純物を低分子化させることができる。また、30重量%以下であれば、PHA製造コストを抑えることができる。工程 (b) において、上記の濃度となるように、過酸化水素を添加し得る。
- [0050] また、工程 (c) において、オゾンの添加量は、例えば、PHAを含有するバイオマス1gにつき、0.01～0.1gであり、好ましくは、0.02～0.08gであり、より好ましくは、0.02～0.07gである。0.01g以上であれば、培養液の粘度を低下させることができる。また、0.1g以下であれば、残存オゾン量が少量となる。
- [0051] 本発明の一実施形態において、過酸化水素を添加する場合、過酸化水素の添加とともに、 $NaHCO_3$ を添加してもよい。 $NaHCO_3$ により、過酸化水素の働きが補助されることが期待される。
- [0052] また、本発明の一実施形態において過酸化水素を添加する場合、過酸化水素の添加とともに、キレート剤を添加してもよい。キレート剤の添加により、過酸化水素溶液を安定化させることができる。キレート剤としては、特に限定されないが、ケイ酸ナトリウム、EDTA、trans-1,2-シクロヘキサンジアミン四酢酸一水和物等が挙げられる。
- [0053] 工程 (c) において、菌体由来の不純物の低分子化を効率よく実施するた

めに、培養液の好適なpHは、10.0～11.0であり、より好ましくは、pH10.2～10.8であり、さらに好ましくはpH10.4～10.6である。pHが10.0以上であれば、菌体由来の不純物を効率良く低分子化できる。また、pHが11.0以下であれば、PHAの重量平均分子量の低下を抑制できる。pHの調整は、例えば、アルカリ水溶液を添加することによって行ってもよい。

- [0054] 本発明の一実施形態において、アルカリ水溶液は、後述する工程(a')と同種類の塩基性化合物を含む水溶液を用いることができる。
- [0055] 工程(c)において、酸化剤の添加と、pHの調整とを行う順番は特に限定されないが、効率的にpHを低下させる観点から酸化剤を添加した後に、pHの調整を行うことが好ましい。
- [0056] 工程(c)において、菌体由来の不純物低分子化を効率よく行い、かつPHAの重量平均分子量低下を抑制するために、培養液の温度は、30℃～75℃であり、好ましくは、35℃～70℃であり、より好ましくは40℃～60℃である。
- [0057] 工程(c)において得られるPHA水性懸濁液は、ニュートン流体となっていることが好ましい。PHA水性懸濁液がニュートン流体であれば、粘度のせん断速度依存性が低いため、攪拌装置内においてPHA水性懸濁液が均一になりやすく、ハンドリング性が向上する。
- [0058] 本発明の一実施形態において、工程(c)において、調整したpHを、好ましくは、0.1～30時間、より好ましくは、0.25～24時間、さらに好ましくは、0.5～15時間維持する工程を含む。工程(c)において、培養液のpHを一定時間維持することにより、過酸化水素が十分に反応し、菌体由来の不純物を十分に低分子化させることができる。
- [0059] 上記pHの維持工程において、調整したpHを維持する方法は特に限定されず、例えば、アルカリ水溶液の添加により行われる。アルカリ水溶液は、特に限定されないが、例えば、上述したアルカリ水溶液が使用される。
- [0060] また、本発明の一実施形態において、上記pHの維持工程における温度は

、特に限定されないが、例えば、30～80℃であり、好ましくは、40～60℃である。

[0061] (工程(e))

工程(e)は、前記工程(c)で得られたPHA水性懸濁液を遠心分離し、上清を除去して、PHAが濃縮されたPHA水性懸濁液を得る工程である。すなわち、菌体から分離したPHA水性懸濁液を濃縮および精製する工程である。なお、本製造方法が後述する工程(d)を含む場合、工程(e)は工程(d)で得られたPHA水性懸濁液を遠心分離し、上清を除去して、PHAが濃縮されたPHA水性懸濁液を得る工程となる。一実施形態において、工程(e)ではPHA水性懸濁液を2倍まで濃縮、2.5倍まで濃縮、3倍まで濃縮、3.3倍まで濃縮、または4倍まで濃縮してもよい。PHA水性懸濁液を濃縮することにより、PHA水性懸濁液の精製度を高めることができる。

[0062] 工程(e)において、前記PHA水性懸濁液を遠心分離する方法は特に限定されず、公知の方法を用いることができる。

[0063] 工程(e)において、前記PHA水性懸濁液を遠心分離し、上清を除去した後、沈降物に溶液を添加し、再度遠心分離および上清を除去する工程を繰り返して行ってもよい。この操作により、PHA水性懸濁液の精製度を高めることができる。PHA水性懸濁液の精製度は、例えば280nm、または254nmにおける吸光度を測定することによって決定することができる。ここで、上清を除去した後に添加する溶液は、PHA水性懸濁液と同じpHに調整されたアルカリ水溶液であることが好ましい。本発明の一実施形態において、本製造方法が工程(d)を含む場合、前記溶液は、前記工程(d)において使用したアルカリ水溶液と同じであることが好ましい。

[0064] 工程(e)により、最終製品に残留する不純物量が概ね決定される。これらの不純物は、できる限り低減させた方が好ましい。当然に、用途によっては、最終製品の物性を損なわない限り不純物が混入しても構わないが、医療用途等、高純度のPHAが必要とされる場合は、できる限り不純物を低減

させることが好ましい。その際の精製度の指標としては、例えば、PHA水性懸濁液中に残留しているタンパク質量（残タンパク質量）が挙げられる。PHA水性懸濁液中のタンパク質量は、PHA粉体の残タンパク質量を達成できる量であれば、特に限定されない。当該タンパク質量は、好ましくは、PHA水性懸濁液中のPHA重量当たり3000ppm以下、より好ましくは、2500ppm以下、さらに好ましくは、2000ppm以下である。

[0065] 工程(e)において、PHA水性懸濁液を構成する溶媒（「溶媒」は、「水性媒体」とも称する。）は、特に限定されず、水、または水と有機溶媒との混合溶媒であってもよい。また、当該混合溶媒において、有機溶媒の濃度は、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、有機溶媒は特に限定されないが、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、ヘプタノール等のアルコール類；アセトン、メチルエチルケトン等のケトン類；テトラヒドロフラン、ジオキサン等のエーテル類；アセトニトリル、プロピオニトリル等のニトリル類；ジメチルホルムアミド、アセトアミド等のアミド類；ジメチルスルホキシド、ピリジン、ピペリジン等が挙げられる。中でも、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、プロピオニトリル等が、除去しやすい点から好ましい。また、メタノール、エタノール、1-プロパノール、2-プロパノール、ブタノール、アセトン等が、入手容易であることからより好ましい。さらに、メタノール、エタノール、アセトンが、特に好ましい。

[0066] PHA水性懸濁液を構成する水性媒体中の水の含有量は、5重量%以上が好ましく、より好ましくは、10重量%以上であり、さらに好ましくは、30重量%以上であり、特に好ましくは、50重量%以上である。

[0067] なお、工程(e)におけるPHA水性懸濁液体は、本発明の本質を損なわ

ない限り、他の溶媒、菌体由来の成分、精製時に発生する化合物等を含んでいても構わない。

[0068] (工程 (f))

工程 (f) は、前記工程 (e) で得られた水性懸濁液を膜ろ過する工程である。工程 (f) により、PHA 水性懸濁液から菌体由来の不純物を膜ろ過によって除去し、PHA 水性懸濁液を得ることができる。

工程 (f) における PHA 水性懸濁液の pH は、好ましくは 8.0~12.0 が好ましく、より好ましくは、9.0~11.5 であり、さらに好ましくは、10.0~11.0 である。pH が 8.0~12.0 であれば、PHA の分子量低下を抑制しながら、PHA をより高い濃度まで濃縮できる。

[0069] 工程 (f) において実施するろ過方法は特に限定されず、クロスフローろ過、デッドエンドろ過等であってもよい。これらの中でも、膜表面のファウリングを抑制できる観点から、クロスフローろ過であることが好ましい。

[0070] 工程 (f) において使用されるろ過膜の平均細孔径は特に限定されないが、例えば 0.05~0.5 μm であり、より好ましくは 0.1~0.3 μm である。平均細孔径が上記範囲であれば、透過流束が高くなり、必要な膜面積を減らすことができるため、生産性が向上する。ろ過膜の平均細孔径は、バブルポイント法によって決定することができる。

[0071] 工程 (f) において使用されるろ過膜の内径は特に限定されないが、例えば 4~10 mm であり、好ましくは 4~7 mm である。内径が上記範囲であれば、ろ過を効率よく実施することができる。なお、本明細書において「ろ過膜の内径」はろ過膜の円形中空断面の内側の直径を意味する。

[0072] ろ過膜の材質は特に限定されないが、例えばポリプロピレン、フッ素系樹脂（例えば、ポリテトラフルオロエチレン、ポリフッ化ビニリデン、ポリフッ化ビニル、四フッ化エチレン・六フッ化プロピレン共重合体、エチレン・四フッ化エチレン共重合体等）、セルロースエステル（例えばセルロースアセテート、セルロースアセテートプロピオネート、セルロースアセテートブチレート等）、ポリスルホン系樹脂（例えば、ポリスルホン、ポリエーテル

スルホン等)、ポリアクリロニトリル、ポリイミド等の樹脂、アルミナ、ムライト、ジルコニア、コーズライト等の多孔質セラミックス、またはステンレス鋼等の多孔質焼結金属からなる多孔質体等の無機材料等が挙げられる。

[0073] 工程(f)における膜間差圧は特に限定されないが、0.001~0.1 MPaが好ましく、0.01~0.1 MPaがより好ましい。膜間差圧が上記範囲であれば、ろ過が十分に行われ、膜の劣化を抑制することができる。

[0074] 工程(f)における、PHA水性懸濁液の線速度は特に限定されないが、1~5 m/sが好ましく、1.5~4 m/sがより好ましく、2~4 m/sがさらに好ましい。線速度が上記範囲であれば、ろ過を十分に実施可能であり、膜の劣化を抑制することができる。また、ろ過膜がポリプロピレン等の樹脂製である場合は、ろ過膜の耐久性の観点から、線速度は3 m/s以下とすることが好ましい。

[0075] (工程(a'))

本発明の一実施形態において、本製造方法は、前記工程(a)で得られた培養液に、アルカリ水溶液を添加して、前記菌体中のPHAの分子量を調整する工程(a')、を含んでもよい。すなわち、工程(a')は、工程(a)で菌体が不活化された培養液にアルカリ水溶液を添加することにより、前記菌体中のPHAの分子量を適当な大きさに調整する工程である。換言すれば、工程(a')はアルカリ処理工程であるとも言える。工程(a')により、PHA粉体の加工性が良くなるという利点を有する。また、工程(a')には、菌体中のタンパク質を可溶化できるという利点も有する。

[0076] 本発明の一実施形態において、アルカリ水溶液は、塩基性化合物を含む水溶液である。アルカリ水溶液に含まれる塩基性化合物としては、特に限定されないが、例えば、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム等のアルカリ金属またはアルカリ土類金属の水酸化物；炭酸ナトリウム、炭酸カリウム等の金属炭酸塩；リン酸ナトリウム、リン酸カリウム、リン酸水素ナトリウム、リン酸水素カリウム等の金属リン酸塩または金属リン酸水素塩等が挙げられる。

[0077] 本発明の一実施形態において、アルカリ水溶液に含まれる塩基性化合物は

、アルカリ金属水酸化物またはアルカリ土類金属水酸化物が好ましく、水酸化ナトリウムがより好ましい。塩基性化合物は、1種を単独で使用してもよく、2種以上を併用してもよい。

[0078] 工程(a')において、アルカリ水溶液を添加することにより、培養液のpHを8.0~12.0に調整することが好ましく、pHを8.2~11.5に調整することがより好ましく、pHを8.4~11.5に調整することがさらに好ましい。pHを8.0以上に調整し、かつpHを一定値(pH8.0~12.0の任意の一定値)に維持することで、菌体中のPHAの分子量を好適に調整することができる。また、pHを12.0以下に調整することで、意図しない菌体の損傷を防ぐことができる。工程(a')における反応時間(換言すると、pHを8.0~12.0に調整して維持する時間)は、例えば、4時間~30時間であり、8時間~20時間が好ましい。工程(a')における反応時間が前記の範囲内であれば、菌体中のPHAの分子量を、好適な範囲に調整できるとともに、PHAの過度の低分子量化を防ぐことができる。

[0079] 工程(a')における温度は、100℃未満であることが好ましく、80℃未満であることがより好ましい。下限は特に限定されないが、例えば、50℃以上であることが好ましい。

[0080] 本発明の一実施形態において、前記工程(a')で得られた培養液中のPHAの重量平均分子量は、好ましくは、10万~80万であり、より好ましくは、20万~80万であり、さらに好ましくは、40万~80万である。重量平均分子量が10万以上であると、PHAを粉体とした場合に十分な機械物性等が得られ、80万以下であると、十分な結晶化速度が得られ、良好な成形加工性が達成される。

[0081] (工程(d))

本発明の一実施形態において、本製造方法は、前記工程(e)の前に、界面活性剤およびアルカリ水溶液を添加して、pHを10.0~12.0に調整する工程(d)を含むことが好ましい。工程(d)は、下記の工程(d1

) および工程 (d 2) を含むことが好ましい。

・工程 (d 1) : 前記工程 (c) で得られた培養液にアルカリ水溶液を添加して pH を 10.0 ~ 12.0 に調整する工程

・工程 (d 2) : 界面活性剤を添加する工程

<工程 (d 1)>

工程 (d 1) は、上述の通り、前記工程 (c) で得られた PHA 水性懸濁液にアルカリ水溶液を添加して pH を 10.0 ~ 12.0 に調整する工程である。工程 (d 1) により、菌体由来の不純物 (核酸、タンパク質等) を分散および溶解することで、高純度の PHA を菌体から分離することができる。

[0082] 工程 (d 1) において、アルカリ水溶液は、(工程 (a')) の項の記載が援用される。

[0083] 工程 (d 1) において、アルカリ水溶液を添加することにより、pH を 10.0 ~ 12.0 に調整することが好ましく、pH を 10.2 ~ 11.8 に調整することがより好ましく、10.4 ~ 11.6 に調整することがさらに好ましい。pH を 10.0 以上に調整することで、菌体成分の分解および溶解ができるという利点を有する。また、pH を 12.0 以下に調整することで、意図しない菌体の損傷を防ぐことができる。

[0084] 工程 (d 1) における温度は、100℃未満であることが好ましく、80℃未満であることがより好ましい。下限は特に限定されないが、例えば、40℃以上であることが好ましい。

[0085] <工程 (d 2)>

工程 (d 2) は、培養液に界面活性剤を添加する工程である。工程 (d 2) により、前記菌体に含まれる不純物、特に細胞膜を効率的に処理することができ、菌体由来の不純物をより多く除去できるため、より高純度の PHA を菌体から分離することができる。

[0086] 本発明の一実施形態において、界面活性剤としては、特に限定されないが、例えば、陰イオン界面活性剤、陽イオン界面活性剤、両性界面活性剤、非

イオン界面活性剤等が挙げられる。このうち、細胞膜の除去能力が高いとの観点から、陰イオン界面活性剤が好ましい。これらの1種類を単独で使用してもよく、2種類以上を組み合わせ使用してもよい。

[0087] 陰イオン界面活性剤としては、例えば、アルキル硫酸塩、アルキルベンゼンスルホン酸塩、アルキル硫酸エステル塩、アルケニル硫酸エステル塩、アルキルエーテル硫酸エステル塩、アルケニルエーテル硫酸エステル塩、 α -オレフィンスルホン酸塩、 α -スルホ脂肪酸塩、 α -スルホ脂肪酸塩のエステル、アルキルエーテルカルボン酸塩、アルケニルエーテルカルボン酸塩、アミノ酸型界面活性剤、N-アシルアミノ酸型界面活性剤等が挙げられる。この中でも、アルキル硫酸エステル塩が好ましく、細胞膜の除去能力が高く、安価であるとの観点から、ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）が特に好ましい。陰イオン界面活性剤は、これらの1種類を単独で使用してもよく、2種類以上を組み合わせ使用してもよい。

[0088] 工程（d2）において、添加する界面活性剤の量は特に限定されず、前記培養液に対して、例えば、0.1～5.0重量%であり、0.3～2.5重量%が好ましい。

[0089] 工程（d2）は、工程（d1）の前に行ってもよいし、同時に行ってもよいし、後に行ってもよい。すなわち、工程（d）において、界面活性剤およびアルカリ水溶液の添加は、アルカリ水溶液を添加しpH調整を行った後、界面活性剤を添加してもよいし、界面活性剤およびアルカリ水溶液を同時に添加しpH調整を行ってもよいし、界面活性剤の添加の後、アルカリ水溶液を添加しpH調整を行ってもよい。

[0090] （工程（g））

本発明の一実施形態において、本製造方法は、工程（f）で得られたPHA水性懸濁液を乾燥する工程（g）を含むことが好ましい。工程（g）は、前記工程（f）で得られたPHA水性懸濁液から水分を除去する工程である。工程（g）により、PHA水性懸濁液から水分量が減少したPHA粉体を得ることができる。

- [0091] 乾燥の方法としては、例えば、P H A水性懸濁液を微細な液滴の状態として乾燥機内に供給し、当該乾燥機内で熱風と接触させながら乾燥する方法（噴霧乾燥）、減圧乾燥等が挙げられる。好ましくは、噴霧乾燥が用いられる。すなわち、工程（g）は、乾燥工程と換言できる。
- [0092] 工程（g）で噴霧乾燥を行う場合、P H A水性懸濁液を微細な液滴の状態として乾燥機内に供給する方法（アトマイザー）は、特に限定されず、回転ディスクを用いる方法、ノズルを用いる方法等の公知の方法が挙げられる。乾燥機内における液滴と熱風の接触方式は、特に限定されず、並流式、向流式、これらを併用する方式等が挙げられる。
- [0093] 工程（g）で噴霧乾燥を行う場合の乾燥温度は、P H A水性懸濁液の液滴から水性媒体の大半を除去できる温度であればよく、目的とする含水率まで乾燥させることができ、かつ、品質悪化（分子量低下、色調低下等）、熔融等を極力生じさせないような条件で、適宜設定できる。例えば、噴霧乾燥機に吹き込む熱風の温度は、100～300℃の範囲で、適宜選択できる。また、乾燥機内の熱風の風量についても、例えば、乾燥機のサイズ等に応じて、適宜設定できる。
- [0094] 工程（g）で噴霧乾燥を行った場合、工程（g）の後に、得られたP H A（P H A粉体等）をさらに乾燥させる工程（例えば、減圧乾燥に付す工程等）を含んでいてもよい。また、本製造方法は、その他の工程（例えば、P H A水性懸濁液に各種添加物を添加する工程等）を含んでいてもよい。
- [0095] 本発明は上述した各実施形態に限定されるものではなく、請求項に示した範囲で種々の変更が可能であり、異なる実施形態にそれぞれ開示された技術的手段を適宜組み合わせて得られる実施形態についても本発明の技術的範囲に含まれる。
- [0096] すなわち、本発明は以下の構成を含む。
- <1>（a）ポリヒドロキシアルカン酸を含有する菌体を含む培養液を40～80℃で維持する工程、
- （b）前記工程（a）で得られた培養液に、酵素を添加して前記菌体を酵

素処理する工程、

(c) 前記工程 (b) で得られた培養液に、酸化剤を添加する工程、

(e) 前記工程 (c) で得られた水性懸濁液を、遠心分離する工程、

(f) 前記工程 (e) で得られた水性懸濁液を、膜ろ過する工程、

を含む、ポリヒドロキシアルカン酸の製造方法。

<2>前記工程 (e) の前に、(d) 前記工程 (c) で得られた培養液に、界面活性剤およびアルカリ水溶液を添加して、pHを10.0~12.0に調整する工程を含む、<1>に記載のポリヒドロキシアルカン酸の製造方法。

<3>前記工程 (b) における酵素が、溶菌酵素、および/またはアルカリ性タンパク質分解酵素である、<1>または<2>に記載のポリヒドロキシアルカン酸の製造方法。

<4>前記工程 (c) における酸化剤が、過酸化水素またはオゾンである、<1>~<3>のいずれかに記載のポリヒドロキシアルカン酸の製造方法。

<5>前記工程 (f) における膜ろ過がクロスフローろ過である、<1>~<4>のいずれかに記載のポリヒドロキシアルカン酸の製造方法。

<6>さらに、(g) 前記工程 (f) で得られた水性懸濁液を乾燥する工程を含む、<1>~<5>のいずれか1項に記載のポリヒドロキシアルカン酸粉体の製造方法。

<7>前記工程 (c) において、水性懸濁液のpHが10.0~11.0である、<1>~<6>のいずれかに記載のポリヒドロキシアルカン酸の製造方法。

<8>前記工程 (e) において、水性懸濁液に含まれるタンパク質量が3000ppm以下になるまで遠心分離を実施する、<1>~<7>のいずれかに記載のポリヒドロキシアルカン酸の製造方法。

<9>工程 (f) における、水性懸濁液のpHが8.0~12.0である<1>~<8>のいずれかに記載のポリヒドロキシアルカン酸の製造方法。

<10>工程 (c) における、培養液の温度が、30℃~75℃である、<

1 > ~ < 9 > のいずれかに記載のポリヒドロキシアルカン酸の製造方法。

実施例

[0097] 本発明の実施例について以下に説明する。

[0098] [測定方法]

実施例および比較例における測定を、以下の方法で行った。

[0099] (低分子化の確認)

1. 遠心分離を行い、アルカリ処理後の上清の 280 nm における吸光度が 0.5 以下となった懸濁液をさらに遠心分離し、上清を取得した。
2. 1 で取得した上清を孔径 0.45 μm の遠心ろ過デバイス (製品名: ナノセップ、日本ポール社製) で一定時間ろ過し、ろ液を回収した。
3. 2 で取得したろ液を孔径 0.2 μm の遠心ろ過デバイス (製品名: ナノセップ、日本ポール社製) で一定時間ろ過し、ろ液と濃縮液を回収した。
4. 3 で取得したろ液を分画分子量 300 kDa の遠心ろ過デバイス (製品名: ナノセップ、日本ポール社製) で一定時間ろ過し、ろ液と濃縮液を回収した。
5. 4 で取得したろ液を分画分子量 30 kDa の遠心ろ過デバイス (製品名: ナノセップ、日本ポール社製) で一定時間ろ過し、ろ液と濃縮液を回収した。
6. 5 で取得したろ液を分画分子量 3 kDa の遠心ろ過デバイス (製品名: ナノセップ、日本ポール社製) で一定時間ろ過し、ろ液と濃縮液を回収した。
7. 3 ~ 5 で得た濃縮液と、6 で得たろ液について、すべてが同じ液量になるよう純水を添加した。
8. 7 で得た液のそれぞれについて、波長 254 nm での吸光度を測定した (測定機器: 分光光度計 (U-5100、日立ハイテク社製))。

[0100] (平均透過流束)

平均透過流束は、ろ過に要した時間、および下記式に基づいて算出した。

[0101] 平均透過流束 ($\text{L} / \text{m}^2 \text{h}$) = 全透過液量 (L) / (膜面積 (m^2) × ろ過

時間 (h))

(タンパク質量)

PHA表面に付着したタンパク質量は、BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific社製) を用いて測定した。具体的には、工程 (c') 直前のPHA水性懸濁液を20~50mg (液中に約10mgのP3HB3HH粒子を含有する量) を15mLのファルコンチューブに投入し、前記キットの試薬2mLを添加した後、60℃で30分間振とうした。振とう終了から30分後に25℃に冷却し、波長562nmの吸光度を測定した。

[実施例1]

(培養)

国際公開第WO2019/142717号に記載のラルストニア・ユートロファを、同文献の段落[0041]~[0048]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・ネカトールに分類されている。PHAの繰り返し単位の組成比(3HB単位/3HH単位の組成比)は94/6(mol/mol)であった。

[0102] (工程(a):不活化)

上記で得られた菌体培養液を、内温60~70℃で7時間加熱および攪拌処理することにより滅菌処理を行い、不活化培養液を得た。不活化培養液中のPHAの重量平均分子量は、180万であった。また、不活化培養液の固形分濃度は、30重量%であった。

[0103] (工程(a'):アルカリ処理工程)

30%水酸化ナトリウムを用いて、不活化培養液のpHを9.0±0.2に調整し、内温を50±2℃として、PHAの分子量調整を12時間行った。工程(a')の後のPHAの分子量は50万であった。

[0104] (工程(b):酵素処理)

不活化培養液に対し、細胞壁中の糖鎖(ペプチドグリカン)を分解する酵

素であるリゾチーム（富士フィルム和光純薬製）を、液中濃度が10ppmとなるように添加して、50℃で2時間保持した。その後、タンパク質分解酵素であるアルカラゼ2.5L（Novozyme社製）を、液中濃度が300ppmとなるように添加し、次いで、50℃で30%水酸化ナトリウムを添加して、pH8.5に調整しながら2時間維持し、酵素処理された培養液を得た。

[0105] （工程（c）：酸化剤処理）

上記で得られた酵素処理された培養液に酸化剤である過酸化水素（富士フィルム和光純薬製）を添加した。次いで、30%水酸化ナトリウム水溶液を添加して、pHを10.5に調整した。溶液を60℃で維持しつつ、30%水酸化ナトリウム水溶液を添加し続けることにより、pHを10.5で4時間維持し、PHA水性懸濁液を得た。

[0106] （工程（d）：界面活性剤およびアルカリ処理）

前記過酸化水素処理後のPHA水性懸濁液に対して、0.6～1.0重量%になるように界面活性剤であるドデシル硫酸ナトリウム（SDS、花王製）を添加した。その後、界面活性剤を添加したPHA水性懸濁液に、水酸化ナトリウム水溶液を添加して、pHが11.0±0.2となるように調整し、アルカリ処理されたPHA水性懸濁液を得た。

[0107] （工程（e）：遠心分離）

上記で得られたアルカリ処理されたPHA水性懸濁液に対して、等量の蒸留水を添加した。これを遠心分離した後、上清を除去して2倍濃縮した。この濃縮したPHAの水性懸濁液に、除去した上清と同量の水酸化ナトリウム水溶液（pH11.0）を添加して遠心分離し、上清を除去した。そこに再度水を添加して懸濁させ、0.2重量%のドデシル硫酸ナトリウムと、PHAの1/100重量のプロテアーゼ（ノボザイム社製、エスペラーゼ）を添加し、pH10.0で50℃に保持したまま、2時間攪拌した。その後、遠心分離により上清を除去して（1）2.5倍、（2）3倍、（3）3.3倍、（4）3.7倍、（5）4倍濃縮した。さらに水を添加することで、PH

A粒子のメジアン径（D50）が $2\mu\text{m}$ であり、固形分濃度が26重量%（PHA粒子の含有量： 260g/L ）であるPHA水性懸濁液を得た。タンパク質量はそれぞれ、（1） 1630ppm 、（2） 1430ppm 、（3） 1400ppm 、（4） 1220ppm 、（5） 1200ppm であった。

[0108] （工程（f）：膜ろ過）

ろ過膜として管状膜（MEMBRALOX（登録商標）1T1-70、PALL社製、材質：アルミナセラミック）を用いた、図3に示す過装置にて、前記PHA水性懸濁液を該管状膜に循環供給し、固形分濃度が55重量%となるまでろ過を実施した。ろ過時の線速度（管状膜内に通液する線速度）は $3\sim 4\text{m/s}$ 、膜間差圧は 80kPa とした。

[0109] 〔比較例1〕

酸化剤処理を実施しなかったこと以外は、実施例1と同様にしてPHA水性懸濁液を得た。なお、濃縮倍率はそれぞれ2.9倍、3倍、3.1倍、3.3倍、3.5倍、3.7倍、4倍、4.2倍、4.5倍、5.5倍とした。

[0110] 〔比較例2〕

酸化剤処理を遠心分離後に実施したこと以外は、実施例1と同様にしてPHA水性懸濁液を得た。なお、比較例2は特許文献1に記載されている方法に相当する。濃縮倍率はそれぞれ3倍、3.5倍、5倍とした。

[0111] 〔結果〕

実施例1、比較例1、比較例2で製造した各PHA水性懸濁液のサンプルの吸光度と平均透過流束の測定結果をプロットしたグラフを、図1に示す。図1中、各サンプルは、濃縮倍率が低いものほど、換言すれば、精製度の低いものほど、 280nm における吸光度の値は高くなっている。

[0112] 図1より、遠心分離の前に酸化剤処理を行った実施例1は、酸化剤処理を行わなかった比較例1、および遠心分離の後に過酸化水素処理を行った比較例2と比べて、同程度の吸光度（すなわち、同程度の精製度）において、P

HA水性懸濁液の平均透過流束が高かった。膜ろ過時のPHA水性懸濁液の平均透過流束が高いほど、より多くのPHA水性懸濁液が膜を透過（ろ過）されていることを示す。以上より、本製造方法は、菌体由来成分による膜の透過性の低下を簡便に抑制することができることが示された。

[0113] また、図2には、実施例1の4倍濃縮した上清と、比較例1の4倍濃縮した上清について、低分子化の確認を行った結果を示す。図2より、実施例1の上清は、比較例1の上清と比較して、3kDa以下の大きさの分子が多く含まれていた。また、別途、ポリアクリルアミド電気泳動（SDS-PAGE）により、実施例1の上清と比較例1の上清について低分子化の確認を行ったところ、上記と同様の結果が得られた（データは示さない。）。したがって、本製造方法による膜の透過性の低下の抑制は、培養液に含まれる不純物の低分子化により、膜ろ過中の膜の閉塞が抑制されていることに因るものであることが示唆された。

産業上の利用可能性

[0114] 本発明は、PHAを、収率よく製造することができる。また、したがって、本発明は、農業、漁業、林業、園芸、医学、衛生品、衣料、非衣料、包装、自動車、建材、その他の分野に好適に利用することができる。

符号の説明

[0115] 1 管状膜
2 ポンプ
3 タンク
4 攪拌機

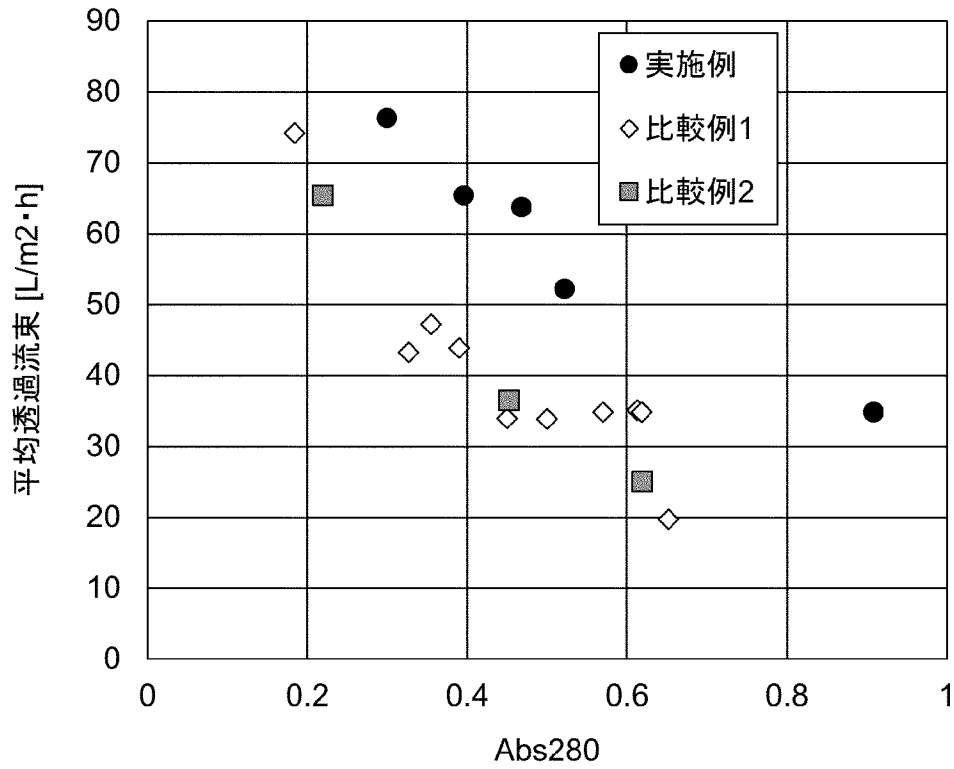
請求の範囲

- [請求項1] (a) ポリヒドロキシアルカン酸を含有する菌体を含む培養液を 40～80℃で維持する工程、
- (b) 前記工程 (a) で得られた培養液に、酵素を添加して前記菌体を酵素処理する工程、
- (c) 前記工程 (b) で得られた培養液に、酸化剤を添加する工程、
- 、
- (e) 前記工程 (c) で得られた水性懸濁液を、遠心分離する工程、
- 、
- (f) 前記工程 (e) で得られた水性懸濁液を、膜ろ過する工程、を含む、ポリヒドロキシアルカン酸の製造方法。
- [請求項2] 前記工程 (e) の前に、(d) 前記工程 (c) で得られた水性懸濁液に、界面活性剤およびアルカリ水溶液を添加して、pHを10.0～12.0に調整する工程を含む、請求項1に記載のポリヒドロキシアルカン酸の製造方法。
- [請求項3] 前記工程 (b) における酵素が、溶菌酵素、および／またはアルカリ性タンパク質分解酵素である、請求項1または2に記載のポリヒドロキシアルカン酸の製造方法。
- [請求項4] 前記工程 (c) における酸化剤が、過酸化水素またはオゾンである、請求項1または2に記載のポリヒドロキシアルカン酸の製造方法。
- [請求項5] 前記工程 (f) における膜ろ過が、クロスフローろ過である、請求項1または2に記載のポリヒドロキシアルカン酸の製造方法。
- [請求項6] さらに、(g) 前記工程 (f) で得られた水性懸濁液を乾燥する工程を含む、請求項1または2に記載のポリヒドロキシアルカン酸の製造方法。
- [請求項7] 前記工程 (c) において、前記培養液のpHが10.0～11.0である、請求項1または2に記載のポリヒドロキシアルカン酸の製造方法。

- [請求項8] 前記工程（e）において、前記水性懸濁液に含まれるタンパク質量が3000 ppm以下になるまで遠心分離を実施する、請求項1または2に記載のポリヒドロキシアルカン酸の製造方法。
- [請求項9] 工程（f）における、水性懸濁液のpHが8.0～12.0である請求項1または2に記載のポリヒドロキシアルカン酸の製造方法。
- [請求項10] 工程（c）における、培養液の温度が、30℃～75℃である、請求項1または2に記載のポリヒドロキシアルカン酸の製造方法。

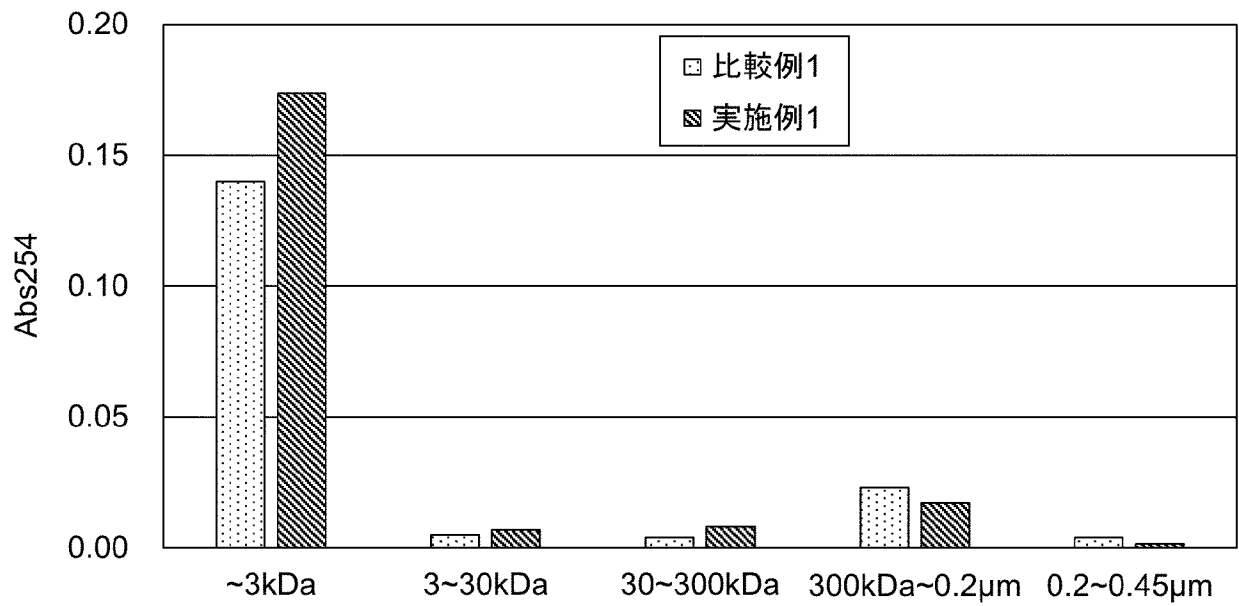
[図1]

図 1



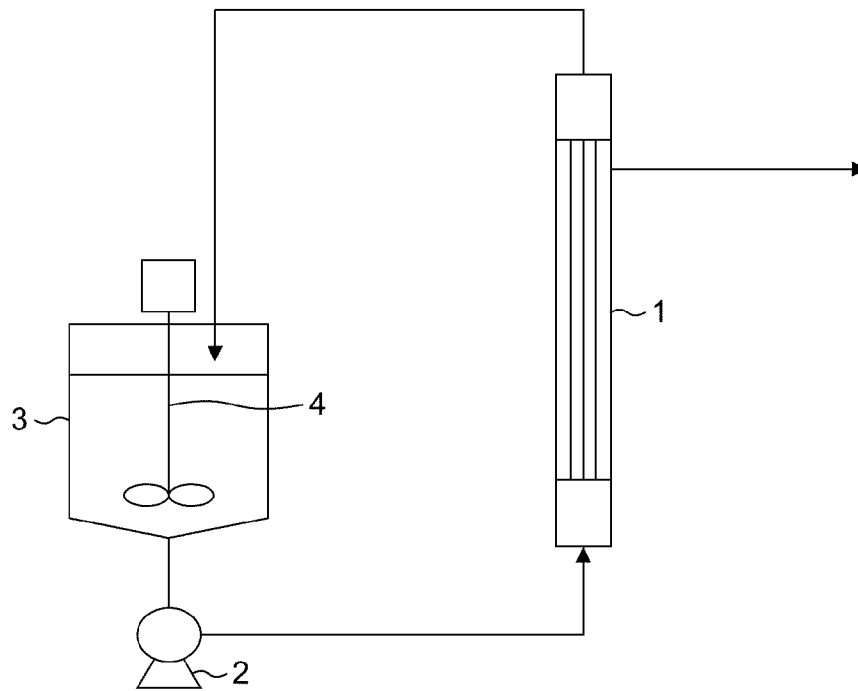
[図2]

図 2



[図3]

図 3



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2024/003416

| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER <i>C12P 7/625</i> (2022.01)i; <i>C08G 63/06</i> (2006.01)i; <i>C08L 101/16</i> (2006.01)i FI: C12P7/625; C08L101/16; C08G63/06 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) C12P7/625; C08G63/06; C08L101/16 | | |
| Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Published examined utility model applications of Japan 1922-1996 Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2024 Registered utility model specifications of Japan 1996-2024 Published registered utility model applications of Japan 1994-2024 | | |
| 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 | JP 8-508881 A (ZENECA LIMITED) 24 September 1996 (1996-09-24) claims, page 5, paragraph [0002] to page 6, paragraph [0006], examples | 1, 3-10 |
| Y | | 1-10 |
| Y | JP 2019-97518 A (KANEKA CORP) 24 June 2019 (2019-06-24) paragraphs [0052]-[0055], examples | 1-10 |
| Y | JP 8-503131 A (ZENECA LIMITED) 09 April 1996 (1996-04-09) claims, page 9, paragraphs [0002]-[0003] | 1-10 |
| P, X | WO 2023/027953 A1 (MEREDIAN, INC.) 02 March 2023 (2023-03-02) claims, paragraphs [051]-[053], examples | 1-10 |
| <input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> 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 "D" document cited by the applicant in the international application "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 05 April 2024 | | Date of mailing of the international search report 16 April 2024 |
| Name and mailing address of the ISA/JP Japan Patent Office (ISA/JP) 3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915 Japan | | Authorized officer Telephone No. |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

| |
|---|
| International application No. PCT/JP2024/003416 |
|---|

| Patent document cited in search report | Publication date (day/month/year) | Patent family member(s) | Publication date (day/month/year) |
|---|--------------------------------------|---|--------------------------------------|
| JP 8-508881 A | 24 September 1996 | US 5691174 A claims, column 1, paragraph [0009] to column 2, paragraph [0009], examples WO 1994/024302 A1 EP 694074 A1 | |
| JP 2019-97518 A | 24 June 2019 | (Family: none) | |
| JP 8-503131 A | 09 April 1996 | US 5622847 A claims, column 4, paragraphs [0003]-[0004] WO 1994/011491 A1 EP 670891 A1 | |
| WO 2023/027953 A1 | 02 March 2023 | US 2023/0061702 A1 | |

| | | |
|---|--|----------------|
| A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） C12P 7/625(2022.01)i; C08G 63/06(2006.01)i; C08L 101/16(2006.01)i FI: C12P7/625; C08L101/16; C08G63/06 | | |
| 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（IPC）） C12P7/625; C08G63/06; 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 1922 - 1996年 日本国公開実用新案公報 1971 - 2024年 日本国実用新案登録公報 1996 - 2024年 日本国登録実用新案公報 1994 - 2024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 | JP 8-508881 A (ゼネカ・リミテッド) 24.09.1996 (1996-09-24) 特許請求の範囲、p.5第2段落-p.6第6段落、実施例 | 1, 3-10 |
| Y | | 1-10 |
| Y | JP 2019-97518 A (株式会社カネカ) 24.06.2019 (2019-06-24) [0052] - [0055]、実施例 | 1-10 |
| Y | JP 8-503131 A (ゼネカ・リミテッド) 09.04.1996 (1996-04-09) 特許請求の範囲、p.9第2-3段落 | 1-10 |
| P, X | WO 2023/027953 A1 (MEREDIAN, INC.) 02.03.2023 (2023-03-02) Claims, [051]-[053], Examples | 1-10 |
| <input type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input checked="" type="checkbox"/> 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、一般的な技術水準を示すもの “D” 国際出願で出願人が先行技術文献として記載した文献 “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抵触するものではなく、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 05.04.2024 | 国際調査報告の発送日 16.04.2024 | |
| 名称及びあて先 日本国特許庁(ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号 | 権限のある職員（特許庁審査官） 平林 由利子 4N 3634 電話番号 03-3581-1101 内線 3448 | |

国際調査報告
 パテントファミリーに関する情報

国際出願番号

PCT/JP2024/003416

| 引用文献 | 公表日 | パテントファミリー文献 | 公表日 |
|-------------------|------------|---|-----|
| JP 8-508881 A | 24.09.1996 | US 5691174 A Claims, 第1カラム第9段落-第2カラム第9段落, Examples WO 1994/024302 A1 EP 694074 A1 | |
| JP 2019-97518 A | 24.06.2019 | (ファミリーなし) | |
| JP 8-503131 A | 09.04.1996 | US 5622847 A Claims, 第4カラム第3-4段落 WO 1994/011491 A1 EP 670891 A1 | |
| WO 2023/027953 A1 | 02.03.2023 | US 2023/0061702 A1 | |