(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
2016 年 12 月 29 日(29.12.2016)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2016/208542 A1

(51) 国際特許分類:
C12P 7/62 (2006.01) *C12R 1/01* (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2016/068282

(22) 国際出願日: 2016 年 6 月 20 日(20.06.2016)

(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 2015-128590 2015 年 6 月 26 日(26.06.2015) JP

(71) 出願人: 国立研究開発法人理化学研究所(RIKEN) [JP/JP]; 〒3510198 埼玉県和光市広沢２番１号 Saitama (JP). 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: 沼田　圭司(NUMATA Keiji); 〒3510198 埼玉県和光市広沢２番１号　国立研究開発法人理化学研究所内 Saitama (JP). 樋口　美栄子(HIGUCHI Mieko); 〒3510198 埼玉県和光市広沢２番１号　国立研究開発法人理化学研究所内 Saitama (JP). 青木　里奈(AOKI Rina); 〒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). 藤木　哲也(FUJIKI Tetsuya); 〒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: 平木　祐輔, 外(HIRAKI Yusuke et al.); 〒1056232 東京都港区愛宕２丁目５番１号　愛宕グリーンヒルズＭＯＲＩタワー３２階 Tokyo (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, BN, 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, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, 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, SM, ST, SV, SY, TH, 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, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, 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, 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).

規則 4.17 に規定する申立て:

— 不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する申立て (規則 4.17(v))

添付公開書類:

— 国際調査報告（条約第 21 条(3)）

WO 2016/208542 A1

(54) **Title**: METHOD FOR PRODUCING POLYHYDROXYALKANOIC ACID USING PURPLE PHOTOSYNTHETIC BACTERIUM

(54) 発明の名称 : 紅色光合成細菌を用いたポリヒドロキシアルカン酸の生産方法

(57) **Abstract**: The present invention addresses the problem of developing and providing a method for producing a polyhydroxyalkanoic acid (PHA) at reduced cost, with high efficiency and in a large quantity using a microorganism. Provided is a method for producing a PHA, comprising culturing a purple photosynthetic bacterium while stirring a liquid culture medium and while irradiating the liquid culture medium with far infrared light to produce cells of the bacterium in each of which the PHA is accumulated.

(57) 要約: 微生物を用いて、製造コストを抑え、効率的かつ多量にポリヒドロキシアルカン酸を生産する方法を開発し、提供することを課題とする。　液体培地を撹拌させながら遠赤色光を照射して紅色光合成細菌を培養することで、細胞内に PHA を蓄積した菌体を得る PHA 生産方法を提供する。

明　細　書

発明の名称 ：

紅色光合成細菌を用いたポリヒドロキシアルカン酸の生産方法

技術分野

[0001] 本発明は、紅色光合成細菌を用いて、バイオプラスチックであるポリヒドロキシアルカン酸を生産する方法に関する。

背景技術

[0002] 合成樹脂、いわゆるプラスチックは、軽量かつ丈夫で成形や着色が容易であり、耐腐食性も高く、大量生産が可能等の優れた利点を有する素材である。利便性が高く、日常生活や産業分野において様々な形で利用され、現代生活において不可欠な素材となっているが、解決すべき大きな問題も抱えている。

[0003] 例えば、現在使用されているプラスチックの多くは石油を原料としているが、石油は新興国の台頭に伴う国際的な消費量の増大により、将来の枯渇が懸念されている。また、非再生可能資源であるため、燃焼に伴い大気中に排出される二酸化炭素が地球温暖化の大きな原因になっている。

[0004] 廃プラスチックの処理も問題となっている。例えば、プラスチックは、高い耐腐食性から微生物等により分解されることなく、自然界で残存し続ける。また、焼却処理した場合にも、多量の二酸化炭素が発生するだけでなく、ダイオキシン等の有害ガスも発生し得る。さらに、焼却時の発熱量が高いため焼却炉を破壊する原因になり得る。

[0005] そこで、上記石油系プラスチックに替わる新たなプラスチック素材として、バイオマスを原料とするバイオプラスチック（バイオマスプラスチック）の研究開発が進められており、その一部は既に実用化されている。バイオマスは、再生可能資源であり、化石燃料のような枯渇問題が生じない。また、バイオマスの燃焼に伴い発生する二酸化炭素は、元来、光合成生物による光合成によって大気中の二酸化炭素が固定化されたものであるためカーボンニ

ュートラルであり、大気中の二酸化炭素量を上昇させることもない。それ故に、地球温暖化防止にも寄与し得る（非特許文献１）。

[0006] また、廃プラスチック処理の問題を解決するために、生分解性プラスチックが開発されている。生分解性プラスチックは、プラスチックとしての機能や物性を有しながら、自然界において微生物の酵素作用等により完全分解される性質を有するプラスチックで、例えば、石油から合成されたポリエステル等が挙げられる。生分解性プラスチックは、焼却しても発熱量が低いことから焼却炉を痛めることもなく、また有害物質も放出しない。

[0007] さらに、バイオプラスチックと生分解性プラスチックの双方の性質を有する生分解性バイオプラスチックも開発されている。生分解性バイオプラスチックには、例えば、ポリヒドロキシアルカン酸（PHA）、ポリ乳酸（PLA）、澱粉樹脂、及びポリブチレンサクシネート(PBS)等が知られている。

[0008] PHAは、微生物が体内に蓄積するバイオポリエステルの一種であり、微生物が貧栄養時に備えて、グルコースを炭素源として細胞内で合成、蓄積している炭素及びエネルギー貯蔵物質である。PHAの特性は、硬質系バイオプラスチックであり、医薬類、農薬類、医療材料、工業材料等の多方面での応用が期待されている。

[0009] PHAを微生物により生産させる方法は、これまでに種々開示されている。例えば、特許文献１には、アルカリゲネス属細菌を用いてPHAの一種であるポリヒドロキシブタン酸（PHB）を製造する方法が開示されている。しかし、特許文献１に開示の方法をはじめ、従来方法の多くは増殖用の資化性炭素源として有機炭素源を必要とする上に、生産性が低いため、製造コストが高くなるという問題があった。

[0010] そこで、有機炭素源の還元物質を必要とすることなく微生物から効率的にPHAを生産させる方法が種々模索された。例えば、非特許文献２には、光合成を行うシアノバクテリアを用いたPHAの製造方法が開示されている。シアノバクテリアは、自ら光合成によって資化性炭素源を獲得できる。有機炭素源を必要としない点でPHA生産のホスト細菌としては優れているが、PHAとして、

ホモポリマーであるPHBしか生産することができない。PHBはポリプロピレンと同程度の融点（180℃）や破壊強度を有するが、ポリプロピレンよりも破壊伸びが低く、また結晶性が高いことから、硬くて脆いという物性的欠点があった。

先行技術文献

特許文献

[0011] 特許文献1：特公平７－１４３５２

非特許文献

[0012] 非特許文献1：Mooney B.M., 2009, Biochem. J., 418: 219-232

非特許文献2：Osanai T., 2013, DNA Res., 20: 525-535

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0013] 本発明は、微生物を用いて、製造コストを抑え、効率的かつ多量にPHAを生産する方法を開発し、提供することである。

課題を解決するための手段

[0014] 上記課題を解決するために、本発明者らはPHA生産のホスト細菌として光合成細菌に着目した。光合成細菌は、シアノバクテリアと同様に、自ら光合成によって資化性炭素源を獲得できることから有機炭素源を必要としない。さらに、海水域に生息する海洋性光合成細菌は、大量に存在する海水を培地として利用できるため、PHAの製造コストを削減することができる。また高塩濃度培地での培養となるため他の細菌のコンタミネーションが少ないという利点も有する。しかし、光合成細菌は、培養方法が十分に確立していないため、PHAを生産する上で効率的な培養が困難という問題があった。

[0015] そこで、本発明者らは、鋭意研究を重ね、紅色光合成細菌を培養期間中、遠赤色光を照射しながら培地を撹拌し続けることによって、菌体の増殖とPHAの効率的な生産及び蓄積を達成できる培養方法を確立した。また、紅色光合成細菌を用いた場合、紅色非硫黄細菌ではPHAがコポリマー（共重合体）とし

て得られることを見出した。本願発明は、当該研究結果に基づくもので、以下を提供する。

（１）紅色光合成細菌を用いたPHAの生産方法であって、液体培地を撹拌させながら遠赤色光を照射して該紅色光合成細菌を培養する培養工程を含む、前記生産方法。

（２）前記遠赤色光が720nm～860nmにピーク波長を有する光である、（１）に記載の生産方法。

（３）前記培養工程が、紅色光合成細菌を増殖培地中で培養する増殖ステップ、前記増殖ステップ後の培養液中の紅色光合成細菌を回収する菌体回収ステップ、及び回収した紅色光合成細菌を有機酸及び／又は炭酸を炭素源とするPHA生産培地で培養するPHA蓄積ステップを含む、（１）又は（２）に記載の生産方法。

（４）前記増殖ステップにおいて、紅色光合成細菌を対数増殖期まで培養する、（３）に記載の生産方法。

（５）前記PHA蓄積ステップにおいて、紅色光合成細菌を後期対数増殖期又は初期静止期まで培養する、（３）又は（４）に記載の生産方法。

（６）前記PHA生産培地が増殖培地の炭素源を有機酸塩及び／又は炭酸塩に置換した培地である、（３）～（５）のいずれかに記載の生産方法。

（７）前記PHA生産培地が窒素源、リン酸源、及びビタミンのいずれか一以上を欠乏している、（３）～（６）のいずれかに記載の生産方法。

（８）前記培養工程後の培養液に含まれる菌体を回収する回収工程を含む、（１）～（７）のいずれかに記載の生産方法。

（９）前記培養工程後の培養液、又は紅色光合成細菌からPHAを抽出する抽出工程をさらに含む、（１）～（８）のいずれかに記載の生産方法。

（１０）紅色光合成細菌が海洋性光合成細菌である、（１）～（９）のいずれかに記載の方法。

（１１）紅色光合成細菌がMarichromatium bheemlicum、Thiohalocapsa marina、Thiophaeococcus mangrovi、Afifella pfennigii、Afifella marina、Rh

odovulum euryhalinum、Rhodovulum imhoffii、Rhodovulum sulfidophilum、Rhodovulum tesquicola、Rhodovulum visakhapatnamense、Roseospira goensis及びRoseospira marinaからなる群から選択される、（１０）に記載の生産方法。

（１２）紅色光合成細菌がMarichromatium bheemlicum JCM13911、Thiohalocapsa marina JCM14780、Thiophaeococcus mangrovi JCM14889、Afifella pfennigii ATCC BAA1145、Afifella marina DSM2698、Rhodovulum euryhalinum DSM4868、Rhodovulum imhoffii JCM13589、Rhodovulum sulfidophilum ATCC35886、Rhodovulum tesquicola ATCC BAA1573、Rhodovulum visakhapatnamense JCM13531、Roseospira goensis JCM14191及びRoseospira marina ATCC BAA447からなる群から選択される、（１１）に記載の生産方法。

[0016] 本明細書は本願の優先権の基礎となる日本国特許出願番号2015-128590号の開示内容を包含する。

発明の効果

[0017] 本発明のPHA生産方法によれば、紅色光合成細菌を安定的に培養することでPHAを効率的に生産することができる。また、一部の紅色光合成細菌を用いることで、PHAをコポリマーとして得ることができる。

図面の簡単な説明

[0018] [図1]選択した12種の紅色光合成細菌を各培地で培養した時の培養後の乾燥菌体重量を示す図である。

[図2]選択した12種の紅色光合成細菌を各培地で培養した後の細胞内に蓄積されたPHA量（乾燥菌体当たりの重量%）（A）と培地1L当たりのPHA量（mg）（B）を示す図である。

発明を実施するための形態

[0019] ＜ポリヒドロキシアルカン酸生産方法＞

本発明は、紅色光合成細菌を用いたポリヒドロキシアルカン酸（PHA）の生産方法に関する。

１．用語の定義

本明細書で使用する以下の用語について定義する。

[0020] 「光合成細菌」とは、酸素非発生型光合成を行う真正細菌であって、色素、電子供与体、好気又は嫌気条件での生育様式に従い、紅色硫黄細菌、紅色非硫黄細菌、緑色硫黄細菌、緑色非硫黄細菌、及び好気性光合成細菌の5科に分類される。

[0021] 「紅色光合成細菌」とは、上記光合成細菌における紅色硫黄細菌及び紅色非硫黄細菌の総称である。本発明のPHAの生産方法では、紅色光合成細菌、すなわち紅色硫黄細菌又は紅色非硫黄細菌を使用する。紅色光合成細菌は、嫌気性の要求性が強くないことから比較的培養しやすく、また炭酸固定活性が強いことから、他の光合成細菌よりもPHA産生上、好ましい。

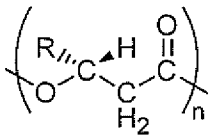
[0022] 紅色光合成細菌は、生息環境により淡水性と海洋性に大別されるが、本発明で使用する紅色光合成細菌は、いずれでもよい。好ましくは、海洋性の紅色光合成細菌である。これは、前述のように、高塩濃度培地により他の細菌のコンタミネーションを抑制できる他、大量に存在する海水を培地として利用できるためバイオプラスチックの製造コストを抑えることができるからである。

[0023] 紅色光合成細菌の具体例としては、後述する表１に示す紅色硫黄細菌や表２に示す紅色非硫黄細菌属の細菌が挙げられる。具体的には、紅色硫黄細菌に属する、Allochromatium属細菌、Ectothiorhodospira属細菌、Halochromatium属細菌、Halorhodospira属細菌、Marichromatium属細菌、Thiocapsa属細菌、Thiohalocapsa属細菌、及びThiophaeococcus属細菌等、また紅色非硫黄細菌に属する、Rhodobaca属細菌、Rhodobacter属細菌、Rhodobium属細菌、Afifella (Rhodobium) 属細菌、Rhodothalassium属細菌、Rhodovulum属細菌、及びRoseospira属細菌等である。中でも海洋性紅色硫黄細菌であるMarichromatium bheemlicum、Thiohalocapsa marina及びThiophaeococcus mangroviの3種、及び海洋性紅色非硫黄細菌であるAfifella pfennigii (Rhodobium pfennigii)、Afifella marina (Rhodobium marinum)、Rhodovulum euryhalinum、Rhodovulum imhoffii、Rhodovulum sulfidophilum、Rhodovulum tesquicola、

Rhodovulum visakhapatnamense、Roseospira goensis及びRoseospira marinaの9種は、本発明の紅色光合成細菌として好適である。これらの紅色光合成細菌は、RIKENバイオリソースセンター（日本）、NITE（日本）、ATCC（USA）、DSMZ（ドイツ）、NMLHC（カナダ）、ECACC（英国）、NIBSC（英国）、CNCM（フランス）、CBS（オランダ）、BCCM（ベルギー）、ABC（イタリア）、NMI（オーストラリア）、CCTCC（中国）、CGMCC（中国）等の各寄託機関から所定の手続きを経て入手することができる。

[0024] 「ポリヒドロキシアルカン酸（polyhydroxyalkanoate)」（本明細書では、しばしば「PHA」と表記する）は、ある種の微生物が貯蔵エネルギーとして細胞内に蓄積することが知られているバイオポリエステルで、本発明の生産方法における対象生産物である。PHAは、以下の一般式１で表すことができる。

[0025] [化1]



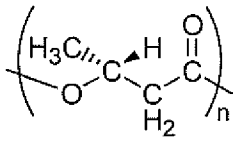
(一般式 1)

[0026] [式中、Rは同一でも異なっていてもよく、炭素数1～14の直鎖又は分岐鎖アルキル基であり、nは2以上の整数であり、好ましくは100以上の整数であり、好ましくは100,000以下の整数である]

PHAの具体例として、例えば、限定はしないが、以下の化学式１で表されるポリヒドロキシブタン酸（PHB:P(3HB)）（Poly-3-hydroxybutyrate）、化学式２で表されるポリヒドロキシバレリン酸（PHV：P(3HV)）（Poly-3-hydroxyvalerate）、化学式３で表されるポリヒドロキシヘキサン酸（PHH:P(3HH)）（Poly-3-hydroxyhexanoate）、化学式４で表されるポリヒドロキシブタン酸-ポリヒドロキシバレリン酸（PHBV:P(3HB-co-3HV)）（Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)）、化学式５で表されるポリヒドロキシブタン酸-ポリヒドロキシヘキサン酸（PHBH:P(3HB-co-3HH)）（Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate)）、及び化学式６で表されるポリ3ヒドロキシブタン酸-ポリ4ヒドロキシブタン酸（PHBB:P(3HB-co-4HB)）（Poly(3-hydroxybut

yrate-co-4-hydroxybutyrate)) 等が挙げられる。

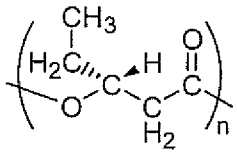
[0027] [化2]



(化学式 1)

[0028] [式中、nは2以上の整数であり、好ましくは100以上の整数であり、好ましくは100,000以下の整数である]

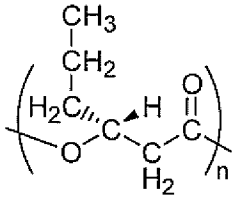
[0029] [化3]



(化学式 2)

[0030] [式中、nは2以上の整数であり、好ましくは100以上の整数であり、好ましくは100,000以下の整数である]

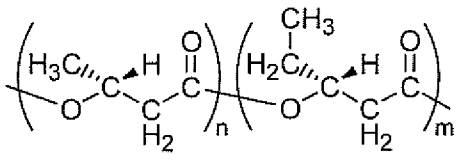
[0031] [化4]



(化学式 3)

[0032] [式中、nは2以上の整数であり、好ましくは100以上の整数であり、好ましくは100,000以下の整数である]

[0033] [化5]

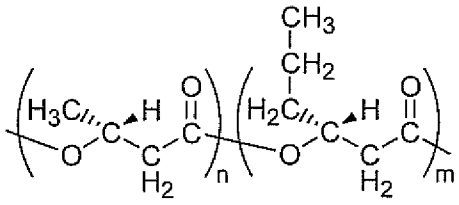


(化学式 4)

[0034] [式中、m及びnは2以上の整数であり、好ましくは100以上の整数であり、好ましくは100,000以下の整数である]

[0035]

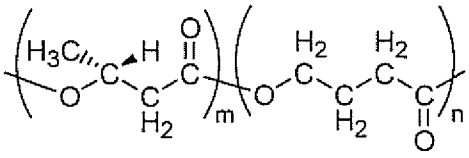
[化6]



(化学式 5)

[0036] [式中、m及びnは2以上の整数であり、好ましくは100以上の整数であり、好ましくは100,000以下の整数である]

[0037] [化7]



(化学式 6)

[0038] [式中、m及びnは2以上の整数であり、好ましくは100以上の整数であり、好ましくは100,000以下の整数である]

本発明の生産方法で生産するPHAは、特に限定はしない。例えば、3HBの単一モノマーからなるP(3HB) のようなホモポリマーであってもよいし、2種以上のモノマーからなるP(3HB-co-3HV)やP(3HB-co-3HH)のようなコポリマーであってもよい。好ましくはコポリマーである。

２．方法

本発明のPHA生産方法は、培養工程を必須工程として含み、選択工程として、回収工程、及び抽出工程を含む。以下、各工程について、具体的に説明をする。

２－１．培養工程

本明細書において「培養工程」とは、紅色光合成細菌を特定条件下で培養することによって、菌体数を増やし、菌細胞内にPHAを蓄積させる工程である。

[0039] 前記「特定の条件」とは、培養時における液体培地の撹拌と菌体への遠赤色光照射である。

[0040] 本明細書において「撹拌」とは、液体を流動させることをいう。撹拌の方

法は、液体を流動させることができれば特に限定はしない。例えば、撹拌子や撹拌棒により液体に回転流動を起こしてかき混ぜる方法や、振盪器等を用いて液体を入れた容器を振盪させる方法（反転方法を含む）、送液装置等により流路に液体を通流する方法等が挙げられる。撹拌は、培地中の成分や菌体を均一化することを目的とする。これによって、各菌体に栄養素や照射される光を均一に付与することが可能となる。

[0041] 本明細書において「遠赤色光」(Far Red）とは、ピーク波長の波長域が700nm～860nmの光をいう。「ピーク波長」とは、光の発光強度が最大となる波長である。培養工程で紅色光合成細菌に照射する遠赤光は前記波長域の光であればよく、限定はされないが、好適な遠赤色光は、ピーク波長が720nm～860nmの光である。

[0042] 本発明において「照射」とは、紅色光合成細菌を前記遠赤色光で曝光することをいう。照射は、連続照射であっても、また明暗期を有する明暗光であってもよい。ここでいう連続照射とは、連続的な照射だけでなく、極めて短時間に明暗期を繰り返すパルス光の照射も含む。明暗周期光の場合には、1日の明暗周期は特に限定はしないが、例えば、明期8時間：暗期16時間～明期16時間:暗期8時間の範囲でよい。あるいは、明期中に周期的に又は非周期的に、肉眼で認識できる暗期（例えば、1秒以上、好ましくは数秒以上の暗期）が挿入される明暗光であってもよい。好ましい照射は、連続照射である。なお、照射する遠赤色光は、必ずしも一定のピーク波長を有する光である必要はなく、照射期間中、前記波長域の範囲で変化させることもできる。例えば、照射開始時にピーク波長730nmの光を照射し、照射8日目以降にピーク波長740nmの光に変更して照射する場合が挙げられる。

[0043] 遠赤色光の放射照度は、0.1/m^2～15W/m^2の範囲であればよい。好ましくは6W/m^2～10W/m^2、より好ましくは8W/m^2±1W/m^2である。

[0044] 照射方法は、培養液中の紅色光合成細菌を十分に曝光できる方法であれば特に限定はしない。例えば、透明な培養槽の周囲に光源を設置して培養槽全体に対して光を照射する方法、一方向又は複数方向から培養槽に光を照射し

、培養槽内の培養液を撹拌することで培養液全体に光を行き渡す方法等が挙げられる。光の照射は、光源からの直接照射が好ましいが、培養液全体に光を行き届かせる目的等のために反射板等を介した間接照射であってもよい。間接照射の場合、照射した光が減衰する可能性があることから、光強度が前述の範囲となるように、必要に応じて光源の光強度を高めることが好ましい。

[0045] 光照射は、紅色光合成細菌の増殖培養期間（後述する「増殖ステップ」期間）、及び／又は紅色光合成細菌によるPHAの生合成と細胞内蓄積を促進させる期間（後述する「PHA蓄積ステップ」期間）に行えばよい。最大で本発明のPHA生産方法の全期間を通して照射することもできる。好ましい照射期間は、増殖ステップ期間及びPHA蓄積ステップ期間である。

[0046] 本工程で使用する光源は、前記波長域の光を放射可能な光源であれば特に限定はしない。例えば、遠赤色光を含む白色光を放射可能な白色発光ダイオード（Light Emitting Diode：以下、本明細書では、しばしば「LED」と表記する）、高輝度放電（HID：High Intensity Discharge）ランプ、ハロゲン電球、白熱電球及び太陽光等が挙げられる。連続照射や電力コストを考慮すれば、700nm～860nmの波長域内、好ましくは720nm～860nmの波長域内にピーク波長を有するLEDを利用するのが好ましく、また効果的である。

[0047] 本工程では、前述の「特定の条件」以外の培養条件については、制限はなく、細菌培養分野で公知の方法に準じて行えばよい。

[0048] 例えば、本工程で使用する培地は、紅色光合成細菌を培養できる増殖培地であれば特に限定はしない。例えば、紅色硫黄細菌であれば、増殖用培地として0.05% KH_2PO_4, 1.5×10^{-3}% $CaCl_2\cdot2H_2O$, 0.2% $MgSO_4\cdot7H_2O$, 6.4×10^{-3}% NH_4Cl, 2% NaCl, 0.3% ピルビン酸ナトリウム, 0.04% yeast extract, 2×10^{-4}% ビタミンB12, 2.4×10^{-3}% $Na_2S\cdot9H_2O$, 0.15% $Na_2S_2O_3\cdot5H_2O$, 0.15% $FeCl_2\cdot6H_2O$, 7×10^{-3}% $ZnCl_2\cdot5H_2O$, 0.01% $MnCl_2\cdot4H_2O$, 6.2×10^{-3}% H_3BO_3, 1.9×10^{-3}% $CoCl_2\cdot6H_2O$, 1.7×10^{-3}% $CuCl_2\cdot2H_2O$, 2.4×10^{-3}% $NiCl_2\cdot6H_2O$, 3.6×10^{-3}% $Na_2MoO_4\cdot H_2O$（培地pH7.5）の組成を有する増殖培地Aの他、市販の培地、

例えばDifco社のMarine Agar 2216等を使用することができる。また、紅色非硫黄細菌増殖用であれば、0.05% KH_2PO_4, 2.5×10^{-3}% $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 0.3% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 6.8×10^{-3}% NH_4Cl, 2% NaCl, 0.3% リンゴ酸ナトリウム, 0.3% ピルビン酸ナトリウム, 0.04% イースト・エクストラクト, 5×10^{-4}% クエン酸酸化鉄, 2×10^{-4}% ビタミンB12, 7×10^{-3} % $ZnCl_2 \cdot 5H_2O$, 0.01% $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, 6×10^{-3}% H_3BO_3, 0.02% $CoCl_2 \cdot 6H_2O$, 2×10^{-3}% $CuCl_2 \cdot 2H_2O$, 2×10^{-3}% $NiCl_2 \cdot 6H_2O$, 4×10^{-3}% $Na_2MoO_4 \cdot H_2O$（培地pH6.8）の組成を有する増殖培地Bを使用することができる。

[0049] 培養温度は、紅色光合成細菌が生育及び／又は増殖可能な温度範囲であればよい。例えば、紅色光合成細菌を入手した各寄託機関で公開されている培養温度を用いることができる。23℃～32℃の範囲内の温度であれば良く、通常は28℃～30℃の範囲であれば足りる。

[0050] 本工程の開始時に、培地に紅色光合成細菌を植菌する際、細胞数は特に限定はしないが、植菌後のOD_{660}値が0.05～0.3の範囲、好ましくは0.05～0.15となるような細胞数であればよい。

[0051] 前記培養工程は、必要に応じて増殖ステップ、菌体回収ステップ、及びPHA蓄積ステップを含むことができる。当該工程を含む培養工程では、増殖ステップ及びPHA蓄積ステップで異なる培地を使用することを特徴とする。培養に関する他の条件は、原則として既述の条件と同じでよい。したがって、ここでは記述の培養条件に関しては、その説明を省略し、各ステップの特徴的な点について、以下で具体的に説明をする。

（１）増殖ステップ

「増殖ステップ」とは、紅色光合成細菌を増殖培地中で培養するステップであり、主に培養液中の細菌数の増加を目的とする。

[0052] 本ステップで使用する培地は、増殖培地である。増殖培地は、紅色光合成細菌を培養可能であれば任意の培地を用いることが可能で、培地の種類や組成は特に限定しない。当該分野において、紅色光合成細菌用として公知の培地を用いることができる。例えば、前述の紅色硫黄細菌用の増殖培地Aや紅色

非硫黄細菌用の増殖培地Bが挙げられる。市販の培地も利用可能である。

[0053] 本ステップの培養期間は、植菌した紅色光合成細菌が対数期（log-phase）、好ましくは中期対数期（mid-log phase）～後期対数期（late-log phase）に達するまでが好ましい。具体的には、培養液のOD_{660}値が0.5～4.0の範囲、0.5～2.0の範囲、0.5～1.5の範囲又は0.6～1.2の範囲、好ましくは0.8～1.1の範囲、より好ましくは0.9～1.0の範囲になるまで培養すればよい。

（２）菌体回収ステップ

「菌体回収ステップ」は、前記増殖ステップ後の培養液中の紅色光合成細菌を回収するステップであり、増殖ステップで培養した紅色光合成細菌をPHA蓄積ステップのPHA生産培地に移す際に培養液から増殖培地や粗雑物等をできる限り除去することを目的とする。

[0054] ただし、本ステップは、他の２つのステップと異なり、必要に応じて行えばよい選択ステップである。すなわち、増殖ステップ後の紅色光合成細菌を回収することなく、増殖ステップ後の培養液の一部をそのままPHA蓄積ステップのPHA生産培地に植え継ぐことも可能である。

[0055] 培養液から菌体を回収する方法は、当該分野で公知の常法を用いればよい。例えば、培養液を遠心又は濾過によって培地を除去する方法が挙げられる。具体的には、培養液を遠心機により適当な重力加速度（g）で適当な時間遠心した後に、上清を除去して菌体を回収する方法や、紅色光合成細菌の細胞サイズよりも小さい孔径を有するフィルターで濾過して培養液を除去し、フィルターに残った菌体を回収する方法が挙げられる。回収した菌体は、必要に応じて培養工程に用いた培地、又は当該培地と同程度の浸透圧を有するバッファ若しくは生理食塩水で1回以上洗浄してもよい。

[0056] 本ステップで回収した菌体は、次のPHA蓄積ステップで使用する。

（３）PHA蓄積ステップ

「PHA蓄積ステップ」とは、増殖ステップで培養した紅色光合成細菌をPHA生産培地に移して培養するステップであり、細菌によるPHAの生合成と細胞内蓄積を促進させることを目的とする。

[0057] 本ステップで使用する培地は、PHA生産培地である。この培地は増殖培地の炭酸源を有機酸塩及び／又は炭酸塩に置換した培地である。増殖培地の炭酸源を有機酸塩、又は有機酸塩及び炭酸塩に置換した培地が好ましい。有機酸塩、及び炭酸塩は、水和物であってもよい。

[0058] 有機酸塩には、例えば、アルカン酸塩（例えば、蟻酸塩、酢酸塩、プロピオン酸塩、酪酸塩、吉草酸塩、及びカプロン酸塩を含む）、クエン酸塩、リンゴ酸塩、スルホン酸塩、酒石酸塩、及び乳酸塩が挙げられる。酢酸塩は特に好適である。酢酸塩の例としては、酢酸ナトリウム、酢酸カルシウム等が挙げられる。また、炭酸塩の例としては、炭酸水素ナトリウム、炭酸ナトリウム、炭酸カリウム、炭酸水素カリウム等が挙げられる。

[0059] PHA生産培地の例として、前記紅色硫黄細菌用の増殖培地Aにおいて、炭素源であるピルビン酸ナトリウムを0.1% 炭酸水素ナトリウム及び0.5% 酢酸ナトリウムに置換した紅色硫黄細菌用のPHA生産培地や、紅色非硫黄細菌用の増殖培地Bにおいて、炭素源であるリンゴ酸ナトリウムとピルビン酸ナトリウムを炭酸水素ナトリウム0.1% 及び酢酸ナトリウム5g/Lに置換した紅色非硫黄細菌用のPHA生産培地が挙げられる。

[0060] PHA生産培地は、炭素源の置換に加えて、さらに増殖培地から窒素源、リン酸源、及びビタミンのいずれか一以上を除いた欠乏培地にしてもよい。具体的には、窒素欠乏培地、リン酸欠乏培地、ビタミン欠乏培地、窒素・リン酸欠乏培地、窒素・ビタミン欠乏培地、リン酸・ビタミン欠乏培地、窒素・リン酸・ビタミン欠乏培地が挙げられる。ビタミンの種類は特に限定しないが、ビタミンB1（チアミン）、ビタミンB5（パントテン酸）、ビタミンB6（ピリドキシン、ピリドキサール、及びピリドキサミン）、ビタミンB7（ビオチン）、ビタミンB12（コバラミン）が好ましい。欠乏させるビタミンは複数種であってもよい。

[0061] これは、光合成細菌におけるPHA生産が窒素、リン酸、及び／又はビタミンの制限により促進されることが知られているためである（例：H. Brandl, et al., 1989, Int J Biol Macromol. 11, 49-55.）。

[0062] 本ステップでは、増殖ステップ後に回収した菌体を必要に応じて適宜希釈して、PHA生産培地に植菌し、培養する。本ステップ開始時の培地中の細胞数は、限定はしないが、培養液のOD_{660}値が0.03～2.0の範囲、0.03～1.5の範囲、0.03～1.0の範囲又は0.05～0.8の範囲、好ましくは0.1～0.5の範囲、より好ましくは0.1～0.3の範囲になるように調節すればよい。

[0063] 培養期間は、植菌した紅色光合成細菌が後期対数増殖期又は初期静止期（early stationary phase）まで、具体的には、培養液のOD_{660}値が0.8～2.0の範囲又は0.8～1.2の範囲、好ましくは0.8～1.0の範囲になるまで培養すればよい。

２－２．回収工程

「回収工程」とは、前記培養工程の培養液から紅色光合成細菌を回収する工程である。本工程は、選択工程で、培養液から培地や粗雑物等を除去して、細胞内にPHAを蓄積した紅色光合成細菌を回収することを目的とする。

[0064] 培養液から菌体を回収する方法は、前述の菌体回収工程に記載の方法に準ずる。

[0065] 本工程により、細胞内にPHAを蓄積した紅色光合成細菌をスラリーとして得ることができる。必要であれば、回収した紅色光合成細菌を公知の乾燥方法により乾燥してもよい。

[0066] 乾燥方法は、水分を減じることができれば特に限定はしない。例えば、送風装置等を用いて温風若しくは冷風を当てる通風乾燥法、加熱により水分蒸発させる無風乾燥法、スラリーを適当なバッファで懸濁した後、その懸濁液を気体中に噴霧して急速乾燥させる噴霧乾燥、凍結乾燥（フリーズドライ）法、密閉容器内で真空ポンプ等を用いて脱気する真空乾燥法、外気に晒して放置する自然乾燥法（天日干しを含む）、又はその組み合わせが挙げられる。実際に菌体を乾燥させる場合、上記方法を応用した各種乾燥装置を用いて行えばよい。例えば、ドラムドライヤー、遠赤バンド乾燥機、連続式真空乾燥装置、スプレードライヤー、フリーズドライヤー等が挙げられる。

[0067] 乾燥後の藻体は、固形状態、顆粒状態又は粉末状態のいずれであってもよ

い。

２－３．抽出工程

「抽出工程」とは、前記培養工程後の培養液、又は培養液中若しくは回収工程後の紅色光合成細菌（細胞破砕物を含む）からPHAを抽出する工程である。本工程は、選択工程であって、紅色光合成細菌の細胞内に蓄積されたPHAを採取することを目的とする。

[0068] 本工程で培養液や紅色光合成細菌の細胞からPHAを抽出する方法は、当該分野で公知のあらゆる方法を用いることができる。

[0069] 例えば、紅色光合成細菌の細胞内に蓄積したPHAを抽出する場合であれば、物理的方法及び／又は化学的方法により細胞を破砕し、得られた細胞抽出物からPHAを単離する方法が挙げられる。ここでいう細胞抽出物は、固形抽出物、及び液体抽出物（培養液中に混在する細胞抽出物を含む）を包含する。

[0070] 菌体を破砕する物理的方法としては、例えば、圧潰・圧搾法、超音波法、浸透圧ショック法、又はそれらの組み合わせによる方法が挙げられる。

[0071] 菌体を破砕する化学的方法としては、例えば、アルカリ法、酵素法が挙げられる。細菌菌体を溶解する具体的な方法については、例えば、Green, M.R. and Sambrook, J., 2012, Molecular Cloning: A Laboratory Manual Fourth Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New Yorkに記載の方法を参照すればよい。

[0072] 得られた細胞抽出物に対して、必要に応じて細胞破砕等のタンパク質を変性除去する処理を行ってもよい。

[0073] 細胞抽出物からPHAを分離精製する方法は、特に制限しない。例えば、PHAが溶解可能な有機溶媒を抽出溶媒として細胞抽出物に加えて混合し、その後、その抽出溶媒よりも溶解度の低い他の有機溶媒を析出溶媒として加えることで、溶解度の低下により目的のPHAを沈殿させて精製する方法がある。具体的には、例えば、細胞抽出物に抽出溶媒としてクロロホルムを加えPHAを溶解し、続いて、析出溶媒としてヘキサンを加え、沈降したPHAを回収すればよい。抽出溶媒又は析出溶媒としての有機溶媒には、メタノール、エタノールな

どのアルコール類、ヘキサン、アセトン、クロロホルム、１，２－ジクロロエタン等のハロゲン化炭化水素を使用することができる。その他、特開2005-348640等に記載の公知の精製方法を用いて分離精製してもよい。

[0074] PHAが紅色光合成細菌の菌体外に漏出又は排出され、培養液中に含まれる場合であれば、培養液に前記抽出溶媒を直接加えて混合し、遠心した後、有機溶媒層を回収する。その後、析出溶媒を加え、上記と同様に沈殿したPHAを回収すればよい。

実施例

[0075] （目的）

本発明のPHA生産方法を用いて、紅色光合成細菌を培養することで目的のPHAが細胞内に蓄積することを確認した。

（方法）

１．紅色光合成細菌

本実施例における紅色光合成細菌は、以下の表１に示す海洋性の紅色硫黄細菌16株、及び表２に示す海洋性の紅色非硫黄細菌17株の計33株を寄託機関から入手して使用した。表中の「Resource number」で「JCM」のコードを有する株はRIKENバイオリソースセンター（日本）から、「DSM」のコードを有する株はDSMZ（ドイツ）から、そして「ATCC」のコードを有する株はATCC（USA）から、入手した。また、表中の「生育温度」は、各寄託機関で公開されている培養温度である。

[0076]

[表1]

＜紅色硫黄細菌＞

Resource number	種名	生育温度
JCM14796	*Allochromatium phaeobacterium*	30°C
JCM14262	*Allochromatium renukae*	28°C
ATCC51935	*Ectothiorhodospira haloalkaliphila*	30°C
DSM241	*Ectothiorhodospira marina*	25°C
DSM237	*Ectothiorhodospira mobilis*	35°C
BRC14151	*Halochromatium roseum*	30°C
DSM244	*Halorhodospira halophila*	25°C
JCM17835	*Halorhodospira neutriphila**	30°C
JCM13911	*Marichromatium bheemlicum*	28°C
DSM1591	*Marichromatium purpuratum*	25°C
JCM13533	*Marichromatium sp.*	26°C
ATCC700894	*Thiocapsa litoralis*	26°C
JCM14780	*Thiohalocapsa marina**	25°C
JCM14889	*Thiophaeococcus mangrovi**	30°C
JCM14149	*Thiorhodococcus bheemlicus*	26°C
JCM14150	*Thiorhodococcus kakinadensis*	28°C

[0077]

[表2]

＜紅色非硫黄細菌＞

Resource number	種名	生育温度
DSM19920	*Rhodobaca barguzinensis*	28°C
JCM14544	*Rhodobacter vinaykumarii*	30°C
JCM13532	*Rhodobium gokarnense*	26°C
JCM9337	*Rhodobium orientis*	26°C
ATCC BAA1145	*Afifella pfennigii (Rhodobium pfennigii)**	30°C
DSM2698	*Afifella marina (Rhodobium marinum)**	25°C
DSM2132	*Rhodothalassium salexigens*	26°C
DSM2781	*Rhodovulum adriaticum*	26°C
DSM4868	*Rhodovulum euryhalinum**	30°C
JCM13300	*Rhodovulum marinum*	30°C
JCM13589	*Rhodovulum imhoffii**	28°C
ATCC35886	*Rhodovulum sulfidophilum**	28°C
ATCC BAA1573	*Rhodovulum tesquicola**	30°C
JCM13531	*Rhodovulum visakhapatnamense**	30°C
BRC14191	*Roseospira goensis**	28°C
ATCC BAA447	*Roseospira marina**	26°C
ATCC BAA1365	*Roseospira visakhapatnamensis*	26°C

[0078] 上記33株のうち、下記増殖培地を用いて、下記培養方法で培養を行った結果、液体培地と寒天培地の少なくとも一方で、3～7日の比較的短い期間内で良好な生育が見られた12株（紅色硫黄細菌3株、紅色非硫黄細菌9株：表１及び２で種名に星印を付した株）を選択し、PHA生産能に関する解析に使用した。

２．細菌培養

本実施例における紅色光合成細菌は、以下の培地や培養方法で培養した。

（１）培地

・増殖培地A（紅色硫黄細菌増殖用）

（組成）

KH_2PO_4: 0.5g/L, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$: 0.15g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$: 2.0g/L, NH_4Cl: 0.64 g/L, NaCl: 20g/L, ピルビン酸ナトリウム: 3.0g/L, yeast extract: 0.4g/L, ビタミンB12: 2mg/L, $Na_2S \cdot 9H_2O$: 240mg/L, $Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$: 1.5g/L, $FeCl_2$

・$6H_2O$: 1.5g/L, $ZnCl_2 \cdot 5H_2O$: 70mg/L, $MnCl_2 \cdot 4H_2O$: 100mg/L, H_3BO_3: 62mg/L, $CoCl_2 \cdot 6H_2O$: 190mg/L, $CuCl_2 \cdot 2H_2O$: 17mg/L, $NiCl_2 \cdot 6H_2O$: 24mg/L, $Na_2MoO_4 \cdot H_2O$: 36mg/L

培地のpHは7.5に調整した。

・増殖培地B（紅色非硫黄細菌増殖用）

（組成）

KH_2PO_4: 0.5g/L, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$: 0.25g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$: 3.0g/L, NH_4Cl: 0.68g/L, NaCl: 20g/L, リンゴ酸ナトリウム: 3.0g/L, ピルビン酸ナトリウム: 3.0g/L, イースト・エクストラクト: 0.4g/L, クエン酸酸化鉄: 5mg/L, ビタミンB12: 2mg/L, $ZnCl_2 \cdot 5H_2O$: 70 mg/L, $MnCl_2 \cdot 4H_2O$: 100mg/L, H_3BO_3: 60mg/L, $CoCl_2 \cdot 6H_2O$: 200 mg/L, $CuCl_2 \cdot 2H_2O$: 20mg/L, $NiCl_2 \cdot 6H_2O$: 20mg/L, $Na_2MoO_4 \cdot H_2O$: 40mg/L

培地のpHは6.8に調整した。

・PHA生産培地A（紅色硫黄細菌PHA生産用）

（組成）

増殖培地AからNH_4Cl及びピルビン酸ナトリウムを除き、炭素源として、1Lあたり1g 炭酸水素ナトリウム（$NaHCO_3$）及び／又は5g 酢酸ナトリウム（CH_3COONa）を添加した。培地のpHは増殖培地Aと同様に7.5に調整した。

・PHA生産培地B（紅色非硫黄細菌PHA生産用）

（組成）

増殖培地BからNH_4Cl、リンゴ酸ナトリウム及びピルビン酸ナトリウムを除き、炭素源として、1Lあたり1g 炭酸水素ナトリウム（$NaHCO_3$）及び／又は5g 酢酸ナトリウム（CH_3COONa）を添加した。培地のpHは増殖培地Bと同様に6.8に調整した。

（２）培養方法

・増殖培養

各紅色光合成細菌は、遠赤色（far-red）のLED光条件下（ピーク波長730nm、放射照度8W/m²)、30℃にて、multi position stirrer（リモート・マルチ60

型　アイシス）を用いてスクリューキャップビン（IWAKI）中で連続振盪しながら培養した。

・PHA生産培養

紅色硫黄細菌を増殖培地Aで、また紅色非硫黄細菌を増殖培地Bで、それぞれ増殖培養条件で培養し、対数期（OD_{660}＝約1.0）の時点で細菌細胞を回収した。回収した細胞は、PHA産生培地で洗浄した後、開始時のOD_{660}が0.1となるようにPHA産生培地で希釈した後、30℃にて、multi position stirrerを用いてスクリューキャップビン中で連続振盪しながら1週間培養した。細胞を1週間後に回収し、20mM Tris-HCl (pH7.0)で洗浄した後、凍結乾燥した。

３．ポリマーの量及び組成の解析

約0.5～2mgの凍結乾燥細胞を100％エタノール中で70℃にて1時間インキュベートして色素を除いた。これらの細胞を用いて、250μLのクロロホルム、100μLの塩酸、及び850μLのエタノール存在下で、100℃にて4時間、エタノリシス（エタノールを用いたエステル交換反応）を行った。冷却後、反応混合液にリン酸バッファ(pH 8.1)を加えて、0.65N NaOHで中和した。1,500rpmで5分間遠心した後、クロロホルム層を、無水硫酸ナトリウムを通して濾過し、分子篩で30分間インキュベートした。PHAの量と組成を30m × 0.25 mm DB-1キャピラリーガスクロマトグラフィーカラム(Agilent Technologies)を装備したGCMS-QP2010 Ultra (Shimadzu) を用いて決定した。

[0079] 1μLのサンプル溶液にキャリアガスであるヘリウムを3.30mL/分で注入した。45℃で1分間、温度傾斜７℃/分で117℃まで上昇させる温度プログラムを用いて、エチルエステルを分離した。界面温度及びイオン源温度は、それぞれ250℃及び230℃とした。3HB量は、較正曲線から決定した。3HVの相対量は、3HBの構成極性から推定した。PHA量は、乾燥細胞重量％として算出した。

４．PHAの抽出

PHAは、クロロホルム中で凍結乾燥細胞から抽出した。抽出物は、濾紙（5C ADVANTEC）を用いて濾過し、ロータリー・バキューム・エバポレーター（アズワン）を用いて濃縮した。その後、クロロホルム抽出したPHAをヘキサンで

沈降させることによってPHA精製を行った。PHA沈降物は濾過した後、一晩風乾した。クロロホルム中に溶解したPHAを、ロータリー・バキューム・エバポレーター（アズワン）を用いて再度濃縮し、冷却メタノールで沈降させることによって精製した。PHA沈降物は濾過した後、一晩風乾した。精製したPHAをクロロホルムに溶解し、さらなる解析に用いた。

５．PHAの特徴付け

精製したPHAをプロトン核磁気共鳴(^{1}H NMR)（JNM-Excalibur 270; JEOL, Ltd.)により解析し、詳細な化学構造及び組成を決定した。NMR用サンプルは、$CDCl_3$中に0.05 v/v %のテトラメチルシラン（TMS）(Wako Pure Chemical Industries, Ltd.）を用いて4 mg/mLの濃度で溶解した。PHAの分子量は、40℃で、Shodex K- 806M、K802及びK-Gカラムを備えたゲル浸透クロマトグラフィー(GPC)（RI-2031, PU-2086, AS-2055, CO-2056; JASCO)により決定した。クロロホルムを流速0.8 mL/分の移動相として用いた。精製したPHAの濃度は、約1 mg/mLであった。またその分子量は、分子量1.32×10^3、3.25×10^3、1.01×10^4、2.85×10^4、6.60×10^4、1.56×10^5、4.60×10^5、1.07×10^6、及び3.15×10^6のポリスチレン標準物との比較によって推定した。

（結果）

結果を、表３及び４、図１及び２に示す。

[0080]

[表3]

細菌名	種名	Growth condition w/o NH_4Cl 0.1% $NaHCO_3$+0.5% accetate				
		PHA 量 (wt%)	ポリマー組成 (mol%)		PHA 量 (wt%)	ポリマー組成(mol%)	
			3HB	3HV		3HB	3HV
紅色硫黄細菌	*Thiohalocapsa marina*	0.1 ± 0.0	100	0	8.6 ± 7.1	100	0
	Thiophaeococcus mangrovi	0.1 ± 0.1	100	0	5.2 ± 2.6	100	0
	Marichromatium bheemlicum	<0.1			8.6 ± 1.4	100	0
紅色非硫黄細菌	*Afifella marina*	5.8 ± 2.2	96.0	4.0	10.7 ± 3.0	95.5	4.5
	Rhodovulum euryhalinum	16.0 ± 3.2	99.2	0.8	20.8 ± 12.6	99.2	0.8
	Rhodovulum imhoffii	14.9 ± 5.9	99.6	0.4	16.8 ± 12.2	99.0	1.0
	Rhodovulum sulfidophilum	25.4 ± 5.4	100	0	20.7 ± 2.0	94.0	6.0
	Rhodovulum tesquicola	2.0 ± 1.4	43.2	56.8	7.2	51.7	48.3
	Rhodovulum visakhapatnamense	30.2 ± 6.4	99.2	0.8	26.7 ± 10.9	97.8	2.2
	Roseospira marina	3.1 ± 0.4	9.8	90.2	3.0 ± 0.7	49.9	50.1
	Roseospira goensis	10.8 ± 10.8	17.3	82.7	13.6 ± 1.6	55.8	44.2
	Roseospira visakhapatnamensis	2.8 ± 2.1	20.6	79.4	9.5 ± 4.4	72.1	27.9

[0081] [表4]

細菌名	種名	w/o NH_4Cl 0.1% $NaHCO_3$			w/o NH_4Cl 0.5% accetate		
		PHA 量 (wt%)	ポリマー組成 (mol%)		PHA 量 (wt%)	ポリマー組成 (mol%)	
			3HB	3HV		3HB	3HV
紅色硫黄細菌	*Thiohalocapsa marina*	1.2 ± 1.9	100	0	24.0 ± 8.7	100	0
	Thiophaeococcus mangrovi	0.4 ± 0.6	100	0	17.5 ± 4.6	100	0
	Marichromatium bheemlicum	0.2 ± 0.1	100	0	18.8 ± 1.7	99.9	0.1
紅色非硫黄細菌	*Afifella marina*	0.4 ± 0.3	51.5	48.5	13.1 ± 3.2	88.6	11.4
	Rhodovulum eurythalinum	4.0 ± 2.2	97.4	2.6	20.9 ± 1.4	96.8	3.2
	Rhodovulum imhoffii	0.5 ± 0.1	100	0	22.2 ± 3.3	96.1	3.9
	Rhodovulum sulfidophilum	<0.1			19.1 ± 4.5	92.4	7.6
	Rhodovulum tesquicola	0.2 ± 0.2	43.7	56.3	14.4 ± 5.0	71.4	28.6
	Rhodovulum visakhapatnamense	2.2 ± 2.6	90.6	9.4	10.5 ± 0.7	98.2	1.8
	Roseospira marina	<0.1			6.9 ± 6.6	69.0	31.0
	Roseospira goensis	0.3 ± 0.1	29.9	70.1	19.0 ± 9.6	38.2	61.8
	Roseospira visakhapatnamensis	0.2 ± 0.1	73.2	26.8	13.3 ± 12.0	72.1	27.9

[0082] 表３は、選択した12種の紅色光合成細菌を増殖培地のみで培養したとき（Growth condition）、及び増殖培地で培養後、増殖培地から窒素源であるNH_4Clを除き、炭素源を0.1%の炭酸水素ナトリウム及び0.5%の酢酸ナトリウムに置換したPHA生産培地（w/o NH_4Cl；0.1% $NaHCO_3$＋0.5% accetate）で培養したときの、乾燥菌体重量あたりのPHA量、及びPHAにおけるポリマーの組成を示している。

[0083] 表４は、選択した12種の紅色光合成細菌を増殖培地で培養後、増殖培地から窒素源であるNH_4Clを除き、炭素源を0.1%の炭酸水素ナトリウムのみに置換したPHA生産培地（w/o NH_4Cl；0.1% $NaHCO_3$）、及び0.5%の酢酸ナトリウムのみに置換したPHA生産培地（w/o NH_4Cl； 0.5% accetate）でそれぞれ培養したときの、乾燥菌体重量あたりのPHA量、及びPHAにおけるポリマーの組成を示している。

[0084] 表で示すように検証した全ての紅色光合成細菌がPHAを蓄積できることが判明した。

[0085] 紅色硫黄細菌3種、及び紅色非硫黄細菌Afifella marina、Rhodovulum tesquicola及びRoseospira visakhapatnamensisの3種は、生育条件下と比較して窒素制限下で顕著なPHAの蓄積が確認できた。他の6種については、窒素制限によるPHA蓄積量の変化は見られなかった。

[0086] また、本実施例で検証した紅色硫黄光合成細菌は、PHAとして3-ヒドロキシブタン酸（3HB）のみからなるモノポリマー（モノポリエステル）を産生した。一方、本実施例で検証した全ての紅色非硫黄光合成細菌は、3-ヒドロキシブタン酸（3HB）及び3-ヒドロキシバレリン酸（3HV）からなるコポリエステルを産生することが明らかとなった。

[0087] 本明細書で引用した全ての刊行物、特許及び特許出願はそのまま引用により本明細書に組み入れられるものとする。

請求の範囲

[請求項1] 紅色光合成細菌を用いたポリヒドロキシアルカン酸の生産方法であって、

液体培地を撹拌させながら遠赤色光を照射して紅色光合成細菌を培養する培養工程を含む、前記生産方法。

[請求項2] 前記遠赤色光が720nm～860nmにピーク波長を有する光である、請求項１に記載の生産方法。

[請求項3] 前記培養工程が、

紅色光合成細菌を増殖培地中で培養する増殖ステップ、

前記増殖ステップ後の培養液中の紅色光合成細菌を回収する菌体回収ステップ、及び

回収した紅色光合成細菌を有機酸及び／又は炭酸を炭素源とするポリヒドロキシアルカン酸生産培地で培養するポリヒドロキシアルカン酸蓄積ステップ

を含む、請求項１又は２に記載の生産方法。

[請求項4] 前記増殖ステップにおいて、紅色光合成細菌を対数増殖期まで培養する、請求項３に記載の生産方法。

[請求項5] 前記ポリヒドロキシアルカン酸蓄積ステップにおいて、紅色光合成細菌を後期対数増殖期又は初期静止期まで培養する、請求項３又は４に記載の生産方法。

[請求項6] 前記ポリヒドロキシアルカン酸生産培地が増殖培地の炭素源を有機酸塩及び／又は炭酸塩に置換した培地である、請求項３～５のいずれか一項に記載の生産方法。

[請求項7] 前記ポリヒドロキシアルカン酸生産培地が窒素源、リン酸源、及びビタミンのいずれか一以上を欠乏している、請求項３～６のいずれか一項に記載の生産方法。

[請求項8] 前記培養工程後の培養液に含まれる菌体を回収する回収工程を含む、請求項１～７のいずれか一項に記載の生産方法。

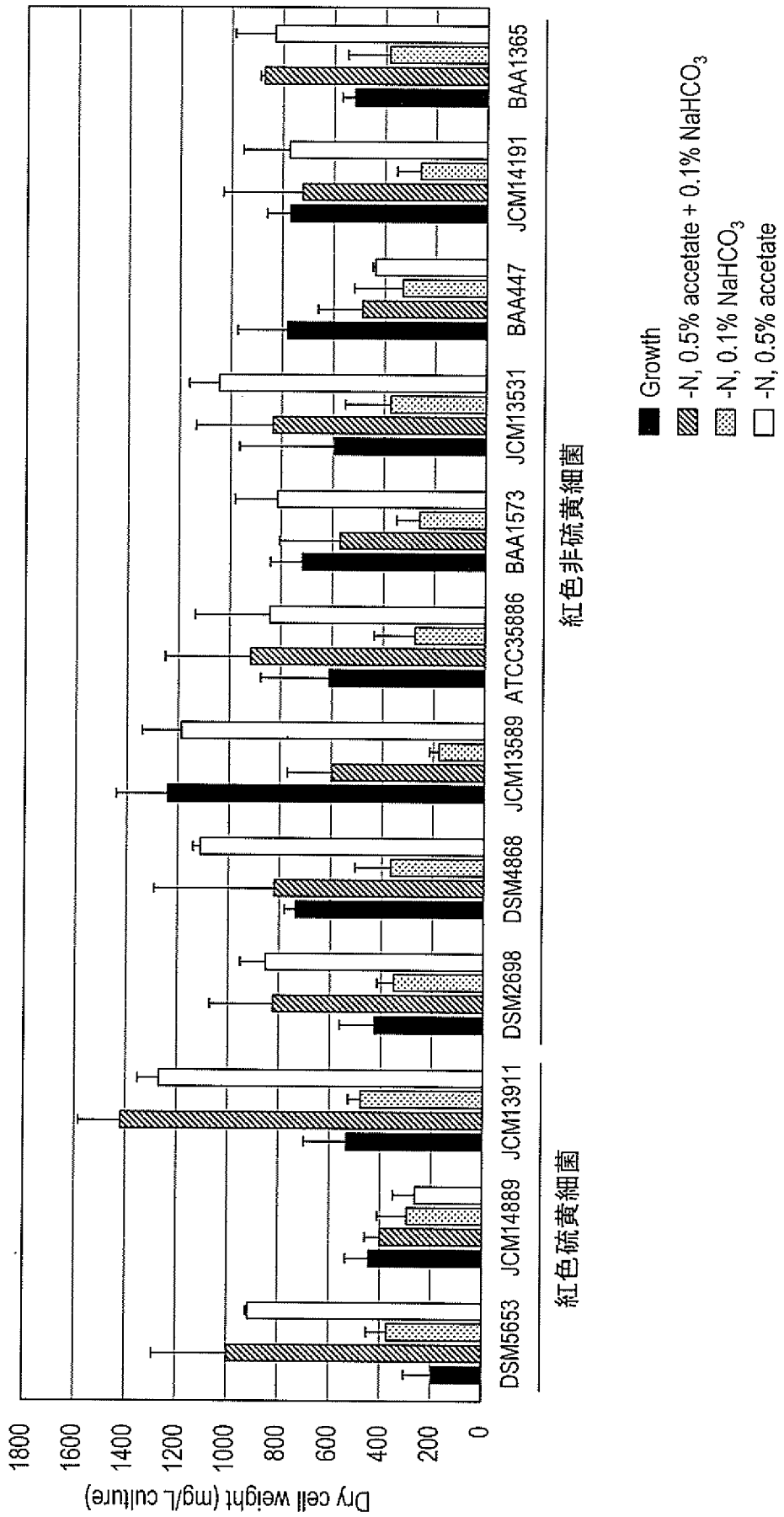
[請求項9] 前記培養工程後の培養液、又は紅色光合成細菌からポリヒドロキシアルカン酸を抽出する抽出工程をさらに含む、請求項１～８のいずれか一項に記載の生産方法。

[請求項10] 紅色光合成細菌が海洋性光合成細菌である、請求項１～９のいずれか一項に記載の生産方法。

[請求項11] 紅色光合成細菌がMarichromatium bheemlicum、Thiohalocapsa marina、Thiophaeococcus mangrovi、Afifella pfennigii、Afifella marina、Rhodovulum euryhalinum、Rhodovulum imhoffii、Rhodovulum sulfidophilum、Rhodovulum tesquicola、Rhodovulum visakhapatnamense、Roseospira goensis及びRoseospira marinaからなる群から選択される、請求項１０に記載の生産方法。

[請求項12] 紅色光合成細菌がMarichromatium bheemlicum JCM13911、Thiohalocapsa marina JCM14780、Thiophaeococcus mangrovi JCM14889、Afifella pfennigii ATCC BAA1145、Afifella marina DSM2698、Rhodovulum euryhalinum DSM4868、Rhodovulum imhoffii JCM13589、Rhodovulum sulfidophilum ATCC35886、Rhodovulum tesquicola ATCC BAA1573、Rhodovulum visakhapatnamense JCM13531、Roseospira goensis JCM14191及びRoseospira marina ATCC BAA447からなる群から選択される、請求項１１に記載の生産方法。

[図1]


Dry cell weight (mg/L culture)
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
DSM5653
JCM14889
JCM13911
DSM2698
DSM4868
JCM13589
ATCC35886
BAA1573
JCM13531
BAA447
JCM14191
BAA1365
紅色硫黄細菌
紅色非硫黄細菌
Growth
-N, 0.5% accetate + 0.1% NaHCO3
-N, 0.1% NaHCO3
-N, 0.5% accetate

[図2]

A
PHA content (wt%)
0
5
10
15
20
25
30
35
40
DSM5653
JCM14889
JCM13911
DSM2698
DSM4868
JCM13589
ATCC35886
BAA1573
JCM13531
BAA447
JCM14191
BAA1365
B
PHA content (mg/L culture)
0
50
100
150
200
250
DSM5653
JCM14889
JCM13911
DSM2698
DSM4868
JCM13589
ATCC35886
BAA1573
JCM13531
BAA447
JCM14191
BAA1365
Growth
-N, 0.5% accetate + 0.1% NaHCO3
-N, 0.5% accetate

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2016/068282

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C12P7/62(2006.01)i, *C12R1/01*(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)
C12P7/62, C12R1/01

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 1996-2016
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2016 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2016

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
WPI, JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII),
CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CHOWDHURY, Wasimul Q. et al., Factors Affecting Polyhydroxybutyrate Biosynthesis in the Marine Photosynthetic Bacterium Rhodopseudomonas sp. Strain W-1S, Applied Biochemistry and Biotechnology, 1996, Vol.57/58, p.361-366, entire text	1-12
Y	LIEBERGESELL, Matthias et al., Formation of poly(3-hydroxyalkanoates) by phototrophic and chemolithotrophic bacteria, Arch Microbiol, 1991, Vol.155, p.415-421, entire text	1-12

☒ 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	Date of mailing of the international search report
26 July 2016 (26.07.16)	16 August 2016 (16.08.16)
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3,Kasumigaseki,Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915,Japan	Authorized officer Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2015)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2016/068282

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	BRANDL, Helmut et al., Ability of the phototrophic bacterium Rhodospirillum rubrum to produce various poly(β-hydroxyalkanoates): potential sources for biodegradable polyesters, Int. J. Biol. Macromol., 1989, Vol.11, p.49-55, entire text	1-12
Y	DO, Young S. et al., Growth of Phodospirillum rubrum on Synthesis Gas: Conversion of CO to H2 and Poly-β-hydroxyalkanoate, Biotechnology and Bioengineering, Vol.97, 2007, p.279-286, entire text	1-12
Y	GIRAUD, Eric et al., Bacteriophytochrome and regulation of the synthesis of the photosynthetic apparatus in Rhodopseudomonas palustris: pitfalls of using laboratory strains, Photochem. Photobiol. Sci., 2004, Vol.3, p.587-591, entire text	1-12
Y	KOJADINOVIC, Mila et al., Dual role for a bacteriophytochrome in the bioenergetic control of Rhodopsdeudomonas palustris: Enhancement of photosystem synthesis and limitaion of respiration, Biochimica et Biophysica Acta, 2008, Vol.1777, p.163-172, entire text	1-12
X	HIGUCHI-TAKEUCHI, Mieko et al., Polyhydroxyalkanoates production in marine photosynthetic purple bacteria, Polymer Preprints, Japan, 2015.05.12, Vol.64, No.1, 1M12, entire text	1-12
A	Mieko HIGUCHI et al., "Kaiyosei Kogosei Saikin ni yoru Polyhydroxyalkanoates (PHA) no Seisan", The 56 th Proceedings of the Annual Meeting of the Japanese Society of Plant Physiologists, 09 March 2015 (09.03.2015), page 130, 1aC10 (0030), entire text	1-12
A	HOLT, Stanley C. et al., Fine Structure of Ectothiorhodospira mobilis Strain 8113 Thylakoids: Chemical Fixation and Freeze-etching Studies, Archiv fuer Mikrobiologie, 1968, Vol.62, p.111-128, abstract	1-12

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１６／０６８２８２

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C12P7/62(2006.01)i, C12R1/01(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（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C12P7/62, C12R1/01

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	１９７１－２０１６年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０１６年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０１６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）

WPI, JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

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
Y	CHOWDHURY, Wasimul Q. et al., Factors Affecting Polyhydroxybutyrate Biosynthesis in the Marine Photosynthetic Bacterium Rhodopseudomonas sp. Strain W-1S, Applied Biochemistry and Biotechnology, 1996, Vol.57/58, p.361-366, 全文	１－１２

☑　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	国際調査報告の発送日
２６．０７．２０１６	１６．０８．２０１６

国際調査機関の名称及びあて先
日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ）
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）　４Ｎ　３３３６
松浦　安紀子
電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４８８

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
Y	LIEBERGESELL, Matthias et al., Formation of poly(3-hydroxyalkanoates) by phototrophic and chemolithotrophic bacteria, Arch Microbiol, 1991, Vol.155, p.415-421, 全文	１－１２
Y	BRANDL, Helmut et al., Ability of the phototrophic bacterium Rhodospirillum rubrum to produce various poly(β-hydroxyalkanoates): potential sources for biodegradable polyesters, Int. J. Biol. Macromol., 1989, Vol.11, p.49-55, 全文	１－１２
Y	DO, Young S. et al., Growth of Phodospirillum rubrum on Synthesis Gas: Conversion of CO to H2 and Poly-β-hydroxyalkanoate, Biotechnology and Bioengineering, Vol.97, 2007, p.279-286, 全文	１－１２
Y	GIRAUD, Eric et al., Bacteriophytochrome and regulation of the synthesis of the photosynthetic apparatus in Rhodopseudomonas palustris: pitfalls of using laboratory strains, Photochem. Photobiol. Sci., 2004, Vol.3, p.587-591, 全文	１－１２
Y	KOJADINOVIC, Mila et al., Dual role for a bacteriophytochrome in the bioenergetic control of Rhodopsdeudomonas palustris: Enhancement of photosystem synthesis and limitaion of respiration, Biochimica et Biophysica Acta, 2008, Vol.1777, p.163-172, 全文	１－１２
X	HIGUCHI-TAKEUCHI, Mieko et al., Polyhydroxyalkanoates production in marine photosynthetic purple bacteria, Polymer Preprints, Japan, 2015.05.12, Vol.64, No.1, 1M12, 全文	１－１２
A	樋口美栄子　他，海洋性光合成細菌によるポリヒドロキシアルカン酸(PHA)の生産，第５６回日本植物生理学会年会要旨集，2015.03.09, p.130, 1aC10(0030), 全文	１－１２
A	HOLT, Stanley C. et al., Fine Structure of Ectothiorhodospira mobilis Strain 8113 Thylakoids: Chemical Fixation and Freeze-etching Studies, Archiv fuer Mikrobiologie, 1968, Vol.62, p.111-128, 抄録	１－１２