



(10) 申请公布号 CN 118434878 A

(43) 申请公布日 2024.08.02

(21) 申请号 202280082377.9

(22) 申请日 2022.12.07

(30) 优先权数据

2021-209798 2021.12.23 JP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.06.13

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2022/045100 2022.12.07

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/120193 JA 2023.06.29

(71) 申请人 株式会社钟化

地址 日本大阪府

(72) 发明人 出口直树 平野优

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

专利代理师 沈雪

(51) Int.Cl.

C12P 7/625 (2022.01)

权利要求书1页 说明书21页 附图1页

(54) 发明名称

聚羟基烷酸酯的制造方法及其利用

(57) 摘要

本发明的目的在于提供能够高效地进行过滤的PHA的制造方法。本发明通过提供如下的PHA的制造方法而解决上述课题,该方法包括:使用通气量为 $0.01 \sim 5.0 \text{cc/cm}^2/\text{sec}$ 的滤材对 $\text{pH}2.5 \sim 5.5$ 的PHA水性悬浮液进行死端过滤的工序,上述PHA水性悬浮液中的PHA表面附着蛋白质的量为 2000ppm 以下,上述过滤工序中的PHA水性悬浮液的液体密度为 $0.50 \sim 1.08 \text{g/mL}$ 。

1. 一种聚羟基烷酸酯的制造方法,该方法包括:
使用通气量为 $0.01 \sim 5.0 \text{cc/cm}^2/\text{sec}$ 的滤材对 $\text{pH}2.5 \sim 5.5$ 的聚羟基烷酸酯水性悬浮液进行死端过滤的工序,
所述聚羟基烷酸酯水性悬浮液中的聚羟基烷酸酯表面附着蛋白质的量为 2000ppm 以下,
所述过滤工序中的聚羟基烷酸酯水性悬浮液的液体密度为 $0.50 \sim 1.08 \text{g/mL}$ 。
2. 根据权利要求1所述的制造方法,其中,
在所述过滤工序中,滤液透过速度为 $200 \text{L/m}^2/\text{hr}$ 以上,且泄漏率为 5% 以下。
3. 根据权利要求1或2所述的制造方法,其中,
所述过滤工序中的聚羟基烷酸酯水性悬浮液的温度为 $20 \sim 95^\circ\text{C}$ 。
4. 根据权利要求1或2所述的制造方法,该方法进一步包括:
(a) 将包含聚羟基烷酸酯的菌体中除聚羟基烷酸酯以外的细胞来源成分进行破坏及可溶化的工序,
所述工序(a)中的聚羟基烷酸酯的体积中值直径为 $0.5 \sim 5.0 \mu\text{m}$ 。
5. 根据权利要求4所述的制造方法,该方法在所述工序(a)之后进一步包括:
(b) 通过离心分离而回收聚羟基烷酸酯水性悬浮液的工序。
6. 根据权利要求1或2所述的制造方法,该方法包括:
使所述过滤工序中得到的聚羟基烷酸酯在 $20 \sim 80^\circ\text{C}$ 下进行干燥的工序。
7. 根据权利要求6所述的制造方法,该方法包括:
使所述干燥后的聚羟基烷酸酯再分散于水性溶剂,得到包含体积中值直径为 $0.5 \sim 5.0 \mu\text{m}$ 的聚羟基烷酸酯的聚羟基烷酸酯水性悬浮液的工序。
8. 根据权利要求1或2所述的制造方法,该方法在所述过滤工序之前进一步包括:
(c) 以聚羟基烷酸酯水性悬浮液的温度达到 $60 \sim 120^\circ\text{C}$ 的方式进行加热处理的工序。
9. 根据权利要求8所述的制造方法,其中,
过滤时的聚羟基烷酸酯水性悬浮液的温度为比所述加热处理工序后的聚羟基烷酸酯水性悬浮液的温度低 5°C 以上的温度。
10. 根据权利要求5所述的制造方法,该方法包括:
将所述工序(b)中得到的聚羟基烷酸酯水性悬浮液调整为 $\text{pH}2.5 \sim 5.5$ 的工序。
11. 一种聚羟基烷酸酯凝聚块,其费雷特直径为 $1 \sim 100 \text{mm}$,且含水率为 $25.0 \sim 50.0\%$ (W.B.)。

聚羟基烷酸酯的制造方法及其利用

技术领域

[0001] 本发明涉及聚羟基烷酸酯的制造方法及其利用。

背景技术

[0002] 已知聚羟基烷酸酯(以下有时称为“PHA”)具有生物降解性。

[0003] 微生物所生成的PHA会积蓄于微生物的菌体内,因此,为了将PHA作为塑料而利用,需要从微生物的菌体内将PHA分离/纯化的工序。在将PHA分离/纯化的工序中,将含有PHA的微生物的菌体破碎、或者将除PHA以外的生物来源成分可溶化之后,从得到的水性悬浮液中取出PHA。此时,例如进行离心分离、过滤、干燥等分离操作。

[0004] 作为使用了过滤的PHA的制造方法,例如,专利文献1中公开了一种PHA的制造方法,该方法包括:将PHA发酵菌接种于发酵培养基并使其发酵的工序;将发酵液固液分离而得到发酵上清液及菌体沉淀的工序;使菌体沉淀,将细胞壁破碎,且使用预涂有细胞壁破碎物的过滤器进行板框过滤,得到PHA的工序。

[0005] 另外,专利文献2中公开了包括进行酸处理作为前处理的工序的从细胞培养物回收PHA且进行纯化的方法。

[0006] 现有技术文献

[0007] 专利文献

[0008] 专利文献1:中国专利第111500650号说明书

[0009] 专利文献2:国际公开2015/015395号

发明内容

[0010] 发明要解决的课题

[0011] 然而,从滤液透过速度及泄漏率的观点出发,上述的技术仍有进一步改进的余地。

[0012] 因此,本发明的目的在于提供能够高效地过滤的PHA的制造方法。

[0013] 解决课题的方法

[0014] 本发明人为了解决上述课题而进行了深入研究,结果发现如下新的见解而完成了本发明:在制造PHA时的过滤工序中,通过控制PHA水性悬浮液的pH、滤材的通气量、PHA表面附着蛋白质的量、及PHA水性悬浮液的液体密度,能够实现特定的滤液透过速度及特定的泄漏率(即,能够高效地进行过滤)。

[0015] 因此,本发明的一个方式为一种PHA的制造方法(以下称为“本制造方法”),该方法包括:使用通气量为 $0.01 \sim 5.0 \text{ cc/cm}^2/\text{sec}$ 的滤材对pH $2.5 \sim 5.5$ 的PHA水性悬浮液进行死端过滤的工序,上述PHA水性悬浮液中的PHA表面附着蛋白质的量为2000ppm以下,上述过滤工序中的PHA水性悬浮液的液体密度为 $0.50 \sim 1.08 \text{ g/mL}$ 。

[0016] 另外,本发明的一个方式为一种PHA凝聚块(以下称为“本PHA凝聚块”),其费雷特直径(Feret直径)为 $1 \sim 100 \text{ mm}$,且含水率为 $25.0 \sim 50.0\% (\text{W.B.})$ 。

[0017] 发明的效果

[0018] 根据本发明的一个方式,可以提供能够高效地过滤的PHA的制造方法。

附图说明

[0019] 图1是示出本发明的实施例10的PHA凝聚块的费雷特直径测定例的图。

具体实施方式

[0020] 以下,对本发明的一个实施方式详细地进行说明。需要说明的是,只要在本说明书中没有特别说明,表示数值范围的“A~B”是指“A以上且B以下”。另外,本说明书中记载的全部文献作为参考文献而援引至本说明书中。

[0021] (1. 本发明内容)

[0022] 在菌体内制造的PHA的粒径为1~2 μm 左右,因此存在难以过滤的课题。另外,PHA的回收主要使用了离心分离,分离方式为形成水性悬浮液,以包含大量的水的状态回收PHA。为了与水分离而回收PHA,需要将水性悬浮液的水分蒸发,存在需要大量能量等的问题。

[0023] 作为使用了过滤的PHA的制造方法,例如已知上述的专利文献1及2。对于专利文献1的技术而言,由于在纯化前(生物来源的残渣大量残留的状态)实施了过滤,因此存在杂质多、过滤速度极慢的问题。另外,对于专利文献2的技术而言,本发明人进行了追加试验,结果发现,可知pH的范围为6~7,在该条件下进行过滤时,存在会泄漏非常多的树脂的问题。另外发现了,在该条件下使滤布细密时过滤速度变得极慢的问题。

[0024] 因此,本发明人从改善滤液透过速度及泄漏率的观点考虑,对PHA的制造中的过滤工序进行了深入研究,结果首次发现,通过控制PHA水性悬浮液的pH、滤材的通气量、PHA表面附着蛋白质的量、及PHA水性悬浮液的液体密度,能够实现特定的滤液透过速度及特定的泄漏率(即,能够高效地进行过滤)。

[0025] 根据本制造方法,可以提供能够高效地进行过滤的PHA的制造方法。因此,本制造方法在PHA的工业制造上是极其有利的。需要说明的是,在本说明书中,“能够高效地进行过滤”是指滤液透过速度为200L/m²/hr以上且泄漏率为5%以下。

[0026] 另外,根据上述这样的构成,能够削减过滤后的干燥工序所需要的热量、时间及成本、即能量。由此,例如,可以对目标7“确保人人都负担得起、可靠且可持续的现代能源”等可持续发展目标(SDGs)的实现做出贡献。以下,对本发明进行详细说明。

[0027] (2. PHA的制造方法)

[0028] 本制造方法为包括以下的工序的方法。

[0029] • 使用通气量为0.01~5.0cc/cm²/sec的滤材对pH2.5~5.5的PHA水性悬浮液进行死端过滤的工序(以下称为工序(d)),上述PHA水性悬浮液中的PHA表面附着蛋白质的量为2000ppm以下,上述过滤工序中的PHA水性悬浮液的液体密度为0.50~1.08g/mL。

[0030] 另外,在本发明的一个实施方式中,本制造方法优选包括以下的工序中的至少一个工序来代替上述工序(d)。

[0031] • 工序(a):将包含PHA的菌体中除PHA以外的细胞来源成分进行破坏及可溶化的工序,上述PHA的体积中值粒径为0.5~5.0 μm 的工序(也称为“可溶化工序”)

[0032] • 工序(b):在上述工序(a)之后,通过离心分离回收PHA水性悬浮液的工序(也称为“回收工序”)

[0033] • 工序(c') :将上述工序(b)中得到的PHA水性悬浮液调整为pH2.5~5.5的工序(也称为“调整工序”)。

[0034] • 工序(c) :进行加热处理以使PHA水性悬浮液的温度为60~120℃的工序(也称为“加热处理工序”)。

[0035] • 工序(e) :将上述工序(d)中得到的PHA在20~160℃下进行干燥的工序(也称为“干燥工序”)。

[0036] • 工序(f) :使上述干燥的PHA再分散于水性溶剂,得到包含体积中值粒径为0.5~5.0 μm 的PHA的PHA水性悬浮液的工序(也称为“再分散工序”)。

[0037] 在本制造方法中,上述的各工序优选以工序(a)、(b)、(c')、(c)、(d)、(e)、(f)的顺序进行,但也可以根据目的而适当调换顺序。例如,可以调换工序(a)、(b)的顺序而以工序(b)、(a)的顺序进行,以及可以调换工序(c')、(c)的顺序而以工序(c)、(c')的顺序进行。另外,也可以根据目的而进行2次以上的工序(a)、(b)、(c')及(c)。即,例如,也可以以工序(b)、(a)、(b)、或(c')、(c)、(c')的顺序进行。以下,为了方便说明,按照工序(a)、(b)、(c')、(c)、(d)、(e)、(f)的顺序进行说明。需要说明的是,在本说明书中,有时将至少包含PHA的水性悬浮液简单表述为“PHA水性悬浮液”。

[0038] (工序(a))

[0039] 在本制造方法中的工序(a)中,将包含PHA的菌体中除PHA以外的细胞来源成分进行破坏及可溶化。通过工序(a),将上述菌体来源的杂质(细胞壁、蛋白质等)破坏并去除,从而能够从上述菌体高效地回收体积中值粒径为0.5~5.0 μm 的PHA。

[0040] <PHA>

[0041] 在本说明书中,“PHA”是指以羟基烷酸作为单体单元的聚合物的总称。作为构成PHA的羟基烷酸,没有特别限定,可以列举例如:3-羟基丁酸、4-羟基丁酸、3-羟基丙酸、3-羟基戊酸、3-羟基己酸、3-羟基庚酸、3-羟基辛酸等。这些聚合物可以为均聚物,也可以为包含2种以上单体单元的共聚物。

[0042] 更详细而言,作为PHA,可以列举例如:聚(3-羟基丁酸酯)(P3HB)、聚(3-羟基丁酸酯-共聚-3-羟基己酸酯)(P3HB3HH)、聚(3-羟基丁酸酯-共聚-3-羟基戊酸酯)(P3HB3HV)、聚(3-羟基丁酸酯-共聚-4-羟基丁酸酯)(P3HB4HB)、聚(3-羟基丁酸酯-共聚-3-羟基辛酸酯)(P3HB3HO)、聚(3-羟基丁酸酯-共聚-3-羟基十八烷酸酯)(P3HB3HOD)、聚(3-羟基丁酸酯-共聚-3-羟基癸酸酯)(P3HB3HD)、聚(3-羟基丁酸酯-共聚-3-羟基戊酸酯-共聚-3-羟基己酸酯)(P3HB3HV3HH)等。其中,从工业上容易生产的方面出发,优选为P3HB、P3HB3HH、P3HB3HV、P3HB4HB。

[0043] 另外,从能够通过改变重复单元的组成比来改变熔点、结晶度、并在结果上使杨氏模量、耐热性等物性发生变化、能够赋予聚丙烯与聚乙烯之间的物性、以及如上所述在工业上容易生产、为物性上有用的塑料的观点考虑,更优选为3-羟基丁酸与3-羟基己酸的共聚物P3HB3HH。

[0044] 在本发明的一个实施方式中,对于P3HB3HH的重复单元的组成比而言,从柔软性及强度的平衡的观点考虑,3-羟基丁酸酯单元/3-羟基己酸酯单元的组成比优选为80/20~99.9/0.1(mol/mol)、更优选为85/15~97/3(mol/mol)。3-羟基丁酸酯单元/3-羟基己酸酯单元的组成比为99.9/0.01(mol/mol)以下时,可获得充分的柔软性,为80/20(mol/mol)以

上时,可获得充分的硬度。

[0045] 工序(a)中的PHA的体积中值粒径优选为该PHA的初级粒子的体积中值粒径(以下称为“初级粒径”)的50倍以下、更优选为20倍以下、进一步优选为10倍以下。通过使PHA的体积中值粒径为初级粒径的50倍以下,能够使PHA水性悬浮液显示出更优异的流动性,因此具有PHA的生产性进一步提高的倾向。

[0046] 在本发明的一个实施方式中,例如,从可实现优异的流动性的观点考虑,PHA的体积中值粒径优选为0.5~5.0 μm 、更优选为1.0~4.5 μm 、进一步优选为1.0~4.0 μm 。PHA的体积中值粒径可使用HORIBA公司制激光衍射/散射式粒径分布测定装置LA-950来测定。

[0047] <菌体(微生物)>

[0048] 工序(a)中使用的微生物只要是能够在细胞内生成PHA的微生物即可,没有特别限定。例如,可以使用天然分离出的微生物及保藏于菌株的保藏机构(例如,IFO、ATCC等)的微生物、或者能够由它们制备的突变体及转化体等。例如,作为生成PHA的一例的P3HB的菌体,最早为1925年发现的巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*),其它可以列举:杀虫贪铜菌(*Cupriavidus necator*)(旧分类:真养产碱杆菌(*Alcaligenes eutrophus*)、富养罗尔斯通氏菌(*Ralstonia eutropha*))、广泛产碱菌(*Alcaligenes latus*)等天然微生物。在这些微生物中,已知PHA积蓄在菌体内。

[0049] 另外,作为生成PHA的一例的羟基丁酸酯与其它羟基烷酸酯的共聚物的菌体,可以列举:作为P3HB3HV及P3HB3HH生产菌的豚鼠气单胞菌(*Aeromonas caviae*)、作为P3HB4HB生产菌的真养产碱杆菌(*Alcaligenes eutrophus*)等。特别是关于P3HB3HH,更优选为为了提高P3HB3HH的生产性而导入了PHA合成酶组的基因的真养产碱杆菌AC32株(*Alcaligenes eutrophus* AC32,FERM BP-6038)(T.Fukui,Y.Doï,J.Bacteriol.,179,p4821-4830(1997))等。另外,除了上述以外,菌体也可以是根据想要生产的PHA而导入了各种PHA合成相关基因的基因重组微生物。

[0050] <细胞来源成分的破坏及可溶化>

[0051] 在工序(a)中,将包含PHA的菌体中除PHA以外的细胞来源成分进行破坏及可溶化的方法没有特别限定。

[0052] 在本发明的一个实施方式中,上述破坏及可溶化例如可使用溶菌酶、蛋白质分解酶(例如,碱性蛋白分解酶)进行。

[0053] 在本说明书中,“溶菌酶”是指具有将菌体的细胞壁(例如,肽聚糖)分解(溶菌)的活性的酶。

[0054] 在本发明的一个实施方式中,溶菌酶没有特别限定,可以列举例如:溶菌酶、labiase、 β -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶、内溶素、自溶素等。从经济上有利的观点考虑,优选为溶菌酶。可以单独使用这些中的1种,也可以组合使用2种以上。

[0055] 作为溶菌酶,也可以使用市售品,可以列举例如:FUJIFILM Wako Pure Chemical公司制“Lysozyme”、“Achromopeptidase”等。

[0056] 在本发明的一个实施方式中,该溶菌酶只要具有细胞壁分解活性即可,没有特别限定,溶菌酶的最优pH例如为5.0~11.0、优选为6.0~9.0、更优选为6.0~8.0。

[0057] 在本发明的一个实施方式中,溶菌酶的最优温度没有特别限定,从能够在不需要过度加热的情况下防止PHA的热变化(热分解)的观点考虑,优选为60 $^{\circ}\text{C}$ 以下、进一步优选为

50℃以下。最优温度的下限没有特别限定,从不需要过度的冷却操作、经济性的观点考虑,优选为室温(例如25℃)以上。

[0058] 在本说明书中,“碱性蛋白分解酶”是指具有在碱性环境下(例如pH8.5的溶液中)分解蛋白质的活性的蛋白质分解酶。

[0059] 在本发明的一个实施方式中,碱性蛋白分解酶只要具有在碱性环境下分解蛋白质的活性即可,没有特别限定,可以列举例如:丝氨酸特异性蛋白质分解酶(例如,枯草杆菌蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、胰蛋白酶)、半胱氨酸特异性蛋白质分解酶(例如,木瓜蛋白酶、菠萝蛋白酶、组织蛋白酶)、天冬氨酸特异性蛋白质分解酶(例如,胃蛋白酶、组织蛋白酶D、HIV蛋白酶)等。从经济性上有利的观点考虑,优选为包含丝氨酸特异性蛋白质分解酶、特别是枯草杆菌蛋白酶的碱性蛋白酶(碱性蛋白酶)。可以单独使用它们中的1种,也可以组合使用2种以上。

[0060] 作为碱性蛋白分解酶,也可以使用市售品,可以列举例如:Novozyme公司制“碱性蛋白酶2.5L”;Amano Enzyme公司制“PROTIN SD-AY10”及“蛋白酶P“AMANO”3SD”;Danisco Japan公司制“Multifect PR6L”及“Optimase PR89L”;新日本化学工业株式会社制“SUMIZYME MP”;DSM Japan公司制“DELVOLASE”;Nagase ChemteX公司制“BIOPLASE OP”、“BIOPLASE SP-20FG”及“BIOPLASE SP-4FG”;HBI公司制“ORIENTASE 22BF”;Yakult Pharmaceutical Industry公司制“AROASE XA-10”等。

[0061] 在本发明的一个实施方式中,该碱性蛋白分解酶只要在碱环境下具有活性即可,没有特别限定,碱性蛋白分解酶的最优pH例如为8.0~14.0、优选为8.0~12.0、更优选为8.0~10.0、进一步优选为8.0~9.0、最优选为8.5。

[0062] 在本发明的一个实施方式中,碱性蛋白分解酶的最优温度没有特别限定,从能够在不需要过度加热的情况下防止PHA的热变化(热分解)的观点考虑,优选为60℃以下、进一步优选为50℃以下。最优温度的下限没有特别限定,从不需要过度的冷却操作、经济性的观点考虑,优选为室温(例如,25℃)以上。

[0063] 在本发明的一个实施方式中,工序(a)中的细胞来源成分的破坏及可溶化可以将溶菌酶及碱性蛋白酶组合而进行。

[0064] 工序(a)中的上述酶处理时间可根据酶的种类、pH、温度等条件而改变,例如为1小时~8小时、优选为2小时~6小时。

[0065] 需要说明的是,构成本制造方法中的PHA水性悬浮液的溶剂(“溶剂”也称为“水性介质”)可以为水、或者水与有机溶剂的混合溶剂。另外,在该混合溶剂中,作为与水具有相容性的有机溶剂的浓度,只要为待使用的有机溶剂在水中的溶解度以下即可,没有特别限定。另外,作为与水具有相容性的有机溶剂,没有特别限定,可以列举例如:甲醇、乙醇、1-丙醇、2-丙醇、1-丁醇、2-丁醇、异丁醇、戊醇、己醇、庚醇等醇类;丙酮、甲乙酮等酮类;四氢呋喃、二噁烷等醚类;乙腈、丙腈等腈类;二甲基甲酰胺、乙酰胺等酰胺类;二甲基亚砜、吡啶、哌啶等。其中,从易于去除的观点考虑,优选为甲醇、乙醇、1-丙醇、2-丙醇、1-丁醇、2-丁醇、异丁醇、丙酮、甲乙酮、四氢呋喃、二噁烷、乙腈、丙腈等。另外,从容易获得的观点考虑,更优选为甲醇、乙醇、1-丙醇、2-丙醇、丁醇、丙酮等。此外,特别优选为甲醇、乙醇、丙酮。需要说明的是,构成PHA水性悬浮液的水性介质只要不损害本发明的本质即可,可以包含其它溶剂、菌体来源的成分、纯化时产生的化合物等。

[0066] 构成本制造方法中的PHA水性悬浮液的水性介质中优选包含水。水性介质中的水的含量优选为5重量%以上、更优选为10重量%以上、进一步优选为30重量%以上、特别优选为50重量%以上。

[0067] (其它工序)

[0068] 在本发明的一个实施方式中,本制造方法可以在工序(a)之前包括以下所示的工序。

[0069] <工序(a1)>

[0070] 工序(a1)是对包含PHA的菌体进行培养的工序。

[0071] 在工序(a1)中,菌体可使用例如上述<菌体(微生物)>一项中记载的菌体。

[0072] 在工序(a1)中,菌体的培养方法没有特别限定,可以举出例如国际公开第W02019/142717号的第(0041)~(0048)段所记载的方法。

[0073] <工序(a2)>

[0074] 工序(a2)是将上述工序(a1)中得到的菌体灭活的工序。在本工序中,将上述工序(a1)中得到的菌体灭活,得到灭活培养液。

[0075] 在工序(a2)中,灭活的方法没有特别限定,可以举出例如将包含含有P3HA的菌体的培养液在内温60~70℃下加热并搅拌处理7小时的方法。

[0076] <工序(a3)>

[0077] 工序(a3)是对上述工序(a2)中得到的灭活培养液的浓度及pH进行调整的工序。工序(a3)主要在上述工序(a2)中得到的灭活培养液的粘度高的情况下进行,调整灭活培养液的浓度及pH,使灭活培养液的粘度降低。通过工序(a3),使工序(a)中的可溶化变得容易。

[0078] 在工序(a3)中,调整灭活培养液的浓度及pH的方法没有特别限定,可通过本技术领域所使用的任意方法进行。例如,可以向灭活培养液添加过氧化氢等来调整灭活培养液的浓度。另外,作为调整pH的方法,可以举出例如向灭活培养液中添加碱性化合物的方法。作为碱性化合物,没有特别限定,优选为碱金属氢氧化物或碱土金属氢氧化物,更优选为氢氧化钠。碱性化合物可以单独使用1种,也可以组合使用2种以上。

[0079] (工序(b))

[0080] 在本制造方法中的工序(b)中,在上述工序(a)之后,通过离心分离回收PHA水性悬浮液。通过工序(b),可以将PHA水性悬浮液中的上述菌体来源的杂质(细胞壁、蛋白质等)去除。

[0081] 在工序(b)中,PHA水性悬浮液的回收可通过该技术领域中公知的任意的离心分离法而进行。离心分离的方法没有特别限定,可以举出例如使用了离心沉淀机、离心脱水机等离心分离。

[0082] 作为离心沉淀机,可以列举例如:分离板型(例如,盘型、自清洁型、喷嘴型、螺旋倾析器型、刮削型等)、圆筒型、倾析器型的离心沉淀机。根据各沉淀成分的排出方法,有分批式和连续式。另外,关于离心脱水机,也可以举出分批式和连续式。通过使用这些设备,可以根据比重差而分离成包含PHA的沉淀物和培养液成分。

[0083] 通过工序(a)及(b),可大致确定最终产品中残留的杂质量,因此优选尽量减少这些杂质。当然,根据用途不同,只要不损害最终产品的物性,也可以混入杂质,但在医疗用途等要求高纯度的PHA的情况下,优选尽量减少杂质。作为此时的纯化度的指标,可以举出例

如PHA水性悬浮液中的PHA表面附着蛋白质的量。该蛋白质的量为每单位PHA重量2000ppm以下、优选为1900ppm以下、进一步优选为1800ppm以下、最优选为1700ppm以下。PHA水性悬浮液的PHA表面附着蛋白质的量为上述的范围内时,具有泄漏率不会变得过高的优点。可以推测,该效果是由于在PHA表面附着蛋白质的量少时,PHA彼此容易聚集。

[0084] (工序(c'))

[0085] 在工序(c')中,通过离心分离而回收的PHA水性悬浮液通常具有大于7的pH。因此,在本制造方法的工序(c')中,将上述工序(b)中得到的PHA水性悬浮液调整为pH2.5~5.5。通过进行工序(c')的pH调整,工序(d)在过滤中的泄漏率降低。

[0086] 在工序(c')中,PHA水性悬浮液的pH为2.5~5.5、优选为2.5~5.0、更优选为2.5~4.5、进一步优选为2.5~4.0、特别优选为2.5~3.5。PHA水性悬浮液的pH为上述的范围内时,具有能够在过滤工序中提高滤液透过速度而不使PHA在滤液中的泄漏率增高的优点。可以推测,该效果是由于PHA不会过小而易于凝聚。另外,关于pH的上限,从减少将PHA加热熔融时的着色、确保加热时和/或干燥时的分子量的稳定性的观点、以及可得到加热熔融时的着色减轻、加热时和/或干燥时的分子量降低受到抑制的PHA的观点出发,优选为pH5.5以下。关于pH的下限,从容器的耐酸性的观点考虑,优选为pH2.5以下。

[0087] 在工序(c')中,pH的调整方法没有特别限定,可以举出例如添加酸的方法等。酸没有特别限定,可以为有机酸、无机酸中的任意酸,无论是否有挥发性。更具体而言,作为酸,可以使用例如硫酸、盐酸、磷酸、乙酸等。

[0088] 在本发明的一个实施方式中,优选在工序(c)中的pH调整之后至进行工序(d)之间不实施追加的pH调整。

[0089] (工序(c))

[0090] 在本制造方法中的工序(c)中,以PHA水性悬浮液的温度达到60~120℃的方式进行加热处理。通过工序(c),能够提高过滤时的滤液透过速度。

[0091] 在工序(c)中,优选以PHA水性悬浮液的温度达到60~120℃的方式进行加热处理,更优选以达到62~118℃的方式进行加热处理,进一步优选以达到65~115℃的方式进行加热处理。PHA水性悬浮液的温度为上述的范围内时,能够进一步提高过滤时的滤液透过速度。

[0092] 在工序(c)中,进行加热处理的方法没有特别限定,可以列举例如:(i)使用蒸气对加入了PHA水性悬浮液的容器进行加热的方法、(ii)使用油对加入了PHA水性悬浮液的容器进行加热的方法、(iii)将PHA水性悬浮液直接投入蒸气中的方法等。上述(i)及(iii)的蒸气的温度、以及上述(ii)的油的温度只要是工序(c)中的PHA水性悬浮液的温度达到60~120℃的温度即可,没有特别限定,例如为95~150℃。

[0093] (工序(d))

[0094] 在本制造方法中的工序(d)中,使用通气量为0.01~5.0cc/cm²/sec的滤材对pH2.5~5.5的PHA水性悬浮液进行死端过滤。在工序(d)中,上述PHA水性悬浮液中的PHA表面附着蛋白质的量为2000ppm以下,上述过滤工序中的PHA水性悬浮液的液体密度为0.50~1.08g/mL。通过工序(d),可得到具有一定的费雷特直径及含水率的PHA。

[0095] 在本说明书中,将每1秒钟通过单位面积(cm²)滤材的空气量(cc)称为通气量。在工序(d)中,通气量为0.01~5.0cc/cm²/sec、优选为0.1~4.0cc/cm²/sec、更优选为0.2~

3.5cc/cm²/sec、进一步优选为0.3~3.0cc/cm²/sec、特别优选为0.4~2.5cc/cm²/sec。通气量为上述的范围内时,具有PHA在滤液中的泄漏率低的优点。需要说明的是,本制造方法的过滤工序中的通气量可通过实施例记载的方法来测定。

[0096] 在工序(d)中,PHA水性悬浮液的液体密度为0.50~1.08g/mL、优选为0.55~1.08g/mL、更优选为0.60~1.05g/mL、进一步优选为0.65~1.03g/mL。PHA水性悬浮液的液体密度为上述的范围内时,具有滤液透过速度快、且PHA凝聚块中的含水率低的优点。在液体密度低的情况下,滤液透过速度降低,可以推测这是由于PHA水性悬浮液的粘度因包含空气而上升,空气与PHA相互作用而使粘度上升。PHA水性悬浮液的液体密度例如可以通过包含空气而调整,在增加空气的量时,PHA水性悬浮液的液体密度降低,在减少空气的量时,PHA水性悬浮液的液体密度增加。

[0097] 作为工序(d)中使用的滤材,没有特别限定,可以从例如纸、滤布(织布、无纺布)、筛网、烧结板、素烧(素烧)、高分子膜、冲孔金属、楔形线等各种原材料中选择。从价格、清洗的容易程度的观点考虑,可优选使用滤布。

[0098] 工序(d)中的过滤的方法只要是死端过滤即可,没有特别限定,可以列举例如:抽滤、加压过滤、离心过滤、重力式过滤等。其中,从设备大小的观点考虑,可优选使用抽滤、加压过滤、离心过滤。此外,从结构的容易程度的观点考虑,可更优选使用抽滤、加压过滤。

[0099] 在本说明书中,滤液透过速度是指滤液透过PHA凝聚块和滤材的速度。在本制造方法中的工序(d)中,滤液透过速度优选为200L/m²/hr以上、更优选为300L/m²/hr以上、更优选为400L/m²/hr以上、更优选为500L/m²/hr以上、更优选为600L/m²/hr以上、进一步优选为800L/m²/hr以上、特别优选为1000L/m²/hr以上。通过使滤液透过速度为上述的范围内,具有能够缩短操作时间的优点。滤液透过速度越高越好,上限没有特别限定,例如为4000L/m²/hr以下。需要说明的是,滤液透过速度可通过实施例记载的方法测定。

[0100] 在本说明书中,泄漏率是指过滤工序后PHA在滤液中的泄漏率。在本制造方法中的工序(d)中,泄漏率优选为5%以下、更优选为4%以下、更优选为3%以下、更优选为2%以下、更优选为1%以下、进一步优选为0.5%以下、特别优选为0.3%以下。泄漏率为上述的范围内时,能够以高分离能力将PHA与水分离,具有能够以高收率回收PHA的优点。需要说明的是,泄漏率可通过实施例记载的方法测定。

[0101] 工序(d)中的PHA水性悬浮液的温度(过滤时温度)优选为20~95℃、更优选为20~90℃、进一步优选为20~85℃、特别优选为25~85℃。PHA水性悬浮液的温度为上述的范围内时,具有滤液透过速度增高的优点。可以推测,上述滤液透过速度的增加是由于随着温度上升粘度升高而另一方面粒径增大。

[0102] 在本制造方法中包括工序(c)的加热处理工序的情况下,过滤时的PHA水性悬浮液的温度优选为比上述加热处理工序后的温度低5℃以上的温度,更优选为低8℃以上的温度、进一步优选为低10℃以上的温度、特别优选为低12℃以上的温度。过滤时的PHA水性悬浮液的温度为上述范围内时,具有能够以高滤液透过速度进行PHA的过滤的优点。另外,作为在上述加热处理工序后降低温度的方法,没有特别限定,可以举出例如利用冷却装置进行冷却、自然冷却等。

[0103] 需要说明的是,在工序(d)中,对于“pH”,援引上述(工序(c'))的记载。另外,在工序(d)中,对于“PHA水性悬浮液中的PHA表面附着蛋白质的量”,援引上述(工序(b))的记载。

[0104] (工序(e))

[0105] 在本制造方法中的工序(e)中,将上述工序(d)中得到的PHA以20~80℃进行干燥。通过工序(e),可以使PHA水性悬浮液中的水分蒸发而调整含水率。

[0106] 在工序(e)中,使PHA干燥的方法没有特别限定,可以列举例如:加热、真空干燥、常温干燥等。从适度的干燥速度的观点考虑,优选通过加热进行。干燥时的热介质(例如,热风、套管等)优选为20~160℃、更优选为40~160℃、进一步优选为40~150℃、特别优选为50℃~150℃。

[0107] (工序(f))

[0108] 在本制造方法中的工序(f)中,使上述干燥后的PHA再分散于水性溶剂,得到包含体积中值粒径为0.5~5.0 μm 的PHA的PHA水性悬浮液。在工序(e)之后,通过进行工序(f)而得到包含具有与原粒径(初级粒径)实质上相同的粒径的PHA的PHA水性悬浮液。

[0109] 在工序(f)中,再分散的方法没有特别限定,可通过本技术领域所使用的任意方法来进行。

[0110] 在工序(f)中,PHA的体积中值粒径只要与工序(a)中的PHA的体积中值粒径实质上相同即可,没有特别限定,例如优选为0.5~5.0 μm 、更优选为1.0~4.5 μm 、进一步优选为1.0~3.0 μm 。

[0111] (3.PHA凝聚块)

[0112] 本PHA凝聚块的费雷特直径为1~100mm,且含水率为25.0~50.0%(W.B.)。需要说明的是,PHA凝聚块有时也称为“PHA饼”、“滤饼”或“PHA滤饼”。

[0113] 本PHA凝聚块的费雷特直径为1~100mm、优选为1~70mm、更优选为1~50mm、进一步优选为1~30mm、特别优选为1~10mm。本PHA凝聚块的费雷特直径为上述的范围内时,具有利于转移至下一工序的优点。需要说明的是,也可以通过破碎机、螺杆等机械方法将工序(d)中得到的PHA凝聚块整粒至上述范围,通过落下的冲击所产生的破坏等而整粒至该范围。对于本PHA凝聚块而言,取得10个PHA凝聚块的图像(图1),用ImageJ(ver1.50)进行分析,对10个PHA凝聚块求出各自的费雷特直径,将10个各自的费雷特直径的算术平均作为费雷特直径。

[0114] 本PHA凝聚块的含水率为25.0~50.0%(W.B.)、优选为25.5~49.0%(W.B.)、更优选为26.0~48.0%(W.B.)、进一步优选为26.5~47.0%(W.B.)、特别优选为27.0~46.0%(W.B.)。本PHA凝聚块的含水率为上述的范围内时,PHA凝聚块不为浆料状而成为固体状,具有易于投入干燥机的优点。需要说明的是,本PHA凝聚块的含水率可通过实施例中记载的方法测定。

[0115] 在本发明的一个实施方式中,本PHA凝聚块可通过本制造方法来制造。

[0116] 只要可发挥本发明的效果,本PHA凝聚块可以包含本制造方法的过程中产生或未被去除的各种成分。

[0117] 本PHA凝聚块可以用于纸、膜、片、管、板、棒、容器(例如,瓶容器等)、袋、构件等各种用途。

[0118] 本发明并不限于上述的各实施方式,可以在权利要求所示的范围内进行各种变更,将不同的实施方式中分别公开的技术手段适当组合而得到的实施方式也包含于本发明的技术范围。

- [0119] 即,本发明的一个方式包括以下方式。
- [0120] <1>一种聚羟基烷酸酯的制造方法,该方法包括:
- [0121] 使用通气量为 $0.01 \sim 5.0 \text{cc}/\text{cm}^2/\text{sec}$ 的滤材对 $\text{pH}2.5 \sim 5.5$ 的聚羟基烷酸酯水性悬浮液进行死端过滤的工序,
- [0122] 上述聚羟基烷酸酯水性悬浮液中的聚羟基烷酸酯表面附着蛋白质的量为 2000ppm 以下,
- [0123] 上述过滤工序中的聚羟基烷酸酯水性悬浮液的液体密度为 $0.50 \sim 1.08 \text{g}/\text{mL}$ 。
- [0124] <2>根据<1>所述的制造方法,其中,
- [0125] 在上述过滤工序中,滤液透过速度为 $200 \text{L}/\text{m}^2/\text{hr}$ 以上,且泄漏率为 5% 以下。
- [0126] <3>根据<1>或<2>所述的制造方法,其中,
- [0127] 上述过滤工序中的聚羟基烷酸酯水性悬浮液的温度为 $20 \sim 95^\circ\text{C}$ 。
- [0128] <4>根据<1> ~ <3>中任一项所述的制造方法,该方法进一步包括:
- [0129] (a) 将包含聚羟基烷酸酯的菌体中除聚羟基烷酸酯以外的细胞来源成分进行破坏及可溶化的工序,
- [0130] 上述工序(a)中的聚羟基烷酸酯的体积中值粒径为 $0.5 \sim 5.0 \mu\text{m}$ 。
- [0131] <5>根据<4>所述的制造方法,该方法在上述工序(a)之后进一步包括:
- [0132] (b) 通过离心分离而回收聚羟基烷酸酯水性悬浮液的工序。
- [0133] <6>根据<1> ~ <5>中任一项所述的制造方法,该方法包括:
- [0134] 使上述过滤工序中得到的聚羟基烷酸酯在 $20 \sim 80^\circ\text{C}$ 下进行干燥的工序。
- [0135] <7>根据<6>所述的制造方法,该方法包括:
- [0136] 使上述干燥后的聚羟基烷酸酯再分散于水性溶剂,得到包含体积中值粒径为 $0.5 \sim 5.0 \mu\text{m}$ 的聚羟基烷酸酯的聚羟基烷酸酯水性悬浮液的工序。
- [0137] <8>根据<1> ~ <7>中任一项所述的制造方法,该方法在上述过滤工序之前进一步包括:
- [0138] (c) 以聚羟基烷酸酯水性悬浮液的温度达到 $60 \sim 120^\circ\text{C}$ 的方式进行加热处理的工序。
- [0139] <9>根据<8>所述的制造方法,其中,
- [0140] 过滤时的聚羟基烷酸酯水性悬浮液的温度为比上述加热处理工序后的聚羟基烷酸酯水性悬浮液的温度低 5°C 以上的温度。
- [0141] <10>根据<5>所述的制造方法,该方法包括:
- [0142] 将上述工序(b)中得到的聚羟基烷酸酯水性悬浮液调整为 $\text{pH}2.5 \sim 5.5$ 的工序。
- [0143] <11>一种聚羟基烷酸酯凝聚块,其费雷特直径为 $1 \sim 100 \text{mm}$,且含水率为 $25.0 \sim 50.0\%$ (W.B.)。
- [0144] 实施例
- [0145] 以下,基于实施例对本发明更详细地进行说明,但本发明并不限于这些实施例。需要说明的是,在实施例中,使用了“P3HB3HH”作为“PHA”,实施例中记载的“PHA”也可以表述为“P3HB3HH”。
- [0146] (测定方法)
- [0147] 通过以下的方法进行了实施例及比较例中的测定。

[0148] (通气量)

[0149] 通气量通过JISL1096中记载的方法进行测定。具体而言,使用弗雷泽型通气性试验机(Permeameter P2东洋精机制作所株式会社制)调节空气的吸入量,使得倾斜型气压计显示125Pa,测定了此时的空气流量。

[0150] (PHA表面附着蛋白质的量)

[0151] PHA表面附着蛋白质的量使用BCA Protein Assay Kit(Thermo Fisher Scientific公司制)进行了测定。具体而言,将即将进行工序(c')之前的PHA水性悬浮液20~50mg(液体中含有约10mg的P3HB3HH粒子的量)投入15mL的Falcon管,添加了上述试剂盒的试剂2mL之后,以60℃振荡30分钟。在振荡结束30分钟后,冷却至25℃,测定了波长562nm的吸光度。

[0152] (固体成分浓度)

[0153] 使用加热干燥式水分计ML-50(株式会社A&D制)对灭活后的包含PHA的培养液及pH调整后的PHA水性悬浮液的固体成分浓度进行了测定。将上述培养液在130℃下加热,加热至重量变化速度低于0.05%/分,根据加热前后的重量变化计算出固体成分浓度。

[0154] (液体密度)

[0155] 将即将进行过滤工序之前的PHA水性悬浮液加热至过滤时温度,在预先测定了重量的20mL塑料注射器(Terumo公司制)中抽吸20mL的量。接着,测定塑料注射器和20mL的水性悬浮液的重量,减去20mL塑料注射器的重量,并将所得重量(g)除以液体的体积(20mL),由此计算出过滤时温度下的液体密度。

[0156] (加热处理温度)

[0157] 对于加热处理温度而言,在用搅拌桨等使PHA水性悬浮液为流动状态的状态下,测定了距热源最远的PHA水性悬浮液的温度。例如,在从容器的外侧进行加热的情况下,测定容器的中心,在将蒸气直接投入容器的中心的情况下,测定了容器壁面温度。温度的测定使用K热电偶(AD5601A AND公司制)进行了测定。

[0158] (过滤时温度)

[0159] 对于过滤时的温度而言,使用K热电偶(AD5601A AND公司制)测定了将PHA水性悬浮液即将投入过滤器之前的温度。

[0160] (工序(c')中的PHA水性悬浮液的pH)

[0161] 使用pH计(9652-10D HORIBA公司制)进行了测定。在用搅拌桨等使PHA水性悬浮液为流动状态的状态下,pH的测定位置设为距酸的添加位置最远的PHA水性悬浮液的位置。例如,在从容器的壁面添加酸的情况下,测定了容器的中心的pH。

[0162] (抽滤的滤液透过速度)

[0163] 将滤布设置于内径47mm的过滤器(kst-47Advantec公司制),在取下了过滤器的上盖的状态下安装于抽吸钟(2L SHIBATA公司制)。以全部滤液进入量筒内的方式将玻璃制的50mL量筒设置于抽吸钟内。一边用真空泵抽吸至-76kPa,一边将PHA水性悬浮液投入过滤器,从而进行了过滤。用摄像机拍摄了滤液落下的情况。根据从排出5mL滤液至排出25mL滤液所需要的时间(hr)和过滤器的截面积(m^2),通过减去差值($25-5=20mL$)的滤液的量(L),计算出滤液透过速度($L/m^2/hr$)。本说明书中的抽滤时的过滤器的截面积以直径47mm的圆的面积的形式计算。

[0164] (加压过滤的滤液透过速度)

[0165] 通过隔膜泵以达到0.2MPa的方式送液PHA水性悬浮液2.0kg,通过过滤面积0.05m²的加压过滤机(YT0型过滤器压机、藪田机械株式会社制)进行了过滤。根据滤液排出100mL的时间至排出1000mL的时间所需要的时间,计算出滤液透过速度(L/m²/hr)。

[0166] (泄漏率)

[0167] 测定了通过过滤工序得到的滤液的重量。使用分光光度计(Jasco V-770日本分光株式会社制)测定滤液的吸光度,测定了波长600nm的吸光度。通过使用由固体成分浓度已知的PHA水性悬浮液制成的校准曲线,计算出滤液中的PHA浓度。根据滤液中的PHA浓度和滤液重量(g),通过用固体成分重量(g)除以过滤工序前的PHA水性悬浮液的固体成分重量(g),计算出泄漏率(%)。

[0168] (PHA凝聚块的含水率)

[0169] 使用加热干燥式水分计ML-50(株式会社A&D制)测定了过滤后得到的PHA凝聚块。将PHA凝聚块以105℃加热,加热至重量变化速度小于0.05%(W.B.)/分,根据加热前后的重量变化计算出PHA凝聚块的含水率。

[0170] (体积中值粒径)

[0171] 使用HORIBA公司制激光衍射/散射式粒径分布测定装置LA-950测定了PHA的体积中值粒径。

[0172] (费雷特直径)

[0173] 取得10个PHA凝聚块的图像(图1),用ImageJ(ver1.50)进行分析,对10个PHA凝聚块求出各自的费雷特直径,将10个各自的费雷特直径的算术平均作为费雷特直径。

[0174] (实施例1)

[0175] (菌体培养液的制备)

[0176] 将国际公开第W02019/142717号中记载的富养罗尔斯通氏菌按照该文献的第(0041)~(0048)段所记载的方法进行培养,得到了包含含有PHA的菌体的菌体培养液。需要说明的是,目前,富养罗尔斯通氏菌被分类为杀虫贪铜菌。

[0177] (灭活)

[0178] 通过将上述得到的菌体培养液以内温60~70℃加热并搅拌处理7小时,进行灭菌处理,得到了灭活培养液。

[0179] (粘度降低处理)

[0180] 对于上述得到的灭活培养液,以达到1重量%的方式添加35重量%过氧化氢(FUJIFILM Wako Pure Chemical公司制)。接着,添加30%氢氧化钠水溶液,将pH调整为11.0。通过一边在60℃下保持溶液,一边持续添加30%氢氧化钠水溶液,以11.0将pH保持180分钟,得到了PHA水性悬浮液。

[0181] (酶处理)

[0182] 对于上述得到的PHA水性悬浮液,添加95%硫酸将pH调整为7.0±0.2。对添加了硫酸的PHA水性悬浮液的固体成分浓度进行测定,结果为30重量%。在添加硫酸后,以液中浓度为10ppm的方式添加分解细胞壁中的糖链(肽聚糖)的酶、即溶菌酶(FUJIFILM Wako Pure Chemical公司制),在50℃下保持了2小时。然后,以液中浓度为300ppm的方式添加作为蛋白质分解酶的碱性蛋白酶2.5L(Novozyme公司制),接着,在50℃下添加30%氢氧化钠调整为

pH8.5,并且保持了2小时。

[0183] (碱处理)

[0184] 对于上述酶处理液,以达到0.3重量%的方式添加十二烷基硫酸钠(SDS、花王制)。然后,使用氢氧化钠水溶液调整pH为 11.0 ± 0.2 。接着,将上述酶处理液进行离心分离(4000G、10分钟)之后,去除上清,得到了2倍浓缩的PHA水性悬浮液。在上述浓缩PHA水性悬浮液中添加与去除的上清等量的氢氧化钠,再次进行离心分离(4000G、10分钟),并去除上清,重复4次上述操作。得到的PHA水性悬浮液中的PHA表面附着蛋白质的量为1000ppm。PHA的体积中值粒径为 $2.2\mu\text{m}$ 。

[0185] (pH调整)

[0186] 将上述得到的PHA水性悬浮液中的固体成分浓度调整为25重量%,在 60°C 下保持。接着,添加10%硫酸,将pH调整为3.0。液体密度为 1.00g/mL 。

[0187] (过滤)

[0188] 将上述PHA水性悬浮液放入 63°C 的水浴,以液温达到 60°C 的方式进行加热,进行了抽滤。使用了通气量 $0.5\text{cc}/\text{cm}^2/\text{sec}$ 的滤布(T7104C荻田机械株式会社制),结果是滤液透过速度为 $1010\text{L}/\text{m}^2/\text{hr}$,粒子泄漏率为0.2%。得到的PHA凝聚块的含水率为40.3%(W.B.)。另外,PHA凝聚块的费用直径为18mm。

[0189] (实施例2)

[0190] 以液体中浓度达到200ppm的方式添加酶处理中作为蛋白质分解酶的碱性蛋白酶2.5L(Novozyme公司制),除此以外,通过与实施例1相同的方法得到了pH3.0的PHA水性悬浮液。PHA表面附着蛋白质的量为1500ppm,液体密度为 0.95g/mL 。PHA的体积中值粒径为 $2.3\mu\text{m}$ 。通过与实施例1相同的方法实施了过滤,结果是滤液透过速度为 $580\text{L}/\text{m}^2/\text{hr}$,泄漏率为1.0%。得到的PHA凝聚块的含水率为38.9%(W.B.)。另外,PHA凝聚块的费用直径为25mm。

[0191] (比较例1)

[0192] 以液中浓度达到100ppm的方式添加酶处理中作为蛋白质分解酶的碱性蛋白酶2.5L(Novozyme公司制),除此以外,通过与实施例1相同的方法得到了pH3.0的PHA水性悬浮液。PHA表面附着蛋白质的量为2500ppm,液体密度为 0.95g/mL 。PHA的体积中值粒径为 $2.5\mu\text{m}$ 。通过与实施例1相同的方法实施了过滤,结果是滤液透过速度为 $2500\text{L}/\text{m}^2/\text{hr}$,泄漏率为10.2%。得到的PHA凝聚块的含水率为40.8%(W.B.)。另外,PHA凝聚块的费用直径为38mm。

[0193]

[表1]

	通气量 [cc/cm ² /sec]	PHA表面附着 蛋白质的量 [ppm]	液体密度 [g/mL]	过滤时温度 [°C]	pH [-]	滤液透过速度 [L/m ² /hr]	泄漏率 [%]	PHA凝聚块 含水率 [% (W. B.)]
实施例1	0.5	1000	1.00	60	3.0	1010	0.2	40.3
实施例2	0.5	1500	0.95	60	3.0	580	1.0	38.9
比较例1	0.5	2500	0.95	60	3.0	2500	10.2	40.8

[0194] 根据表1可知,PHA表面附着蛋白质的量越高,粒子泄漏率越高。

[0195] (实施例3)

[0196] 在pH调整工序中将pH调整为3.0之后,将PHA水性悬浮液加入容器,用手进行振动以使其含有空气,除此以外,通过与实施例1相同的方法得到了pH3.0的PHA水性悬浮液。PHA表面附着蛋白质的量为1000ppm,液体密度为0.7g/mL。PHA的体积中值粒径为2.2 μ m。通过与实施例1相同的方法实施了过滤,结果是滤液透过速度为450L/m²/hr,泄漏率为0.2%。得到的PHA凝聚块的含水率为36.8% (W.B.)。另外,PHA凝聚块的费用直径为25mm。

[0197] (比较例2)

[0198] 在pH调整工序中实施强力搅拌,将液体密度设为0.40g/mL,除此以外,通过与实施例1相同的方法实施了过滤。滤液透过速度为150L/m²/hr,泄漏率为3.2%。得到的PHA凝聚块的含水率为35.4% (W.B.)。另外,PHA凝聚块的费用直径为34mm。

[0199]

[表2]

	通气量 [cc/cm ² /sec]	PHA表面附着 蛋白质的量 [ppm]	液体密度 [g/mL]	过滤时温度 [°C]	pH [-]	滤液透过速度 [L/m ² /hr]	泄漏率 [%]	PHA凝聚块 含水率 [% (W.B.)]
实施例1	0.5	1000	1.00	60	3.0	1010	0.2	40.3
实施例3	0.5	1000	0.70	60	3.0	450	0.2	36.8
比较例2	0.5	1000	0.40	60	3.0	150	3.2	35.4

[0200] 根据表2可知,液体密度越高,滤液透过速度越上升,含水率越高。

[0201] (比较例3)

[0202] 在pH调整工序中将pH调整为6.0,除此以外,通过与实施例1相同的方法实施了过滤。过滤透过速度为11800L/m²/h,泄漏率为99%,未能得到PHA凝聚块。

[0203] (比较例4)

[0204] 在pH调整工序中将pH调整为2.0,除此以外,通过与实施例1相同的方法实施了过滤。滤液透过速度为9800L/m²/hr,泄漏率为95%,未能得到PHA凝聚块。

[0205]

[表3]

	通气量 [cc/cm ² /sec]	PHA表面附着 蛋白质的量 [ppm]	液体密度 [g/mL]	过滤时温度 [°C]	pH [-]	滤液透过速度 [L/m ² /hr]	泄漏率 [%]	PHA凝聚块 含水率 [% (W.B.)]
实施例1	0.5	1000	1.00	60	3.0	1010	0.2	40.3
实施例3	0.5	1000	1.00	60	6.0	11800	99.0	-
比较例4	0.5	1000	1.00	60	2.0	9800	95.0	-

[0206] 根据表3可知,泄漏率随pH而变化,pH低时适于PHA凝聚块回收。

[0207] (实施例4)

[0208] 在过滤工序中使用了通气量2.0cc/cm²/sec的滤布(T7302C荻田机械株式会社制),除此以外,通过与实施例1相同的方法得到了pH3.0的PHA水性悬浮液。PHA表面附着蛋白质的量为1000ppm,液体密度为1.00g/mL。PHA的体积中值粒径为2.2μm。通过与实施例1相同的方法实施了过滤,结果是过滤透过速度为1210L/m²/hr,泄漏率为0.2%。得到的PHA凝聚块的含水率为42.3% (W.B.)。另外,PHA凝聚块的费用直径为17mm。

[0209] (比较例5)

[0210] 在过滤时使用通气量12.0cc/cm²/sec的滤布(PP26F中尾过滤器制),除此以外,通过与实施例1相同的方法实施了过滤。过滤透过速度为9440L/m²/h,泄漏率为73.0%。得到的PHA凝聚块的含水率为47.0% (W.B.)。另外,PHA凝聚块的费用直径为11mm。

[0211]

表4]	通气量 [cc/cm ² /sec]	PHA表面附着 蛋白质的量 [ppm]	液体密度 [g/mL]	过滤时温度 [°C]	pH [-]	滤液透过速度 [L/m ² /hr]	泄漏率 [%]	PHA凝聚块 含水率 [% (W. B.)]
实施例1	0.5	1000	1.00	60	3.0	1010	0.2	40.3
实施例4	2.0	1000	1.00	60	3.0	1210	3.6	42.3
比较例5	12.0	1000	1.00	60	3.0	9440	73.0	47.0

[0212] 根据表4可知,在使用通气量高的滤材时,虽然滤液透过速度上升,但泄漏率也上升。

[0213] (实施例5)

[0214] 在过滤工序中于78°C的水浴中加热至内温达到75°C,除此以外,通过与实施例1相同的方法得到了pH3.0的PHA水性悬浮液。PHA表面附着蛋白质的量为1000ppm,液体密度为1.00g/mL。PHA的体积中值粒径为2.2 μ m。通过与实施例1相同的方法实施了过滤,结果是滤液透过速度为1580L/m²/hr,泄漏率为0.3%。得到的PHA凝聚块的含水率为42.5% (W. B.)。另外,PHA凝聚块的费用直径为18mm。

[0215] (实施例6)

[0216] 在过滤工序中于28°C的水浴中冷却至内温达到25°C,除此以外,通过与实施例1相同的方法得到了pH3.0的PHA水性悬浮液。PHA表面附着蛋白质的量为1000ppm,液体密度为1.00g/mL。PHA的体积中值粒径为2.2 μ m。通过与实施例1相同的方法实施了过滤,结果是滤

液透过速度为 $450\text{L}/\text{m}^2/\text{hr}$, 泄漏率为 0.1% 。得到的PHA凝聚块的含水率为 44.8% (W.B.)。另外, PHA凝聚块的费用直径为 26mm 。

[0217]

[表5]

	通气量 [cc/cm ² /sec]	PHA表面附着 蛋白质的量 [ppm]	液体密度 [g/mL]	过滤时温度 [°C]	pH [—]	滤液透过速度 [L/m ² /hr]	泄漏率 [%]	PHA凝聚块 含水率 [% (W.B.)]
实施例1	0.5	1000	1.00	60	3.0	1010	0.2	40.3
实施例5	0.5	1000	1.00	75	3.0	1580	0.3	42.5
实施例6	0.5	1000	1.00	25	3.0	450	0.1	44.8

[0218] 根据表5可知, PHA水性悬浮液的温度会影响滤液透过速度, 温度越高, 滤液透过速度越上升。

[0219] (实施例7)

[0220] 在过滤工序之前将pH调整工序后的液体在 125°C 的油浴中加热至内温达到 75°C , 然后, 用 63°C 的水浴冷却至内温达到 60°C , 除此以外, 通过与实施例1相同的方法得到了pH3.0的PHA水性悬浮液。PHA表面附着蛋白质的量为 1000ppm , 液体密度为 $1.00\text{g}/\text{mL}$ 。PHA的体积中值粒径为 $2.2\mu\text{m}$ 。通过与实施例1相同的方法实施了过滤, 结果是滤液透过速度为 $1220\text{L}/\text{m}^2/\text{hr}$, 泄漏率为 0.2% 。得到的PHA凝聚块的含水率为 42.2% (W.B.)。另外, PHA凝聚块的费用直径为 28mm 。

[0221] (实施例8)

[0222] 在过滤工序之前将pH调整工序后的液体在 125°C 的油浴中加热至内温达到 90°C ,

然后,用63℃的水浴冷却至内温达到60℃,除此以外,通过与实施例1相同的方法得到了pH3.0的PHA水性悬浮液。PHA表面附着蛋白质的量为1000ppm,液体密度为1.00g/mL。PHA的体积中值粒径为2.2 μ m。通过与实施例1相同的方法实施了过滤,结果是滤液透过速度为1320L/m²/hr,泄漏率为0.1%。得到的PHA凝聚块的含水率为44.0%(W.B.)。另外,PHA凝聚块的费用直径为21mm。

[0223] (实施例9)

[0224] 在pH调整工序中,将PHA水性悬浮液中的固体成分浓度调整为28重量%,在过滤工序之前将pH调整后的液体加入耐压釜,投入0.3MPaG的蒸气,升温至液温达到110℃,然后,用63℃的水浴冷却至内温达到60℃,以PHA水性悬浮液中的浓度为25重量%的方式添加蒸馏水,除此以外,通过与实施例1相同的方法得到了pH3.0的PHA水性悬浮液。PHA表面附着蛋白质的量为1000ppm,液体密度为1.00g/mL。PHA的体积中值粒径为2.2 μ m。通过与实施例1相同的方法实施了过滤,结果是滤液透过速度为2840L/m²/hr,泄漏率为0.0%。得到的PHA凝聚块的含水率为44.9%(W.B.)。另外,PHA凝聚块的费用直径为15mm。

[0225]

[表6]

	通气量 [cc/cm ² /sec]	PHA表面附着 蛋白质的量 [ppm]	液体密度 [g/mL]	加热处理温度 [°C]	过滤时温度 [°C]	pH [-]	滤液透过速度 [L/m ² /hr]	泄漏率 [%]	PHA凝聚块 含水率 [%(W.B.)]
实施例1	0.5	1000	1.00	无	60	3.0	1010	0.2	40.3
实施例7	0.5	1000	1.00	75	60	3.0	1220	0.2	42.2
实施例8	0.5	1000	1.00	90	60	3.0	1320	0.1	44.0
实施例9	0.5	1000	1.00	110	60	3.0	2840	0.0	44.9

[0226] 根据表6可知,将PHA水性悬浮液暂时加热至高温时,滤液透过速度上升,加热温度越高,该速度越上升。

[0227] (实施例10)

[0228] 进行与实施例1同样的操作直至pH调整工序。使用通气量0.5cc/cm²/秒的滤布(T7104C蕪田机械株式会社制)通过加压过滤机(YT0型过滤器压机、蕪田机械株式会社制)进行了加压过滤。通过上述的方法对滤液透过速度进行计算,结果为1500L/m²/hr。进一步以0.5MPa压力进行压榨脱水,得到的PHA凝聚块的含水率为31.9%(W.B.)。得到的全部滤液的泄漏率为2.6%。不论过滤方式如何,均能够实施过滤。另外,PHA凝聚块的费用直径为20mm。

[0229] (实施例11)

[0230] (干燥)

[0231] 将实施例1中得到的PHA凝聚块放入干燥机(EYELA公司制、WFO-700),在60℃下干燥24小时。使干燥后的PHA凝聚块再分散于水中,将固体成分浓度调整为15重量%。使用1% NaOH水溶液及1% H₂SO₄水溶液将pH调整为7~9之间,进行搅拌,制备了PHA水性悬浮液。在30分钟搅拌后测定PHA水性悬浮液中的PHA粒子的粒径,结果是体积中值粒径为2.8μm。

[0232] (总结)

[0233] 由以上可知,根据本制造方法,PHA表面附着蛋白质的量、液体密度、PHA水性悬浮液的pH、滤材的通气量、以及PHA水性悬浮液的温度会影响过滤时的滤液透过速度及泄漏率。即,通过至少控制PHA表面附着蛋白质的量、液体密度、PHA水性悬浮液的pH、以及滤材的通气量,对于PHA而言,能够高效地进行过滤。另外可以明确,根据本制造方法,不论过滤方法如何,均能够进行PHA的过滤。

[0234] 工业实用性

[0235] 本制造方法能够以简便的操作制造PHA,因此可以在PHA的制造中有利地使用。另外,通过本制造方法得到的PHA可以优选用于农业、渔业、林业、园艺、医学、卫生用品、衣料、非衣料、包装、汽车、建材、其它领域。

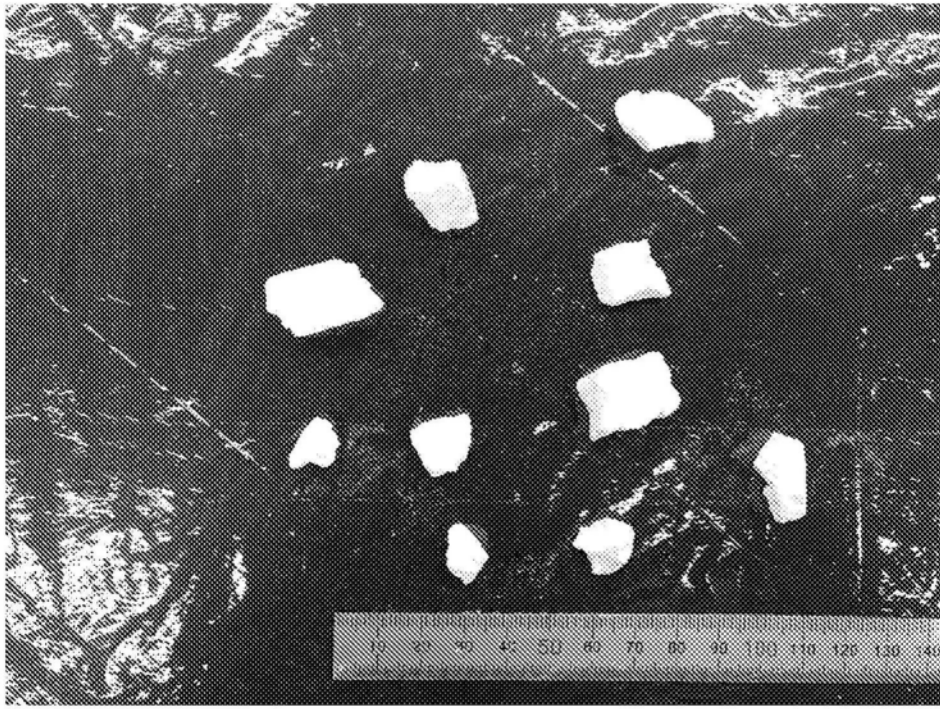


图1