



(10) 申请公布号 CN 116547339 A

(43) 申请公布日 2023.08.04

(21) 申请号 202180076760.9

(22) 申请日 2021.10.06

(30) 优先权数据

2020-194506 2020.11.24 JP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2023.05.15

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2021/036938 2021.10.06

(87) PCT国际申请的公布数据

W02022/113530 JA 2022.06.02

(71) 申请人 株式会社钟化

地址 日本大阪府

(72) 发明人 广田翔悟 西中智哉

(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.

C08G 63/89 (2006.01)

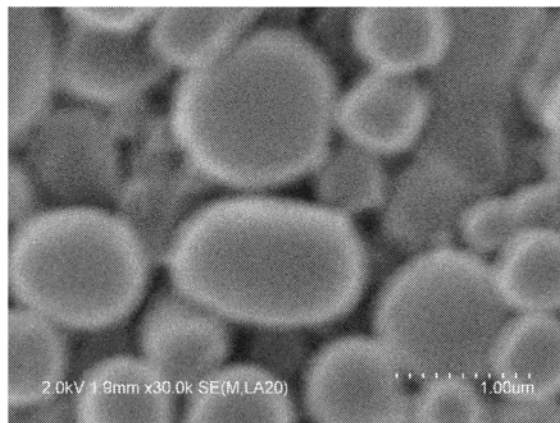
权利要求书1页 说明书22页 附图3页

(54) 发明名称

聚(3-羟基烷酸酯)的制造方法

(57) 摘要

本发明的课题在于由包含P3HA的菌体提供高收率且减少了杂质(特别是残留蛋白质)的P3HA。本发明通过如下的重均分子量为10万~70万的P3HA的制造方法来解决上述课题,该方法包括:(a)将包含含有P3HA的菌体的培养液的pH调整为8.0~12.0的工序、(b)在上述培养液中添加酶进行酶处理的工序、以及(c)将上述培养液的pH再次调整为10.0~12.0的工序。



1. 一种聚(3-羟基烷酸酯)的制造方法,其是重均分子量为10万~70万的聚(3-羟基烷酸酯)的制造方法,该方法包括:

(a) 在包含含有聚(3-羟基烷酸酯)的菌体的培养液中添加碱水溶液,将pH调整为8.0~12.0的工序;

(b) 在通过所述工序(a)得到的培养液中添加酶,对所述菌体进行酶处理的工序;以及

(c) 在通过所述工序(b)得到的培养液中添加碱水溶液,将pH调整为10.0~12.0的工序。

2. 根据权利要求1所述的聚(3-羟基烷酸酯)的制造方法,其中,

所述工序(b)中的酶处理包括依次进行碱性蛋白分解酶处理、溶菌酶处理、及碱性蛋白分解酶处理。

3. 根据权利要求1或2所述的制造方法,该方法在所述工序(a)与(b)之间进一步包括:

(a') 将通过所述工序(a)得到的培养液的pH调整为6.0~8.0的工序,

所述工序(b)中的酶处理包括依次进行溶菌酶处理及碱性蛋白分解酶处理。

4. 根据权利要求1~3中任一项所述的聚(3-羟基烷酸酯)的制造方法,其中,

所述工序(b)中的酶为溶菌酶及碱性蛋白酶。

5. 根据权利要求1~4中任一项所述的聚(3-羟基烷酸酯)的制造方法,该方法在所述工序(c)之后进一步包括:

(c') 在通过所述工序(c)得到的培养液中添加表面活性剂的工序。

6. 根据权利要求1~5中任一项所述的聚(3-羟基烷酸酯)的制造方法,其中,所述工序(a)的反应时间为4小时~30小时。

7. 根据权利要求1~6中任一项所述的聚(3-羟基烷酸酯)的制造方法,其中,

所述聚(3-羟基烷酸酯)为聚(3-羟基丁酸酯-共聚-3-羟基己酸酯)。

8. 一种聚(3-羟基烷酸酯)粉体,其重均分子量为10万~60万,残留蛋白质量为2000ppm以下,粒子表面为非多孔质,且所述聚(3-羟基烷酸酯)粉体的以下式(1)表示的重均分子量保持率为50%以上,

重均分子量保持率(%) = (在160℃下加热20分钟后的P3HA的重均分子量/在160℃下加热20分钟前的P3HA的重均分子量) × 100

• • • (1)。

9. 根据权利要求8所述的聚(3-羟基烷酸酯)粉体,其重均分子量(Mw)与数均分子量(Mn)之比(Mw/Mn)为1.0~3.1。

聚(3-羟基烷酸酯)的制造方法

技术领域

[0001] 本发明涉及聚(3-羟基烷酸酯)的制造方法。

背景技术

[0002] 近年来,废弃塑料所导致的环境问题备受关注。其中,废弃塑料所导致的海洋污染严重,期待着在自然环境下分解的生物降解性塑料的普及。

[0003] 作为这样的生物降解性塑料,已知各种塑料,其中,聚(3-羟基烷酸酯)(以下有时称为“P3HA”)是在多种微生物种的细胞内作为储能物质而生产、蓄积的热塑性聚酯,是不仅在土中、在海水中也可以进行生物降解的材料,因此,作为解决上述问题的原材料而备受瞩目。

[0004] 作为制造P3HA的方法,例如,专利文献1中记载了在对包含P3HA的菌体进行了酶处理之后用碱水溶液进行处理的方法。另外,专利文献2中记载了用碱水溶液对包含P3HA的菌体进行处理的方法。

[0005] 现有技术文献

[0006] 专利文献

[0007] 专利文献1:日本公开专利公报2012-115145号

[0008] 专利文献2:中国专利申请公开第111019108号说明书

发明内容

[0009] 发明要解决的课题

[0010] 但是,虽然现有的技术优异,但仍然有改进的余地。

[0011] 因此,本发明的目的在于提供从包含P3HA的菌体制造高收率且减少了杂质(特别是残留蛋白质)的P3HA的方法。

[0012] 解决课题的方法

[0013] 本发明人等为了解决上述课题而进行了深入研究,结果首次发现,通过在包含P3HA的菌体粉碎前(酶处理前)及粉碎后(酶处理后),对该菌体进行碱处理进行P3HA的分子量调整,能够得到高收率且减少了杂质(特别是残留蛋白质)的P3HA,从而完成了本发明。

[0014] 因此,本发明的一个方式为一种聚(3-羟基烷酸酯)的制造方法,其是重均分子量为10万~70万的聚(3-羟基烷酸酯)的制造方法,该方法包括:(a)在包含含有聚(3-羟基烷酸酯)的菌体的培养液中添加碱水溶液,将pH调整为8.0~12.0的工序;(b)在通过上述工序(a)得到的培养液中添加酶,对上述菌体进行酶处理的工序;以及(c)在通过上述工序(b)得到的培养液中添加碱水溶液,将pH调整为10.0~12.0的工序。

[0015] 另外,本发明的一个方式为一种聚(3-羟基烷酸酯)粉体,其重均分子量为10万~60万,残留蛋白质量为2000ppm以下,粒子表面为非多孔质,且所述聚(3-羟基烷酸酯)粉体的以下式(1)所表示的重均分子量保持率为50%以上。

[0016] 重均分子量保持率(%) = (在160℃下加热20分钟后的P3HA的重均分子量/在160

℃下加热20分钟前的P3HA的重均分子量) × 100 · · · (1)

[0017] 发明的效果

[0018] 根据本发明的一个方式,可以提供从包含P3HA的菌体制造高收率且减少了杂质(特别是残留蛋白质)的P3HA的方法。

附图说明

[0019] 图1是用电子显微镜(SEM)观察本发明的一个实施方式的实施例1中制造的P3HA粉体的表面的图。

[0020] 图2是用电子显微镜(SEM)观察比较例2中制造的P3HA粉体的表面的图。

[0021] 图3是将实施例及比较例中进行的各操作及顺序总结而成的图。

具体实施方式

[0022] 在本发明的一个实施方式中,以下详细地进行说明。需要说明的是,在本说明书中,只要没有特别说明,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在本说明书中援引作为参考文献。

[0023] (1. 本发明内容)

[0024] 本发明的一个实施方式的聚(3-羟基烷酸酯)的制造方法(以下称为“本制造方法”)是重均分子量为10万~70万的聚(3-羟基烷酸酯)的制造方法,该方法包括:(a)在包含含有聚(3-羟基烷酸酯)的菌体的培养液中添加碱水溶液,将pH调整为8.0~12.0的工序;(b)在通过上述工序(a)得到的培养液中添加酶,对上述菌体进行酶处理的工序;以及(c)在通过上述工序(b)得到的培养液中添加碱水溶液,将pH调整为10.0~12.0的工序。

[0025] 本发明人按照专利文献1中记载的方法尝试了从包含P3HA的菌体进行P3HA的制造,结果发现会发生P3HA的收率降低的问题。特别是发现,在制造低分子量的P3HA时,P3HA的收率变得极差。另外,本发明人按照专利文献2中记载的方法尝试了从包含P3HA的菌体进行P3HA的制造,结果发现在得到的P3HA中包含大量杂质(特别是残留蛋白质)。如果使用这样的P3HA进行加工,则会在产品中产生异物,发生品质变差的问题。

[0026] 因此,本发明人为了解决上述课题而进行了深入研究,结果首次发现,通过在菌体粉碎前(酶处理前)及粉碎后(酶处理后)对菌体进行碱处理而进行P3HA的分子量调整,能够得到高收率且减少了杂质(特别是残留蛋白质)的P3HA。需要说明的是,在本说明书中,“菌体粉碎后”只要是在后述的工序(b)的酶处理工序之后即可,也包含菌体粉碎时。

[0027] 另外,本发明人首次发现通过上述的制造方法得到的P3HA具有以下特性:

[0028] • 热稳定性优异。

[0029] • 从分子量分布的观点考虑,包含大量同等程度的分子量的P3HA(单分散)。

[0030] • 在制造低分子量的P3HA的情况下,得到的P3HA粉体的表面为非多孔质。

[0031] 如上所述,对于制造高收率且减少了杂质(特别是残留蛋白质)的P3HA的方法,目前尚无报告,本发明人发现的制造方法是极其有用的。另外,以往,如果通过进行多次碱处理而使P3HA的分子量下降过多,则有可能无法发挥出目标的物性,因此,在制造P3HA时仅进行1次碱处理。在这样的情况下,将碱处理的次数设为多次,且同时实现P3HA的高收率和低杂质(低蛋白质),这是令人震惊的。

[0032] 需要说明的是,作为通过本制造方法可得到高收率的P3HA的原因,本发明人推测如下。即,在现有的方法(例如,专利文献1中记载的方法)中,由于在P3HA结晶化之后进行了分子量调整,因此,无法充分地实现P3HA的结晶化部分的分子量调整,其结果是,仅P3HA的末端部被水解,会产生无法回收的小分子。另一方面,在本制造方法中,通过在菌体粉碎前进行分子量调整,无定形状态的P3HA被随机水解。其结果是,可抑制无法回收的小分子的产生,能够实现高收率。

[0033] 另外,作为通过本制造方法可得到减少了杂质(特别是残留蛋白质)的P3HA的原因,本发明人推测如下。即,在现有的方法(例如,专利文献2)所记载的方法中,由于在菌体破碎后立即进行了基于表面活性剂的清洗,因此,来自于菌体的残留蛋白质未被充分去除。另一方面,在本制造方法中,通过在菌体粉碎后进行碱处理,来自于菌体的蛋白质等杂质被分散、溶解,从而能够制造杂质少的P3HA。

[0034] 此外,根据上述的构成,能够抑制由废弃塑料导致的海洋污染,由此,例如,可以对目标12“确保可持续消费和生产模式”、目标14“保护和可持续利用海洋及海洋资源以促进可持续发展”等可持续发展目标(SDGs)的实现做出贡献。

[0035] (2.P3HA的制造方法)

[0036] 本制造方法是包括以下的工序(a)~(c)的重均分子量为10万~70万的聚(3-羟基烷酸酯)的P3HA的制造方法。

[0037] 在本发明的一个实施方式中,本制造方法可以适当包括以下所示的工序(a')、(c')、(d)、(e)、(f)等。

[0038] 需要说明的是,在本说明书中,“分子量”在没有特别说明的情况下是指“重均分子量”。另外,在本说明书中,“低分子量的P3HA”是指重均分子量为30万以下的P3HA。通过本制造方法制造的P3HA优选为低分子量的P3HA。

[0039] <工序(a)>

[0040] 工序(a)是在包含含有P3HA的菌体的培养液中添加碱水溶液(也称为“碱处理”)、并将pH调整为8.0~12.0的工序。即,也可以称为通过将pH调整为8.0~12.0而将P3HA水解来调整P3HA的分子量的工序。根据该工序,在含有P3HA的菌体中,可以在菌体中(换言之,在该P3HA未结晶化(无定形)的状态下)对该P3HA的分子量进行调整。工序(a)也可以称为将包含含有P3HA的菌体的培养液在pH为8.0~12.0的状态下保持一定时间的工序。另外,工序(a)也可以称为分子量调整工序。

[0041] (P3HA)

[0042] 在本说明书中,“P3HA”是指包含以下述式(2)表示的1种以上单元的共聚物的总称。

[0043] $[-O-CHR-CH_2-CO-]$ (2)

[0044] (式中,R为以 C_nH_{2n+1} 表示的烷基,n为1~15的整数)。

[0045] P3HA只要包含于上述的式(2)即可,没有特别限定。

[0046] 在本发明的一个实施方式中,P3HA可以是仅以3-羟基丁酸酯作为重复单元的聚(3-羟基丁酸酯),也可以是3-羟基丁酸酯与其它羟基烷酸酯的共聚物。

[0047] 在本发明的一个实施方式中,P3HA可以为均聚物与1种或2种以上共聚物的混合物,也可以为2种以上共聚物的混合物。共聚的形式没有特别限定,可以为无规共聚、交替共

聚、嵌段共聚、接枝共聚等。

[0048] 在本发明的一个实施方式中,作为P3HA,可以列举例如:聚(3-羟基丁酸酯)(P3HB)、聚(3-羟基丁酸酯-共聚-3-羟基丙酸酯)(P3HB3HP)、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。从能够将熔点调节得低、可以扩展加工范围的观点考虑,优选为P3HB3HH、P3HB4HB、P3HB3HP。其中,从工业上容易生产的观点考虑,优选为P3HB、P3HB3HV,特别优选为P3HB3HH、P3HB4HB。

[0049] 在本发明的一个实施方式中,P3HA的共聚成分的组成比优选为(3-羟基丁酸酯)/(3-羟基己酸酯)=99.9/0.1~80.0/20.0(mol/mol),更优选为99.9/0.1~83.0/17.0(mol/mol),进一步优选为99.9/0.1~85.0/15.0(mol/mol)。P3HA的共聚成分的组成比为上述范围内时,可以提供加工性优异的P3HA。

[0050] 在本发明的一个实施方式中,分子量调整前(即,添加碱水溶液之前)的P3HA的重均分子量(以下也称为“初期分子量”)没有特别限定,例如为300万以下,优选为280万以下,更优选为250万以下。P3HA的初期分子量为300万以下时,能够以较短的时间进行分子量调整,具有生产性优异的优点。P3HA的初期分子量的下限没有特别限定,例如,可以为40万以上。P3HA的初期分子量可通过实施例中记载的方法测定。

[0051] (含有P3HA的菌体)

[0052] 在本说明书中,“含有P3HA的菌体”是指生产P3HA的微生物。即,在本发明的一个实施方式中,P3HA由微生物产生。本制造方法中使用的微生物只要是能够在细胞内生成P3HA的微生物即可,没有特别限定。例如,可以使用保藏于天然分离出的微生物、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、转化体等。更具体可以列举例如:贪铜菌(*Cupriavidus*)属、产碱菌(*Alcaligenes*)属、罗尔斯通氏菌(*Ralstonia*)属、假单胞菌(*Pseudomonas*)属、芽孢杆菌(*Bacillus*)属、固氮菌(*Azotobacter*)属、诺卡氏菌(*Nocardia*)属、气单胞菌(*Aeromonas*)属的菌等。其中,特别优选为属于气单胞菌属、产碱菌属、罗尔斯通氏菌属、或贪铜菌属的微生物。特别是更优选为解脂产碱菌(*A. lipolytica*)、广泛产碱菌(*A. latus*)、豚鼠气单胞菌(*A. caviae*)、嗜水气单胞菌(*A. hydrophila*)、杀虫贪铜菌(*C. necator*)等菌株,最优选为杀虫贪铜菌。

[0053] 另外,在微生物原本不具有P3HA的生产能力的情况、或在P3HA的生产量低的情况下,也可以使用向该微生物中导入目标P3HA的合成酶基因和/或导入其突变体而得到的转化体。作为这样的转化体的制备所使用的P3HA的合成酶基因,没有特别限定,优选为豚鼠气单胞菌来源的P3HA合成酶的基因。通过在适当的条件下培养这些微生物,能够得到在菌体内蓄积有P3HA的微生物菌体。该微生物菌体的培养方法没有特别限定,例如可以使用日本特开平05-93049号公报等中记载的方法。

[0054] 在工序(a)中,含有P3HA的菌体优选已被灭活。灭活的方法没有特别限定,例如,可以举出将包含含有P3HA的菌体的培养液在70℃~80℃下加热及搅拌处理8小时的方法。

[0055] (碱水溶液)

[0056] 在本发明的一个实施方式中,碱水溶液为包含碱性化合物的水溶液。作为碱水溶液中包含的碱性化合物,没有特别限定,可以列举例如:氢氧化钠、氢氧化钾等碱金属或碱土金属的氢氧化物;碳酸钠、碳酸钾等金属碳酸盐;磷酸钠、磷酸钾、磷酸氢钠、磷酸氢钾等金属磷酸盐或金属磷酸氢盐等。

[0057] 在本发明的一个实施方式中,碱水溶液中包含的碱性化合物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。

[0058] 在工序(a)中,优选通过添加碱水溶液而将pH调整为8.0~12.0,更优选将pH调整为8.2~11.5,进一步优选将pH调整为8.4~11.5。通过将pH调整为8.0以上、且将pH保持为一定值(pH8.0~12.0的一定值),能够适宜地调整菌体中的P3HA的分子量。另外,通过将pH调整为12.0以下,能够防止意外的菌体损伤。工序(a)中的反应时间(换言之,将pH调整为8.0~12.0并保持的时间)例如为4小时~30小时,优选为8小时~20小时。工序(a)中的反应时间为上述的范围内时,能够将菌体中的P3HA的分子量调整为适宜的范围,并且可以防止P3HA的过度低分子量化。

[0059] 工序(a)中的温度优选低于100℃,更优选低于80℃。下限没有特别限定,例如优选为50℃以上。

[0060] 在本制造方法中,P3HA的收率基于以下的式(3)及(4)计算:

[0061] $P3HA \text{ 含量 (g/g)} = (\text{干燥物的重量 (g)} / \text{培养液的重量 (g)}) \cdot \cdot \cdot (3)$

[0062] $P3HA \text{ 的收率 (\%)} = (\text{分子量调整后的培养液的P3HA含量} / \text{分子量调整前的培养液的P3HA含量}) \times 100 \times (\text{分子量调整前的培养液的固体成分浓度 (\%)} / \text{分子量调整后的培养液的固体成分浓度 (\%)}) \cdot \cdot \cdot (4)$

[0063] 上述式(3)及(4)中的各种参数可通过实施例记载的方法测定。

[0064] 本制造方法至少包括2次分子量调整工序(碱处理工序)。式(4)中的“分子量调整前的培养液的P3HA含量”是指进行最初的分子量调整之前的培养液的P3HA含量,“分子量调整后的培养液的P3HA含量”是指进行最后的分子量调整之后的培养液的P3HA含量。需要说明的是,在本说明书中,“分子量调整前的培养液的P3HA含量”及“分子量调整后的培养液的P3HA含量”是通过实施例记载的方法而测得的值。

[0065] 在本发明的一个实施方式中,上述P3HA的收率为95%以上,从生产性的观点考虑,优选为95.3%以上,更优选为95.5%以上。上述P3HA的收率越高越好,上限没有特别限定,例如为99%,优选为99.5%,最优选为100%。

[0066] <工序(b)>

[0067] 工序(b)是在通过上述工序(a)得到的培养液中添加酶,对上述菌体进行酶处理的工序。根据该工序,通过将来自于上述菌体的杂质(细胞壁、蛋白质等)破坏并去除,可以从上述菌体中高效率地回收P3HA。

[0068] 在本发明的一个实施方式中,工序(b)的酶处理可以为碱性蛋白分解酶处理和/或溶菌酶处理。碱性蛋白分解酶处理及溶菌酶处理优选至少各进行1次,也可以根据需要进行2次以上的碱性蛋白分解酶处理和/或溶菌酶处理。

[0069] 在本发明的一个实施方式中,进行碱性蛋白分解酶处理和/或溶菌酶处理的顺序没有特别限定。

[0070] 在本发明的一个实施方式中,对于工序(b)的酶处理而言,优选依次进行碱性蛋白分解酶处理、溶菌酶处理、以及碱性蛋白分解酶处理。通过按照上述顺序进行工序(b)的酶处理,本制造方法不需要为了调整培养液的pH而使用硫酸等。即,可以不使用作为装置腐蚀性液体的硫酸等而制造P3HA。作为优选上述顺序的理由,本发明人推测如下:通过最初的碱性蛋白分解酶处理,培养液中的pH降低至中性附近,结果是不需要为了调整pH而添加硫酸等。

[0071] 在工序(b)中,在进行酶处理(例如,碱性蛋白分解酶处理及溶菌酶处理)时,优选根据待使用的酶的最适pH及最适温度相应地调整上述培养液的pH及温度。上述培养液的pH及温度的调整方法没有特别限定,可以使用公知的方法。

[0072] (碱性蛋白分解酶处理)

[0073] 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。

[0074] 另外,在本说明书中,“碱性蛋白分解酶处理”是指将上述碱性蛋白分解酶添加于上述培养液对菌体进行酶处理的工序。

[0075] 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。从经济上有利的观点考虑,优选为丝氨酸特异性蛋白质分解酶,尤其优选为枯草杆菌蛋白酶(例如,碱性蛋白酶(alcalase))。可以单独使用它们中的1种,也可以组合使用2种以上。

[0076] 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。

[0077] 在本发明的一个实施方式中,碱性蛋白分解酶的最适pH只要使该碱性蛋白分解酶在碱性环境下具有活性即可,没有特别限定,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。

[0078] 在本发明的一个实施方式中,碱性蛋白分解酶的最适温度没有特别限定,从不需要过度加热、可防止P3HA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。最适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。

[0079] (溶菌酶处理)

[0080] 在本发明的一个实施方式中,碱性蛋白分解酶处理是指将溶菌酶添加于上述培养液对上述菌体进行酶处理的工序。

[0081] 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。

[0082] 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。可以单独使用它们中的1种,也可以组合使用2种以上。

[0083] 作为溶菌酶,可以使用市售品,可以列举例如:FUJIFILM Wako Pure Chemical公司制“Lysozyme”、“Achromopeptidase”等。

[0084] 在本发明的一个实施方式中,溶菌酶的最适pH只要使该溶菌酶具有细胞壁分解活性即可,没有特别限定,例如为5.0~11.0,优选为6.0~9.0,更优选为6.0~8.0。

[0085] 在本发明的一个实施方式中,溶菌酶的最适温度没有特别限定,从不需要过度的加热、能够防止P3HA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。最适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。

[0086] 在本发明的一个实施方式中,工序(b)的酶处理可以通过溶菌酶及碱性蛋白酶的组合作为进行。

[0087] 工序(b)中的酶处理时间可以根据酶的种类、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。

[0088] <工序(a')>

[0089] 本制造方法可以在工序(a)与(b)之间进一步包括工序(a')。

[0090] 工序(a')是将通过上述工序(a)得到的培养液的pH调整至6.0~8.0的工序,上述工序(b)中的酶处理包括依次进行溶菌酶处理及碱性蛋白分解酶处理。通过实施该工序(a'),可顺利地进行工序(b)的酶处理。

[0091] 在工序(a')中,pH的调整方法没有特别限定,例如,可以举出在培养液中添加酸的方法等。酸没有特别限定,可以为有机酸、无机酸中的任意酸而无论是否具有挥发性。更具体而言,作为酸,例如可以使用硫酸、盐酸、磷酸、乙酸等。

[0092] 对于在工序(a')之后实施的溶菌酶处理及碱性蛋白分解酶处理,援引<工序(b)>一项的记载。

[0093] <工序(c)>

[0094] 工序(c)是在通过工序(b)得到的培养液中添加碱水溶液而将pH调整为10.0~12.0的工序。根据该工序,能够将P3HA的分子量调整得更小,并且在将菌体破碎时将来自于菌体的杂质(核酸、蛋白质等)分散及溶解,由此能够从菌体中分离高纯度的P3HA。工序(c)也可以称为碱清洗工序。

[0095] 对于工序(c)中添加的碱水溶液,援引<工序(a)>一项的记载。

[0096] 在工序(c)中,优选通过添加碱水溶液而将pH调整为10.0~12.0,更优选调整为10.2~11.8,进一步优选调整为10.4~11.6。通过将pH调整为10.0以上,可以将菌体中的P3HA调整为更低的分子量。另外,通过将pH调整为12.0以下,可以防止P3HA的过度低分子量化。

[0097] 工序(c)中的反应时间(换言之,将pH调整为10.0~12.0并保持的时间)例如为1小时~12小时,优选为1小时~6小时。工序(c)中的反应时间为上述的范围内时,能够将菌体中的P3HA的分子量调整为适宜的范围,并且可以防止P3HA的过度低分子量化。

[0098] <工序(c')>

[0099] 本制造方法可以在工序(c)之后进一步包括工序(c')。工序(c')也可以称为表面活性剂处理工序。

[0100] 工序(c')是在通过上述工序(c)得到的培养液中添加表面活性剂的工序。根据该工序,能够高效地处理上述菌体中包含的杂质、特别是细胞膜,可以更多地去去除来自于菌体的杂质,因此,能够从菌体中分离更高纯度的P3HA。

[0101] 在本发明的一个实施方式中,作为表面活性剂,没有特别限定,可以列举例如:阴离子表面活性剂、阳离子表面活性剂、两性表面活性剂、非离子表面活性剂等。其中,从细胞膜的去除能力高的观点考虑,优选为阴离子表面活性剂。可以单独使用它们中的1种,也可以组合使用2种以上。

[0102] 作为阴离子表面活性剂,可以列举例如:烷基硫酸盐、烷基苯磺酸盐、烷基硫酸酯盐、烯基硫酸酯盐、烷基醚硫酸酯盐、烯基醚硫酸酯盐、 α -烯炔磺酸盐、 α -磺基脂肪酸盐、 α -磺基脂肪酸盐的酯、烷基醚羧酸盐、烯基醚羧酸盐、氨基酸型表面活性剂、N-酰基氨基酸型表面活性剂等。其中,优选为烷基硫酸酯盐,从细胞膜的去除能力高、廉价的观点考虑,特别优选为十二烷基硫酸钠(SDS)。可以单独使用它们中的1种,也可以组合使用2种以上。

[0103] 在工序(c')中,添加的表面活性剂的量没有特别限定,相对于上述培养液,例如为0.1~5.0重量%,优选为0.3~2.5重量%。

[0104] 在本发明的另一个实施方式中,可以在上述工序(c)之前、或者与上述工序(c)同时进行工序(c')。即,可以在将碱水溶液添加于上述培养液之前、或者在添加碱水溶液的同时添加上述表面活性剂。另外,上述表面活性剂的添加可以在上述工序(a)之前进行,或者与上述工序(a)同时进行。

[0105] <工序(d)>

[0106] 在本发明的一个实施方式中,本制造方法可以进一步包括工序(d)。

[0107] 工序(d)是将上述工序(c)中得到的培养液离心分离,去除上清,得到P3HA被浓缩后的P3HA水性悬浮液的工序。即,是从由菌体分离得到的P3HA中去除杂质并进行浓缩及纯化的工序。工序(d)也可以称为离心分离工序。

[0108] 在工序(d)中,将上述培养液离心分离的方法没有特别限定,可以使用公知的方法。

[0109] 在工序(d)中,优选重复进行在将上述培养液离心分离而去除上清后向沉淀物中添加溶液并再次离心分离及去除上清的工序。通过该操作,可以得到进一步浓缩及纯化后的P3HA水性悬浮液。这里,在去除了上清后添加的溶液优选为调整成与上述培养液相同pH的碱水溶液。在本发明的一个实施方式中,上述溶液优选为上述工序(c)中使用的碱水溶液。

[0110] 通过工序(d),可基本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,只要不损害最终产品的物性,也可以混入杂质,但在医疗用途等需要高纯度的P3HA的情况下,优选尽量减少杂质。作为此时的纯化度的指标,例如,可以举出P3HA水性悬浮液中的蛋白质量。P3HA水性悬浮液中的蛋白质量只要是能够实现后述的P3HA粉末的残留蛋白质量的量即可,没有特别限定。该蛋白质量优选为P3HA水性悬浮液中每单位P3HA重量3000ppm以下,更优选为2500ppm以下,进一步优选为2000ppm以下。

[0111] 在工序(d)中,构成P3HA水性悬浮液的溶剂(“溶剂”也称为“水性介质”)没有特别

限定,可以为水、或水与有机溶剂的混合溶剂。另外,在该混合溶剂中,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,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;二甲基亚砷、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。

[0112] 构成P3HA水性悬浮液的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。

[0113] 需要说明的是,只要不损害本发明的本质,工序(d)中的P3HA水性悬浮液也可以包含其它溶剂、来自于菌体的成分、纯化时产生的化合物等。

[0114] <工序(e)>

[0115] 在本发明的一个实施方式中,本制造方法可以进一步包括工序(e)。

[0116] 工序(e)是在上述工序(d)所得到的P3HA水性悬浮液中添加分散剂、并制备pH为7以下的P3HA水性悬浮液的工序。工序(e)也可以称为pH调整工序。

[0117] 工序(e)优选包含下述的工序(e1)及工序(e2)。

[0118] • 工序(e1):在P3HA水性悬浮液中添加分散剂的工序

[0119] • 工序(e2):将P3HA水性悬浮液的pH调整为7以下的工序

[0120] 实施工序(e1)和工序(e2)的顺序没有特别限定,从工序(e2)中的P3HA的凝聚受到抑制、可得到P3HA的分散稳定性更优异的水性悬浮液的观点考虑,优选在工序(e1)之后实施工序(e2)。

[0121] 在工序(e)中,待添加的分散剂没有特别限定,可以列举例如:聚乙烯醇(PVA)类分散剂、氧化烯类分散剂、纤维素类分散剂、醇类分散剂等。由于抑制P3HA在悬浮液中的凝聚的效果高,因此优选聚乙烯醇类分散剂及氧化烯类分散剂,由于得到的P3HA粉体的加工性增高,因此更优选为氧化烯类分散剂。可以单独使用它们中的1种,也可以组合使用2种以上。

[0122] 在本发明的一个实施方式中,氧化烯类分散剂只要起到上述的效果即可,没有特别限定,优选由聚(氧化乙烯)(PEO)嵌段和聚(氧化丙烯)(PPO)嵌段构成,为PEO-PP0-PE0的形式。

[0123] 在本说明书中,“聚(氧化乙烯)(PEO)嵌段”是指在氧化烯类分散剂的结构中环氧乙烷(E0)聚合而形成的聚合物部分。

[0124] 在本说明书中,“聚(氧化丙烯)(PPO)嵌段”是指在氧化烯类分散剂的结构中环氧丙烷(P0)聚合而形成的聚合物部分。

[0125] 在本发明的一个实施方式中,通过将氧化烯类分散剂中的PE0分子量及PE0分子量/PP0分子量设为特定的范围,将水性悬浮液的粘度保持为低水平,能够以高生产性制造P3HA。

[0126] 在本发明的一个实施方式中,氧化烯类分散剂中的PE0分子量及PE0分子量/PP0分子量的范围优选为以下的组合。

[0127] 需要说明的是,在本说明书中,将“PEO分子量”称为“E0量”,将“PPO分子量”称为“P0量”。

[0128] 即,在本发明的一个实施方式中,氧化烯类分散剂中的PEO分子量可以为1500以上、优选为1750以上、更优选为2000以上。另外,在本发明的一个实施方式中,氧化烯类分散剂中的PEO分子量的上限例如为30000以下、优选为25000以下、更优选为20000以下。

[0129] 在本发明的一个实施方式中,氧化烯类分散剂中的PEO分子量/PPO分子量优选为0.5以上、更优选为0.6以上、进一步优选为0.7以上。PEO分子量/PPO分子量的上限优选为5.0以下、更优选为4.8以下、进一步优选为4.5以下。

[0130] 在本发明的一个实施方式中,氧化烯类分散剂中的PEO分子量及PEO分子量/PPO分子量为上述的范围内时,氧化烯类分散剂具有亲水性,且分子数相对于氧化烯类分散剂添加重量增多,因此,易于保持水性悬浮液的分散性。

[0131] 在本发明的一个实施方式中,氧化烯类分散剂的PEO分子量为1500以上、且PEO分子量/PPO分子量为0.5~5.0。

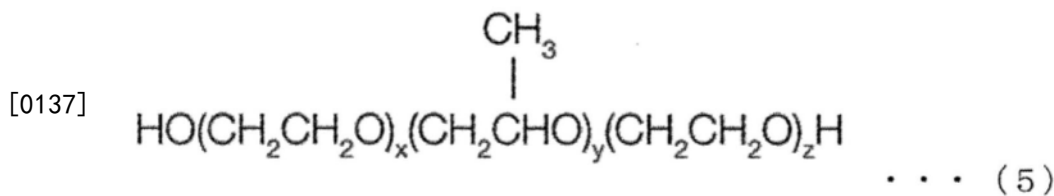
[0132] 在本发明的一个实施方式中,氧化烯类分散剂优选具有至少1个以上的分子量为750以上的PEO嵌段,更优选具有至少2个以上。另外,其上限没有特别限定,例如为4以下,优选为3以下。PEO嵌段的数量为上述的范围内时,氧化烯类分散剂具有亲水性。

[0133] 在本发明的一个实施方式中,氧化烯类分散剂中的PPO分子量没有特别限定,例如为500以上,优选为1500以上。另外,在本发明的一个实施方式中,氧化烯类分散剂中的PPO分子量的上限例如为6700以下,优选为6250以下。氧化烯类分散剂中的PPO分子量为上述的范围内时,氧化烯类分散剂具有疏水性。

[0134] 在本发明的一个实施方式中,氧化烯类分散剂中的PPO嵌段的数量只要起到上述的效果即可,没有特别限定,可以为1个,也可以为多个(例如,2、3、4个)。

[0135] 在本发明的一个实施方式中,氧化烯类分散剂例如为以下述的式(5)表示的化合物。

[0136] [化学式1]



[0138] 在上述式(5)中,X例如为17~340,优选为20~285,更优选为22~226。X为340以下时,分子数相对于氧化烯类分散剂添加重量增多,因此易于保持水性悬浮液的分散性,X为17以上时,具有亲水性。Y例如为8~115,优选为10~110,更优选为24~107。Y为115以下时,容易溶解于水中,Y为8以上时,具有疏水性。Z例如为17~340,优选为20~285,更优选为22~226。Z为340以下时,分子数相对于氧化烯类分散剂添加重量增多,因此易于保持水性悬浮液的分散性,Z为17以上时,具有亲水性。

[0139] 另外,在上述式(5)中,X与Z之和(以下有时称为“X+Z”)例如为34~680,优选为40~570,更优选为44~452。X+Z为680以下时,分子数相对于氧化烯类分散剂添加重量增多,因此易于保持水性悬浮液的分散性,X为34以上时,具有亲水性。

[0140] 在本发明的一个实施方式中,作为氧化烯类分散剂,可以使用市售品。作为氧化烯

类分散剂的市售品,可以列举例如:Pluronic 10400(BASF公司制)、Pluronic 10500(BASF公司制)、Genapol PF80(Clariant公司制)、UNILUBEDP60-600B(日油株式会社制)、UNILUBEDP60-950B(日油株式会社制)、PLONON208(日油株式会社制)、EPANU105(第一工业制药株式会社制)、EPANU108(第一工业制药株式会社制)、EPAN750(第一工业制药株式会社制)等。

[0141] 在工序(e)中,上述分散剂相对于上述P3HA水性悬浮液的添加量没有特别限定,相对于悬浮液中包含的P3HA 100质量份,优选为0.1~20质量份,更优选为0.5~10质量份,进一步优选为0.75~5质量份。通过将分散剂的添加量设为上述的范围,P3HA水性悬浮液中的P3HA的分散稳定性进一步提高,能够高效地制造P3HA粉体。

[0142] 在工序(e)中,从减轻将P3HA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等的观点考虑,优选将上述分散剂添加后的P3HA水性悬浮液的pH调整为7以下,更优选调整为5以下,进一步优选调整为4以下。另外,从容器的耐酸性的观点考虑,优选调整为1以上,更优选调整为2以上,进一步优选调整为3以上。通过将P3HA水性悬浮液的pH设为7以下,将P3HA粉体加热熔融(加工)时的着色减轻,能够抑制加热时和/或干燥时的分子量降低。

[0143] 在工序(e)中,pH的调整方法没有特别限定,例如,可以举出添加酸的方法等。酸没有特别限定,可以为有机酸、无机酸中的任意酸而无论是否具有挥发性。更具体而言,作为酸,例如可以使用硫酸、盐酸、磷酸、乙酸等。

[0144] 对于通过工序(e)得到的P3HA水性悬浮液中的P3HA的浓度而言,从干燥效用的方面考虑,在经济方面是有利的,为了提高生产性,优选为30重量%以上,更优选为40重量%以上,进一步优选为50重量%以上。另外,P3HA的浓度的上限为最密填充,由于可能无法确保充分的流动性,因此优选为65重量%以下,更优选为60重量%以下。调整P3HA的浓度的方法没有特别限定,可以举出添加水性介质、或将水性介质的一部分去除(例如,基于在进行了离心分离后去除上清等)等的方法。P3HA的浓度的调整可以在工序(e)的任意阶段实施,也可以在工序(e)之前的阶段实施。

[0145] <工序(f)>

[0146] 在本发明的一个实施方式中,本制造方法可以进一步包括工序(f)。

[0147] 工序(f)是将通过工序(e)制备的P3HA水性悬浮液进行干燥的工序。作为干燥的方法,可以举出例如:将P3HA水性悬浮液以微细的液滴的状态供给至干燥机内、并在该干燥机内使其与热风接触并进行干燥的方法(喷雾干燥);减压干燥等。优选使用喷雾干燥。工序(f)也称为干燥工序。

[0148] 在工序(f)中进行喷雾干燥的情况下,将P3HA水性悬浮液以微细的液滴的状态供给至干燥机内的方法(雾化器)没有特别限定,可以举出使用旋转盘的方法、使用喷嘴的方法等公知的方法。干燥机内的液滴与热风的接触方式没有特别限定,可以列举并流式、逆流式、将它们组合使用的方式等。

[0149] 工序(f)中进行喷雾干燥时的干燥温度只要是能够从P3HA水性悬浮液的液滴中去除大半水性介质的温度即可,可以在能够干燥至目标含水率且尽量不发生品质变差(分子量降低、色调降低等)、熔融等的条件下适当设定。例如,吹入喷雾干燥机的热风的温度可以在100~300℃的范围适当选择。另外,对于干燥机内的热风的风量,例如,也可以根据干燥

机的尺寸等而适当设定。

[0150] 在工序(f)中进行了喷雾干燥的情况下,可以在工序(f)之后包括使得到的P3HA(P3HA粉体等)进一步干燥的工序(例如,供于减压干燥的工序等)。另外,本制造方法还可以包括其它工序(例如,在P3HA水性悬浮液中添加各种添加物的工序等)。

[0151] (3.P3HA粉体)

[0152] 本发明的一个实施方式的P3HA粉体(以下称为“本P3HA粉体”)的重均分子量为10万~60万,残留蛋白质量为2000ppm以下,粒子表面为非多孔质,且所述P3HA粉体的以下式(1)表示的重均分子量保持率为50%以上。

[0153] 重均分子量保持率(%) = (在160℃下加热20分钟后的P3HA的重均分子量/在160℃下加热20分钟前的P3HA的重均分子量) × 100 · · · (1)

[0154] 本P3HA粉体在加工时不产生异物,生产性优异,且具有很高的热稳定性,因此在各种领域是极其有用的。

[0155] 在本发明的一个实施方式中,本P3HA粉体通过上述的本制造方法而制造。具体而言,本P3HA粉体例如可以通过包括上述(a)的工序的P3HA的制造方法、包括上述(a)~(c)的工序的P3HA的制造方法等而制造。对于P3HA,除本项中特别说明的事项以外,援引(2.P3HA的制造方法)一项的记载。

[0156] 本P3HA粉体的重均分子量为10万~70万,优选为10万~60万,更优选为10万~50万,进一步优选为10万~40万,特别优选为10万~30万,最优选为10万~25万。如果本P3HA粉体的重均分子量为70万以下(尤其为60万以下),则在热加工时使用,可以因成核剂效果而提高成形体的射出成型性及机械特性。其中,在为低分子量的P3HA粉体的情况下,成核剂效果更优异,因此优选。本P3HA粉体的重均分子量在实施例中表示为“最终分子量”。本P3HA粉体的重均分子量通过实施例(<最终分子量>一项)中记载的方法而测定。

[0157] 本P3HA粉体的重均分子量(最终分子量)(Mw)与数均分子量(Mn)之比(Mw/Mn)没有特别限定,从分子量的分散性优异的观点考虑,优选为1.0~3.1,更优选为1.2~3.0,进一步优选为1.4~2.9。本P3HA粉体的Mw/Mn可通过实施例中记载的方法测定。需要说明的是,数均分子量(Mn)是用于与重均分子量(最终分子量)(Mw)之比(分散度)的评价的值,是与Mw基本上成比例增减的值。P3HA粉体的Mw/Mn为1.0~3.1是指分子量的偏差小,换言之,是指P3HA粉体的分子量为单分散。根据本制造方法,可以得到Mw/Mn为1.0~3.1的P3HA粉体。

[0158] 对于本P3HA粉体而言,P3HA粉体中的P3HA粒子的表面为非多孔质。在P3HA粒子的表面为非多孔质的情况下,分散性良好,因此,粒子不会处于凝聚状态,在凝聚体内部不会残留制造过程中使用的碱。其结果是,在热加工时残留碱不会成为水解催化剂,热稳定性变得良好。P3HA粒子的表面是否为非多孔质可通过实施例中记载的方法测定。

[0159] 本P3HA粉体的以上述式(1)表示的重均分子量保持率为60%以上,优选为63%以上,更优选为65%以上,特别优选为68%以上。从防止P3HA粉体在加热时(热加工时)的劣化的观点考虑,以上述式(1)表示的重均分子量保持率越高越优选,在为50%以上时,至少能够防止加热时(热加工时)的剧烈劣化。以上述式(1)表示的重均分子量保持率越高越好,上限没有特别限定,例如为90%,优选为95%,更优选为98%以下,最优选为100%。以上述式(1)表示的重均分子量保持率可通过实施例中记载的方法测定。需要说明的是,P3HA的粒子表面为多孔质时,具有以上述式(1)表示的重均分子量保持率降低的倾向。

[0160] 本P3HA粉体的残留蛋白质量为2000ppm以下,优选为1900ppm以下,更优选为1800ppm以下。本P3HA粉体的残留蛋白质量可以作为表示在制造的过程中产生或未被去除的P3HA粉体中的各种成分的量的指标而发挥作用。本P3HA的残留蛋白质量为2000ppm以下时,杂质对P3HA粉体的物性造成影响的可能性低,能够提供加工时不产生异物的品质稳定的P3HA粉体。本P3HA的残留蛋白质量越少越好,其下限没有特别限定,例如为200ppm以上,优选为100ppm以上,更优选为50ppm以上,可以为0ppm。本P3HA粉体的残留蛋白质量可通过实施例中记载的方法测定。

[0161] 本P3HA粉体的堆积密度没有特别限定,从可实现优异的流动性的观点考虑,优选为0.20g/mL以上,更优选为0.25g/mL以上,进一步优选为0.30g/mL以上。本P3HA粉体的堆积密度的上限没有特别限定,例如可以为0.50mg/mL以下。本P3HA粉体的堆积密度可以通过以下的方法测定。即,按照JIS的K-7365中记载的方法,使用下述装置进行测定:在体积100ml \pm 0.5ml、内径45mm \pm 5mm的将内面加工得平滑的金属圆筒(接受器)的上部设置有在下部开口部为20mm \sim 30mm的漏斗具有挡板(例如,金属制的板)的构件的装置。称量中使用能够测量至0.1g位数的装置。

[0162] 本P3HA粉体的中值粒径(平均粒径)没有特别限定,从防止粉尘爆炸、粉体流动性的观点考虑,优选为60 \sim 1000 μ m,更优选为100 \sim 500 μ m。本P3HA粉体的中值粒径可使用激光衍射/散射式粒径分布测定装置LA-950(HORIBA公司)测定。具体而言,作为分散剂,在离子交换水20ml中添加作为表面活性剂的十二烷基硫酸钠0.05g,得到表面活性剂水溶液。接着,在上述表面活性剂水溶液中加入P3HA粉体0.2g并使其分散,得到P3HA分散液。然后,将上述P3HA分散液导入HORIBA公司制激光衍射/散射式粒径分布测定装置LA-950,对P3HA粉体的中值粒径进行测定。

[0163] 本发明并不限定于上述的各实施方式,可以在权利要求书所示的范围内进行各种变更,将不同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。

[0164] 即,本发明的一个实施方式为以下方式。

[0165] <1>一种聚(3-羟基烷酸酯)的制造方法,其是重均分子量为10万 \sim 70万的聚(3-羟基烷酸酯)的制造方法,该方法包括:

[0166] (a) 在包含含有聚(3-羟基烷酸酯)的菌体的培养液中添加碱水溶液,将pH调整为8.0 \sim 12.0的工序;

[0167] (b) 在通过上述工序(a)得到的培养液中添加酶,对上述菌体进行酶处理的工序;
以及

[0168] (c) 在通过上述工序(b)得到的培养液中添加碱水溶液,将pH调整为10.0 \sim 12.0的工序。

[0169] <2>根据<1>所述的聚(3-羟基烷酸酯)的制造方法,其中,上述工序(b)中的酶处理包括依次进行碱性蛋白分解酶处理、溶菌酶处理、及碱性蛋白分解酶处理。

[0170] <3>根据<1>或<2>所述的制造方法,该方法在上述工序(a)与(b)之间进一步包括:

[0171] (a') 将通过上述工序(a)得到的培养液的pH调整为6.0 \sim 8.0的工序,

[0172] 上述工序(b)中的酶处理包括依次进行溶菌酶处理及碱性蛋白分解酶处理。

[0173] <4>根据<1>~<3>中任一项所述的聚(3-羟基烷酸酯)的制造方法,其中,上述工序(b)中的酶为溶菌酶(lysozyme)及碱性蛋白酶(alcalase)。

[0174] <5>根据<1>~<4>中任一项所述的聚(3-羟基烷酸酯)的制造方法,其在上述工序(c)之后进一步包括:

[0175] (c')在通过上述工序(c)得到的培养液中添加表面活性剂的工序。

[0176] <6>根据<1>~<5>中任一项所述的聚(3-羟基烷酸酯)的制造方法,其中,上述工序(a)的反应时间为4小时~30小时。

[0177] <7>根据<1>~<6>中任一项所述的聚(3-羟基烷酸酯)的制造方法,其中,上述聚(3-羟基烷酸酯)为聚(3-羟基丁酸酯-共聚-3-羟基己酸酯)。

[0178] <8>一种聚(3-羟基烷酸酯)粉体,其重均分子量为10万~60万,残留蛋白质量为2000ppm以下,粒子表面为非多孔质,且上述聚(3-羟基烷酸酯)粉体的以下式(1)表示的重均分子量保持率为50%以上。

[0179] 重均分子量保持率(%) = (在160℃下加热20分钟后的P3HA的重均分子量/在160℃下加热20分钟前的P3HA的重均分子量) × 100 · · · (1)

[0180] <9>根据<8>所述的聚(3-羟基烷酸酯)粉体,其重均分子量(Mw)与数均分子量(Mn)之比(Mw/Mn)为1.0~3.1。

[0181] 实施例

[0182] 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,作为“P3HA”,使用了“P3HB3HH”,也可以将“P3HA”称为“P3HB3HH”。

[0183] (测定及评价方法)

[0184] 通过以下的方法进行实施例及比较例中的测定及评价。

[0185] <热稳定性>

[0186] 热稳定性以在160℃下加热20分钟后的P3HA的重均分子量保持率的形式进行了评价。P3HA的重均分子量保持率通过以下的式(1)计算。

[0187] 重均分子量保持率(%) = (加热后的P3HA的重均分子量/加热前的P3HA的重均分子量) × 100 · · · (1)

[0188] (加热前的P3HA的重均分子量)

[0189] 使P3HA粉体10mg溶解于氯仿10mL后,通过过滤去除了不溶物。对于该溶液(滤液),使用安装有“Shodex K805L(300×8mm、2根连接)”(昭和电工株式会社制)的株式会社岛津制作所制GPC系统,以氯仿作为流动相,测定了重均分子量。分子量标准样品使用了昭和电工株式会社制Shodex K-804(聚苯乙烯凝胶)。

[0190] (加热后的P3HA的重均分子量)

[0191] 将P3HA粉体以160℃预热处理7分钟后,在5MPa加压下以160℃加热20分钟,制作了P3HA树脂片。除了使该P3HA树脂片10mg溶解于氯仿10mL以外,按照与(加热前的P3HA的重均分子量的测定)中记载的相同的步骤测定了加热后的P3HA的重均分子量。

[0192] <初期分子量>

[0193] 通过以下的步骤测定了初期分子量:用蒸馏水稀释包含灭活后的P3HA的培养液,在进行了离心分离后,去除上清。在得到的沉淀物(P3HA)中加入乙醇,使其分散于乙醇中,

进行了离心分离。去除上清,利用真空干燥器干燥1小时以上,使沉淀物完全干燥,得到了干燥体(P3HA粉体)。使得到的P3HA粉体10mg溶解于氯仿10mL后,通过过滤去除了不溶物。对于该溶液(滤液),使用安装有“Shodex K805L(300×8mm、2根连接)”(昭和电工株式会社制)的株式会社岛津制作所制GPC系统,以氯仿作为流动相,测定了初期分子量。分子量标准样品使用了昭和电工株式会社制Shodex K-804(聚苯乙烯凝胶)。

[0194] <最终分子量(Mw)及数均分子量(Mn)>

[0195] 通过以下的步骤测定了最终分子量及数均分子量:使P3HA粉体10mg溶解于氯仿10mL后,通过过滤去除了不溶物。对于该溶液(滤液),使用安装有“Shodex K805L(300×8mm、2根连接)”(昭和电工株式会社制)的株式会社岛津制作所制GPC系统,以氯仿作为流动相,测定了最终分子量及数均分子量。分子量标准样品使用了昭和电工株式会社制Shodex K-804(聚苯乙烯凝胶)。

[0196] <P3HA的收率>

[0197] 通过以下的步骤测定了P3HA的收率:

[0198] (a) 将后述的分子量调整前的培养液和分子量调整后的培养液分别各采集2g,使用水分计(A&D公司制ML-50)测定了固体成分浓度。

[0199] (b) 将后述的分子量调整前的培养液和分子量调整后的培养液分别各采集5g,量取至50ml离心管中,用乙醇(FUJIFILM Wako Chemicals公司制)定容至20ml,使浆料分散后进行了离心分离(9500rpm、5分钟)。

[0200] (c) 将上清去除后,在上述管中添加蒸馏水,定容至20ml,使沉淀物分散,进行了离心分离(9500rpm、5分钟)。

[0201] (d) 将上清去除后,在上述管中添加3.3%十二烷基硫酸钠水溶液(使十二烷基硫酸钠(花王株式会社制)以3.3重量%溶解于蒸馏水而成的水溶液),定容至30ml,使沉淀物分散。

[0202] (e) 使用超声波破碎机(株式会社日本精机制作所制超声波均化器US-150T)进行了1分钟的菌体破碎。

[0203] (f) 将上述(e)重复了3次。

[0204] (g) 进行离心分离(9500rpm、5分钟),将上清去除后,添加蒸馏水,定容至20ml,使沉淀物分散,进行了离心分离(9500rpm、5分钟)。

[0205] (h) 将上清去除后,在上述管中添加乙醇,定容至20ml,使沉淀物分散,进行了离心分离(9500rpm、5分钟)。

[0206] (i) 将上清去除后,使用设定为60℃的真空干燥器干燥12小时。

[0207] (j) 测定通过(i)得到的干燥物的重量,按照以下的式(3)及(4)计算出P3HA含量和收率。

[0208]
$$\text{P3HA含量(g/g)} = (\text{干燥物的重量(g)} / \text{培养液的重量(g)}) \cdots (3)$$

[0209]
$$\text{收率(\%)} = (\text{分子量调整后的培养液的P3HA含量} / \text{分子量调整前的培养液的P3HA含量}) \times 100 \times (\text{分子量调整前的培养液的固体成分浓度(\%)} / \text{分子量调整后的培养液的固体成分浓度(\%)}) \cdots (4)$$

[0210] <残留蛋白质量>

[0211] 残留蛋白质量使用BCA Protein Assay Kit(Thermo Fisher Scientific公司制)

进行了测定。

[0212] <SEM>

[0213] 在SEM试样台上粘贴碳带(carbon tape),从其上方撒上含有外部添加剂的P3HA粉体、或作为比较例的P3HA粉体,然后用鼓风机去除了过量的粉体。前处理使用氩等离子体涂布机以20nm的厚度进行了涂敷。上述P3HA粉体的前处理使用Filgen公司制OPC60A-G氩等离子体涂布机进行。SEM观察使用Hitachi High-Tech Fielding公司制S-4800进行。

[0214] (实施例1)

[0215] (菌体培养液的制备)

[0216] 将国际公开第W02019/142717号中记载的富养罗尔斯通氏菌用该文献的(0041)~(0048)段中记载的方法进行培养,得到了包含含有P3HA的菌体的菌体培养液。对P3HA的重复单元的组成比(3-羟基丁酸酯单元/3-羟基己酸酯单元的组成比)进行了测定,结果为99.9/0.1~96.0/4.0(mol/mol)。

[0217] (灭活)

[0218] 将上述得到的菌体培养液以内温70℃进行8小时的加热/搅拌处理,进行了灭菌处理。

[0219] (分子量调整)

[0220] 对于上述得到的经灭活的培养液(灭活培养液),使用30%氢氧化钠将pH调整为 9.0 ± 0.2 ,将内温设为 $75 \pm 2^\circ\text{C}$,进行了12小时的菌体中的P3HA的分子量调整。P3HA的收率为97%(表1)。

[0221] (酶处理)

[0222] 对于上述得到的分子量调整后的液体(分子量调整后液),添加95%硫酸将pH调整为 7.0 ± 0.2 。添加IW(工业用水)将固体成分浓度调整为18%后,添加溶菌酶(FUJIFILM Wako Chemicals公司制)并在50℃下保持了2小时,所述溶菌酶是分解细胞壁中的糖链(肽聚糖)的酶(溶菌酶)。然后,添加作为碱性蛋白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,调整至pH8.5并保持了2小时。

[0223] (溶菌、浓缩)

[0224] 对于上述得到的酶处理液,添加30%氢氧化钠调整为pH8.5(碱清洗)。接着,对于上述酶处理液,以0.6~1.0wt%添加了十二烷基硫酸钠(SDS、花王株式会社制)(表面活性剂处理)。然后,使用30%氢氧化钠进行调整,使得pH达到 11.0 ± 0.2 ,并且添加pH11.0的氢氧化钠水溶液,相对于上述酶处理液稀释至2倍。

[0225] 将上述酶处理液离心分离(4500rpm、10分钟)后,去除上清,进行了2倍浓缩。在该浓缩后的P3HA的水性悬浮液中添加与去除的上清等量的氢氧化钠水溶液(pH11.0),进行离心分离(4500rpm、10分钟),去除了上清。将该工序重复了3次。

[0226] 最后,通过去除上清进行调整,使得P3HA浓度达到 54 ± 2 重量%,得到了P3HA水性悬浮液。P3HA水性悬浮液中的残留蛋白质量相对于P3HA悬浮液中存在的P3HA的重量为939ppm(表1)。

[0227] (干燥)

[0228] 在上述得到的P3HA水性悬浮液中添加氧化乙烯/氧化丙烯共聚物非离子性分散剂(聚氧化乙烯分子量8000、聚氧化丙烯分子量2000、商品名PLONON208)1.0phr(相对于水性

悬浮液中存在的P3HA100重量份为1重量份),进行了混合。将该液体搅拌120分钟后,相对于每100g的P3HA水性悬浮液添加10重量%硫酸0.3ml,得到了P3HA水性悬浮液。

[0229] 使该P3HA水性悬浮液以60℃干燥12小时以上,得到了P3HA粉体。得到的P3HA粉体的最终分子量(Mw)为173000,数均分子量(Mn)为70000,热稳定性为73%(表1)。此外,使用电子显微镜(SEM、Hitachi High-Tech公司制S-4800)观察了上述P3HA粉体表面的状态,结果是可以确认为非多孔质表面(图1)。

[0230] (实施例2)

[0231] 直至(分子量调整)为止,通过与实施例1相同的方法得到了分子量调整后液。

[0232] (酶处理)

[0233] 对于上述得到的分子量调整后的液体(分子量调整后液),添加IW(工业用水)将固体成分浓度调整为18%。接着,添加作为碱性蛋白分解酶的碱性蛋白酶2.5L(Novozyme公司制),以50℃保持了2小时。接着,添加溶菌酶(FUJIFILM Wako Chemicals公司制)并在50℃下保持了2小时,所述溶菌酶是分解细胞壁中的糖链(肽聚糖)的溶菌酶。然后,添加碱性蛋白酶2.5L(Novozyme公司制),接着,在50℃下添加30%氢氧化钠,调整至pH8.5并保持了2小时。以后,通过与实施例1相同的方法得到了P3HA粉体。另外,通过与实施例1相同的方法进行了各种测定。

[0234] P3HA的收率为97%,残留蛋白质量为760ppm(表1)。另外,得到的P3HA粉体的最终分子量(Mw)为173000,数均分子量(Mn)为70000,热稳定性为70%(表1)。此外,使用电子显微镜(SEM、Hitachi High-Tech公司制S-4800)观察了上述P3HA粉体表面的状态,结果是可以确认为非多孔质表面。

[0235] (实施例3)

[0236] 使用了P3HA的重复单元的组成比(3-羟基丁酸酯单元/3-羟基己酸酯单元的组成比)为96.0/4.0~92.0/8.0(mol/mol)的P3HA,除此以外,通过与实施例1相同的方法得到了P3HA粉体。另外,通过与实施例1相同的方法进行了各种测定。

[0237] P3HA的收率为98%,残留蛋白质量为1647ppm(表1)。另外,得到的P3HA粉体的最终分子量(Mw)为158000,数均分子量(Mn)为84000,热稳定性为78%(表1)。此外,使用电子显微镜(SEM、Hitachi High-Tech公司制S-4800)观察了上述P3HA粉体表面的状态,结果是可以确认为非多孔质表面。

[0238] (实施例4)

[0239] 使用了P3HA的重复单元的组成比(3-羟基丁酸酯单元/3-羟基己酸酯单元的组成比)为92.0/8.0~87.0/13.0(mol/mol)的P3HA,除此以外,通过与实施例1相同的方法得到了P3HA粉体。另外,通过与实施例1相同的方法进行了各种测定。

[0240] P3HA的收率为99%,残留蛋白质量为1704ppm(表1)。另外,得到的P3HA粉体的最终分子量(Mw)为257000,数均分子量(Mn)为91000,热稳定性为80%(表1)。此外,使用电子显微镜(SEM、Hitachi High-Tech公司制S-4800)观察了上述P3HA粉体表面的状态,结果是可以确认为非多孔质表面。

[0241] (实施例5)

[0242] 直至(灭活)为止,通过与实施例3相同的方法得到了灭活培养液。

[0243] (酶处理)

[0244] 对于上述得到的灭活培养液,添加IW(工业用水)将固体成分浓度调整为18%,然后,添加溶菌酶(FUJIFILM Wako Chemicals公司制)并在50℃下保持了2小时,所述溶菌酶是分解细胞壁中的糖链(肽聚糖)的酶。然后,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,调整至pH8.5并保持了2小时。

[0245] (分子量调整)

[0246] 对于上述得到的酶处理后液,使用30%氢氧化钠将pH调整为 11.5 ± 0.2 ,将内温设为 $50 \pm 2^\circ\text{C}$,进行了12小时的P3HA的分子量调整。以后,通过与实施例1相同的方法得到了P3HA粒子。另外,通过与实施例1相同的方法进行了各种测定。需要说明的是,P3HA的收率在即将进行(溶菌、浓缩)之前(换言之,将pH调整为 11.5 ± 0.2 ,将内温设为 $50 \pm 2^\circ\text{C}$ 并保持了12小时之后立即)进行测量。

[0247] P3HA的收率为30%,残留蛋白质量为796ppm(表1)。另外,得到的P3HA粉体的最终分子量(Mw)为224000,数均分子量(Mn)为61000,热稳定性为3%(表1)。此外,使用电子显微镜(SEM、Hitachi High-Tech公司制S-4800)观察了上述P3HA粉体表面的状态,结果是可以确认为多孔质表面。

[0248] (实施例6)

[0249] 使用了P3HA的重复单元的组成比(3-羟基丁酸酯单元/3-羟基己酸酯单元的组成比)为92.0/8.0~87.0/13.0(mol/mol)的P3HA,除此以外,通过与实施例5相同的方法得到了P3HA粉体。另外,通过与实施例5相同的方法进行了各种测定。

[0250] P3HA的收率为96%,残留蛋白质量为1326ppm(表1)。另外,得到的P3HA粉体的最终分子量(Mw)为556000,数均分子量(Mn)为287000,热稳定性为80%(表1)。此外,使用电子显微镜(SEM、Hitachi High-Tech公司制S-4800)观察了上述P3HA粉体表面的状态,结果是可以确认为非多孔质表面。

[0251] (比较例1)

[0252] 直至(酶处理)为止,通过与实施例1相同的方法得到了酶处理液。

[0253] (溶菌、浓缩)

[0254] 对于上述得到的酶处理液,以0.6~1.0wt%添加十二烷基硫酸钠(SDS、花王株式会社制),进行了2倍稀释。接着,使用30%氢氧化钠进行调整,使得pH达到8.5。以后,通过与实施例1相同的方法得到了P3HA粒子。另外,通过与实施例1相同的方法进行了各种测定。

[0255] P3HA的收率为97%,残留蛋白质量为3547ppm(表1)。另外,得到的P3HA粉体的最终分子量(Mw)为216000,数均分子量(Mn)为86000,热稳定性为63%(表1)。此外,使用电子显微镜(SEM、Hitachi High-Tech公司制S-4800)观察了上述P3HA粉体表面的状态,结果是可以确认为非多孔质表面。

[0256] (比较例2)

[0257] 直至(灭活)为止,通过与实施例1相同的方法得到了灭活培养液。

[0258] (酶处理)

[0259] 对于上述得到的灭活培养液,添加IW(工业用水)将固体成分浓度调整为18%,然后,添加溶菌酶(FUJIFILM Wako Chemicals公司制)并在50℃下保持了2小时,所述溶菌酶是分解细胞壁中的糖链(肽聚糖)的酶。然后,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,调整至pH8.5并保持了2小时。

[0260] (分子量调整)

[0261] 对于上述得到的酶处理后液,使用30%氢氧化钠将pH调整为 11.5 ± 0.2 ,将内温设为 $50 \pm 2^\circ\text{C}$,进行了12小时的P3HA的分子量调整。以后,通过与实施例1相同的方法得到了P3HA粒子。另外,通过与实施例1相同的方法进行了各种测定。需要说明的是,P3HA的收率在即将进行(溶菌、浓缩)之前(换言之,将pH调整为 11.5 ± 0.2 ,将内温设为 $50 \pm 2^\circ\text{C}$ 并保持了12小时之后立即)进行测量。

[0262] P3HA的收率为30%,残留蛋白质量为796ppm(表1)。另外,得到的P3HA粉体的最终分子量(M_w)为224000,数均分子量(M_n)为61000,热稳定性为3%(表1)。此外,使用电子显微镜(SEM、Hitachi High-Tech公司制S-4800)观察了上述P3HA粉体表面的状态,结果是可以确认为多孔质表面。

[0263] (比较例3)

[0264] 使用了P3HA的重复单元的组成比(3-羟基丁酸酯单元/3-羟基己酸酯单元的组成比)为 $96.0/4.0 \sim 92.0/8.0$ (mol/mol)的P3HA,除此以外,通过与比较例2相同的方法得到了P3HA粉体。另外,通过与实施例1相同的方法进行了各种测定。

[0265] P3HA的收率为85%,残留蛋白质量为1263ppm(表1)。另外,得到的P3HA粉体的最终分子量(M_w)为287000,数均分子量(M_n)为68000,热稳定性为71%(表1)。此外,使用电子显微镜(SEM、Hitachi High-Tech公司制S-4800)观察了上述P3HA粉体表面的状态,结果是可以确认为多孔质表面。

[0266] (比较例4)

[0267] 使用了P3HA的重复单元的组成比(3-羟基丁酸酯单元/3-羟基己酸酯单元的组成比)为 $92.0/8.0 \sim 87.0/13.0$ (mol/mol)的P3HA,除此以外,通过与比较例2相同的方法得到了P3HA粉体。另外,通过与实施例1相同的方法进行了各种测定。

[0268] P3HA的收率为80%,残留蛋白质量为1806ppm(表1)。另外,得到的P3HA粉体的最终分子量(M_w)为250000,数均分子量(M_n)为78000,热稳定性为57%(表1)。此外,使用电子显微镜(SEM、Hitachi High-Tech公司制S-4800)观察了上述P3HA粉体表面的状态,结果是可以确认为多孔质表面。

[0269] (比较例5)

[0270] 在(分子量调整)中进行了6小时的分子量调整,除此以外,通过与比较例3相同的方法得到了P3HA粉体。另外,通过与实施例1相同的方法进行了各种测定。需要说明的是,P3HA的收率在即将进行(溶菌、浓缩)之前(换言之,将pH调整为 11.5 ± 0.2 ,将内温设为 $50 \pm 2^\circ\text{C}$ 并保持了6小时之后立即)进行测量。

[0271] P3HA的收率为94%,残留蛋白质量为1214ppm(表1)。另外,得到的P3HA粉体的最终分子量(M_w)为652000,数均分子量(M_n)为336000,热稳定性为78%(表1)。此外,使用电子显微镜(SEM、Hitachi High-Tech公司制S-4800)观察了上述P3HA粉体表面的状态,结果是可以确认为非多孔质表面。

[0272] (比较例6)

[0273] 在(分子量调整)中进行了6小时的分子量调整,除此以外,通过与比较例4相同的方法得到了P3HA粉体。另外,通过与实施例1相同的方法进行了各种测定。需要说明的是,P3HA的收率在即将进行(溶菌、浓缩)之前(换言之,将pH调整为 11.5 ± 0.2 ,将内温设为 $50 \pm$

2℃并保持了6小时之后立即)进行测量。

[0274] P3HA的收率为88%，残留蛋白质量为1050ppm(表1)。另外，得到的P3HA粉体的最终分子量(Mw)为603000，数均分子量(Mn)为322000，热稳定性为80%(表1)。此外，使用电子显微镜(SEM、Hitachi High-Tech公司制S-4800)观察了上述P3HA粉体表面的状态，结果是可以确认为非多孔质表面。

[0275]

[表1]

	3HB/3HH [mol/mol]	菌体中分子量调整的有无	碱性蛋白酶处理次数	菌体破碎前的碱pH调整次数	菌体破碎后的碱pH调整次数	初期分子量 [万]	最终分子量 (Mw)[万]	数均分子量 (Mn)[万]	Mw/Mn	粒子表面	残留蛋白质 [ppm]	热稳定性 [%]	收率 [%]
实施例1	99.9/0.1~96.0/4.0	有	1	1	1	60	17.3	7.0	2.5	非多孔质	939	73	97
实施例2	99.9/0.1~96.0/4.0	有	2	1	1	60	17.3	7.0	2.5	非多孔质	760	70	97
实施例3	96.0/4.0~92.0/8.0	有	1	1	1	206	15.8	8.4	1.9	非多孔质	1647	78	98
实施例4	92.0/8.0~87.0/13.0	有	1	1	1	121	25.7	9.1	2.8	非多孔质	1704	80	99
实施例5	96.0/4.0~92.0/8.0	有	1	1	1	169	56.8	29.2	1.9	非多孔质	1307	86	99
实施例6	92.0/8.0~87.0/13.0	有	1	1	1	132	55.6	28.7	1.9	非多孔质	1326	80	96
比较例1	99.9/0.1~96.0/4.0	有	1	1	0	60	21.6	8.6	2.5	非多孔质	3547	63	97
比较例2	99.9/0.1~96.0/4.0	无	1	0	1	60	22.4	6.1	3.7	多孔质	796	3	30
比较例3	96.0/4.0~92.0/8.0	无	1	0	1	165	28.7	6.8	4.2	多孔质	1263	71	85
比较例4	92.0/8.0~87.0/13.0	无	1	0	1	121	25.0	7.8	3.2	多孔质	1806	57	80
比较例5	96.0/4.0~92.0/8.0	无	1	0	1	169	65.2	33.6	1.9	非多孔质	1214	78	94
比较例6	92.0/8.0~87.0/13.0	无	1	0	1	132	60.3	32.2	1.9	非多孔质	1050	80	88

[0276] (结果)

[0277] 分别将实施例1~6及比较例1~6中测得的各项物性示于表1,将实施例1~6及比较

例1~6中进行的各操作及其顺序示于图3。

[0278] 根据表1,将实施例1~2与比较例1进行对比可知,通过在酶处理后(即,在菌体外)以碱条件进行保持,能够大幅减少残留蛋白质量。另外,将实施例1~6与比较例2~6进行对比可知,如果在酶处理前(即,在菌体内)进行P3HA的分子量调整,能够实现很高的P3HA收率。另外,将实施例1~4与比较例2~4进行对比可知,在进行分子量调整而将分子量降低至15万~30万时,通过在酶处理后(即,在菌体外)进行分子量调整,能够使P3HA粉体表面为非多孔质。

[0279] 工业实用性

[0280] 根据本发明,能够以高收率制造减少了杂质(特别是残留蛋白质)的P3HA。另外,通过本发明的制造方法得到的减少了杂质(特别是残留蛋白质)的P3HA可以优选用于农业、渔业、林业、园艺、医学、卫生品、衣料、非衣料、包装、汽车、建材、其它领域。

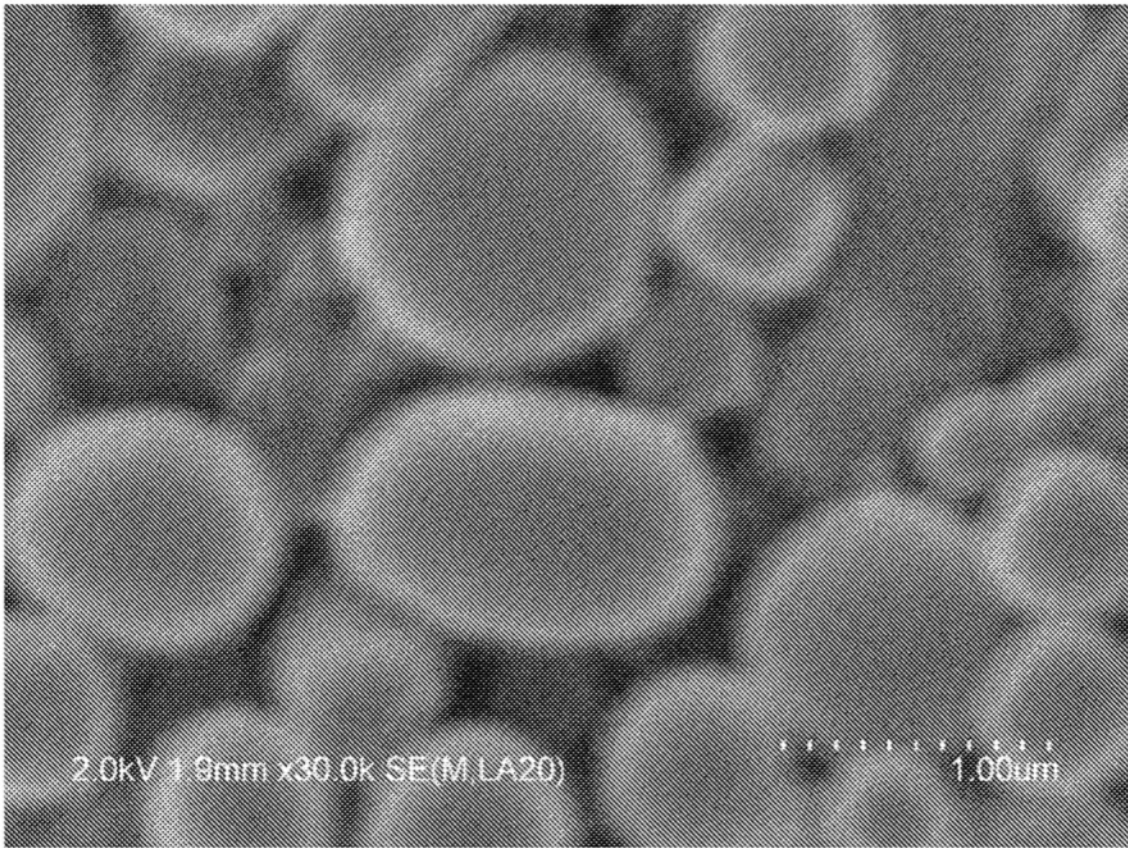


图1

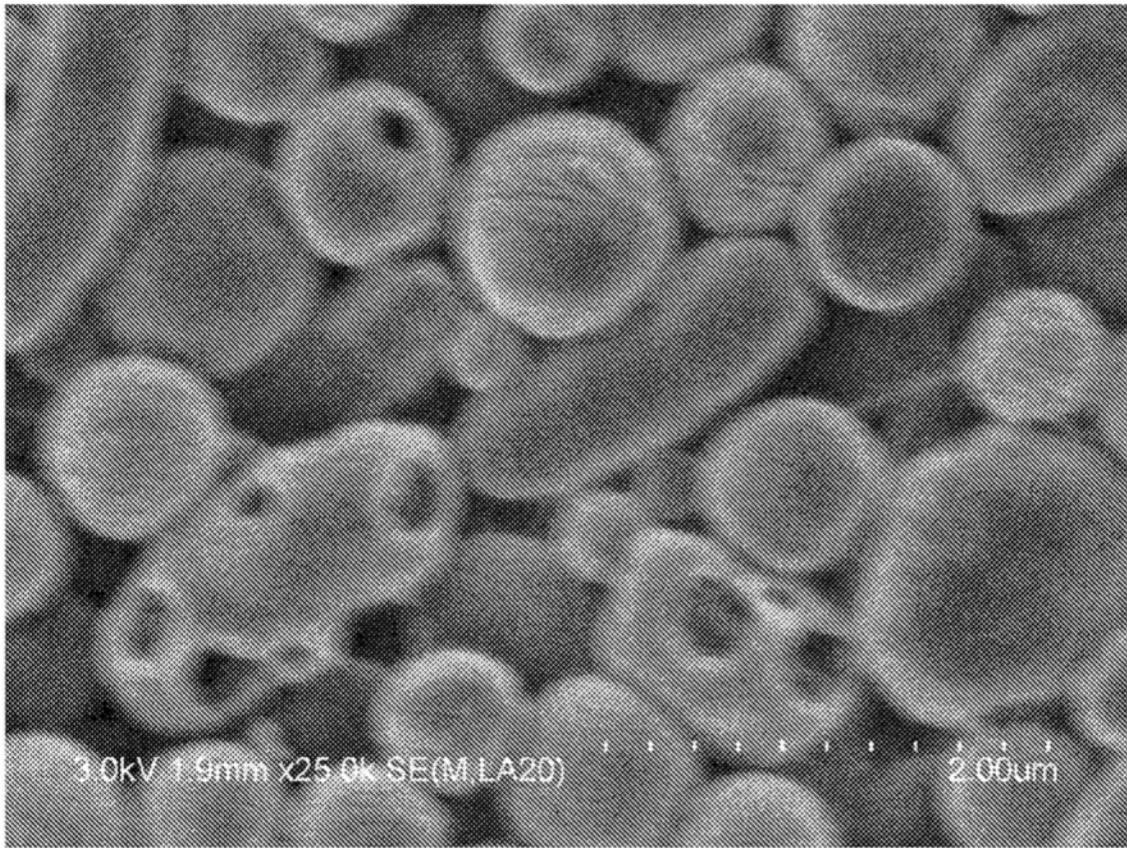


图2

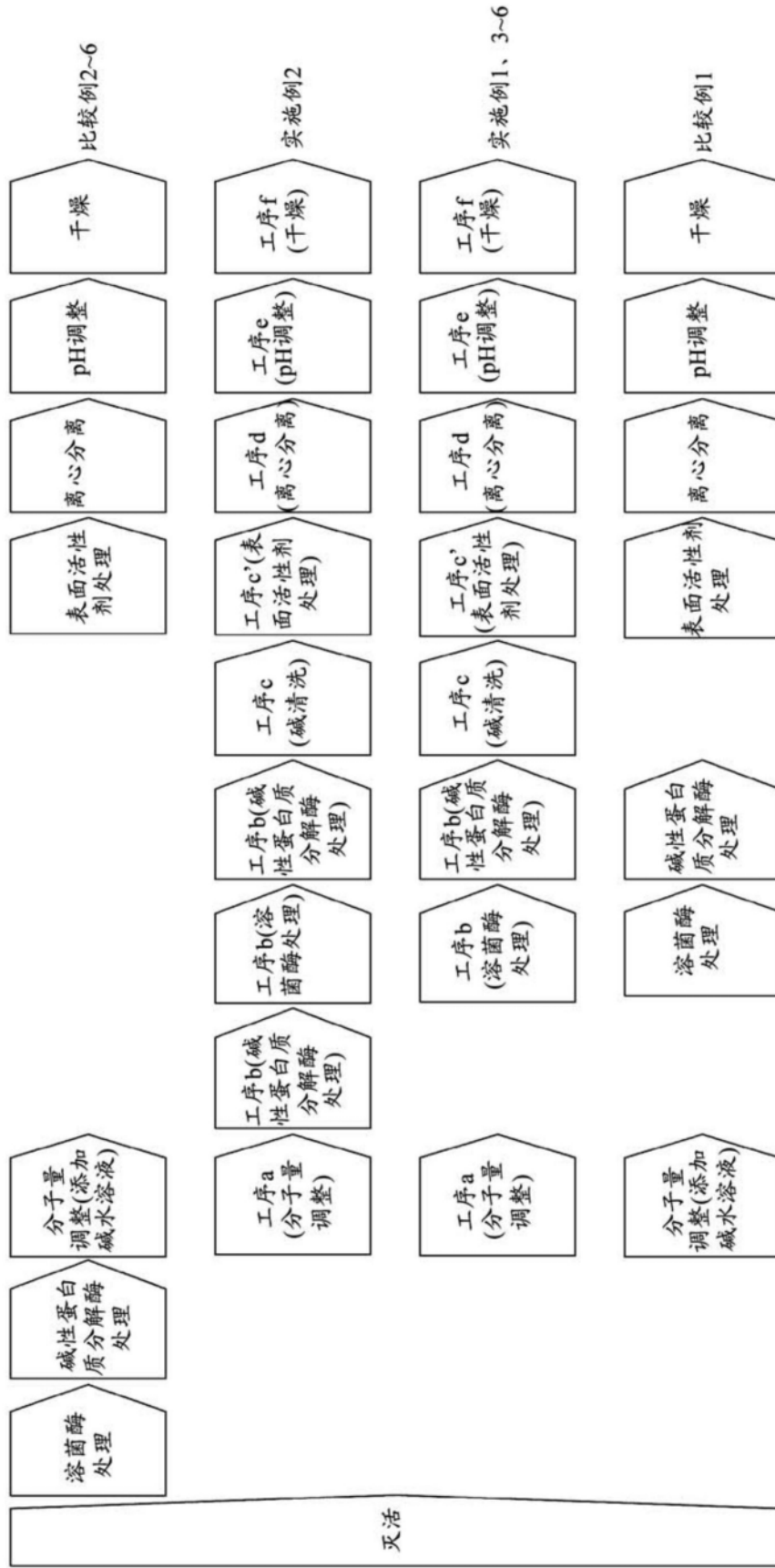


图3