



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 115279913 A

(43) 申请公布日 2022. 11. 01

(21) 申请号 202180020705.8

(22) 申请日 2021.03.25

(30) 优先权数据

2020-058908 2020.03.27 JP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2022.09.13

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2021/012646 2021.03.25

(87) PCT国际申请的公布数据

W02021/193847 JA 2021.09.30

(71) 申请人 住友林业株式会社

地址 日本东京

(72) 发明人 猪野光太郎 门田贤一

(74) 专利代理机构 中国贸促会专利商标事务所  
有限公司 11038

专利代理师 吴宗颐

(51) Int.Cl.

*C12P* 7/625 (2022.01)

*C12N* 1/20 (2006.01)

*C12R* 1/01 (2006.01)

权利要求书2页 说明书34页 附图2页

(54) 发明名称

使用海水的PHA的制造方法

(57) 摘要

本发明涉及一种聚羟基烷酸的制造方法,其包括以下工序:(a)使用含有海水的培养基培养嗜盐菌的工序;以及(b)作为所述培养的培养产物,得到聚羟基烷酸的工序。

1. 聚羟基烷酸的制造方法,其包括以下工序:
  - (a) 使用含有海水的培养基培养嗜盐菌的工序;以及
  - (b) 作为所述培养的培养产物,得到聚羟基烷酸的工序。
2. 权利要求1所述的制造方法,其中,培养基中含有除了来自海水的NaCl以外的NaCl。
3. 权利要求1或2所述的制造方法,其中,嗜盐菌为极端嗜盐菌。
4. 权利要求1~3任一项所述的制造方法,其中,极端嗜盐菌是地中海富盐菌(*Haloferax mediterranei*)。
5. 权利要求1~4任一项所述的制造方法,其中,聚羟基烷酸是3-羟基丁酸和3-羟基戊酸无规共聚而成的共聚物。
6. 权利要求5所述的制造方法,其中,相对于构成共聚物的3-羟基丁酸的摩尔数和3-羟基戊酸的摩尔数的总和,3-羟基戊酸的摩尔数的比例(3HV分率)为5.0%~40.0%。
7. 权利要求6所述的制造方法,其中,作为碳源,含有糖,使该糖为:
  - (a) 仅葡萄糖和/或其衍生物,
  - (b) 葡萄糖及其衍生物以及选自木糖、纤维二糖、葡糖醛酸、阿拉伯糖、甘露糖、半乳糖、蔗糖及它们的衍生物中的1种或2种以上,或者
  - (c) 选自木糖、纤维二糖、葡糖醛酸、阿拉伯糖、甘露糖、半乳糖、蔗糖及它们的衍生物中的1种或2种以上,得到聚羟基烷酸。
8. 权利要求1~7任一项所述的制造方法,其中,聚羟基烷酸的重均分子量大于361万。
9. 权利要求1~8任一项所述的制造方法,其中,得到的聚羟基烷酸的重均分子量为600万以下。
10. 权利要求1~9任一项所述的制造方法,其中,海水包含浓缩的海水。
11. 权利要求10所述的制造方法,其中,浓缩的海水的盐分浓度为3.5%~20%。
12. 权利要求1~11任一项所述的制造方法,其中,培养基含有下述的成分或海水中的至少1种:
  - (i) 人工海水素,
  - (ii) 海洋深层水,和
  - (iii) 天然海水。
13. 海水在聚羟基烷酸的制造方法中的应用,其中,所述聚羟基烷酸的制造方法包括以下工序:
  - (a) 使用含有浓缩的海水或未浓缩的海水的培养基培养嗜盐菌的工序;以及
  - (b) 作为所述培养的培养产物,得到聚羟基烷酸的工序。
14. 聚羟基烷酸的制造方法,其包括以下工序:

使用含有海水的培养基培养嗜盐菌,作为培养产物,得到聚羟基烷酸,所述培养中的碳源含有糖和糠醛系化合物,使该糖为:

  - (a) 仅葡萄糖和/或其衍生物,
  - (b) 葡萄糖及其衍生物以及选自木糖、纤维二糖、葡糖醛酸、阿拉伯糖、甘露糖、半乳糖、

蔗糖及它们的衍生物中的1种或2种以上,或者

(c) 选自木糖、纤维二糖、葡糖醛酸、阿拉伯糖、甘露糖、半乳糖、蔗糖及它们的衍生物中的1种或2种以上。

15. 控制所制造的聚羟基烷酸的重均分子量的方法,其是使用含有海水的培养基培养嗜盐菌,控制作为培养产物得到的聚羟基烷酸的分子量的方法,其中,

所述培养中的碳源含有糖和糠醛系化合物,

使该糖为:

(a) 仅葡萄糖和/或其衍生物,

(b) 葡萄糖及其衍生物以及选自木糖、纤维二糖、葡糖醛酸、阿拉伯糖、甘露糖、半乳糖、蔗糖及它们的衍生物中的1种或2种以上,或者

(c) 选自木糖、纤维二糖、葡糖醛酸、阿拉伯糖、甘露糖、半乳糖、蔗糖及它们的衍生物中的1种或2种以上。

## 使用海水的PHA的制造方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及PHA (聚羟基烷酸) 共聚物的新的制造方法。另外,本发明还涉及剩余海水的使用方法。

### 背景技术

[0002] 20世纪下半叶,由石油炼制塑料的技术飞速发展,塑料的普及彻底改变了人们的生活。有许多人获得了与塑料相关的诺贝尔奖(卡罗瑟斯的尼龙、齐格勒-纳塔的聚乙烯、聚丙烯等)。

[0003] 目前,仅日本一年就生产1075万吨塑料(2016年)。另一方面,塑料的大部分是由石油制成的,其废弃时排放的二氧化碳对全球变暖的影响和石油资源的稳定供应性等越来越成为问题。另外,普通的塑料一旦释放到环境中,就不会在自然界中降解,因此塑料原样漂浮在海中,加剧了微塑料的问题。

作为这样的问题的解决方案,可举出生物质塑料、生物降解塑料。生物质塑料是一种原料不是化石燃料而是玉米或甘蔗等的榨渣、木质等生物质的塑料,生物降解塑料是使用后在环境中借助微生物的力量分解成为水和二氧化碳的塑料。

[0004] 聚羟基烷酸(PHA)是一种将脂质和糖质等生物质作为碳源(营养物质)供应给某些微生物时作为储能物质储存的塑料,是使用后在环境中生物降解的环境负荷小的生物质塑料。

作为PHA,最初发现的是聚[3-羟基丁酸](有时称为“P(3HB)”) (非专利文献1),在非专利文献1中,除了作为单体成分的3-羟基丁酸以外,还公开了作为第2成分的3-羟基戊酸(有时称为“3HV”)等。

[0005] 还已知了使用海水合成PHA的技术(专利文献2、专利文献4)。

现有技术文献

[0006] 专利文献

专利文献1:日本特开2016-185087号公报

专利文献2:日本特开2018-133997号公报

专利文献3:日本特开2014-512194号公报

专利文献4:日本特开2012-210165号公报

[0007] 非专利文献

非专利文献1:Macromolecular Bioscience,2007,7,218

### 发明内容

发明要解决的课题

[0008] 对制造PHA的方法有持续的需求。本发明的课题在于提供PHA的新的制造方法。

解决课题的手段

[0009] 本发明人等为了解决上述课题反复进行了深入研究,结果发现,有可能使用过去

没有使用过的材料来制造PHA,进一步进行研究,结果完成了本发明。

[0010] 即,本发明至少涉及以下发明:

[1]聚羟基烷酸(聚羟基烷酸酯)的制造方法,其包括以下工序:

- (a) 使用含有海水的培养基来培养微生物的工序;和
- (b) 作为所述培养的培养产物,得到聚羟基烷酸的工序。

[2]根据[1]所述的制造方法,其中,培养基中含有除了来自海水的NaCl以外的NaCl。

[3]根据[1]或[2]所述的制造方法,其中,嗜盐菌为极端嗜盐菌。

[4]根据[1]~[3]任一项所述的制造方法,其中,极端嗜盐菌是地中海富盐菌(*Haloferax mediterranei*)。

[5]根据[1]~[4]任一项所述的制造方法,其中,聚羟基烷酸是3-羟基丁酸和3-羟基戊酸无规共聚而成的共聚物。

[6]根据[5]所述的制造方法,其中,相对于构成共聚物的3-羟基丁酸的摩尔数和3-羟基戊酸的摩尔数的总和,3-羟基戊酸的摩尔数的比例(3HV分率)为5.0%~40.0%。

[7]根据[6]所述的制造方法,其中,作为碳源,含有糖,该糖为:

- (a) 仅葡萄糖和/或其衍生物、
- (b) 葡萄糖及其衍生物以及选自木糖、纤维二糖、葡糖醛酸、阿拉伯糖、甘露糖、半乳糖、蔗糖及它们的衍生物中的1种或2种以上、或者

(c) 选自木糖、纤维二糖、葡糖醛酸、阿拉伯糖、甘露糖、半乳糖、蔗糖及它们的衍生物中的1种或2种以上,  
得到聚羟基烷酸。

[8]根据[1]~[7]任一项所述的制造方法,其中,聚羟基烷酸的重均分子量大于361万。

[9]根据[1]~[8]任一项所述的制造方法,其中,得到的聚羟基烷酸的重均分子量为600万以下。

[10]根据[1]~[9]任一项所述的制造方法,其中,海水包含浓缩的海水。

[11]根据[10]所述的制造方法,其中,浓缩的海水的盐分浓度为3.5%~20%。

[12]根据[1]~[11]任一项所述的制造方法,其中,培养基含有下述的成分或海水中的至少1种:

- (i) 人工海水素,
- (ii) 海洋深层水,和
- (iii) 天然海水。

[13]海水在聚羟基烷酸的制造方法中的应用,其中,所述聚羟基烷酸的制造方法包括以下工序:

- (a) 使用含有浓缩海水或未浓缩海水的培养基培养嗜盐菌的工序;和
- (b) 作为所述培养的培养产物,得到聚羟基烷酸的工序。

[14]聚羟基烷酸的制造方法,其包括以下工序:

使用含有海水的培养基培养嗜盐菌,作为培养产物,得到聚羟基烷酸,上述培养中的碳源含有糖和糠醛系化合物,该糖为:

(a) 仅葡萄糖和/或其衍生物,

(b) 葡萄糖及其衍生物以及选自木糖、纤维二糖、葡糖醛酸、阿拉伯糖、甘露糖、半乳糖、蔗糖及它们的衍生物中的1种或2种以上,或者

(c) 选自木糖、纤维二糖、葡糖醛酸、阿拉伯糖、甘露糖、半乳糖、蔗糖及它们的衍生物中的1种或2种以上。

[15]控制所制造的聚羟基烷酸的重均分子量的方法,其是使用含有海水的培养基培养嗜盐菌,控制作为培养产物得到的聚羟基烷酸的分子量的方法,其中,

所述培养中的碳源含有糖和糠醛系化合物,

该糖为:

(a) 仅葡萄糖和/或其衍生物,

(b) 葡萄糖及其衍生物以及选自木糖、纤维二糖、葡糖醛酸、阿拉伯糖、甘露糖、半乳糖、蔗糖及它们的衍生物中的1种或2种以上,或者

(c) 选自木糖、纤维二糖、葡糖醛酸、阿拉伯糖、甘露糖、半乳糖、蔗糖及它们的衍生物中的1种或2种以上。

[16]根据上述任一项所述的制造方法,其中,培养基还包含:并非来源于人工海水素的NaCl、并非来源于海洋深层水的NaCl、或并非来源于天然海水的NaCl。

[17]根据上述任一项所述的制造方法,其中,海水是人工海水,该人工海水中使用的人工海水素的量比通常用于制造人工海水的量多。

发明效果

[0011] 根据本发明,作为PHA的新的制造方法,提供使用过去没有使用的材料来制造PHA的方法。

过去曾有过关于使用海水制造PHA的报道(NBRC(独立行政法人制品评价技术基盘机构生物技术中心)的网站上的培养基一览(<https://www.nite.go.jp/nbrc/cultures/cultures/culture-list.html>),然而,在这些报道中公开的方法都只不过公开了以极端嗜盐菌的生长为目的的培养基,不涉及PHA的制造。另外,在现有技术中,各种成分在其浓度保持初始浓度或规定浓度的状态下使用,并未使用浓缩的海水来制造PHA。也就是说,迄今为止还不知道使用海水、特别是浓缩的海水来制造PHA。

[0012] 专利文献1(日本特开2016-185087号公报)中记载了将浓缩海水用水稀释而用于培养藻类的方法。然而,在该文献中,没有公开或暗示直接使用浓缩的海水或使用嗜盐菌。

专利文献2(日本特开2018-133997公报)中公开了:使生活在海水区域中的海洋性光合细菌产生PHA的方法;利用海水作为培养基;降低高盐浓度培养基中的污染风险。然而,在该文献中既没有公开关于嗜盐菌的记载,也没有关于使用浓缩的海水的记载。

专利文献3(日本特开2014-512194号公报)中公开了使用浓缩海水制造含有藻类所含有用成分的食盐的方法。

专利文献4(日本特开2012-210165号公报)中公开了一种关于从深海中分离出的产生PHA的菌,但所使用的组合物保持与海水几乎相同的浓度。

非专利文献1(Macromolecular Bioscience,2007,7,218)中公开了当使用Haloferax mediterranei培养时,能够产生77.8g/L的PHA。但是,该文献中没有关于海水的记载,当然也就更加没有公开或暗示浓缩海水(浓缩的海水)了。

[0013] 在海水淡化时,由于从海水中取出了淡水,因而存在大量产生比通常浓的海水的问题。目前,大部分的浓的海水被原样排放到海中,但人们担心由此导致的盐浓度的上升等周边环境的变化会对生态系统造成不良影响。

根据本发明制造方法中的包括作为海水使用浓缩海水的制造方法,由于提供了使用在海水淡化技术等中被废弃的浓海水的PHA的生物学制造方法,还起到了以下效果:可以使制备以食盐为代表的培养基中的无机盐类的成本比以往的方法低。

[0014] 另外,根据本发明,作为目前直接废弃的浓海水的新的利用方法,还具有提供用于培养嗜盐菌(优选极端嗜盐菌)的培养基的效果。

水资源的特点是可再生,但时期和地域分布不均,在缺水的地区,保障生活用水是健康文化生活不可回避的课题。在日本也存在大量的缺水的地区,例如,兵库县稻美町、香川县、爱知县的知多半岛和渥美半岛、千叶县的九十九里地区、南房总地区等,关于农业用水、生活用水,建设了:水坝、水渠等水利设施、圆柱形分水等用于正确分配水的水利设施。

近代以来,日本国内几乎解决了生活用水短缺的问题,但在海外,例如中东等水资源有限的地区,存在下雨带来的生活用水的保障困难的地域,在这些地域中,农业本身很困难,因此通过进口采购农产品,但确保生活用水的方法,例如海水淡化,是有力而重要的方法。

本发明使以中东地区为代表的世界各地成为问题的浓缩海水的再利用成为可能,在可以廉价地生产有用物质的基础上,有助于保护海洋的丰富性。

[0015] 根据本发明制造方法中的使用极端嗜盐菌(有时也称为“Haloearchaea”)的方法,实现了能够以低成本制造和回收PHA的效果。

已知在仅生活在高浓度氯化钠水溶液中的被称为极端嗜盐菌的类型中存在产生PHA的微生物。已知在高浓度氯化钠水溶液中产生PHA的菌体可以在产生PHA后在低浓度氯化钠水溶液中或水中溶菌,取出其中蓄积的PHA。通常,在从菌体中回收PHA时,大量使用有机溶剂、表面活性剂等,但在极端嗜盐菌的情况下,仅用水即可回收,因此在成本方面的优势更大。

尽管不受理论的束缚,但在本发明的制造方法中,认为通过使盐类的浓度高于普通海水或已知培养基的盐浓度,可促进目标微生物的生长,并提高PHA的生产效率。

## 附图说明

[0016] [图1]是表示实施例1~12(培养基:改变#1214)的3HV分率(%)、重均分子量(Mw)、干燥菌体重量(g/L)、以及PHBV的产量(g/L)的表。在各表中,“人工”表示使用人工海水的实施例1~4,“石垣(日本地名)”表示使用天然海水的实施例5~8,“深层”表示使用深层海洋水的实施例9~12,从左起依次表示为浓缩倍率1倍、2倍、3倍、4倍的例子。

[图2]是表示实施例13~24(培养基:改变#1338)的3HV分率(%)、重均分子量(Mw)、干燥菌体重量(g/L)、以及PHBV的产量(g/L)的表。在各表中,“人工”表示使用人工海水的实施例13~16,“石垣”表示使用天然海水的实施例17~20,“深层”表示使用深层海洋水的实施例21~24,从左起依次表示为浓缩倍率1倍、2倍、3倍、4倍的例子。

[图3]是表示实施例61~64(人工海水)、实施例65~68(天然海水)、以及实施例69~72(海洋深层水)的每一种浓缩程度(1倍~4倍)下的PHBV的产量(g/L)的表。

## 具体实施方式

[0017] 以下,更详细地说明本发明。予以说明,本说明书中的PHA的分子量是通过使用聚苯乙烯标准的凝胶过滤色谱法测得的数值,除非另有说明。

本说明书中,符号“~”表示通过由该符号连接的2个数值之间的范围确定的数值范围(包括上述2个数值)。例如,“20万~600万”的记载是指包括20万和600万在内的由20万至600万之间存在的所有数值构成的范围。有时使用“20万以上600万以下”的表述来表示相同的含义。

本说明书中,当聚合物的分子量用数值表示时,是指由包括所属技术领域的本领域技术人员能够理解的数值范围而规定的数值。

[0018] 本发明的PHA的制造方法如下所述:

一种聚羟基烷酸的制造方法,其包括以下工序:

- (a) 使用含有海水的培养基来培养微生物的工序;和
- (b) 作为所述培养的培养产物,得到聚羟基烷酸的工序。

[0019] 本发明中使用海水没有限定,可例示:

- (i) 使用人工海水素得到的海水、
- (ii) 海洋深层水、和
- (iii) 天然海水。

本发明中使用海水可以将上述(i)~(iii)的海水中的1种或2种以上以任意比例配合使用。

本发明中使用的(ii)海洋深层水或(iii)天然海水的产地没有限定。

本发明中使用的(ii)海洋深层水的种类没有限定,例如可举出从约200m以上深度的地点采集的海水。

本发明中使用的(iii)天然海水是指天然来源的海水中的(ii)海洋深层水以外的海水。

予以说明,已知天然来源的海水中的各金属盐类的含量比与采集地无关,大致是恒定的。

[0020] 本发明中,作为海水,优选使用浓缩的海水(本说明书中,有时也称为“浓缩海水”或“浓海水”)。

本发明中,也可以使用未浓缩的海水来代替后述的浓缩海水。使用未浓缩的海水的本发明的制造方法不需要对采集的海水进行前处理,具有作业负担小和成本低等优点。

[0021] 本发明中的浓缩海水中包含:

- (1) 在从海采集的海水中几乎不改变所含成分的量而仅减少水分含量的组合物,
- (2) 将由人工海水组合物得到的海水(组合物)浓缩而得到的组合物、或者利用比规定水分量少的水分调制人工海水组合物而得到的组合物,
- (3) 在不改变所含有成分的绝对量的情况下将从盐湖等海洋以外的具有盐水的场所采集的盐的水溶液浓缩或稀释至适当的或期望的程度的组合物,调整到比普通的海水高的盐浓度,以及

(4) 具有与上述(1)~(3)的组合物相同组成的组合物、或者具有向具有与(1)~(3)的组合物相同组成的组合物中添加盐类等成分而得到的组成的组合物

等。这些组合物中的盐浓度约大于3.5%。

本发明中,从大海采集的海水没有限定,除了盐浓度约为3.5%的海水以外,也包括盐浓度低于和高于约3.5%的海水。予以说明,本说明书中的海水等的“盐浓度”或“盐分浓度”的术语是指本技术领域常用的、包含约78%的氯化钠、约21%~22%的其他盐分(氯化镁、硫酸镁、硫酸钙、氯化钾等无机盐类)的海水等中的盐分、即由盐类构成的部分的浓度。

作为浓缩海水的盐分浓度,例如可举出3.5%~20%,优选为7%~14%。

本发明中的海水的浓度的表述中使用的%只要没有其他记载,则由w/v规定。

[0022] 在将使用海水或具有与海水相同组成的组合物调制而成的培养基用于培养微生物的过程中,由于水分的蒸发而组合物的比例相对变高的组合物本身与本发明的作为浓缩海水的组合物是不同的。

[0023] 在本发明中,在作为浓缩海水的从海中采集的海水中,在使用不改变所含成分的量而仅减少水分含量的组合物的情况下,即,在使用将海水浓缩而得到的组合物的情况下,浓缩的方法没有限定,可以使用加热浓缩、反渗透膜的方法、或者利用离子交换膜电渗析法进行浓缩的方法等。

另外,为了调整浓缩的程度,可以根据需要添加水。

[0024] 本发明中,在使用人工海水的情况下,人工海水的种类没有限定,可以使用市售的人工海水素来制造。作为市售的人工海水素,可例示:海产微小藻类用Daigo's人工海水SP、红海盐、人工海水Marineart、人工海水tetramarine盐、红十字海盐(Instant Ocean)。

[0025] 作为本发明中的浓缩的海水,可以使用将海洋深层水或天然海水浓缩而得到的组合物。

本发明中,在使用人工海水的情况下,培养基包含人工海水素以及非来源于该人工海水素的NaCl——有助于高分子量PHA的制造、PHA的产量的增加,因而是优选的。另外,也优选在培养基中含有人工海水的本发明的方法,所述人工海水是使用比通常用于制造人工海水的浓度高的浓度的人工海水素而得到的。

本发明中,在使用海洋深层水或天然海水的情况下,培养基含有非来源于海洋深层水或天然海水的NaCl——有助于高分子量PHA的制造,因而是优选的。

本发明中,作为使用人工海水时的培养基的例子,可例示使用由海水中含有的成分确定组成的一部分的已知培养基的培养基,优选改变NBRC(独立行政法人制品评价技术基盘机构生物技术中心)在网站上公开的培养基一览(<https://www.nite.go.jp/nbrc/cultures/cultures/culture-list.html>)中的No.1214或No.1338的培养基。这些培养基的组成如下所示:

培养基编号	1214
培养基	海洋嗜盐菌属(Halomarina 属)培养基
组成	
酪蛋白氨基酸	1 g
Bacto™ 酵母提取物(Difco)	1 g
NaCl	150 g
琼脂	15 g
人工海水	1 L
	pH 7.5
注释	

培养基编号	1338
培养基	NSSM 培养基
组成	
Bacto™ 酵母提取物(Difco)	1 g
酪蛋白氨基酸	1 g
Bacto™ 豚蛋白胍 No. 3(Difco)	3 g
葡萄糖	1 g
丙酮酸钠	0.05 g
NaCl	132 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.6 g
琼脂(如果需要)	20 g
人工海水	1 L
	pH 7.0-7.2
注释	

[0026] 本发明中的含有浓缩海水的培养基中,除了使用上述(1)~(4)例示的组合物的培养基以外,还包括在公知的微生物培养用培养基中,使用上述(1)~(4)例示的组合物的培养基中所含的微量金属盐的量为约1/32~约4倍的培养基。

作这样的培养基的例子,可举出作为规定了成分的人工海水的海产微小藻类用 Daigo's 人工海水 SP。Daigo's 人工海水 SP 的除氯化钠以外的盐(微量金属盐等)的浓度(mg/L)如下所示。

金属盐	培养基中的浓度(mg/1000mL)
MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	9474
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	1326
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	3505
KCl	597
NaHCO <sub>3</sub>	171
KBr	85
Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> · 10H <sub>2</sub> O	34

SrCl <sub>2</sub>	12
NaF	3
LiCl	1
KI	0.07
CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0.0002
AlCl <sub>3</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0.008
FeCl <sub>3</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0.005
Na <sub>2</sub> WO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.0002
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> · 4H <sub>2</sub> O	0.02
MnCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	0.0008

在本发明的制造方法中,可以使用以上表中的值的1.5倍以上的量含有这些金属盐的1种或2种以上的培养基,优选以3倍以上的量含有这些金属盐的1种或2种以上的培养基,更优选以约4倍的量含有这些金属盐的1种或2种以上的培养基。另外,在本发明的制造方法中,可以使用与上表中的值表示的金属盐的量相当的量的1.5倍以上的量、与上表中所示的金属盐不同的盐的形态含有这些金属盐中所含金属的1种或2种以上的培养基,优选以3倍以上的量来含有其的培养基,更优选以约4倍的量来含有其的培养基。通过增加金属盐的量,能够提高PHBV的生产效率,并且能够提高得到的PHBV的分子量。

[0027] 在本发明的制造方法中,可以原样使用未浓缩的海水或浓缩的海水,不在海水或培养基中添加特定的盐类中的1种或2种以上或者减少其添加量来使用。该方式能够利用海水成分置换作为培养基成分所必须的盐类,在成本和制造培养基的劳力方面占优势,因而是优选的。能够置换的盐类没有限定,可例示:钙盐、镁盐、钾盐、和氯化铁。

在本发明的制造方法中,可以向未浓缩的海水或浓缩的海水中适当添加盐类来制作培养基。

添加的盐类只要是对于所使用的微生物生长所必须的或者促进生长的盐类,就没有限定,可例示无机盐类和有机盐类。作为该盐类,可例示以下的盐类:

- NH<sub>4</sub>Cl、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、FeCl<sub>3</sub>、NaCl、MgCl<sub>2</sub>、MgSO<sub>4</sub>、CaCl<sub>2</sub>、KCl、NaHCO<sub>3</sub>、NaBr和Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>等无机盐类及其水合物;

- 柠檬酸钠、柠檬酸二钠、谷氨酸钠、柠檬酸三钠、次氨基三乙酸等有机盐类及其水合物。

[0028] 本发明制造方法所使用的培养基中的上述盐类的种类和量没有限定。例如,关于无机盐类中的NH<sub>4</sub>Cl、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、FeCl<sub>3</sub>、KCl、NaHCO<sub>3</sub>、NaBr和NaCl,分别可例示以下的量(g/L):

NH<sub>4</sub>Cl:0.1~2.5、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>:0.005~5.0、FeCl<sub>3</sub>:0.00001~0.01、KCl:0.3~3、NaHCO<sub>3</sub>:0.01~0.3、NaBr:0.03~0.5、NaCl:30~300。

[0029] 作为本发明制造方法中的总盐浓度,例如可举出100g/L~300g/L。总盐浓度优选为150g/L~250g/L。

作为本发明PHA的制造方法中使用的培养基,优选改变NBRC(独立行政法人制品评价技术基盘机构生物技术中心)在网站上公开的培养基一览(<https://www.nite.go.jp/nbrc/cultures/cultures/culture-list.html>)中的No.1214、No.1338、No.1380的培养基。从上述培养基一览中引用示出该No.1380的培养基组成(No.1214和No.1338的培养基组成

如上所述)：

培养基编号	1380
培养基	Halo 2g
组成	
葡萄糖	1.8 g
Bacto™酵母提取液 (Difco)	0.1 g
酪蛋白氨基酸	0.1 g
谷氨酸钠	1 g
柠檬酸三钠	1 g
KCl	2 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.3 g
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.15 g
NH <sub>4</sub> Cl	1 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	50 g
NaCl	200 g
微量元素溶液*	2 ml
琼脂 (如有需要)	20 g
蒸馏水	1 L
	pH 7.0-7.4
高压处理后, 加入经过滤灭菌的葡萄糖溶液	
*微量元素溶液	
次氨基三乙酸 (NTA)	12.8 g
FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	1.35 g
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0.1 g
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.024 g
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.1 g
ZnCl <sub>2</sub>	0.1 g
CuCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.025 g
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.01 g
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.024 g
NaCl	1 g
NiCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.12 g
蒸馏水	1 L
首先使次氨基三乙酸溶解并用 NaOH 调节至 pH6.5, 然后加入矿物质。 最终 pH7.0。	
注释	

[0030] 另外, 例如在使用富营养状态你的浓海水的情况下, 优选通过适当沉淀磷等的过剩的营养素等的方法进行精制。

[0031] 浓缩的海水有可能存活其他微生物和/或病毒等。优选在制造PHA之前除去这些其他微生物和/或病毒。该除去的方法没有限定, 可以通过加入适量盐类使盐浓度上升而进行的灭菌、利用高压釜、过滤灭菌等公知的方法的灭菌。

[0032] 在本发明的制造方法中, 可以在培养基中添加糖。此类糖不包括其他营养来源如酵母提取物中所含的糖。该糖是指与酵母提取物等其他营养来源分开供应的糖。

本发明制造方法中使用的糖还包括上述各糖的衍生物。作为糖的衍生物, 可以设想上述糖被醚化、酯化的衍生物, 特别是作为醚化的衍生物, 可例示被甲氧基化的衍生物, 作为酯化的衍生物, 可例示被乙酰化的衍生物。

[0033] 在本发明的制造方法中,例如可以控制PHA的分子量在100万~600万的重均分子量来制造PHA,可以通过进一步添加糠醛系化合物作为碳源而得到更低分子量的PHA,可以制造具有更广范围分子量的PHA。在进一步添加作为碳源的糠醛系化合物的本发明的制造方法中,所制造的PHA的分子量没有限定,例如可以控制PHA的分子量在20万~600万的重均分子量来制造PHA,关于使用糠醛系化合物的本发明的制造方法,在后面进一步叙述。

作为本发明的制造方法,优选将PHA的分子量控制在100万~575万的重均分子量来制造PHA的方法。

[0034] <碳源>

在本发明的制造方法中,可以加入碳源。

作为该碳源,当使用

(a) 仅葡萄糖和/或其衍生物

时,生成的PHA的分子量有增大的倾向,

作为上述碳源,当使用

(b) 葡萄糖及其衍生物以及选自木糖、纤维二糖、葡糖醛酸、阿拉伯糖、甘露糖、半乳糖、蔗糖及它们的衍生物中的1种或2种以上

时,生成的PHA的分子量有小于上述(a)的情况的倾向,

作为上述碳源,当使用

(c) 选自木糖、纤维二糖、葡糖醛酸、阿拉伯糖、甘露糖、半乳糖、蔗糖及它们的衍生物中的1种或2种以上、而不使用葡萄糖和/或其衍生物

时,生成的PHA的分子量有进一步小于上述(b)的情况的倾向。

[0035] 本发明的制造方法中使用的糖的量(培养的初始浓度)没有限定,可例示约5g/L~910g/L。作为糖的量,优选为约5g/L~约500g/L,更优选为约10g/L~50g/L。

在本发明的制造方法中,所使用的糖可以分多次投入。投入的次数、时机及总投入量没有限定,作为次数,可以为2次、3次、4次、5次或6次以上。另外,可以连续供给糖,此时,可以使用控制以保持糖浓度恒定、控制以保持供给速率恒定的方法。

[0036] 在本发明的制造方法中,如上所述,通过进一步添加作为碳源的糠醛系化合物,能够控制PHA的分子量在更宽范围的分子量、例如20万~600万的重均分子量来制造PHA。

[0037] 已知糠醛系化合物是以糖质为原料生产的醛的一种,通过将糖质在酸性条件下加热等,从六碳糖生成5-羟甲基糠醛(HMF),从五碳糖生成糠醛。在糠醛系化合物中,“糠醛”是2-呋喃基醛的统称。

本发明中的“糠醛系化合物”是指糠醛和5-羟甲基糠醛、以及它们的衍生物。

虽然不受理论的束缚,但糠醛化合物之所以能通过更宽的分子量范围内控制PHA的分子量来制造PHA,是因为糠醛系化合物具有容易引起聚合生成的聚合物链的链转移反应的可能性。认为:通过聚合生成聚合物时,通过糠醛系化合物来促进较低分子量聚合物链的生长末端移动,使得该聚合物链的伸长停止,与该聚合物不同的下一个聚合物链开始伸长,因此得到的PHA的分子量小于不使用糠醛系化合物时的分子量。

[0038] 在使用糠醛系化合物的本发明的制造方法或控制方法中使用的糠醛系化合物的种类没有限定,可例示糠醛和5-羟甲基糠醛、以及它们的衍生物。作为这样的衍生物,可举出5-羟甲基呋喃甲酸、5-羟基糠醇、呋喃-2,5-双甲醇、以及它们的醚化或酯化的衍生物。作

为醚化,可例示甲氧基化,作为酯化,可例示乙酰化和甲酯化。

优选糖为葡萄糖及其衍生物、以及选自木糖、纤维二糖、葡糖醛酸、阿拉伯糖、甘露糖、半乳糖、蔗糖及它们的衍生物中的1种或2种以上、糠醛系化合物为糠醛和/或5-羟甲基糠醛或它们的衍生物的本发明的制造方法或本发明的控制方法。

[0039] 本发明的制造方法中使用的糠醛系化合物的量没有限定,作为培养的初始浓度,可例示约0.01~约3.0g/L。作为糠醛系化合物的初始浓度,优选为0.01g/L~1g/L。

所使用的糠醛系化合物的量相对于糖的量的比例没有限定,可例示为约0.0025~约0.6。优选所使用的糠醛系化合物的量相对于糖的量的比例为0.01~0.2的本发明的制造方法或本发明的控制方法。

[0040] <微生物>

本发明的制造方法中使用的微生物没有限定,作为该微生物,优选嗜盐菌,特别优选极端嗜盐菌。这是因为:嗜盐菌(包括极端嗜盐菌)是本发明制造方法中的适合培养的微生物,另外,不仅PHA的生产能力高,而且生产的PHA容易回收。

极端嗜盐菌中,优选盐富饶菌属(Haloferax属)、盐碱球菌属(Halalkalicoccus属)、嗜盐古细菌属(Haloarchaeobius属)、盐盒菌属(Haloarcularia属)、嗜盐杆菌属(Halobacterium属)、嗜盐棒菌属(Halobaculum属)、嗜盐球菌属(Halococcus属)、盐颗菌属(Halogranum属)、海洋嗜盐菌属(Halimarina属)、嗜盐红菌属(Halorubrum属)、盐陆生菌属(Haloterrigena属)、钠白菌属(Natrialba属)、嗜盐嗜碱杆菌属(Natronobacterium属),特别优选地中海富盐菌(Haloferax mediterranei)。

[0041] <其他培养条件>

关于本发明的PHA的制造方法中的微生物的培养,对于上述碳源和微生物以外的条件没有限定,可以使用本技术领域通常使用的条件或公知的条件。

另外,作为本发明的制造方法中的培养中使用的培养基,为固体、液体、凝胶状均可,从生产速度的观点出发,优选为液体培养基。

此外,本发明的制造方法的培养中,作为总盐浓度,例如可举出100g/L~300g/L。如上所述,总盐浓度优选为150g/L~250g/L。

作为所使用的培养基,例如可举出含有 $\text{NH}_4\text{Cl}$ 、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、 $\text{FeCl}_3$ 、 $\text{NaCl}$ 、 $\text{MgCl}_2$ 、 $\text{MgSO}_4$ 、 $\text{CaCl}_2$ 、 $\text{KCl}$ 、 $\text{NaHCO}_3$ 和 $\text{NaBr}$ 等无机盐类的培养基。这些无机盐类的种类和量没有限定,例如关于 $\text{NH}_4\text{Cl}$ 、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、 $\text{FeCl}_3$ 、 $\text{KCl}$ 、 $\text{NaHCO}_3$ 、 $\text{NaBr}$ 和 $\text{NaCl}$ ,可分别例示以下的量(g/L):

$\text{NH}_4\text{Cl}$ :0.1~2.5、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ :0.005~5.0、 $\text{FeCl}_3$ :0.00001~0.01、 $\text{KCl}$ :0.3~3、 $\text{NaHCO}_3$ :0.01~0.3、 $\text{NaBr}$ :0.03~0.5、 $\text{NaCl}$ :30~300。

作为本发明的PHA的制造方法中使用的培养基,优选NBRC(独立行政法人制品评价技术基盘机构生物技术中心)在网站中公开的培养基一览(<https://www.nite.go.jp/nbrc/cultures/cultures/culture-list.html>)中的No.1380培养基。从上述培养基一览中引用示出该No.1380的培养基组成:

培养基编号	1380
培养基	Halo 2g
组成	
葡萄糖	1.8 g
Bacto™ 酵母提取液 (Difco)	0.1 g
酪蛋白氨基酸	0.1 g
谷氨酸钠	1 g
柠檬酸三钠	1 g
KCl	2 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.3 g
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.15 g
NH <sub>4</sub> Cl	1 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	50 g
NaCl	200 g
微量元素溶液*	2 ml
琼脂 (如有需要)	20 g
蒸馏水	1 L
	pH 7.0-7.4
高压处理后, 加入经过滤灭菌的葡萄糖溶液	
*微量元素溶液	
次氨基三乙酸 (NTA)	12.8 g
FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	1.35 g
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0.1 g
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.024 g
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.1 g
ZnCl <sub>2</sub>	0.1 g
CuCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.025 g
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.01 g
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.024 g
NaCl	1 g
NiCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.12 g
蒸馏水	1 L
首先使次氨基三乙酸溶解并用 NaOH 调节至 pH6.5, 然后加入矿物质。 最终 pH7.0.	
注释	

[0042] 进一步说明本发明制造方法中的用于培养微生物的培养基中所含的营养源, 作为碳源, 如上所述, 至少使用上述任意的糖, 作为培养微生物时的与上述糖不同的碳源, 可以使用氨基酸类、醇类、油脂类和/或脂肪酸类等通常用于培养微生物的碳源。具体地, 可例示以下物质:

作为氨基酸类, 甘氨酸、丙氨酸、苯丙氨酸、赖氨酸、亮氨酸、酪蛋白氨基酸、谷氨酸;

作为醇类, 甲醇、乙醇、1-丙醇、2-丙醇、甘油;

作为油脂类, 棕榈油、棕榈仁油、玉米油、椰子油、橄榄油、大豆油、和菜籽油;

作为脂肪酸类, 乙酸、丙酸、丁酸、戊酸、己酸、巴豆酸、柠檬酸、和丙酮酸及它们的钠盐、铵盐。在使用脂肪酸类的情况下, 该脂肪酸类的量优选为少量。

[0043] 在本发明制造方法中的用于培养微生物的培养基中, 还可以含有氮源、无机盐类

等。

作为氮源,例如可举出:氨、氯化铵、硫酸铵、磷酸铵等铵盐,此外还可举出:蛋白胨、肉提取物、酵母提取物等。

作为无机盐类,例如可举出:磷酸二氢钾、磷酸氢二钠、磷酸镁、硫酸镁、氯化钠、氯化锰(II)、氯化钴(II)、氯化钙、氯化锌、氯化铜(II)、硼酸( $H_3BO_3$ )、锰酸钠( $Na_2MnO_4$ )和氯化镍(II)等。本发明中,可以以水合物的形态使用包含这些无机盐类的各种盐类。另外,例如,作为钙盐,优选利用扇贝壳等废弃物。

[0044] 本发明的制造方法中培养微生物时的培养温度只要是该微生物能够生长的温度即可,没有限定,例如可举出约 $10^{\circ}C$ ~约 $65^{\circ}C$ ,优选为 $20^{\circ}C$ ~ $50^{\circ}C$ ,更优选为 $35^{\circ}C$ ~ $45^{\circ}C$ 。

在本发明的制造方法中,关于添加碳源、无机盐类、有机营养源的时机没有限定,可以根据目的适当选择使用一般使用的分批培养、流加培养、连续培养等方法。

作为本发明制造方法中的微生物的培养时间,分批培养中可例示24小时~168小时,流加培养中可例示72小时~14天,连续培养中可例示超过14天的长时间,但不限定为这些时间。

在本发明的制造方法中,为了在培养中使pH不易变化,可以添加缓冲液。作为该缓冲液,可举出:Tris盐酸缓冲液、PIPES、HEPES等。优选使用PIPES、HEPES,因为缓冲液本身在培养时难以用作氮源、碳源、硫化物源。

作为缓冲液的浓度,可举出 $5g/L$ ~ $40g/L$ ,优选为 $10$ ~ $20g/L$ 。

当在含有缓冲液的培养基中使用烧瓶进行振荡培养时,即使不调整pH,pH也不会轻易变化,因此可以认为与保持pH恒定的发酵罐中的培养条件相似。

为了在本发明的方法中在培养中保持pH恒定,可以适当添加氨、氢氧化钾、氢氧化钠、磷酸三钾之类的碱性成分。

[0045] 在本发明的制造方法中,优选增大培养基中的溶解氧量,更优选将培养基中的溶解氧量保持在饱和量。

在本发明的制造方法中,培养基的pH没有限定,优选将培养基的初始pH设为约 $6.5$ ~约 $7.5$ 。更优选:将培养基的初始pH设为约 $6.5$ ~约 $7.5$ 、且使培养过程中的培养基的pH维持在约 $6.5$ ~约 $7.5$ 。进一步优选使这些pH设为约 $7.0$ ~约 $7.4$ 。

[0046] 在本发明的控制方法中,也可以使用本发明的制造方法中使用的其他培养条件。

[0047] <通过本发明制造方法制造的PHA>

作为本发明制造方法中的产物的PHA的种类没有限定,可例示:PHBV、PHB(聚羟基丁酸酯)、聚(羟基丁酸酯/羟基己酸酯)、以及聚(3-羟基丁酸酯/4-羟基丁酸酯)。其中,PHBV和/或PHB是优选的产物。

[0048] 通过本发明制造方法制造的PHA可以通过使用有机溶剂、表面活性剂、低浓度氯化钠水溶液或水的离心分离、利用过滤、沉淀的公知方法从菌体中回收。

本发明的制造方法中微生物所产生的PHA的生产量和3HV分率可以使用GC-MS法等公知的方法来测定。当通过本发明制造方法得到的PHA为共聚物时,第2成分的分率也可以使用GC-MS法等公知的方法来确定。

对于葡萄糖或其衍生物、其他糖质、糠醛系化合物的浓度测定,可以使用利用市售的浓度测定试剂盒进行的测定、HPLC法等公知的方法。

在本发明的制造方法中培养微生物时,在有必要确定微生物菌体的生产量的情况下,可以通过吸光度法、干燥菌体重量测定法等公知的方法测定微生物菌体的生产量。

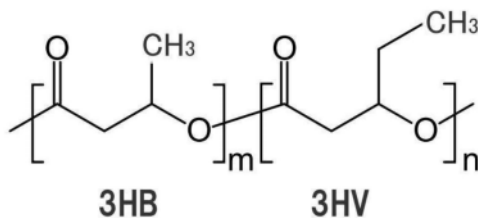
此外,通过本发明制造方法得到的PHA的分子量的测定也可以通过公知方法来进行,例如,可以通过使用聚苯乙烯标准的凝胶过滤色谱来进行。如上所述,只要没有特别说明,本说明书中的PHA的分子量使用通过使用聚苯乙烯标准的凝胶过滤色谱法测得的数值。

通过本发明制造方法制造的PHA的重均分子量在不使用糠醛系化合物的情况下为约100万~约600万,在使用糠醛系化合物的情况下为约20万~约600万。可以在本发明的制造方法中对各范围中得到的PHA的分子量进行控制或调节。

#### [0050] 2. PHBV

通过本发明的制造方法,还提供3-羟基丁酸(3HB)与3-羟基戊酸(3HV)无规共聚而成的共聚物(以下有时也称为“PHBV”),该PHBV的重均分子量超过361万,优选分子量超过400万。作为本发明的PHBV,更优选分子量超过500万,进一步优选分子量超过570万。

本发明的PHBV以PHBV整体的分子量超过361万的任意组合的方式含有以下所示的结构单元(下式中,m和n表示整数):



本发明的PHBV的结构、单体组成和分子量没有限定,只要分子量超过361万即可。本发明的PHBV为线状,本发明的PHBV优选至少基本上为直链状。

如上所述,本发明的PHBV是3HB与3HV无规共聚而成的共聚物,也包括通过3HB与3HV的交替共聚或嵌段共聚而生成的共聚物。

本发明的PHBV中,构成PHBV的3-羟基丁酸与3-羟基戊酸的摩尔比没有限定。本发明的PHBV优选3HV分率(相对于构成共聚物的3-羟基丁酸的摩尔数和3-羟基戊酸的摩尔数的总和,3-羟基戊酸的摩尔数的比例)为约5.0%~约40.0%,本发明的PHBV更优选3HV分率为约5.0%~约28.0%,本发明的PHBV更进一步优选3HV分率为约7.0%~18.0%,本发明的PHBV再进一步优选3HV分率为约9.0%~约15.0%。

本发明的PHBV中,优选具有超过以往的PHBV的特性、特别是具有比以往的PHBV柔软和/或强度更优异的特性的PHBV。本发明的PHBV中,优选拉伸强度优异的PHBV。

本发明的PHBV中,优选通过冷拉伸成为拉伸强度更优异的材料PHBV。优选冷拉伸后的拉伸强度为240MPa以上的PHBV,更优选该拉伸强度为250MPa以上的PHBV,进一步优选该拉伸强度为255MPa以上的PHBV。

根据本发明,还提供对3-羟基丁酸和3-羟基戊酸无规共聚而成的重均分子量大于361万的共聚物进行冷拉伸而得到的膜。该膜具有与重均分子量为100万的普通分子量的PHBV相比拉伸强度优异的特征。

本发明的上述膜中,优选拉伸强度为240MPa以上的膜,更优选该拉伸强度为250MPa以上的膜,进一步优选该拉伸强度为255MPa以上的膜。

此外,冷拉伸包括以下工序的上述膜能够更可靠地获得拉伸强度优异的膜,因而

是优选的：

- (1) 使3-羟基丁酸和3-羟基戊酸无规共聚而成的共聚物熔融而得到熔融膜；
- (2) 使(1)中得到的熔融膜在冰水中骤冷而制作非晶膜；
- (3) 将(2)中得到的非晶膜直接在冰水中拉伸至10倍长度而使非晶膜取向；
- (4) 对(3)中得到的取向后的膜进行张力热处理使其结晶化而得到经过冷拉伸的膜。

考虑到冷拉伸导致的拉伸强度的提高,3HV分率为5%以上的膜的冷拉伸导致的拉伸强度的提高显著,因而是优选的。推测这是因为,以5%以上的比例含有3HV成分的晶体能够在实现与PHB同等强度的基础上在170℃熔化,但本发明发挥效果的机制不受该理论的限制。本发明的PHBV更优选3HV分率为5%~15%。

[0054] 用于制造本发明的PHBV的方法只要是包括上述工序(a)和(b)的方法就没有限定,可以是任何能够制造重均分子量超过361万的PHBV的方法。

作为该方法,可例示对微生物进行培养,得到作为培养产物的本发明的PHBV的方法,优选使用极端嗜盐菌作为上述培养中的微生物、使用葡萄糖和/或其衍生物作为碳源的方法,特别优选使用葡萄糖的方法。因为:利用这些方法,能够有效制造重均分子量超过361万的PHBV,此外,能够简便地回收所制造的PHBV。

[0055] 在使用本发明的上述PHA的制造方法制造本发明的PHBV的情况下,作为碳源的糖类可以为

(a) 仅葡萄糖和/或其衍生物、或

(b) 葡萄糖及其衍生物以及选自木糖、纤维二糖、葡糖醛酸、阿拉伯糖、甘露糖、半乳糖、蔗糖及它们的衍生物中的1种或2种以上。

本发明的PHBV使用酵母提取物制造,但即使不添加酵母提取物中含有的氨基酸等碳源以外的碳源,也可以制造。通过使用酵母提取物中含有的氨基酸等碳源以外的碳源,能够以更低的成本制造本发明的PHBV。

[0056] (本发明的实施例)

通过实施例和参考例更具体地说明本发明。本发明在任何意义上都不受这些实施例的限定。

在所有的实施例中,只要未另行说明,都使用NBRC提供的菌株——地中海富盐菌(*Haloferax mediterranei*)NBRC 14739进行实验。

在所有的实施例中,只要未另行说明,将上述菌用各例的项目中所示的方法、条件培养后,通过使用聚苯乙烯标准的GPC(凝胶过滤色谱)测定通过培养得到的PHA(PHBV)的分子量,表示为分子量。

GPC测定中使用东曹株式会社制的EcoSEC HLC-8320GPC。保护柱使用TSKgel guardcolumn SuperHZ-H,色谱柱串联使用两根TSKgel Super HZM-H。流动相使用氯仿(0.6mL/min),柱温设为40℃。样品浓度设为约0.5mg/mL,样品注入量设为10μL。校正曲线的制作中使用聚苯乙烯标准。

共聚物的3-羟基戊酸(3HV)分率和PHBV生产量的测定使用气相色谱—质谱分析(GC-MS法)如下进行(设备名:Agilent 6890/5973GCMS System)。即,如下进行:在约2mg~25mg的干燥菌体中添加2ml的硫酸-甲醇混合液(15:85)和2ml的氯仿,密封,在100℃下加热

140分钟,从而得到聚酯分解物的甲酯,向其中加入1mL水并搅拌后,通过GC-MS法对氯仿层进行分析。

这些PHA的生产量、分子量、3HV分率的测定方法是作为用于确定PHA的生产量、分子量、3HV分率的方法在本技术领域通常使用的方法。此外,通过这些方法确定的PHA的生产量、分子量和3HV分率的数值能够与公知文献中记载的PHA的生产量、分子量和3HV分率的数值分别准确地比较其大小。

干燥菌体重量可以通过冻干法等公知的方法测定。想要对干燥菌体中所含的无机盐进行定量时,可以使用在高温下使无机盐以外的有机物全部热分解的方法。

在本实施例中,作为海水,使用人工海水、天然海水和海洋深层水。人工海水使用Daigo's人工海水SP,天然海水使用日本石垣岛的海水。人工海水的成分如表1所示。天然海水和海洋深层水的成分如表2所示。予以说明,对于表2中所示的化合物以外的成分,未进行分析。

[0057] [人工海水的成分]

[表1]

金属盐	培养基中的浓度 (mg/1000mL)
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	9474
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	1326
$Na_2SO_4$	3505
KCl	597
$NaHCO_3$	171
KBr	85
$Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$	34
$SrCl_2$	12
NaF	3
LiCl	1
KI	0.07
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0.0002
$AlCl_3 \cdot 6H_2O$	0.008
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	0.005
$Na_2WO_4 \cdot 2H_2O$	0.0002
$(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$	0.02
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	0.0008
NaCl	20747

[天然海水和海洋深层水的成分]

[表2]

	天然海水 (石垣島)	海洋深層水
氯化钠 (g/L)	23.79	23.45
硫酸根离子 (g/L)	2.2	2.2
钙 (g/L)	0.32	0.33
镁 (g/L)	1.1	1.1
钾 (g/L)	0.32	0.32
溴离子 (g/L)	65	64
铜 (g/L)	<0.2 <sup>a)</sup>	<0.2

a) “<0.2”表示小于0.2mg/L。

[0058] 实施例1~12

[材料和方法]

关于*Haloferax mediterranei*,参考NBRC指定培养基No.1214来制备培养基(NBRC指定培养基No.1214的成分组成如前述和后述)。实施例1~4、5~8、9~12分别采用人工海水、天然海水、海洋深层水作为海水。在实施例1~4、5~8、9~12中,为了使海水的浓缩率分别为1倍(普通海水)、2倍、3倍、4倍,且使总盐浓度一致,以表3中所示的量进一步添加氯化钠。向300mL容量的三角烧瓶中加入50mL培养基,在200rpm、37℃下培养72h。

[0059] [结果]

如下表(表3和表4、图1)所示。在任一种海水中,随着海水浓度的增加,均得到了以下结果:3HV分率下降、干燥菌体重量上升、PHBV产量增加、以及分子量稳定且取得了较高的值。

[表3]

	海水的 种类	海水的 浓缩率	海水 (g/L)	氯化钠 (g/L)	酪蛋白氨基酸 (g/L)	酵母提取物 (g/L)	葡萄糖 (g/L)
实施例1	人工海水	1倍	36	150	1	1	5
实施例2	人工海水	2倍	72	114	1	1	5
实施例3	人工海水	3倍	108	78	1	1	5
实施例4	人工海水	4倍	144	42	1	1	5
实施例5	天然海水	1倍	36	150	1	1	5
实施例6	天然海水	2倍	72	114	1	1	5
实施例7	天然海水	3倍	108	78	1	1	5
实施例8	天然海水	1倍	144	42	1	1	5
实施例9	海洋深層水	1倍	36	150	1	1	5
实施例10	海洋深層水	2倍	72	114	1	1	5
实施例11	海洋深層水	3倍	108	78	1	1	5
实施例12	海洋深層水	4倍	144	42	1	1	5

[表4]

	海水的 种类	浓度	DCW (g/L)	PHA (g/L)	3HV (mol%)	Mw ( $\times 10^6$ )	Mw/Mn
实施例1	人工海水	1倍	0.49	0.19	13.5	4.55	1.96
实施例2	人工海水	2倍	1.28	0.48	9.03	5.39	1.62
实施例3	人工海水	3倍	1.68	0.64	8.64	5.46	1.55
实施例4	人工海水	4倍	1.88	0.76	8.47	5.20	1.79
实施例5	天然海水	1倍	0.44	0.25	14.0	4.44	1.75
实施例6	天然海水	2倍	1.03	0.26	13.6	3.70	1.92
实施例7	天然海水	3倍	1.83	0.62	9.23	4.49	1.77
实施例8	天然海水	4倍	1.32	0.43	9.33	4.65	1.76
实施例9	海洋深層水	1倍	0.90	0.28	13.2	4.11	1.71
实施例10	海洋深層水	2倍	1.03	0.25	14.3	4.11	1.93
实施例11	海洋深層水	3倍	1.09	0.31	11.9	4.62	1.73
实施例12	海洋深層水	4倍	1.62	0.44	10.1	4.15	1.90

## [0060] 实施例13~24

## [材料和方法]

关于*Haloferax mediterranei*,参考NBRC指定培养基No.1338来制备培养基(NBRC指定培养基No.1338的成分组成如前述和后述)。实施例13~16、17~20、21~24分别采用人工海水、天然海水、和海洋深层水作为海水。在实施例13~16、17~20、21~24中,为了使海水的浓缩率分别为1倍(普通的海水)、2倍、3倍、4倍,且使总盐浓度一致,以表5中所示的量进一步添加氯化钠。向300mL容量的三角烧瓶中加入50mL培养基,在200rpm、37℃下培养72h。

[表 5]

海水种类	海水的浓缩率	海水 (g/L)	氯化钠 (g/L)	酪蛋白氨基酸 (g/L)	酵母提取物 (g/L)	蛋白胨 (g/L)	丙酮酸钠 (g/L)	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (g/L)	葡萄糖 (g/L)
实施例13	人工海水 1倍	36	132	1	1	3	1	1	5
实施例14	人工海水 2倍	72	96	1	1	3	1	1	5
实施例15	人工海水 3倍	108	60	1	1	3	1	1	5
实施例16	人工海水 4倍	144	24	1	1	3	1	1	5
实施例17	天然海水 1倍	36	132	1	1	3	1	1	5
实施例18	天然海水 2倍	72	96	1	1	3	1	1	5
实施例19	天然海水 3倍	108	60	1	1	3	1	1	5
实施例20	天然海水 4倍	144	24	1	1	3	1	1	5
实施例21	海洋深層水 1倍	36	132	1	1	3	1	1	5
实施例22	海洋深層水 2倍	72	96	1	1	3	1	1	5
实施例23	海洋深層水 3倍	108	60	1	1	3	1	1	5
实施例24	海洋深層水 4倍	144	24	1	1	3	1	1	5

[0061] [结果]

如下表(表6、图2)所示。在任一种海水中,随着海水浓度的增加,均得到了以下结

果:3HV分率下降、干燥菌体重量上升、PHBV产量增加、以及分子量稳定且取得了较高的值。

[表6]

	海水的 种类	浓度	DCW (g/L)	PHA (g/L)	3HV (mol%)	Mw ( $\times 10^6$ )	Mw/Mn
实施例13	人工海水	1倍	0.92	0.20	12.3	3.78	2.61
实施例14	人工海水	2倍	1.50	0.37	10.3	4.60	1.73
实施例15	人工海水	3倍	2.61	0.53	9.17	4.40	1.95
实施例16	人工海水	4倍	3.24	1.11	6.81	4.77	2.14
实施例17	天然海水	1倍	0.92	0.50	11.85	3.88	1.84
实施例18	天然海水	2倍	1.14	0.43	14.1	3.31	2.04
实施例19	天然海水	3倍	1.46	0.52	12.9	3.91	2.04
实施例20	天然海水	4倍	1.77	0.63	12.5	4.69	1.56
实施例21	海洋深層水	1倍	0.59	0.23	15.7	4.26	1.78
实施例22	海洋深層水	2倍	0.75	0.35	14.2	3.63	1.93
实施例23	海洋深層水	3倍	0.79	0.42	13.3	4.55	1.62
实施例24	海洋深層水	4倍	1.13	0.41	13.2	5.03	1.42

[0062] 比较例1、实施例25~36、比较例2、实施例37~48(无机盐是否可以用海水成分置换)

[材料和方法]

关于Haloferax mediterranei,如下表(表7)所示,制备改变了BSM培养基(关于BSM培养基,记载于参考例B)的培养基(实施例25~36)和改变了1380培养基的培养基(实施例37~48)。

在这些实施例中,将BSM培养基或1380培养基中所含的无机盐类中的除了铵盐和磷酸盐以外的所有的无机盐类(钙盐、镁盐、钾盐、微量金属盐类)用海水置换。作为与上述实施例对应的比较例,制备比较例1和2。

更详细而言,不改变有机营养源的种类和量,在实施例25~48中,作为盐,并用海水和氯化钠、以及铵盐和磷酸盐。在比较例1和2中,

不使用海水,作为盐,仅添加与实施例相同的盐(氯化钠、铵盐和磷酸盐)。向300mL容量的三角烧瓶中加入50mL培养基,在200rpm、37℃下培养72h。

[表 7]

海水种类	海水的浓缩率	海水 (g/L)	氯化钠 (g/L)	氯化铵 (g/L)	磷酸二氢钾 (g/L)	酵母提取物 (g/L)	酪蛋白氨基酸 (g/L)	谷氨酸钠 (g/L)	柠檬酸钠二水合物 (g/L)	葡萄糖 (g/L)
比较例1	-	0	239	2	0.0375	5				5
比较例2	-	0	239	2	0.0375	1	0.1	1	1	5
实施例25	1倍	36	203	2	0.0375	5				5
实施例26	2倍	72	167	2	0.0375	5				5
实施例27	3倍	108	131	2	0.0375	5				5
实施例28	4倍	144	95	2	0.0375	5				5
实施例29	1倍	36	203	2	0.0375	5				5
实施例30	2倍	72	167	2	0.0375	5				5
实施例31	3倍	108	131	2	0.0375	5				5
实施例32	4倍	144	95	2	0.0375	5				5
实施例33	1倍	36	203	2	0.0375	5				5
实施例34	2倍	72	167	2	0.0375	5				5
实施例35	3倍	108	131	2	0.0375	5				5
实施例36	4倍	144	95	2	0.0375	5				5
实施例37	1倍	36	203		0.0375	1	0.1	1	1	5
实施例38	2倍	72	167		0.0375	1	0.1	1	1	5
实施例39	3倍	108	131		0.0375	1	0.1	1	1	5
实施例40	4倍	144	95		0.0375	1	0.1	1	1	5
实施例41	1倍	36	203		0.0375	1	0.1	1	1	5
实施例42	2倍	72	167		0.0375	1	0.1	1	1	5
实施例43	3倍	108	131		0.0375	1	0.1	1	1	5
实施例44	4倍	144	95		0.0375	1	0.1	1	1	5
实施例45	1倍	36	203		0.0375	1	0.1	1	1	5
实施例46	2倍	72	167		0.0375	1	0.1	1	1	5
实施例47	3倍	108	131		0.0375	1	0.1	1	1	5
实施例48	4倍	144	95		0.0375	1	0.1	1	1	5

[0063] [结果]

如下表(表8)所示。与比较例1、2相比,通过使用海水,产生了更多的超高分子量

PHA。可知:除了氯化钠以外的无机盐类可以被海水代替。在成本方面和制作培养基的功夫方面显示出优越性。

另一方面,表8中标记为“PHA”的PHBV的产量与实施例1~24(表4)是同等的。认为这可能是因为在培养中的pH降低对细菌的生长产生影响。

[表8]

	海水的 种类	海水的 浓缩率	DCW (g/L)	PHA (g/L)	3HV (mol%)	Mw ( $\times 10^6$ )	Mw/Mn
比较例1	-	-	0.60	0.22	12.6	3.34	1.85
比较例2	-	-	0.49	0.084	11.9	4.88	1.52
实施例25	人工海水	1倍	2.28	1.11	7.40	4.25	1.74
实施例26	人工海水	2倍	2.69	0.94	7.37	3.94	2.04
实施例27	人工海水	3倍	3.71	1.76	6.07	4.48	1.69
实施例28	人工海水	4倍	4.09	2.10	6.15	4.30	1.73
实施例29	天然海水	1倍	3.90	1.77	7.05	4.09	1.76
实施例30	天然海水	2倍	2.53	1.45	6.44	4.49	1.81
实施例31	天然海水	3倍	2.50	0.92	7.36	3.28	1.99
实施例32	天然海水	4倍	2.63	0.88	6.99	3.23	2.26
实施例33	海洋深層水	1倍	2.83	1.29	7.45	3.42	1.89
实施例34	海洋深層水	2倍	2.06	0.85	8.20	3.22	2.10
实施例35	海洋深層水	3倍	2.41	0.71	7.70	3.16	2.30
实施例36	海洋深層水	4倍	2.29	0.70	7.41	3.18	2.00
实施例37	人工海水	1倍	1.08	0.51	12.8	5.47	1.47
实施例38	人工海水	2倍	1.67	0.79	7.71	5.26	1.49
实施例39	人工海水	3倍	1.84	0.74	7.24	5.28	1.44
实施例40	人工海水	4倍	2.26	0.86	6.20	4.94	1.74
实施例41	天然海水	1倍	1.27	0.42	12.8	5.05	1.67
实施例42	天然海水	2倍	1.27	0.46	11.5	5.37	1.41
实施例43	天然海水	3倍	1.74	0.73	9.02	5.28	1.44
实施例44	天然海水	4倍	1.95	1.01	7.39	5.22	1.46
实施例45	海洋深層水	1倍	0.99	0.42	13.2	4.65	1.92
实施例46	海洋深層水	2倍	1.26	0.47	12.4	5.30	1.54
实施例47	海洋深層水	3倍	1.17	0.57	9.78	5.27	1.54
实施例48	海洋深層水	4倍	1.63	0.58	8.38	5.63	1.46

[0064] 比较例3、4、实施例49~72(抑制pH变化的效果)

[材料和方法]

使用pH不发生变化的培养基,在与发酵罐培养近似的条件下进行培养,确认通过抑制pH变化而带来的效果。

关于*Haloferax mediterranei*,分别制备下表(表9)所示的培养基(比较例3、实施例49~60、比较例4、实施例61~72)。这些培养基分别是通过在相当于比较例1、实施例25~36、比较例2、实施例37~48的培养基中加入15g/L的PIPES作为缓冲液而得到的。向300mL容量的三角烧瓶中加入50mL培养基,在200rpm、37℃下培养72h。

[表 9]

海水的种类	海水的浓缩率	海水 (g/L)	氯化钠 (g/L)	氯化铵 (g/L)	磷酸二氢钾 (g/L)	酵母提取物 (g/L)	酪蛋白氨基酸 (g/L)	谷氨酸钠 (g/L)	柠檬酸钠二水合物 (g/L)	葡萄糖 (g/L)	PIPES (g/L)
比较例3	-	0	239	2	0.0375	5				5	15
比较例4	-	0	239	2	0.0375	1	0.1	1	1	5	15
实施例49	1倍	36	203	2	0.0375	5				5	15
实施例50	2倍	72	167	2	0.0375	5				5	15
实施例51	3倍	108	131	2	0.0375	5				5	15
实施例52	4倍	144	95	2	0.0375	5				5	15
实施例53	1倍	36	203	2	0.0375	5				5	15
实施例54	2倍	72	167	2	0.0375	5				5	15
实施例55	3倍	108	131	2	0.0375	5				5	15
实施例56	4倍	144	95	2	0.0375	5				5	15
实施例57	1倍	36	203	2	0.0375	5				5	15
实施例58	2倍	72	167	2	0.0375	5				5	15
实施例59	3倍	108	131	2	0.0375	5				5	15
实施例60	4倍	144	95	2	0.0375	5				5	15
实施例61	1倍	36	203	2	0.0375	1	0.1	1	1	5	15
实施例62	2倍	72	167	2	0.0375	1	0.1	1	1	5	15
实施例63	3倍	108	131	2	0.0375	1	0.1	1	1	5	15
实施例64	4倍	144	95	2	0.0375	1	0.1	1	1	5	15
实施例65	1倍	36	203	2	0.0375	1	0.1	1	1	5	15
实施例66	2倍	72	167	2	0.0375	1	0.1	1	1	5	15
实施例67	3倍	108	131	2	0.0375	1	0.1	1	1	5	15
实施例68	4倍	144	95	2	0.0375	1	0.1	1	1	5	15
实施例69	1倍	36	203	2	0.0375	1	0.1	1	1	5	15
实施例70	2倍	72	167	2	0.0375	1	0.1	1	1	5	15
实施例71	3倍	108	131	2	0.0375	1	0.1	1	1	5	15
实施例72	4倍	144	95	2	0.0375	1	0.1	1	1	5	15

[0065] [结果]

如下表(表10-1)和图3所示。予以说明,将这些例子中的pH的变化与比较例1、实施

例25~36、比较例2、实施例37~48中的pH的变化一并示出(表10-2)。

与比较例1、2相比,通过使用海水,产生了更多的超高分子量PHA。另外,在人工海水和天然海水中,随着海水浓度的增加,PHA的产量增加。进而,由于通过缓冲液抑制了培养过程中的pH的变化,因此与实施例25~48相比,PHBV的产量增多(表10-1和图3)。

[表10-1]

	海水的 种类	海水的 浓缩率	DCW (g/L)	PHA (g/L)	3HV (mol%)	Mw ( $\times 10^6$ )	Mw/Mn
比较例3	-	—	1.25	0.37	12.4	3.37	1.92
比较例4	-	—	0.34	0.17	7.34	4.72	1.66
实施例49	人工海水	1倍	2.92	1.16	6.69	4.26	1.74
实施例50	人工海水	2倍	3.86	1.97	6.53	4.57	1.72
实施例51	人工海水	3倍	3.87	1.89	6.38	4.50	1.70
实施例52	人工海水	4倍	3.79	2.02	6.39	4.69	1.71
实施例53	天然海水	1倍	3.30	1.52	7.65	3.90	1.75
实施例54	天然海水	2倍	3.22	1.19	5.93	3.42	1.92
实施例55	天然海水	3倍	3.82	1.81	6.82	3.64	1.83
实施例56	天然海水	4倍	3.81	1.86	6.69	3.12	1.89
实施例57	海洋深層水	1倍	3.38	1.26	7.22	3.39	1.85
实施例58	海洋深層水	2倍	3.13	1.01	5.94	3.27	1.86
实施例59	海洋深層水	3倍	3.35	1.27	5.86	2.63	2.10
实施例60	海洋深層水	4倍	2.59	0.74	7.60	2.93	2.14
实施例61	人工海水	1倍	1.27	0.65	7.29	5.11	1.58
实施例62	人工海水	2倍	1.85	0.98	7.42	5.19	1.53
实施例63	人工海水	3倍	2.28	1.19	8.47	5.43	1.40
实施例64	人工海水	4倍	2.66	1.33	8.83	5.44	1.43
实施例65	天然海水	1倍	1.22	0.71	8.52	5.36	1.43
实施例66	天然海水	2倍	1.67	0.92	8.83	5.06	1.67
实施例67	天然海水	3倍	1.72	0.96	6.11	4.95	1.63
实施例68	天然海水	4倍	2.51	1.29	7.73	5.02	1.67
实施例69	海洋深層水	1倍	1.44	0.76	8.06	5.14	1.66
实施例70	海洋深層水	2倍	1.50	0.63	7.99	5.20	1.56
实施例71	海洋深層水	3倍	1.74	0.92	7.77	5.28	1.44
实施例72	海洋深層水	4倍	1.75	0.86	7.29	5.07	1.70

[表10-2]

	0h	48h	72h		0h	48h	72h
比较例1	7.2	6.27	6.2	比较例3	7.2	6.92	6.83
比较例2	7.2	6.48	6.75	比较例4	7.2	6.99	6.99
实施例25	7.2	6.23	6.03	实施例49	7.2	6.85	6.77
实施例26	7.2	6.75	6.58	实施例50	7.2	6.77	6.78
实施例27	7.2	6.94	6.56	实施例51	7.2	6.82	6.89
实施例28	7.2	7.09	6.86	实施例52	7.2	6.89	7.09
实施例29	7.2	6.33	6.05	实施例53	7.2	6.75	6.79
实施例30	7.2	6.45	5.71	实施例54	7.2	6.66	6.47
实施例31	7.2	6.53	6.13	实施例55	7.2	6.78	6.68
实施例32	7.2	6.65	6.47	实施例56	7.2	6.83	6.74
实施例33	7.2	6.26	6.15	实施例57	7.2	6.79	6.64
实施例34	7.2	6.24	6.01	实施例58	7.2	6.69	6.4
实施例35	7.2	6.39	6.1	实施例59	7.2	6.58	6.88
实施例36	7.2	6.48	6.04	实施例60	7.2	6.9	6.59
实施例37	7.2	6.78	6.41	实施例61	7.2	6.98	6.98
实施例38	7.2	5.46	5.26	实施例62	7.2	7	6.97
实施例39	7.2	6.52	5.39	实施例63	7.2	7.02	6.96
实施例40	7.2	6.48	7.49	实施例64	7.2	7.01	6.98
实施例41	7.2	6.49	6.87	实施例65	7.2	6.96	6.95
实施例42	7.2	6.6	6.77	实施例66	7.2	6.94	6.89
实施例43	7.2	5.34	5.1	实施例67	7.2	6.99	6.94
实施例44	7.2	5.21	5.01	实施例68	7.2	7.14	7.12
实施例45	7.2	6.29	5.78	实施例69	7.2	6.99	7.02
实施例46	7.2	5.39	5.18	实施例70	7.2	6.83	6.8
实施例47	7.2	5.31	5.08	实施例71	7.2	6.94	6.88
实施例48	7.2	5.23	5.06	实施例72	7.2	6.99	6.95

[0066] 使用浓缩海水的培养预备试验

关于*Haloferox mediterranei*,在NBRC指定培养基No.1380中,仅将葡萄糖浓度变更为5g/L(NBRC指定培养基No.1380的培养基的组成如上所述)。进而,关于NBRC指定培养基No.1380中的微量元素溶液(trace element solution),如下表(表11)那样改变投入量。在300mL三角烧瓶中,将培养液总量设为50mL,进行72小时培养。

[表11]

	葡萄糖浓度 (g/L)	微量元素溶液 (mL/1000mL)
实施例9-2	5	0.06
实施例10-2	5	0.13
实施例11-2	5	0.25
实施例12-2	5	0.5
实施例13-2	5	1
实施例14-2	5	2(基本)
实施例15-2	5	4
实施例16-2	5	8

微量元素溶液的构成如下所述。

次氨基三乙酸 (NTA)	12.8 g
FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	1.35 g
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0.1 g
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.024 g
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.1 g
ZnCl <sub>2</sub>	0.1 g
CuCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.025 g
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.01 g
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.024 g
NaCl	1 g
NiCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.12 g
蒸馏水	1 L

[0067]

结果

如下表(表12)所示。

[表12]

	微量元素溶液 (mL/1000mL)	DCW(g/L)	PHA (g/L)	3HV (mol%)	Mn ( $\times 10^6$ )	Mw ( $\times 10^6$ )	Mw/Mn
实施例9-2	0.06	1.09	0.39	11.3	3.30	5.31	1.61
实施例10-2	0.13	1.94	0.74	10.5	3.77	5.65	1.50
实施例11-2	0.25	2.84	1.23	10.8	3.56	5.53	1.55
实施例12-2	0.5	2.93	1.03	18.2	3.88	5.60	1.45
实施例13-2	1	2.83	0.88	24.9	4.03	5.80	1.44
实施例14-2	2(基本)	2.50	0.74	30.1	3.19	5.34	1.67
实施例15-2	4	2.23	0.57	32.7	3.02	4.94	1.64
实施例16-2	8	2.14	0.43	19.8	3.23	5.05	1.57

在本发明制造方法中使用的浓缩海水中设想的、上述微量金属盐类(trace element)中包含的盐类的浓度与NaCl的浓度相比相对低的实施例(实施例9-2~13-2)和相对高的实施例(实施例15-2和16-2)中,也产生了高分子量的PHA。即,进一步证实了:通过本发明的制造方法,产生了高分子量的PHA。

另外可知:通过改变本发明制造方法中使用的浓缩海水中所含的微量金属盐类(盐类)的量,微生物的生长程度和产生的PHA的分子量发生改变。

#### [0068] 参考例A.

##### ● (材料和方法)

关于Haloferax mediterranei,使用表10中所示的用于极端嗜盐菌的NBRC指定培养基+5g/L的葡萄糖,在300mL三角烧瓶中,将培养液的总量设定为50mL,进行培养。在指定培养基中含有葡萄糖的情况下,除了原来包含的葡萄糖以外,还追加5g/L的葡萄糖。

各指定培养基的成分引用NBRC在网站上公开的培养基一览(<https://www.nite.go.jp/nbrc/cultures/cultures/culture-list.html>),如下所示。

培养基编号	255
培养基	
组成	
Bacto™酪蛋白氨基酸 (Difco)	7.5 g
酵母提取物	10 g
柠檬酸三钠	3 g
KCl	2 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	20 g
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.05 g
MnSO <sub>4</sub> ·nH <sub>2</sub> O	0.2 mg
NaCl	250 g
蒸馏水, 至多	1 L
琼脂 (如果需要)*	20 g
	pH 7.4
*在加入 NaCl 之前加热溶解琼脂。	
注释	

培养基编号	865
培养基	盐盒菌属 (horoarcula 属) 培养基
组成	
酪蛋白氨基酸 (Difco)	5 g
Bacto™酵母提取物 (Difco)	5 g
谷氨酸钠	1 g
柠檬酸三钠	3 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	20 g
KCl	2 g
NaCl	200 g
FeCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	36 mg
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0.26 mg
蒸馏水	1 L
琼脂 (如果需要)	20 g
	pH 7.0-7.2
注释	

培养基编号	258
培养基	
组成	
NaCl	125 g
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	160 g
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.13 g
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	5 g
高聚蛋白胨*	1 g
酵母提取物	1 g
可溶性淀粉	2 g
蒸馏水	1 L
琼脂 (如果需要)	15 g
	pH 7.0
*和光纯药工业株式会社, 日本大阪	
注释	

培养基编号	368
培养基	
组成	
酵母提取物	10 g
酪蛋白氨基酸	7.5 g
NaCl	250 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	40 g
KCl	2 g
柠檬酸三钠	3 g
FeCl <sub>3</sub> ·4H <sub>2</sub> O	36 mg
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0.36 mg
蒸馏水, 至多	1 L
琼脂* (如果需要)	20 g
	pH 7.2
*在加入 NaCl 之前加热溶解琼脂。	
注释	

培养基编号	1214
培养基	海洋嗜盐菌属 (Halomarina 属) 培养基
组成	
酪蛋白氨基酸	1 g
Bacto™ 酵母提取物 (Difco)	1 g
NaCl	150 g
琼脂	15 g
人工海水	1 L
	pH 7.5
注释	

培养基编号	1338
培养基	NSSM 培养基
组成	
Bacto™ 酵母提取物 (Difco)	1 g
酪蛋白氨基酸	1 g
Bacto™ 豚蛋白胨 No. 3 (Difco)	3 g
葡萄糖	1 g
丙酮酸钠	0.05 g
NaCl	132 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.6 g
琼脂 (如果需要)	20 g
人工海水	1 L
	pH 7.0-7.2
注释	

培养基编号	1380
培养基	Halo 2g
组成	
葡萄糖	1.8 g
Bacto™酵母提取液(Difco)	0.1 g
酪蛋白氨基酸	0.1 g
谷氨酸钠	1 g
柠檬酸三钠	1 g
KCl	2 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.3 g
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.15 g
NH <sub>4</sub> Cl	1 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	50 g
NaCl	200 g
微量元素溶液*	2 ml
琼脂(如有需要)	20 g
蒸馏水	1 L
	pH 7.0-7.4
高压处理后, 加入经过滤灭菌的葡萄糖溶液	
*微量元素溶液	
次氨基三乙酸(NTA)	12.8 g
FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	1.35 g
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0.1 g
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.024 g
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.1 g
ZnCl <sub>2</sub>	0.1 g
CuCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.025 g
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.01 g
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.024 g
NaCl	1 g
NiCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.12 g
蒸馏水	1 L
首先使次氨基三乙酸溶解并用 NaOH 调节至 pH6.5, 然后加入矿物质。 最终 pH7.0。	
注释	

[0069] 结果

如下表(表13)所示。

通过改变培养基, 可以生产重均分子量的范围为130万~540万的PHA。

另外可知, 在NBRC规定的No. 1380培养基中, 能够生产出PHA的产量高、而且3HV分率高、分子量高的、前所未有的类型的PHA。

[表13]

培养基	pH	DCW (g/L)	PHA (wt%)	3HV (mol%)	$M_n$ ( $\times 10^6$ )	$M_w$ ( $\times 10^6$ )	$M_w/M_n$
BSM	7.2	3.9	43.0	12.1	2.7	4.4	1.6
255	7.2	5.7	27.5	16.6	0.94	1.6	1.7
865	7-7.2	2.8	33.7	27.4	1.5	2.6	1.8
258	7.0	3.7	34.8	14.5	2.4	4.1	1.7
368	7.2	4.3	3.8	27.2	0.81	1.3	1.6
1214	7.5	2.1	30.0	13.3	3.0	5.2	1.7
1338	7-7.2	1.2	24.1	17.1	2.3	4.5	1.9
1380	7-7.4	3.4	49.0	35.5	3.3	5.4	1.6

[0070] 参考例B

进一步使用糠醛系化合物,除此以外,采用与实施例1~12同样的方法,使初始葡萄糖浓度为10g/L、糠醛浓度、HMF(5-羟甲基糠醛)浓度分别从0.06g/L变更为1.6g/L,进行 *Haloferax mediterranei*、NBRC 14739的烧瓶培养。更具体而言,如下所述。

● (材料和方法)

在300mL三角烧瓶中,将培养液总量设为50mL,加入以下各成分,在72h、37℃、200rpm下进行振荡培养。将初始pH调节至7.2。

培养基中的成分(g/L):

$\text{NH}_4\text{Cl}$  2、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.0375、 $\text{FeCl}_3$  0.005、 $\text{NaCl}$  194、  
 $\text{MgCl}_2$  16、 $\text{MgSO}_4$  24、 $\text{CaCl}_2$  1、 $\text{KCl}$  5、 $\text{NaHCO}_3$  0.2、  
 $\text{NaBr}$  0.5、酵母提取物5

在含有上述成分的培养基(BSM培养基)中,加入规定量的下表所示的糖质和糠醛系化合物作为碳源,进行72h的培养。

● (结果)

将在各条件下生成的PHBV的3HV分率、重均分子量、多分散度、干燥菌体重量、以及PHBV产量示于下表(表14)。

[表14]

	初始 葡萄糖 浓度 (g/L)	初始 糠醛 浓度 (g/L)	初始 HMF 浓度 (g/L)	3HV 分率 (%)	Mw ( $\times 10^6$ )	Mw/Mn	干燥 菌体 重量 (g/L)	PHBV (g/L)
例 1	10	0.06	0	13	1.2	2.15	4.07	2.15
例 2	10	0.1	0	12	0.46	1.95	5.56	1.95
例 3	10	0.2	0	10.5	0.26	2.27	4.26	2.27
例 4	10	0.4	0	17.2	0.31	2.06	1.88	2.06
例 5	10	1.6	0	n. d	n. d	n. d	0.274	n. d
例 6	10	0	0.06	13.5	3.38	1.68	3.76	1.68
例 7	10	0	0.1	14.6	0.69	1.8	4.58	1.8
例 8	10	0	0.2	11.2	0.44	1.72	5.66	1.72
例 9	10	0	0.4	11.1	0.31	1.92	4.21	1.92
例 10	10	0	1.6	n. d	n. d	n. d	0.33	n. d

可知:通过改变糠醛的浓度和HMF的浓度,能够制造各种分子量的PHBV并控制分子量。认为:即使使用葡萄糖以外的糖,也能够控制由糠醛或HMF等糠醛系化合物生成的PHBV的分子量。另外认为:糠醛系化合物可以用于本发明的聚羟基烷酸的制造方法和聚羟基烷酸的分子量的控制方法中。

#### 产业实用性

[0071] 根据本发明,能够制造PHA并将其在重均分子量控制在例如20万~600万之间。因此本发明有助于PHA制造业及其相关产业的发展。

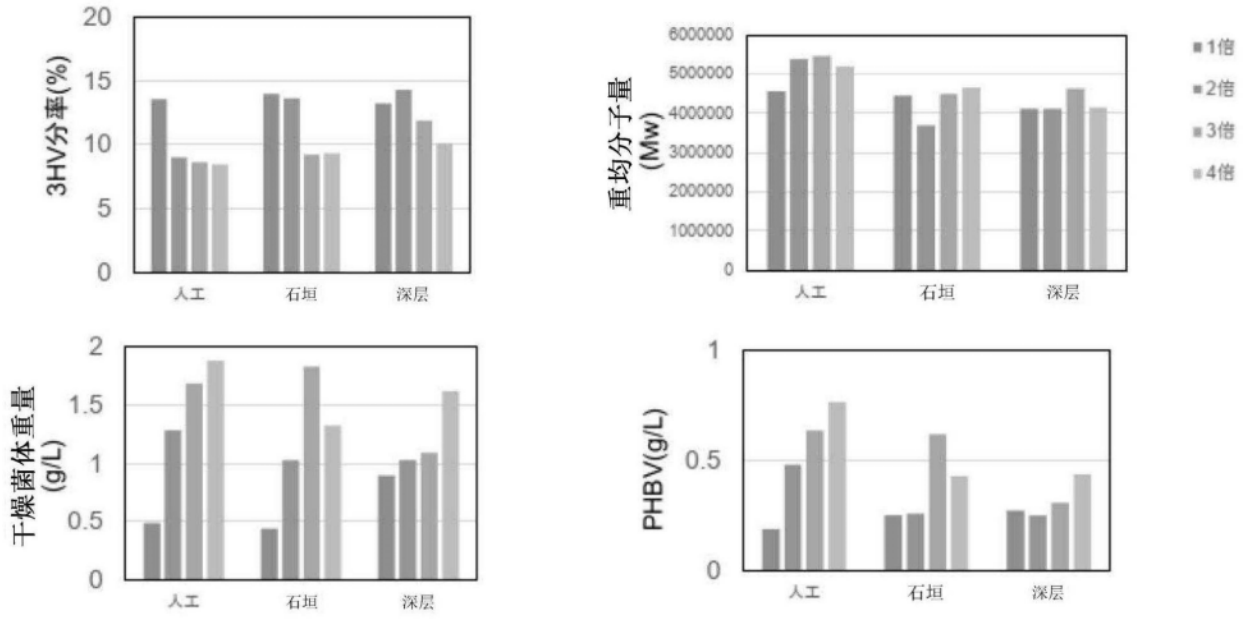


图1

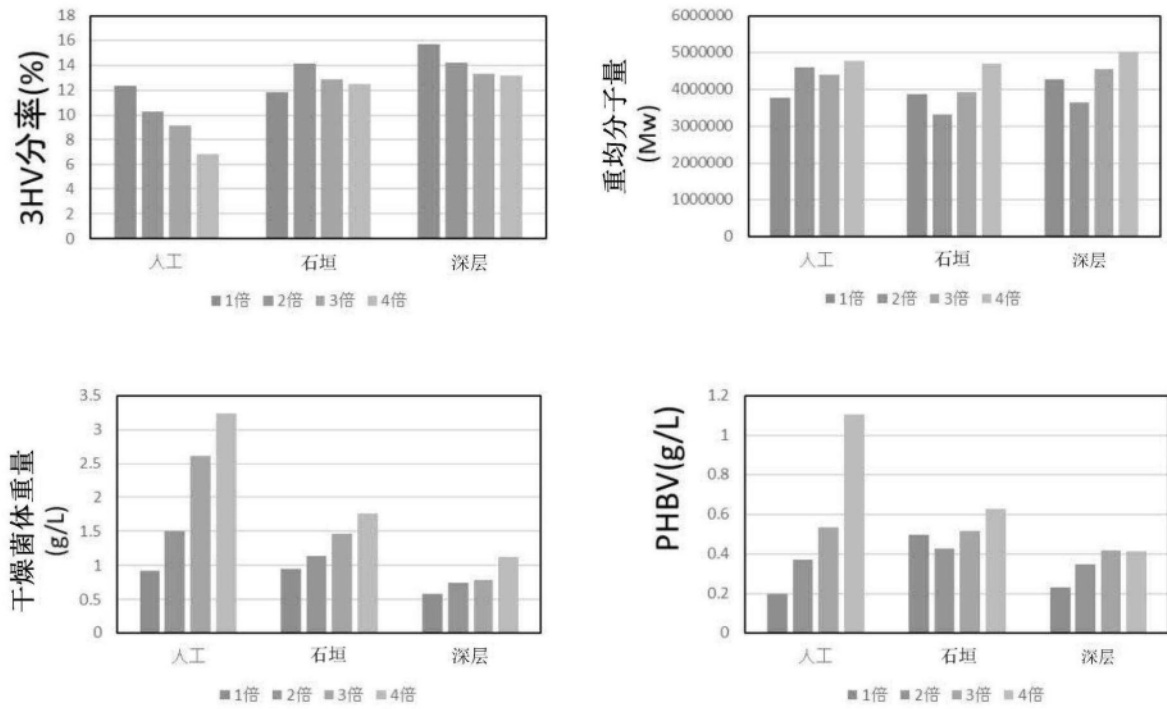


图2

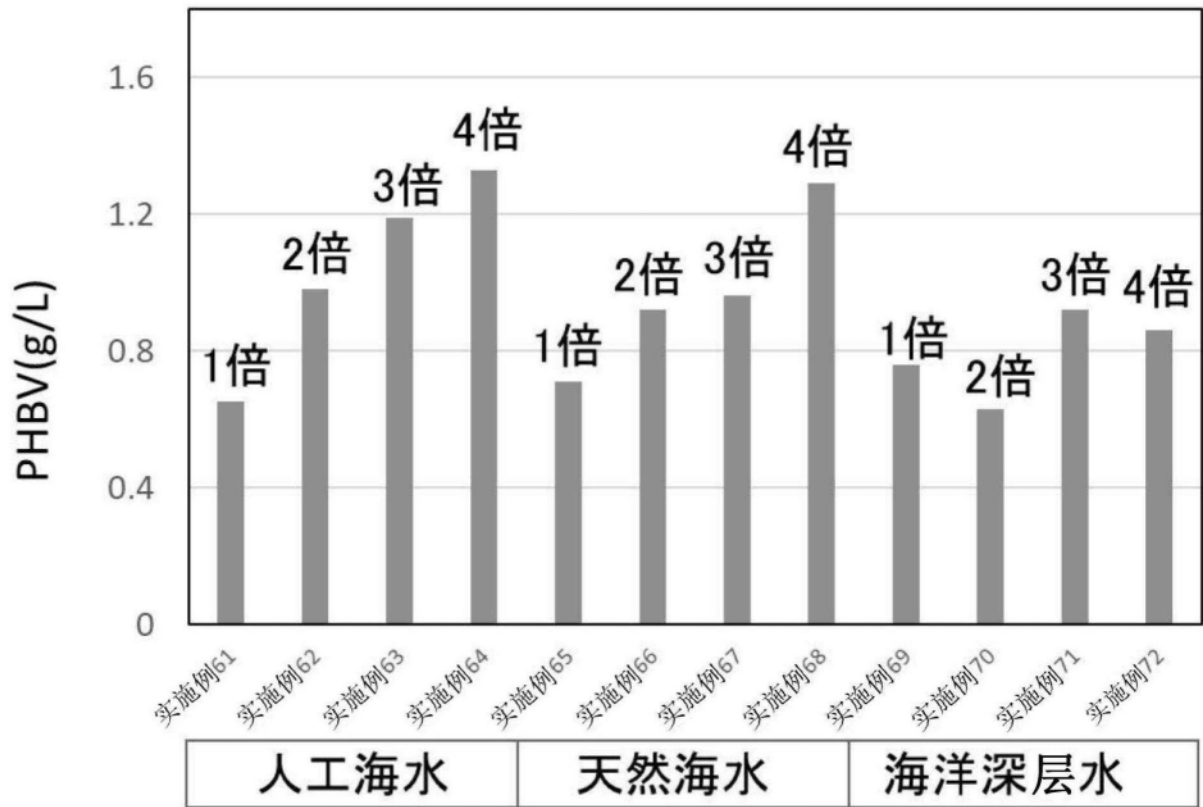


图3