



(10) 申请公布号 CN 117460764 A

(43) 申请公布日 2024.01.26

(21) 申请号 202280040426.2

(22) 申请日 2022.03.31

(30) 优先权数据

2021-064686 2021.04.06 JP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2023.12.05

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2022/016649 2022.03.31

(87) PCT国际申请的公布数据

W02022/215653 JA 2022.10.13

(71) 申请人 株式会社未来科学

地址 日本东京都

(72) 发明人 井上浩三 K·苏得什·库玛尔

宫内宏长

(74) 专利代理机构 北京聿宏知识产权代理有限公司 11372

专利代理师 吴大建 常怡

(51) Int.Cl.

C08J 3/12 (2006.01)

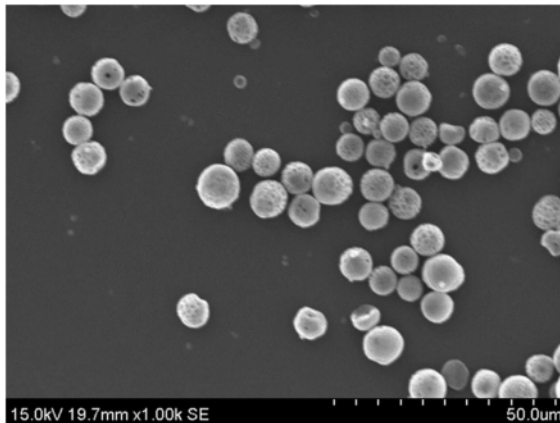
权利要求书2页 说明书16页 附图7页

(54) 发明名称

包含多羟基烷酸(PHA)的微粒及其制造方法

(57) 摘要

本发明提供一种微粒及其制造方法,该微粒包含3-羟基丁酸(3-HB)作为生物降解性聚合物的多羟基烷酸(PHA)的重复单元,该微粒的粒径为 $0.2\mu\text{m}$ ~小于 $10\mu\text{m}$ 。本发明的微粒是具有生物降解性、加工性优异、具备生物相容性的的微粒,因此能够应用于包含医药用途在内的广泛的用途。



1. 一种微粒,其包含多羟基烷酸(PHA),其特征在于,所述微粒包含3-羟基丁酸(3-HB)作为多羟基烷酸(PHA)的重复单元,所述微粒的粒径为 $0.2\mu\text{m}$ ~小于 $10\mu\text{m}$ 。
2. 根据权利要求1所述的微粒,其特征在于,所述微粒的粒径为 $7\mu\text{m}$ 以下。
3. 根据权利要求1或2所述的微粒,其特征在于,多羟基烷酸(PHA)还包含3-羟基己酸(3-HH)作为其重复单元。
4. 根据权利要求3所述的微粒,其特征在于,3-羟基己酸(3-HH)的比例是相对于多羟基烷酸(PHA)的重复单元的总重量为27%(重量比)以下。
5. 根据权利要求3或4所述的微粒,其特征在于,多羟基烷酸(PHA)包含3-羟基丁酸(3-HB)与3-羟基己酸(3-HH)的共聚物。
6. 根据权利要求1~5中任一项所述的微粒,其特征在于,多羟基烷酸(PHA)还包含4-羟基丁酸(4-HB)单元作为其重复单元。
7. 根据权利要求6所述的微粒,其特征在于,4-羟基丁酸(4-HB)的比例是相对于多羟基烷酸(PHA)的重复单元的总重量为40~50%(重量比)。
8. 根据权利要求6或7所述的微粒,其特征在于,多羟基烷酸(PHA)包含3-羟基丁酸(3-HB)与4-羟基丁酸(4-HB)的共聚物。
9. 根据权利要求1~8中任一项所述的微粒,其特征在于,多羟基烷酸(PHA)的平均分子量(Mw)为10万至130万。
10. 根据权利要求1~9中任一项所述的微粒,其特征在于,多羟基烷酸(PHA)的熔点为 55°C 以上且 170°C 以下。
11. 根据权利要求1~10中任一项所述的微粒,其特征在于,微粒包含多羟基烷酸(PHA)以外的树脂。
12. 根据权利要求11所述的微粒,其特征在于,多羟基烷酸(PHA)以外的树脂为生物降解性树脂。
13. 根据权利要求1~12中任一项所述的微粒,其特征在于,微粒为球状。
14. 根据权利要求1~13中任一项所述的微粒,其特征在于,微粒为多孔质。
15. 根据权利要求1~14中任一项所述的微粒,其特征在于,微粒在其表面和/或内部保持有其他物质。
16. 根据权利要求1~15中任一项所述的微粒,其特征在于,微粒的10%压缩强度为 $0.23\sim 2.20(\text{MPa})$ 。
17. 根据权利要求1~16中任一项所述的微粒,其特征在于,微粒能够分散于水系溶剂中。
18. 一种微粒的制造方法,其是权利要求1~17中任一项所述的微粒的制造方法,其特征在于,所述微粒的制造方法包含以下工序:
工序1:准备产生多羟基烷酸(PHA)的微生物的工序;
工序2:在培养基内增殖工序1的微生物的工序;
工序3:使动物摄取增殖后的微生物的工序;
工序4:从工序3的动物的排泄物中回收、纯化多羟基烷酸(PHA)的工序;以及
工序5:将通过工序4得到的多羟基烷酸(PHA)微粒化的工序。

19. 根据权利要求18所述的微粒的制造方法,其特征在于,工序5是将包含通过工序4得到的多羟基烷酸 (PHA) 的树脂组合物微粒化的工序。

包含多羟基烷酸(PHA)的微粒及其制造方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种微粒及其制造方法,所述微粒包含多羟基烷酸(PHA),其特征在于,所述微粒包含3-羟基丁酸(3-HB)单元作为多羟基烷酸(PHA)的重复单元,且粒径为 $0.2\mu\text{m}$ ~小于 $10\mu\text{m}$ 。

背景技术

[0002] 由合成树脂构成的微粒在作为塑料树脂改性剂、化妆品用改性剂等改性剂的用途、作为涂料用添加剂、调色剂用添加剂、化妆品用添加剂等添加剂的用途、作为液晶用间隔物、层析填充剂、粘接胶带用填充剂等填充剂的用途等的基础上,还具有药物递送系统(DDS)、医疗诊断用检查颗粒等医疗领域中的各种用途,因此成为在众多产业领域中不可或缺的原材料。但是,迫切需要在全世界范围内解决如下问题:在由合成树脂构成的微粒中,在作为原料的石油价格变动、原料供给不固定这样的问题的基础上,作为对环境的负面影响,产生温室效应气体,并且在制造过程中或制造后使用后,直接或穿过排水处理厂,流入河川、海洋等,由此产生各种问题等。

[0003] 尤其是最近,海洋中的微塑料的污染成为问题。例如,当塑料垃圾被波浪、紫外线粉碎时,变为长度为5毫米以下的微塑料,微塑料积蓄在鱼的体内。认为在50年后大海中的塑料垃圾将超过鱼的总重量,削减塑料垃圾对于人类来说成为紧迫的问题。尤其是,由合成树脂构成的微粒由于其自身为微塑料,因此其使用已经受到较大的限制。因而,在必须使用由合成树脂构成的微粒的产业领域中,迫切需要将微粒的原料从以往的合成树脂进行转换(非专利文献1)。

[0004] 另外,由合成树脂构成的微粒如上所述在医疗领域中也以应用于药物递送系统(DDS)等为目的而受到很大的期待,但在医疗领域中,在上述的由合成树脂构成的微粒所具有的问题的基础上,为了能够在生物体内安全地使用,还需要满足生物相容性等条件(非专利文献2)。

[0005] 作为这些问题的解决方法之一,提出了使用生物降解性生物聚合物作为微粒的原料。已经提出了使用聚乳酸(PLA)、多羟基烷酸(PHA)、纤维素等生物聚合物的微粒的开发(专利文献1以及专利文献2),但也指出了不是在堆肥等高温多湿环境中,而是在实际的河川、海洋环境中也可以说是“生物降解性”的情况仅是使用多羟基烷酸(PHA)和纤维素作为原料的情况。

[0006] 另一方面,关于作为生物降解性生物聚合物而使用多羟基烷酸(PHA)作为微粒的原料的微粒的制造,主要进行了使用了聚-3-羟基丁酸(3-PHB)的开发。在专利文献3中记载了一种微粒,该微粒由生物相容性及生物降解性的聚合物构成,可利用注射器注入,且使用了3-羟基丁酸与4-羟基丁酸的共聚物(聚(4-羟基丁酸酯-共-3-羟基丁酸酯))作为聚合物。另外,在专利文献4中记载了一种化妆品组合物,其为包含聚羟基烷酸酯(PHA)的微粒形态,作为PHA,举例示出了聚-3-羟基丁酸酯(PHB)、聚-3-羟基己酸酯(PHH)、聚(3-羟基丁酸酯-共-4-羟基丁酸酯)。另外,在专利文献5中,记载了一种包含聚羟基烷酸酯的多孔质树脂颗

粒,作为聚羟基烷酸酯,以优选例列举了作为3-羟基丁酸酯单元与3-羟基己酸酯单元的共聚物的聚(3-羟基丁酸酯-共-3-羟基己酸酯)。进一步地,在专利文献6中记载了一种无纺布,该无纺布包含聚羟基烷酸酯,更优选包含聚-4-羟基丁酸酯及其共聚物,该无纺布通过具备具有特定的平均直径及破裂强度的微细纤维的干式纺纱工序而得到。

[0007] 然而,聚-3-羟基丁酸在脆性、硬度等物性方面存在问题,另外,由于耗费生产、纯化的成本,因此尚未达到以聚-3-羟基丁酸为主原料、且具有所期望的物性的微粒的实用化。

[0008] 现有技术文献

[0009] 专利文献

[0010] 专利文献1:日本专利第5133478号公报

[0011] 专利文献2:美国专利申请公开第2006/0177513号说明书

[0012] 专利文献3:美国专利第10463619号说明书

[0013] 专利文献4:国际公开第2018/178899号

[0014] 专利文献5:国际公开第2017/056908号

[0015] 专利文献6:日本特表2013-534978号公报

[0016] 非专利文献

[0017] 非专利文献1:平成28年度化学物质安全对策(微塑料国内排放实态调查)报告书
平成29年2月JFE TechnoResearch株式会社平成28年度经济产业省委托调查报告书

[0018] 非专利文献2:Microparticles, Microspheres, and Microcapsules for Advanced Drug Delivery, Sci. Pharm. 2019, 87, 20

发明内容

[0019] 发明所要解决的问题

[0020] 因此,为了提供可用于包含医疗用途在内的广泛用途的微粒,要求用于制造具有在各个用途中所要求的物性、尤其是作为重要物性的适当的粒径分布以及其他物质的保持性这样的物性的微粒的合适的生物降解性聚合物,并且要求确立由这些生物降解性聚合物更简便地制造具有可用于广泛用途的物性的微粒的方法。

[0021] 用于解决问题的手段

[0022] 本发明的发明人为了解决上述问题而进行了研究的结果是,通过包含准备产生多羟基烷酸(PHA)的微生物的步骤、使上述微生物在培养基内增殖的步骤、使动物摄取增殖后的上述微生物的步骤、以及从上述动物的排泄物中回收多羟基烷酸(PHA)的步骤的方法,可产生熔融流动性优异的多羟基烷酸(PHA),基于该见解发现了包含3-羟基丁酸(3-HB)作为该多羟基烷酸(PHA)的重复单元、且粒径为 $0.2\mu\text{m}$ ~小于 $10\mu\text{m}$ 的微粒具有所期望的物性,从而完成了本发明(关于上述见解,参照日本特愿2019-086889:提出日平成31年4月26日)。

[0023] 即,确认到以下情况:作为包含多羟基烷酸(PHA)的微粒,包含3-羟基丁酸(3-HB)单元作为其重复单元、且粒径为 $0.2\mu\text{m}$ ~小于 $10\mu\text{m}$ 的微粒具有所期望的物性,从而完成了本发明。

[0024] 本发明通过以下的特定事项来确定。

[0025] (1) 一种微粒,其包含多羟基烷酸(PHA),其特征在于,所述微粒包含3-羟基丁酸

(3-HB) 作为多羟基烷酸 (PHA) 的重复单元,所述微粒的粒径为 $0.2\mu\text{m}$ ~ 小于 $10\mu\text{m}$ 。

[0026] (2) 根据(1)所述的微粒,其中,所述微粒的粒径为 $7\mu\text{m}$ 以下。

[0027] (3) 根据(1)或(2)所述的微粒,其中,多羟基烷酸 (PHA) 还包含3-羟基己酸 (3-HH) 作为其重复单元。

[0028] (4) 根据(3)所述的微粒,其中,3-羟基己酸 (3-HH) 的比例是相对于多羟基烷酸 (PHA) 的重复单元的总重量为27% (重量比) 以下。

[0029] (5) 根据(3)或(4)所述的微粒,其中,多羟基烷酸 (PHA) 包含3-羟基丁酸 (3-HB) 与3-羟基己酸 (3-HH) 的共聚物。

[0030] (6) 根据(1) ~ (5) 中任一项所述的微粒,其中,多羟基烷酸 (PHA) 还包含4-羟基丁酸 (4-HB) 单元作为其重复单元。

[0031] (7) 根据(6)所述的微粒,其中,4-羟基丁酸 (4-HB) 的比例是相对于多羟基烷酸 (PHA) 的重复单元的总重量为40 ~ 50% (重量比)。

[0032] (8) 根据(6)或(7)所述的微粒,其中,多羟基烷酸 (PHA) 包含3-羟基丁酸 (3-HB) 与4-羟基丁酸 (4-HB) 的共聚物。

[0033] (9) 根据(1) ~ (8) 中任一项所述的微粒,其中,多羟基烷酸 (PHA) 的平均分子量 (M_w) 为10万至130万。

[0034] (10) 根据(1) ~ (9) 中任一项所述的微粒,其中,多羟基烷酸 (PHA) 的熔点为 55°C 以上且 170°C 以下。

[0035] (11) 根据(1) ~ (10) 中任一项所述的微粒,其中,微粒包含多羟基烷酸 (PHA) 以外的树脂。

[0036] (12) 根据(11)所述的微粒,其中,多羟基烷酸 (PHA) 以外的树脂为生物降解性树脂。

[0037] (13) 根据(1) ~ (12) 中任一项所述的微粒,其中,微粒为球状。

[0038] (14) 根据(1) ~ (13) 中任一项所述的微粒,其中,微粒为多孔质。

[0039] (15) 根据(1) ~ (14) 中任一项所述的微粒,其中,微粒在其表面和/或内部保持有其他物质。

[0040] (16) 根据(1) ~ (15) 中任一项所述的微粒,其中,微粒的10%压缩强度为 $0.23 \sim 2.20$ (MPa)。

[0041] (17) 根据(1) ~ (16) 中任一项所述的微粒,其中,微粒能够分散于水系溶剂中。

[0042] (18) 一种微粒的制造方法,其是(1) ~ (17) 中任一项所述的微粒的制造方法,其中,

[0043] 所述微粒的制造方法包含以下工序:

[0044] 工序1:准备产生多羟基烷酸 (PHA) 的微生物的工序;

[0045] 工序2:在培养基内增殖工序1的微生物的工序;

[0046] 工序3:使动物摄取增殖后的微生物的工序;

[0047] 工序4:从工序3的动物的排泄物中回收、纯化多羟基烷酸 (PHA) 的工序;以及

[0048] 工序5:将通过工序4得到的多羟基烷酸 (PHA) 微粒化的工序。

[0049] (19) 根据(18)所述的微粒的制造方法,其中,工序5是将包含通过工序4得到的多羟基烷酸 (PHA) 的树脂组合物微粒化的工序。

[0050] 发明效果

[0051] 根据本发明,通过形成为包含多羟基烷酸(PHA)的微粒、且包含3-羟基丁酸(3-HB)作为多羟基烷酸(PHA)的重复单元,从而该包含多羟基烷酸(PHA)的微粒在自然环境下的生物降解性以及加工性优异。另外,根据本发明,通过使包含多羟基烷酸(PHA)的微粒的粒径为 $0.2\mu\text{m}$ ~小于 $10\mu\text{m}$,作为可用于广泛用途的物性,能够具有熔点、粒径、多孔质性、压缩强度、物质保持性等。另外,根据本发明,提供该包含多羟基烷酸(PHA)的微粒的简便的制造方法。

[0052] 因而,根据本发明,能够提供具有生物降解性、加工性优异、具有具备生物相容性的可用于广泛用途的物性的包含多羟基烷酸(PHA)的微粒。

[0053] 而且,本发明所涉及的微粒能够作为自然环境下的生物降解性优异的微粒来提供,因此能够有助于解决海洋污染、微塑料问题等。另外,在废弃处理中能够进行生物降解处理,因此还能够期待减少焚烧处理、降低对环境的负荷的效果。进一步地,本发明所涉及的微粒在多羟基烷酸(PHA)所具有的生物相容性、生物体内降解性的基础上,还能够具有可用于广泛用途的物性,因此在迄今为止的用途的基础上,在医疗用途中能够广泛使用的可能性高。

附图说明

[0054] 图1是表示电喷雾沉积装置的基本结构的概念图。

[0055] 图2是在实施例1中由P(3-HB)制造的微粒的SEM观察图像。

[0056] 图3是在实施例2中由P(3-HB)制造的多孔质微粒的SEM观察图像。

[0057] 图4是在实施例3中由P(3-HB-co-3-HH)制造的微粒的SEM观察图像。

[0058] 图5是在实施例4中由P(3-HB-co-4-HB)制造的微粒的SEM观察图像。

[0059] 图6是表示在实施例5中由P(3-HB)制造的微粒将二氧化硅颗粒保持于表面这一情况的SEM观察图像。

[0060] 图7是表示在实施例5中由P(3-HB)制造的微粒将二氧化硅颗粒保持在内部这一情况的SEM观察图像。

[0061] 图8是表示在实施例5中由P(3-HB)制造的微粒保持有二氧化硅颗粒这一情况的SEM的BSE观察图像。

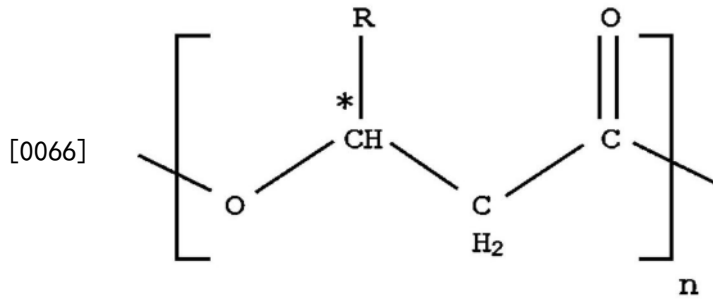
具体实施方式

[0062] 接着,对包含用于实施本发明的最佳方式在内的具体方式进行说明。

[0063] [多羟基烷酸(PHA)]

[0064] 多羟基烷酸(PHA)是由下述化学式(1)例示的羟基烷酸的聚酯,是生物降解性的聚合物。

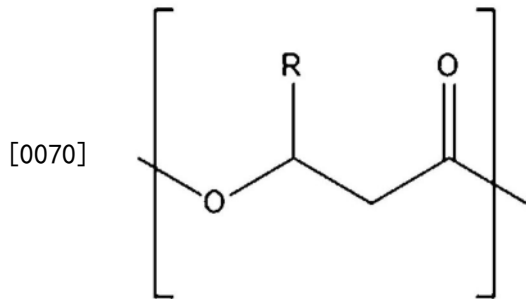
[0065] [化1]



[0067] (化学式(1), R表示烷基。)

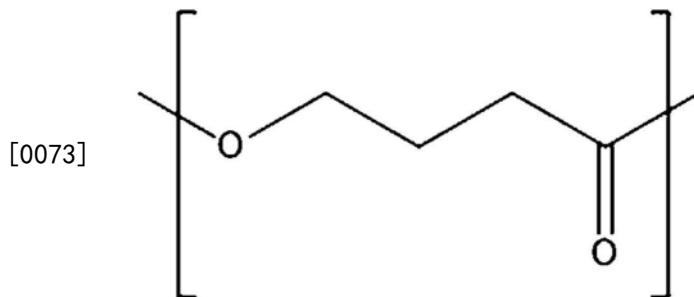
[0068] 以下将作为本发明所涉及的多羟基烷酸(PHA)的重复单元的3-羟基烷酸单元(3-HA)记载为化学式(2),将4-羟基烷酸单元(4-HA)记载为化学式(3)。

[0069] [化2]



[0071] (化学式(2), R表示烷基。)

[0072] [化3]

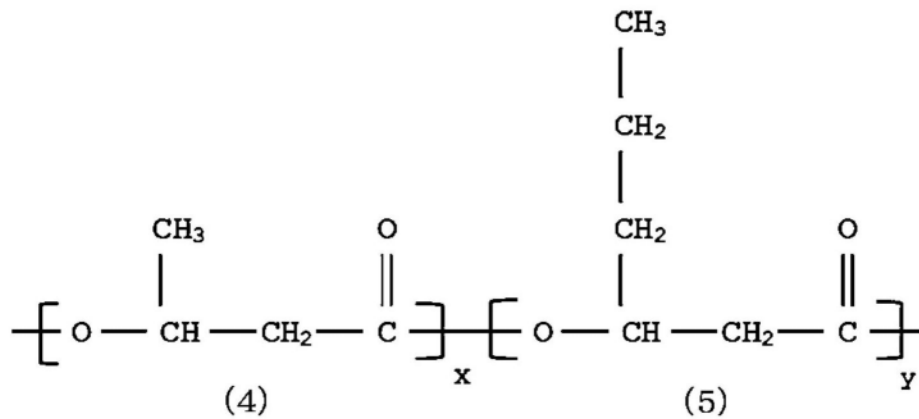


[0074] (化学式(3))

[0075] 在3-羟基烷酸单元(3-HA)中,作为烷基(R),可以取甲基、乙基、丙基、丁基、戊基、己基、庚基、辛基、壬基、癸基、十一烷基、十二烷基、十三烷基等,本发明所涉及的多羟基烷酸(PHA)的重复单元的特征在于,包含以下记载的烷基为甲基的3-羟基丁酸(3-HB:下述化学式(4))。进一步地,作为本发明的另一实施方式,其特征在于,作为多羟基烷酸(PHA)的重复单元,包含烷基为丙基的3-羟基己酸(3-HH:下述化学式(5)),在本发明所涉及的多羟基烷酸(PHA)作为其重复单元而包含3-羟基丁酸单元(3-HB)和3-羟基庚酸单元(3-HH)的情况下,优选以以下例示的3-羟基丁酸(3-HB)与3-羟基己酸(3-HH)的共聚物(P(3-HB-co-3-HH))的形式包含。

[0076] [化4]

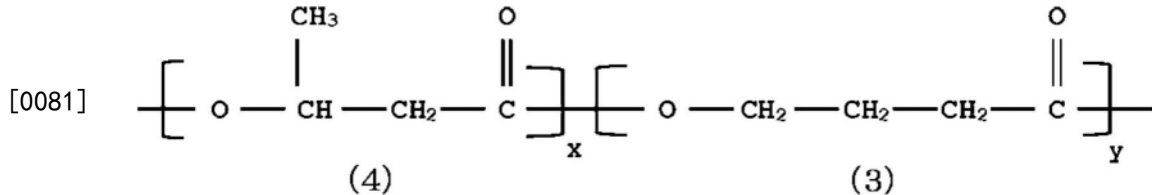
[0077]



[0078] 作为本发明所涉及的多羟基烷酸 (PHA) 的另一实施方式, 本发明所涉及的多羟基烷酸 (PHA) 的重复单元中的 3-羟基己酸 (3-HH) 的比例是相对于多羟基烷酸 (PHA) 的重复单元的总量为 30% 以下 (重量比), 优选为 27% 以下。在 3-羟基己酸 (3-HH) 的比例是相对于多羟基烷酸的重复单元总量为 27% 以下的情况下, 能够制造多孔质的微粒, 但在包含超过 27% 的情况下, 存在难以制造多孔质的微粒的隐患。

[0079] 另外, 作为本发明所涉及的多羟基烷酸 (PHA) 的另一实施方式, 其特征在于, 作为本发明所涉及的多羟基烷酸 (PHA) 的重复单元, 包含上述化学式 (3) 所记载的 4-羟基丁酸 (4-HB), 在本发明所涉及的多羟基烷酸 (PHA) 作为其重复单元而包含 4-羟基丁酸单元 (4-HB) 的情况下, 优选以以下例示的 3-羟基丁酸 (3-HB) 与 4-羟基丁酸 (4-HB) 的共聚物 (P(3-HB-co-4-HB)) 的形式包含。

[0080] [化5]



[0082] 本发明所涉及的多羟基烷酸 (PHA) 的重复单元中的 4-羟基丁酸 (4-HB) 的比例是相对于多羟基烷酸 (PHA) 的重复单元的总量为 40~50% (重量比), 优选为 40~45% 的比例, 更优选为 40~42% 的比例。在 4-羟基丁酸 (4-HB) 相对于多羟基烷酸 (PHA) 的重复单元的总量在上述比例的范围包含的情况下, 能够期待良好的生物相容性和生物体内降解性, 能够制造可在医疗用途中广泛使用的微粒, 但在脱离上述比例的范围而包含的情况下, 有可能无法期待良好的生物相容性和生物体内降解性, 存在难以制造可在医疗用途中广泛使用的微粒的隐患。

[0083] 作为本发明所涉及的多羟基烷酸 (PHA) 的另一实施方式, 多羟基烷酸 (PHA) 的重均分子量为 $1.0 \times 10^5 \sim 13.0 \times 10^5 \text{g/mol}$, 优选为 $3.0 \times 10^5 \sim 10.0 \times 10^5 \text{g/mol}$, 更优选为 $3.0 \times 10^5 \sim 8.0 \times 10^5 \text{g/mol}$ 。当多羟基烷酸 (PHA) 的重均分子量在上述范围内的情况下, 能够提供能够在溶剂中的溶解性、以及制成微粒时的硬度、柔软性、耐热性、耐久性进行控制的多羟基烷酸 (PHA), 但在脱离上述范围的情况下, 存在无法得到上述的效果的隐患。

[0084] 作为本发明所涉及的多羟基烷酸 (PHA) 的另一实施方式, 多羟基烷酸 (PHA) 的熔点为 55°C 以上且 170°C 以下, 优选为 60°C 至 160°C , 更优选为 80°C 至 120°C 。通过将多羟基烷酸

(PHA)的熔点设为上述范围,能够提供能够制造适于各种用途中的使用条件的微粒的多羟基烷酸(PHA)。此外,多羟基烷酸(PHA)的熔点可以通过任意的方法进行测定,例如可以通过DSC分析进行测定。

[0085] [多羟基烷酸(PHA)的制造方法]

[0086] 本发明所涉及的多羟基烷酸(PHA)的制造方法只要可获得具备本发明所涉及的多羟基烷酸的特征的多羟基烷酸(PHA)即可,可以为任何制造方法,没有特别限制。

[0087] 例如,作为本发明的多羟基烷酸(PHA)的制造方法的一个实施方式,可以包含以下的工序:

[0088] 工序1:准备产生多羟基烷酸(PHA)的微生物的工序;

[0089] 工序2:在培养基内增殖工序1的微生物的工序;

[0090] 工序3:使动物摄取增殖后的微生物的工序;以及

[0091] 工序4:从工序3的动物的排泄物中回收、纯化多羟基烷酸(PHA)的工序。

[0092] 本发明所涉及的多羟基烷酸(PHA)优选使用微生物来制造。例如,作为微生物,可列举为巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)、钩虫贪铜菌(*Cupriavidus necator*)、富养罗尔斯通氏菌(*Ralstonia eutropha*)、广泛产碱菌(*Alcaligenes latus*)等具有多羟基烷酸产生能力的微生物。其中,特别优选为钩虫贪铜菌。

[0093] 作为微生物,优选为缺失或导入了参与多羟基烷酸(PHA)的合成的基因的微生物。例如,优选使用缺失了乙酰乙酰基-CoA还原酶基因的微生物。另外,优选导入羟基烷酸合成酶基因、烯酰基-CoA水合成酶基因。由此,能够提高多羟基烷酸中所含的3-羟基己酸单元(3-HB)的含量。另外,能够制造熔融流动性高、加工性优异的由3-羟基丁酸(3-HB)和3-羟基己酸(3-HH)构成的共聚物P(3HB-co-3HH)。

[0094] 在微生物的培养中使用的培养基只要是供微生物增殖的培养基即可,没有特别限制。例如为作为碳源而含有甲醇、乙醇、丁醇等醇类、乙酸、丙酸、己酸、辛酸、癸酸、月桂酸、油酸、棕榈酸、亚油酸、亚麻酸、肉豆蔻酸等饱和/不饱和脂肪酸等脂肪酸类、葡萄糖、果糖等糖类、乳酸等有机酸类、大量包含碳原子数为10以上的饱和/不饱和脂肪酸的油脂类的培养基。作为油脂类,例如可列举为椰子油、棕榈仁油、棕榈油、棕榈油精、菜籽油、大豆油、米油、芝麻油等植物油脂、猪油、牛油等动物油脂、鱼油等。此外,油脂类也可以使用纯化前的油脂类、废弃食用油等。作为在培养基中作为碳源而添加的油脂类,优选为含有月桂酸的棕榈仁油或椰子油。通过含有棕榈仁油或椰子油,能够提高多羟基烷酸(PHA)的含量。

[0095] 作为用于生产本发明所涉及的多羟基烷酸(PHA)的微生物的培养条件,优选为好氧性条件下。另外,如果有需要,也可以添加氮源、无机物。作为氮源,可列举为氨、氯化铵、硫酸铵、磷酸铵等铵盐等。作为无机物,例如可列举为磷酸一钾、磷酸二钾、磷酸镁、硫酸镁、氯化钠等。

[0096] 培养温度优选为20℃~40℃,更优选为25℃~35℃。培养时间没有特别限定,优选为48~72小时。

[0097] 在本发明所涉及的多羟基烷酸(PHA)的制造方法中,通过对上述乙酰乙酰基-CoA还原酶基因和烯酰基-CoA水合成酶基因的表达量进行控制,能够对3-羟基丁酸(3-HB)与3-羟基己酸(3-HH)的共聚物中的3-羟基己酸(3-HH)的含量进行控制。

[0098] 另外,通过对碳源的残留量的控制、对培养液中的无机成分浓度的调整、对氧的通

气量以及培养时间进行调整,也能够对3-羟基丁酸(3-HB)与3-羟基己酸(3-HH)的共聚物中的3-羟基己酸(3-HH)的含量进行控制。

[0099] 多羟基烷酸(PHA)的回收、纯化方法没有特别限定,可列举为通过离心分离从培养基中回收,并利用溶剂等进行提取的方法、使上述微生物被动物消化、吸收而作为排泄物进行回收的方法等。从能够对多羟基烷酸(PHA)的浓度简便地进行浓缩的观点出发,优选为微生物被动物消化、吸收而作为排泄物中所含的颗粒状的多羟基烷酸(PHA)进行回收的方法。

[0100] 作为上述动物,可列举为啮齿类、山羊、绵羊、牛、鸡等动物、水生生物、甲虫、虫等。其中,优选为大黄粉虫幼体(mealworm)等甲虫的幼虫,更优选为35日龄的家蝇的虫蛀(黄粉虫的幼虫,*Tenebrio molitor*)。

[0101] 将上述微生物作为饵料提供给大黄粉虫幼体等幼虫后,回收粪便颗粒,使用筛网进行筛分后,用水、氢氧化钠等碱进行清洗、干燥,由此能够回收多羟基烷酸(PHA)。

[0102] 以下,举例示出关于多羟基烷酸(PHA)的制造方法的具体方式。

[0103] (1)P(3-HB)的制造方法

[0104] 使用*Cupriavidus necator* H16株,预培养后,转移至包含10g/L棕榈油、0.54g/L的尿素以及100 μ L的MM组合液(组成记载于以下(3))的500mL锥形烧瓶中,以200rpm在30 $^{\circ}$ C下振荡培养24小时。对培养后菌体进行冷冻干燥,将约5g溶于500mL的氯仿中,在室温下搅拌5天。用过滤器从该液体中分离出菌体残渣。将该溶液用旋转蒸发器浓缩,滴加到冷甲醇中,搅拌约2小时直至产生沉淀物,将作为多羟基烷酸(PHA)的不含3-羟基己酸(3-HH)的聚3-羟基丁酸P(3-HB)纯化。将产生的沉淀物用0.2 μ m的PTFE过滤器真空过滤,使其干燥。

[0105] (2)P(3-HB-co-3-HH)的制造方法

[0106] (a)用于制造P(3HB-co-3HH)的矿物质培养基的制备

[0107] 用于制造P(3HB-co-3HH)的矿物质培养基由4.0g/L的 NaH_2PO_4 、4.6g/L的 Na_2HPO_4 、0.45g/L的 K_2SO_4 、0.39g/L的 MgSO_4 、62mg/L的 CaCl_2 、1mL/L的微量元素溶液(微量元素溶液包含溶解于0.1M的HCl中的15g/L的 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、2.4g/L的 $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 、2.4g/L的 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 以及0.48g/L的 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)构成,在利用高压釜进行灭菌之前,将培养基的pH调整为7.0。

[0108] (b)使用了13L发酵槽的P(3HB-co-3HH)的生物合成

[0109] P(3HB-co-3HH)生物合成:使用导入了多羟基烷酸合成酶基因的钩虫贪铜菌来进行。

[0110] 首先,将导入了编码多羟基烷酸合成酶的基因的钩虫贪铜菌在琼脂板上画线,在30 $^{\circ}$ C下培养24小时。接着,作为预培养,使用铂环在50mL的培养液中接种两次上述钩虫贪铜菌,在30 $^{\circ}$ C的振荡培养箱中振荡8小时直至培养液的OD_{600nm}达到4。对于添加有尿素0.54g/L、 MgSO_4 0.39g/L、 CaCl_2 62mg/L、微量元素溶液1mL/L以及粗棕榈仁油1质量%的矿物质培养基100mL,接种上述培养液约3mL。粗棕榈仁油在添加至矿物质培养基之前进行了高压釜处理。进一步地,将该矿物质培养基培养18小时,接种于6L的发酵槽。在转移至发酵槽之前检查所接种的所述钩虫贪铜菌的形态(10%v/v)。培养基的温度维持在30 $^{\circ}$ C,并且培养基的pH通过添加3M的NaOH以及3M的 H_3PO_4 而设定为 7.0 ± 0.1 。搅拌使用Rushton涡轮以200~900rpm搅拌速度进行搅拌。通过滤筒(Sartorius stedim, Germany),以1vvm(空气体积/发酵槽的作业体积/分钟)供给空气,将溶解氧浓度维持在40%以上。 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 在培养后每18小时添加一次,尿素每6小时添加一次。微量元素在种植期间以及培养的第18小时加入1mL。粗

棕榈仁油根据微生物对油的消耗,每6小时以10g/L~20g/L的浓度供给。为了确定细菌培养物的残余油分、湿润细胞重量以及光学密度,每隔6小时进行取样。培养时间根据细菌的增殖为48小时至72小时的范围。

[0111] (c)P(3HB-co-3HH)的生物学回收

[0112] 在周围温度(约25℃)下,在塑料容器中饲养35日龄的大黄粉虫幼体(黄粉虫的幼虫,*Tenebrio molitor*)。对上述饲养的100g大黄粉虫幼体供给包含上述P(3HB-co-3HH)的干燥微生物。

[0113] 所供给的微生物的量基于大黄粉虫幼体的体重进行供给(每日体重的5%)。在供给新批次的微生物之前,回收大黄粉虫幼体的粪便颗粒,使用0.50mm以及0.25mm尺寸的筛网进行筛分。通过进行双重筛分,能够去除其他杂质,使之后的清洗工序变得容易。

[0114] (d)使用了蒸馏水的P(3HB-co-3HH)的纯化

[0115] 将约10%(w/v)的粪便颗粒加入自来水中,浓度为100g/L。冲洗粪便颗粒悬浮液数次,在弃去上清液之前使其沉降。去除上清液,将回收的P(3HB-co-3HH)在50℃的烘箱中干燥至一定质量。

[0116] 再将上述干燥后的P(3HB-co-3HH)在0.25M的NaOH中冲洗1小时,使混合物沉降,去除上清液,将回收的颗粒在自来水中进一步搅拌1小时直至pH降低至小于9.5。接着,将回收的P(3HB-co-3HH)颗粒在50℃的烘箱中干燥至一定质量,回收作为目标的P(3HB-co-3HH)。

[0117] (3)P(3HB-co-4HB)的制造方法

[0118] 使用*Cupriavidus necator* Re2058/pHT1phaCCs株,在NR琼脂培养基(添加有50μg/mL卡那霉素)30℃下进行平板培养,使其增殖。收集增殖后的细胞并转移到50ml的MM培养基中,在48℃、200rpm下培养48小时。培养后,以8000rpm离心分离10分钟收集菌体,冷冻干燥2天。P(3HB-co-4HB)的提取通过氯仿与上述(1)同样地进行。

[0119] MM培养基的组成

果糖	10g/L
4-羟基丁酸钠	9g/L
磷酸二氢钠	4.0g/L
磷酸氢二钠	4.6g/L

[0120] 硫酸钾 0.45g/L

硫酸镁 0.39g/L

氯化钙 62mg/L

尿素 0.54g/L

TE溶液 1.0g/L

[0121] TE溶液的组成

硫酸亚铁 15g/L

[0122]

硫酸锰 2.4g/L

[0123]	硫酸锌	2.4g/L
	硫酸铜	0.48g/L

[0124] [包含多羟基烷酸 (PHA) 的树脂组合物]

[0125] 本发明的多羟基烷酸 (PHA) 只要不损害其物性,也可以与其他添加物混合而制成树脂组合物。作为其他添加剂,可以使用本发明的多羟基烷酸 (PHA) 以外的其他树脂、抗氧化剂、紫外线吸收剂、增塑剂、阻燃剂、无机填充剂、结晶成核剂等。

[0126] 作为本发明的聚羟基烷酸 (PHA) 以外的其他树脂,可列举为热塑性树脂、热固性树脂等,可列举为聚乙烯、聚丙烯等聚烯烃系树脂、聚酰亚胺、聚酰胺、聚苯醚、聚醚酮、聚醚酮酮、聚丁二烯、聚苯乙烯、聚酯、聚乳酸、酚醛树脂、聚(甲基)丙烯酸、降冰片烯树脂等。其中,优选为生物降解性树脂。

[0127] [包含多羟基烷酸 (PHA) 的微粒]

[0128] 本发明的包含多羟基烷酸 (PHA) 的微粒的形状可以采用球状、板状、纺锤状、针状等各种形状,优选为球状的形状。

[0129] 另外,若也考虑应用于医疗用途,则本发明的包含多羟基烷酸 (PHA) 的微粒的粒径为 $0.2\mu\text{m}$ ~小于 $10\mu\text{m}$,优选为 $7\mu\text{m}$ 以下。此外,关于本发明的包含多羟基烷酸 (PHA) 的微粒的粒径的测定方法,在下述中详细记载,使用了基于SEM观察图像和软件(ImageJ)的处理、以及动态光散射法。

[0130] 进一步地,本发明的包含多羟基烷酸 (PHA) 的微粒为了增大表面积,可以采用多孔质的形态。

[0131] 进一步地,本发明的包含多羟基烷酸 (PHA) 的微粒不仅可以在微粒的表面保持其他物质,还可以在内部保持其他物质。作为其他物质,只要不损害本发明的包含多羟基烷酸的微粒的特征,就没有特别限制,例如可列举为碳酸钙、氧化铝、氧化镁、碳酸镁、云母、滑石、二氧化硅等无机粉体物质类、或者硬脂酸镁、硬脂酸锌等有机粉体物质类、溶剂可溶性物质。

[0132] 进一步地,本发明的包含多羟基烷酸 (PHA) 的微粒可以采取10%压缩强度为 $0.23\sim 2.20\text{MPa}$ 的方式。本发明所涉及的微粒的10%压缩强度例如可以通过混合存在纤维素等树脂来进行调整。

[0133] 另外,本发明的包含多羟基烷酸 (PHA) 的微粒包含能够分散于水系溶剂中的方式。作为水系溶剂,可列举为水,但并不限定于水,可列举为水与醇等亲水性溶剂的混合溶剂。本发明所涉及的包含多羟基烷酸 (PHA) 的微粒能够分散于水系溶剂中,因此能够期待可应用于各种用途的效果。

[0134] [包含多羟基烷酸 (PHA) 的微粒的制造]

[0135] 作为由本发明所涉及的多羟基烷酸 (PHA) 制造微粒的方法,可以应用喷雾干燥法、分散法等各种方法,但从能够应用于多种多羟基烷酸 (PHA)、且能够使微粒的粒径、强度在宽范围内变化、制造工艺也简便等方面考虑,优选为电喷雾沉积法。以下,对电喷雾沉积法(ESD法)进行说明,但作为由本发明所涉及的多羟基烷酸 (PHA) 制造微粒的方法,并不限定于电喷雾沉积法。

[0136] [电喷雾沉积法]

[0137] 对作为本发明的具体实施方式而使用的电喷雾沉积法的原理以及用于实施电喷

雾沉积法的电喷雾沉积装置(ESD:静电喷雾装置)进行说明。

[0138] 在图1中示出了表示电喷雾沉积装置的基本结构的概念图。如图所示,容器CNT收容有试样溶液SL。试样溶液SL例如有机高分子溶液或聚合物溶液等。在本实施方式中,作为试样溶液,为溶解于溶剂的多羟基烷酸(PHA)溶液、或二氧化硅微粒分散液。

[0139] ESD法是非常复杂的物理现象,尚未阐明其全部的过程,但一般认为是如下的现象。试样溶液收纳于细毛细管状的喷嘴NZN,对与其对置的靶基板TS(对置电极)施加几千到几万伏的电压。在毛细管前端,由于电场集中的效应而产生强力的电场,在液体表面具有电荷的微小液滴聚集而形成锥体(被称为泰勒锥(Taylor Cone))。进一步地,试样溶液从该前端冲破表面张力而形成射流。射流强烈带电,由于静电力的排斥而形成喷雾(库仑爆炸)。通过喷雾而形成的液滴非常小,在短时间内溶剂蒸发干燥,形成为微细的纳米颗粒、纳米纤维。当然,也可以在不蒸发、干燥的湿状态下堆积。该带电的微细的纳米颗粒、直径细的纳米纤维被静电力吸引到作为对置电极而发挥功能的靶基板TS。沉积的图案能够通过未图示的绝缘体掩模、辅助电极来进行控制。试样只要是液状即可,不限于溶液,即使是分散液也没有问题。

[0140] 另外,优选容器CNT内的试样溶液利用气压注射泵、柱塞等(喷出机构,未图示)向喷嘴NZN侧施加挤出的压力。挤出的压力例如由步进马达和丝杠进给机构(未图示)施加。受到挤出压力的试样溶液SL在容器CNT内内压增加,从喷嘴NZN的前端排出。如上所述,通过设置对喷出试样溶液的速度进行调整的调整机构(步进马达和丝杠进给机构),能够调整为适当的喷出速度。

[0141] 喷嘴NZN为金属制,从高电压电源HPS经由导体的导线WL供给正电压。高电压电源HPS的负侧与靶基板TS(成为对置电极的基板)相连。通过从高电压电源HPS施加电压,经由喷嘴NZN对试样溶液SL施加正电压,溶液带正电。此外,施加于试样溶液SL的电压的极性也可以为负。

[0142] 为了实施本发明,需要抑制纳米纤维的形成而仅制作微粒,并对其粒径、物性进行控制,需要对试样以及溶剂的选择、试样溶液的浓度、电压的高低、喷雾距离、温度、湿度等环境条件等进行调整。

[0143] 被喷雾的材料形成为纤维、液滴,在因带电所产生的排斥而飞散的期间内反复分裂,形成纳米纤维、纳米颗粒。由于被喷雾的材料为纳米尺寸且表面积大,因此在到达基板或受液槽时形成为大致干燥的状态。可以根据喷雾条件来改变形状、尺寸,例如在使用高分子溶液的情况下,如果增大分子量而提高浓度,则形成粗的纳米纤维,如果减小分子量而降低浓度,则形成细的纳米纤维、或纳米颗粒。除此以外,喷嘴-基板间的电压、距离、周边温度、湿度等各种条件会产生影响。在本实施方式中,使用各种溶剂可溶性的多羟基烷酸作为试样,在各种条件下制作微粒,利用实施例记载的方法进行微粒的粒径、形状、表面形状等的确认。作为电喷雾沉积装置,不仅能够使用上述的装置,还能够使用其他类型的ESD装置,尤其是在以量产为目的的情况下,优选为日本再表2009/060898号所记载的使用气流的方法。

[0144] 为了制造本发明的包含多羟基烷酸(PHA)的微粒,重要的是选择适当的溶剂。作为溶剂,只要是充分溶解该PHA聚合物并且更强地抑制纳米纤维的形成、促进微粒形成的溶剂,并进一步地具有对使粒径变化有用的效果,则没有特别限定。在以下的实施例中,从这

样的观点出发,使用氯仿和碳酸二甲酯作为优选的溶剂。

[0145] [包含多羟基烷酸 (PHA) 的微粒的回收方法]

[0146] 作为所制造的微粒的回收方法,在由多羟基烷酸 (PHA) 制造的物质为纳米纤维的情况下,能够在着地部制作纳米纤维结构,但在所制造的物质为微粒的情况下,需要在不使这些微粒粘连的情况下从着地部进行回收。因此,虽然也取决于着地部的环境条件,但根据多羟基烷酸 (PHA) 的物性、所使用的溶剂,需要在液体中而不是固体面上进行回收。

[0147] 作为微粒的具体的回收方法,需要在微粒彼此不因表面电位等而结合的情况下进行回收,在使用自来水来回收所制造的微粒的情况下,观察到由于表面电位等的影响而颗粒彼此结合,因此为了在微粒彼此不结合而颗粒分散的状态下进行回收,优选使用乙醇进行回收。作为乙醇,可以使用无水乙醇,但根据所制造的微粒,也可以用10~30%左右的水稀释后使用。此外,即使是自来水,通过适当配合阴离子系表面活性剂等,也能够以微粒彼此不结合而分散的状态进行回收。

[0148] 为了回收干燥后的颗粒,在使用乙醇进行回收的情况下,优选为真空干燥,但即使自然干燥也能够回收。在利用配合有表面活性剂的自来水进行回收的情况下,优选为真空干燥。

[0149] [包含多羟基烷酸 (PHA) 的微粒的粒径的测定方法]

[0150] (1) 基于SEM观察图像和软件 (ImageJ) 的处理

[0151] 是将通过SEM得到的图像用ImageJ进行处理而得到粒径的测定方法,ImageJ是开源的,是公有领域的图像处理软件,被广泛用于科学研究中的图像分析,在生物学中成为事实标准 (de facto standard) 的分析工具。通过基于ImageJ的处理,能够由SEM图像照片计算出粒径。作为具体的步骤,1. 图像输入、2. 自动二值化、3. 删除不需要的颗粒、4. 二值图像孔洞填充、以及5. 测定结果。研究的结果是,尤其是在数 μm 以上的微粒的情况下,优选使用该方法,关于通过本方法得到的测定结果的准确性,通过使用由P(3-HB-co-4-HB)得到的数百nm级的微粒,通过本方法和动态光散射法这两种方法对粒径进行测定来进行确认。其结果如以下在实施例4中记载的那样,通过两种方法得到的测定结果大致一致。尤其是,若考虑到粒径小于500nm这样非常微小的情况,则可以判断为本方法的测定结果的准确性非常高。

[0152] (2) 动态光散射法

[0153] 在微粒的颗粒径 (粒径) 测定中,除上述以外还有多种方法。使用电检测体法、离心沉降法、激光衍射法、FFF法等,各有所长,但据说能够测定电子显微镜测定水平的大小的仅是动态光散射法,在超微粒测定中被有效利用。在本开发中,在亚微米级的微粒的粒径测定中使用了动态光散射法。所使用的装置为HORIBA NANO PARTICLE ANALYZER SZ-100,测定条件如下所述。

[0154] 检测角度:90

[0155] 支架温度:25.0°C

[0156] 试样折射率:1.500-0.000i

[0157] 分散介质文件:水

[0158] 分散介质折射率:1.333

[0159] 分散介质粘度:0.896mPa·s

[0160] 分子形态(分散度):多分散

[0161] 粒径基准:散射光强度

[0162] 计数率:1285kCPS

[0163] 以下,列举实施例对本发明进一步详细地进行说明。此外,这些并不对本发明进行任何限定。

[0164] 实施例

[0165] [实施例1]由P(3-HB)制造微粒

[0166] 将作为多羟基烷酸(PHA)的重复单元不含3-HH、由3-HB构成的P(3-HB)的树脂1.5g溶解于氯仿中,制作浓度为1.5%重量的样品溶液100g。将该样品溶液1mL放入图1所示的安装有内径为0.29mm的金属双喷嘴NZL(武藏高科技株式会社DN-24G)的玻璃制注射器(翼工业白硬注射筒1mL)的容器CNT中,并装配于电喷雾沉积装置(株式会社FONTEC制造的EsprayerES-2000)。在靶基板TS(集电极基板)上载置厚度为0.25毫米、直径为5cm、高度为1cm的铁制的8.9g的容器,向其中注入无水甲醇15mL。此时的电喷雾的条件设为喷嘴NZL-集电极(靶基板TS)间电压为25KV、喷嘴-集电极间距离为4cm、送液流速为20 μ L/分钟,在基板上向前后左右均匀地扫描而对整体进行喷雾并分散,得到P(3-HB)的微粒。此外,将溶液浓度设为0.7~3.0重量%,其他条件相同,得到包含P(3-HB)的微粒的液体。通过使该液体干燥,得到图2所示的微粒。由该SEM观察图像通过ImageJ的粒径分析求出平均粒径,结果为平均粒径为6.70 μ m。

[0167] [实施例2]由P(3-HB)制造多孔质微粒

[0168] 将作为多羟基烷酸(PHA)的重复单元不含3-HH、由3-HB构成的P(3-HB)的树脂1.5g溶解于氯仿中,制作浓度为1.5%重量的样品溶液100g。将该样品溶液1mL放入图1所示的安装有内径为0.21mm的金属喷嘴NZL(武藏高科技株式会社27G)的玻璃制注射器(翼工业白硬注射筒1mL)的容器CNT中,并装配于电喷雾沉积装置(株式会社FONTEC制造的EsprayerES-2000)。在靶基板TS(集电极基板)上载置厚度为0.5毫米、纵8cm \times 横10cm、高度为约5mm的铝制的11.5g的容器,向其中注入无水乙醇15mL,用于回收微粒。此时的电喷雾的条件设为喷嘴NZL-集电极(靶基板TS)间电压为25KV、喷嘴-集电极间距离为2.5cm、送液流速为10 μ L/分钟,在基板上前后左右均匀地扫描而对整体进行喷雾,得到分散的3-PHB(PHA0%)的微粒。此外,将溶液浓度设为0.7~3.0重量%,在其他喷嘴直径、流速的条件下也得到包含由P(3-HB)构成的微粒的液体。通过使该液体干燥,得到图3所示的微粒。根据SEM观察图像,确认了该微粒的形状为球形,表面为多孔状。另外,与实施例1同样地通过SEM观察图像和软件(ImageJ)对粒径进行测定,结果为粒径的平均为约6.4 μ m。据认为,形成为多孔质的主要原因与树脂自身的物性有关,在作为构成本发明所涉及的多羟基烷酸(PHA)的重复单元的3-羟基己酸(3-HH)的包含比例大的情况下,未观察到多孔质微粒的产生,例如,在配合有27%的3-羟基己酸(3-HH)的P(3-HB-co-3-HH)中,几乎未观察到多孔质微粒的产生。

[0169] [实施例3]由P(3-HB-co-3-HH)制造微粒

[0170] 将作为重复单元而包含27%的3-羟基己酸(3-HH)的P(3-HB-co-3-HH)的树脂1.5g溶解于氯仿中,制作浓度为1.5%重量的样品溶液100g。将该样品溶液1mL放入图1所示的安装有内径为0.42mm的金属喷嘴NZL(武藏高科技株式会社SNA-22G)的玻璃制注射器(翼工业白硬注射筒1mL)的容器CNT中,并装配于电喷雾沉积装置(株式会社FONTEC制造的

EsprayerES-2000)。在靶基板TS(集电极基板)上载置厚度为0.25毫米、直径为5.5cm、高度为1cm的铁制的8.9g的容器,向其中注入90%浓度的乙醇15ml。此时的电喷雾的条件设为喷嘴NZN-集电极(靶基板TS)间电压为25KV、喷嘴-集电极间距离为5cm、送液流速为20 μ l/分钟,在基板上前后左右均匀地扫描而对整体进行喷雾并分散,得到P(3-HB-co-3-HH)的微粒。此外,将溶液浓度设为0.7~3.0重量%,除此以外,在同样的条件(金属喷嘴24G、21G、DN-24)下也得到包含P(3-HB-co-3-HH)的微粒的液体。通过使该液体干燥,得到图4的微粒。根据SEM观察图像,该微粒的形状为大致球形,几乎看不到多孔质。与实施例1同样地通过SEM观察图像和软件(ImageJ)对粒径进行测定,结果为平均粒径为约6.6 μ m。

[0171] [实施例4]由P(3-HB-co-4-HB)制造微粒

[0172] 将作为重复单元而包含42%的4-羟基丁酸(4-HB)的P(3-HB-co-4-HB)的树脂1.5g溶解于碳酸二甲酯中,制作浓度为1.0%重量的样品溶液150g。将该样品溶液1mL放入图1所示的安装有内径为0.29mm的金属喷嘴NZN(武藏高科技株式会社DN-24G)的玻璃制注射器(翼工业白硬注射筒1ml)的容器CNT中,并装配于电喷雾沉积装置(株式会社FOUNTEC制造的EsprayerES-2000)。在靶基板TS(集电极基板)上载置厚度为0.25毫米、直径为5cm、高度为1cm的铁制的8.9g的容器,向其中注入自来水(在50ml中加入表面活性剂5滴)15ml。此时的电喷雾的条件设为喷嘴NZN-集电极(靶基板TS)间电压为25KV、喷嘴-集电极间距离为5cm、送液流速为20 μ l/分钟,在基板上前后左右均匀地扫描而对整体进行喷雾并分散,得到P(3-HB-co-4-HB)的微粒。此外,将溶液浓度设为0.7~3.0重量%,除此以外,在同样的条件下也得到包含P(3-HB-co-4-HB)的微粒的液体。通过使该液体干燥,得到图5的微粒。

[0173] 通过基于SEM观察图像和软件(ImageJ)处理的测定方法和动态散射光强度法对所得到的微粒的粒径进行测定。测定条件如上所述。

[0174] 其结果是,通过SEM观察图像和软件(ImageJ)处理测定的粒径以平均粒径计为0.42 μ m。另一方面,通过动态散射光强度法测定的众数直径为0.34 μ m(335.1nm)。因而,通过SEM观察图像和软件(ImageJ)处理测定的粒径420nm(0.42 μ m)与通过动态散射光强度法测定的众数直径335.1nm显示出极其近似的结果,可以确认基于SEM观察图像和软件(ImageJ)处理的粒径的测定是可靠性高的测定方法。

[0175] [实施例5]保持有其他化合物的微粒的制造

[0176] 加入作为多羟基烷酸(PHA)的重复单元而仅由3-HB构成的P(3-HB)的树脂1.5g、相对于其重量为0.5%的二氧化硅颗粒Admafine SC2500-SPJ(Admatechs公司制造),将其用氯仿溶解,制作P(3-HB)为1.5重量百分比的溶液约100g。将该样品溶液1mL放入图1所示的安装有内径为0.29mm的金属喷嘴NZN(武藏高科技株式会社DN-24G)的玻璃制注射器(翼工业白硬注射筒1ml)的容器CNT中,并装配于电喷雾沉积装置(株式会社FOUNTEC制造的EsprayerES-2000)。在靶基板TS(集电极基板)上载置厚度为0.25毫米、直径为5cm、高度为1cm的铁制的8.9g的容器,向其中注入无水乙醇15ml。此时的电喷雾的条件设为喷嘴NZN-集电极(靶基板TS)间电压为25KV、喷嘴-集电极间距离为4cm、送液流速为20 μ l/分钟(由于是双喷嘴,因此每1根为10 μ l/分钟),在基板上前后左右均匀地扫描而对整体进行喷雾,得到分散的P(3-HB)的微粒的分散液。将该微粒自然干燥,得到图6所示的微粒。该微粒的粒径为约6-10 μ m,在其表面保持有二氧化硅颗粒。

[0177] 对于上述的保持有二氧化硅颗粒的P(3-HB)微粒,通过以下的方法来确认在P(3-

HB) 微粒的内部也保持有该二氧化硅颗粒这一情况。

[0178] 通过以下的步骤,进行基于超薄切片法的修面,通过SEM进行观察。

[0179] 1) 在载玻片上载置试样。

[0180] 2) 在粉末上滴1滴包埋树脂,使其固化。使用EPON812(环氧树脂),在60℃下实施48小时。

[0181] 3) 在固化的树脂上覆盖充满包埋树脂的BEEM包埋管。

[0182] 4) 使包埋树脂固化(60℃、48小时)。

[0183] 5) 加热载玻片,剥离包埋树脂固化后的BEEM包埋管。

[0184] 6) 从BEEM包埋管中取出固化后的树脂。

[0185] 7) 利用光学显微镜确认粉末的位置并进行标记。

[0186] 8) 对粉末的周围进行修整。

[0187] 9) 将试样设置于超薄切片机,利用金刚石刀进行修面。

[0188] 10) 将试样切割为载置于样品台的高度。

[0189] 11) 利用导电性的双面胶带将试样粘贴于铜板。

[0190] 12) 进行碳蒸镀。

[0191] 将SEM的观察图像示于图7,由观察图像可以确认,在P(3-HB)微粒内也存在相当于二氧化硅颗粒的颗粒。进一步地,将SEM的BSE图像的观察图像示于图8。SEM的BSE图像是SEM的反射电子图像,是能够确认试样中的组成分布的方法,根据该观察图像,能够确认P(3-HB)微粒保持有化学组成与P(3-HB)微粒不同的颗粒。

[0192] 根据以上的结果,关于该微粒的保持二氧化硅颗粒的强度尚不明确,但确认了在电喷雾沉积操作后二氧化硅颗粒被保持在P(3-HB)颗粒表面以及内部。这表示不仅是通过电喷雾沉积操作将多羟基烷酸(PHA)微粒化,而且在该过程中使其他物质溶解或分散在喷雾溶液中,由此在本发明所涉及的包含多羟基烷酸(PHA)的微粒中保持其他物质并混入或一体化,显示了本发明所涉及的包含多羟基烷酸(PHA)的微粒作为其他物质的载体而有用的可能性。

[0193] [实施例6]包含多羟基烷酸(PHA)的微粒的压缩强度测定

[0194] 作为微粒所具有的物性的破坏强度、变形强度在研究该微粒在各种用途中的应用的情况下成为实用上重要的因素,因此对本发明所涉及的包含多羟基烷酸(PHA)的微粒进行压缩试验,对10%压缩强度进行了确认。作为样品,使用以下的样品。

[0195] 样品(1)由P(3-HB)制造的微粒(在实施例1中制造的微粒)

[0196] 样品(2)由P(3-HB-co-3-HH)制造的微粒(在实施例3中制造的微粒)

[0197] 压缩试验使用岛津微小压缩试验机MCT-510,在下述的条件下实施。此外,在玻璃板上极微量地散布样品,逐个微粒地进行压缩试验。试验结果以平均值进行评价。

[0198] 表1

[0199] 试验的种类	压缩试验
试验力(mN)	4.900
负荷速度(mN/sec)	0.0446
试验粒径(μm)	10±1
上部加压压头(μm)	平面 φ 50

试验次数	5
------	---

[0200] 将压缩试验的结果示于以下的表中。

[0201] 表2

试样编号	试样名	平均粒径 (μm)	10%变形时的 试验力 (mN)	10%强度 C(x) (MPa)
1	样品 (1)	10.47	0.31	2.20
2	样品 (2)	10.27	0.03	0.23

[0203] 根据以上的结果,本发明所涉及的包含多羟基烷酸(PHA)的微粒的样品作为10%压缩强度显示为0.23~2.20(MPa),因此确认具有耐受相当的压缩强度的强度。另外,由P(3-HB)制造的微粒与由作为重复单元而包含27%的3-羟基己酸(3-HH)的P(3-HB-co-3-HH)制造的微粒相比,作为10%压缩强度显示出高的值,确认为更高的强度。因而,本发明所涉及的包含多羟基烷酸(PHA)的微粒通过调整作为其重复单元的3-羟基己酸(3-HH)的配合比例而对强度进行调整,能够根据各种使用环境和用途进行应用。

[0204] [实施例7]多羟基烷酸(PHA)聚合物的热性质

[0205] 在作为本发明所涉及的微粒的原料的多羟基烷酸(PHA)的物性中,从用于将微粒应用于实际用途的加工容易性等来看,熔点是重要的物性之一,如果能够使熔点变化,则在加工等中能够成为有利的物性。关于迄今为止研究相对地取得进展的P(3-HB)的熔点,据报告在多数情况下为170~180°C,相对于此,作为重复单元而包含27%的3-羟基己酸(3-HH)的P(3-HB-co-3-HH)的熔点未知,P(3-HB-co-4-HB)的熔点根据文献而存在相当大的变动,因此通过以下的方法进行了确认。

[0206] 测定利用PerkinElmer公司制造的差示扫描热量计DSC8500来进行,作为测定条件,使用样品约6mg,在氮气气氛下,以5.00°C/分钟从5.00°C升温至200.00°C来进行。

[0207] 其结果是,确认了P(3-HB-co-3-HH)的熔点为79.8°C,P(3-HB-co-4-HB)的熔点为56°C。

[0208] 工业实用性

[0209] 本发明所涉及的包含多羟基烷酸(PHA)的微粒的加工性、自然环境下的生物降解性、生物相容性、生物体内降解性等优异,具有较宽的熔点、粒径和适度的压缩强度,能够用于多种工业用途、医疗用途,并且完全不产生微塑料等对环境造成的问题。

[0210] 附图标记说明

[0211] CNT:容器;

[0212] HPS:高电压电源;

[0213] NZL:喷嘴;

[0214] SL:试样溶液;

[0215] TS:靶基板;

[0216] ESD:电喷雾沉积装置;

[0217] WL:导线。

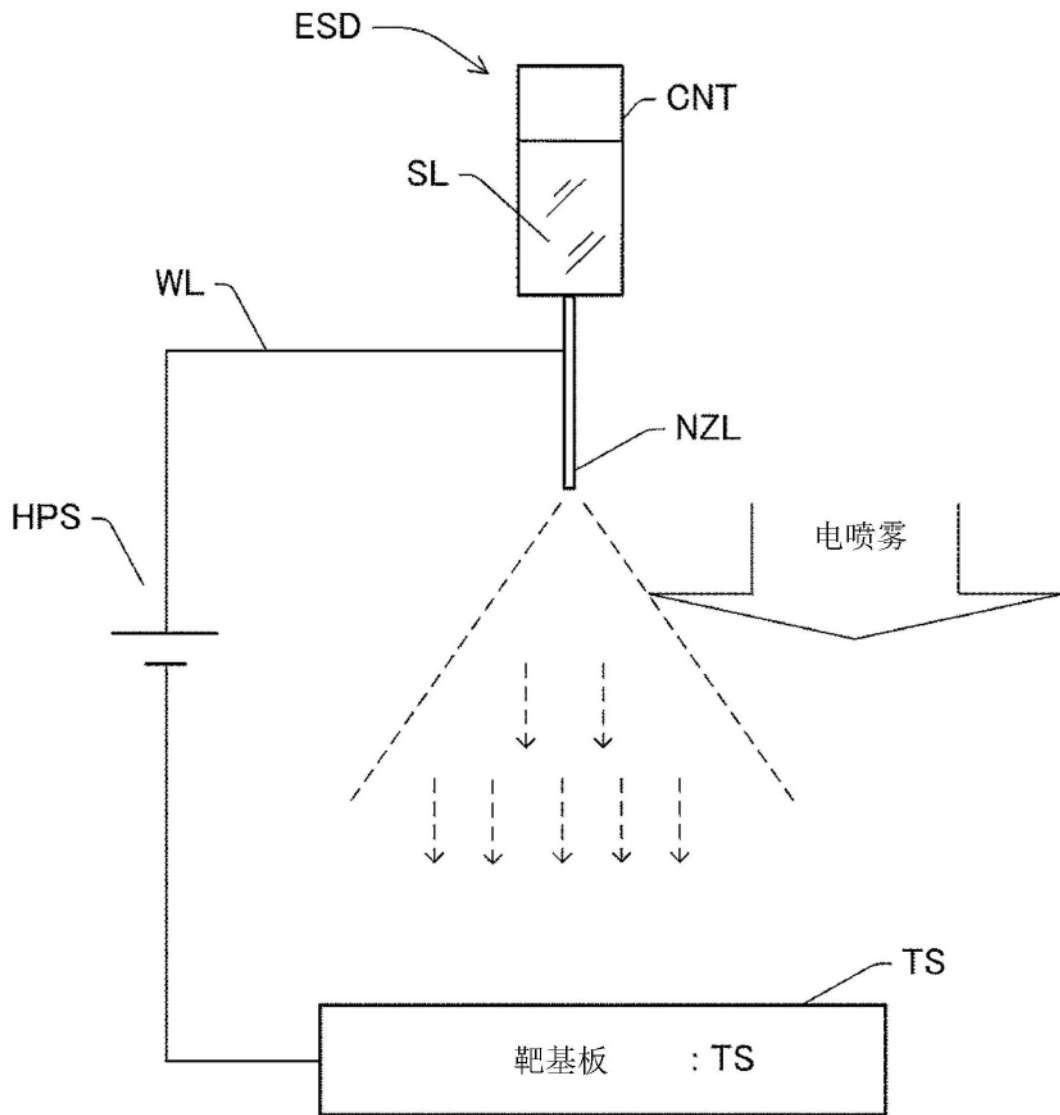


图1

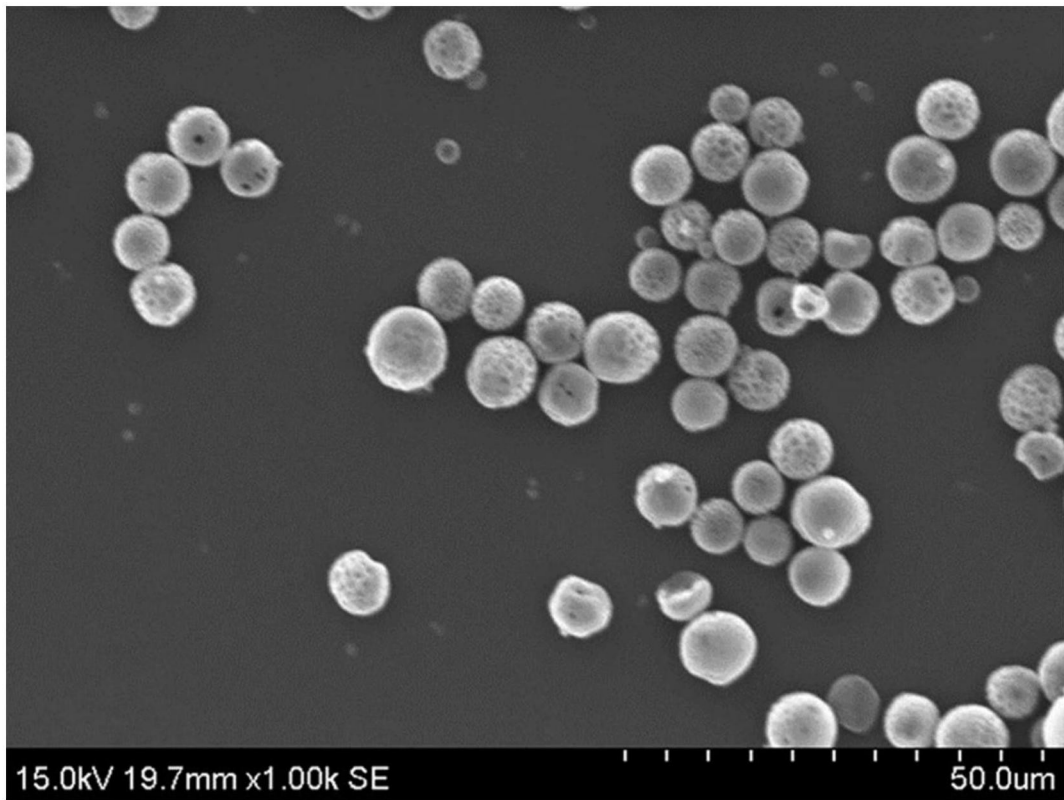


图2

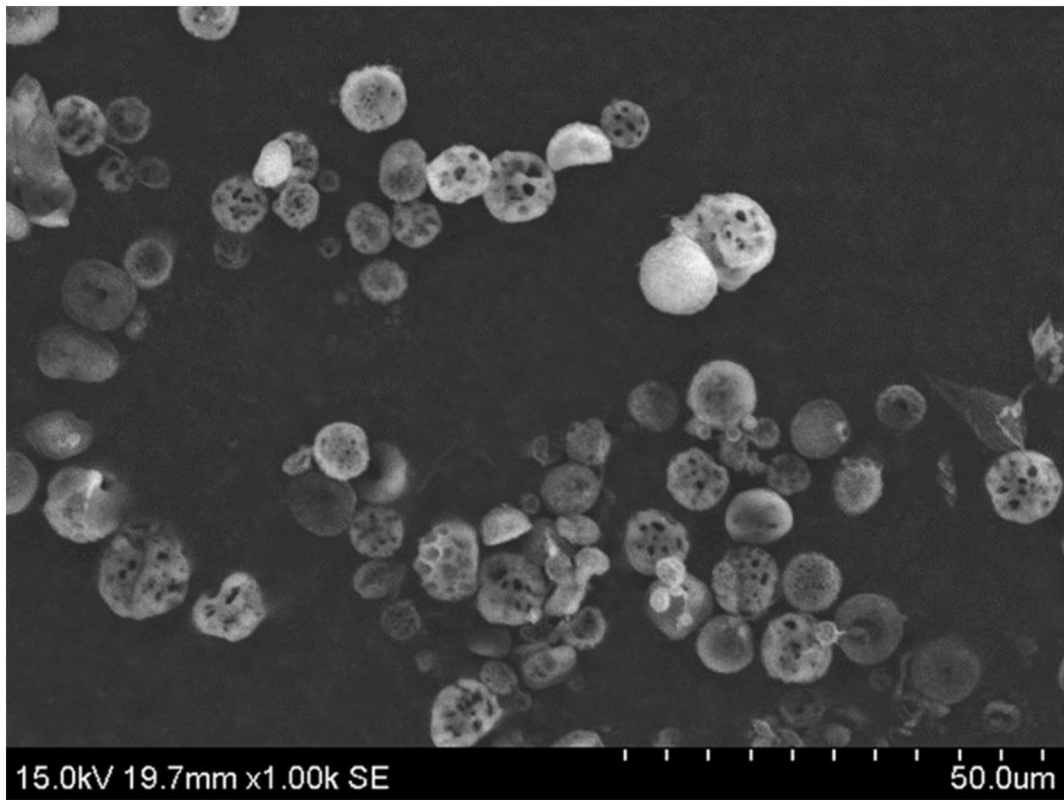


图3

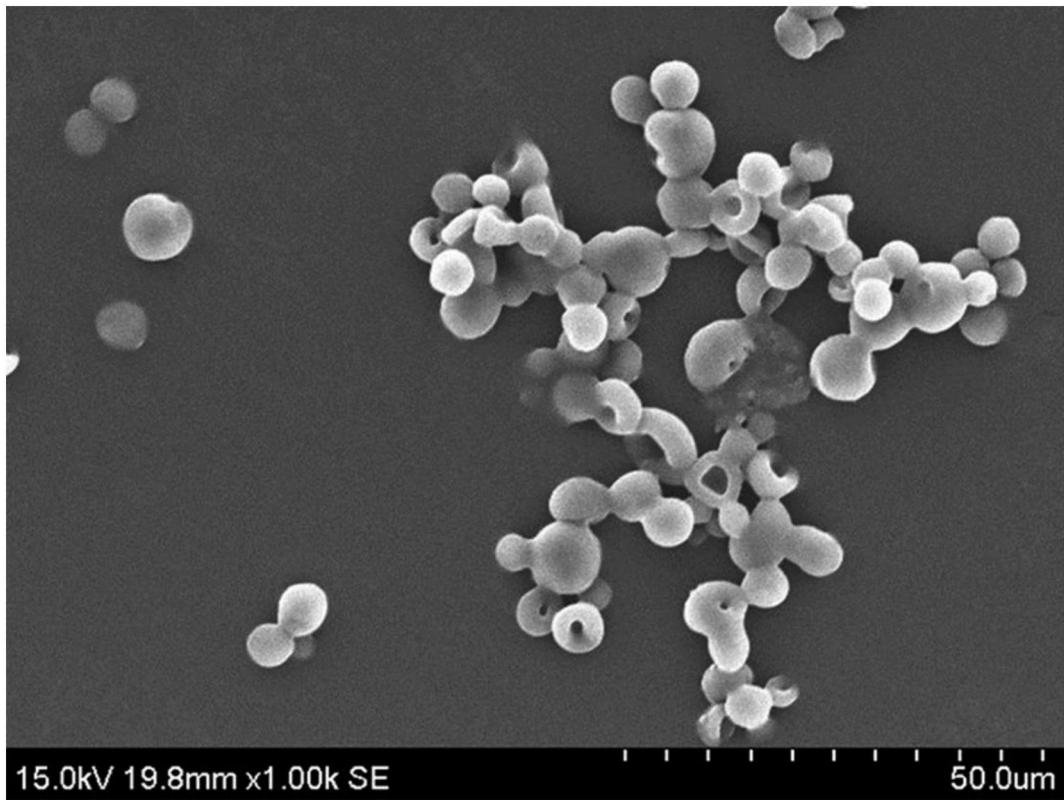


图4

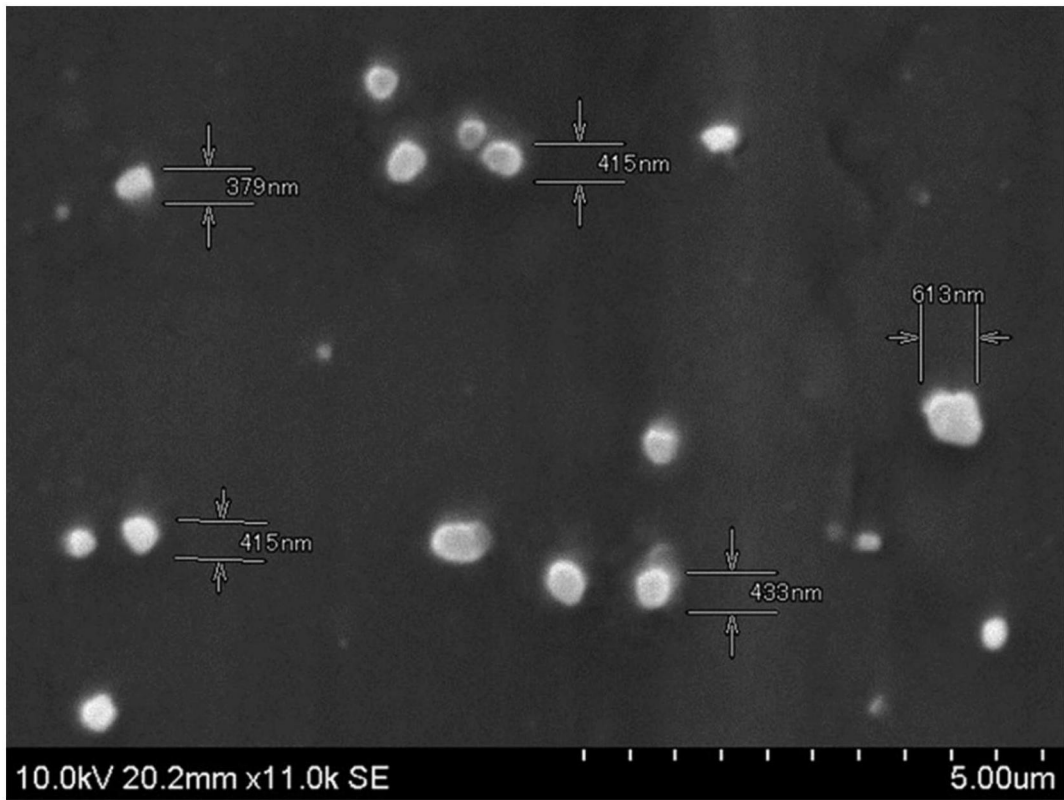


图5

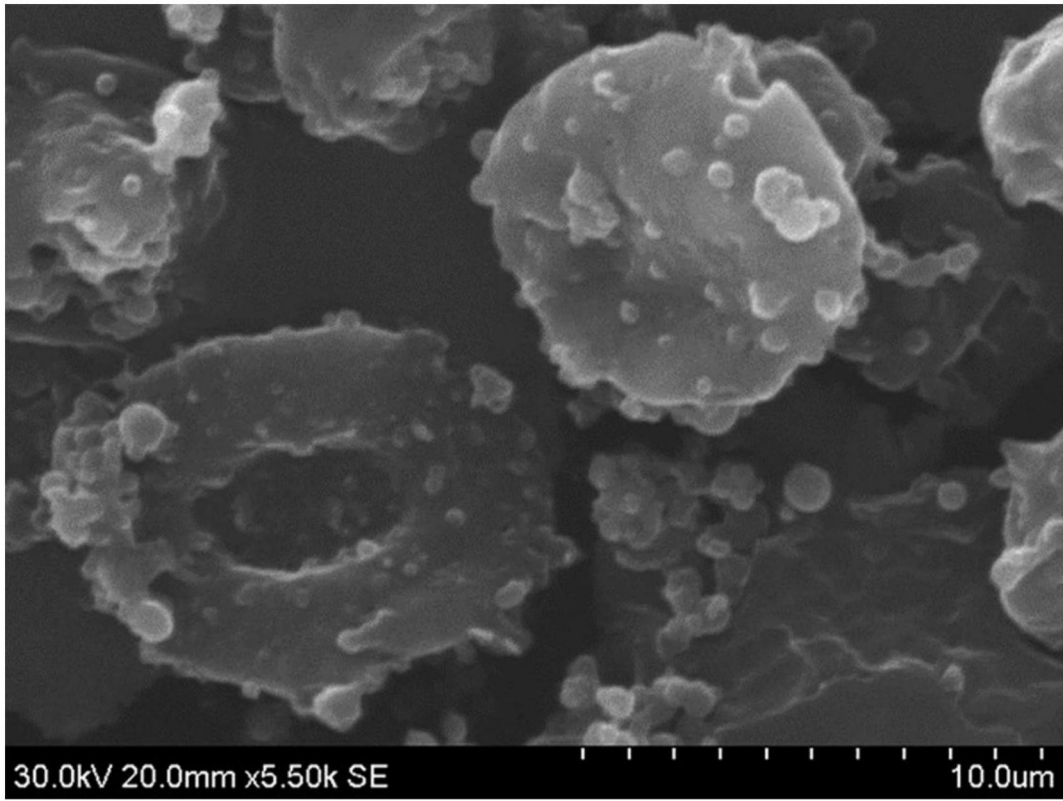


图6

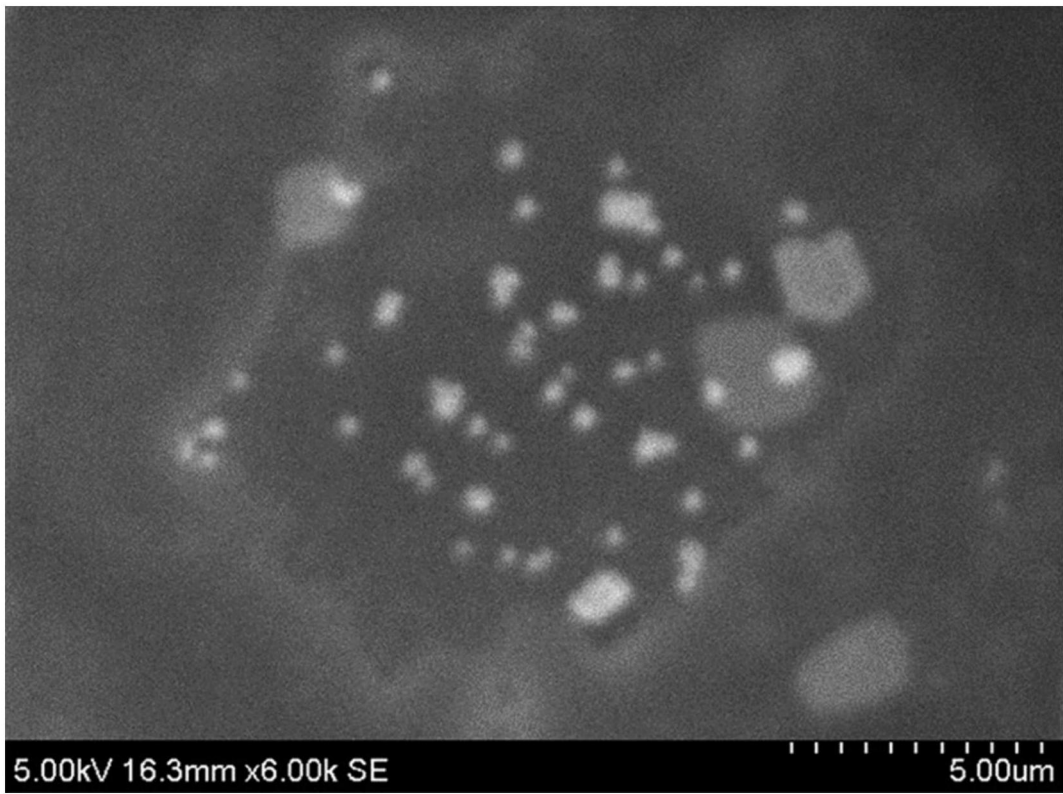


图7

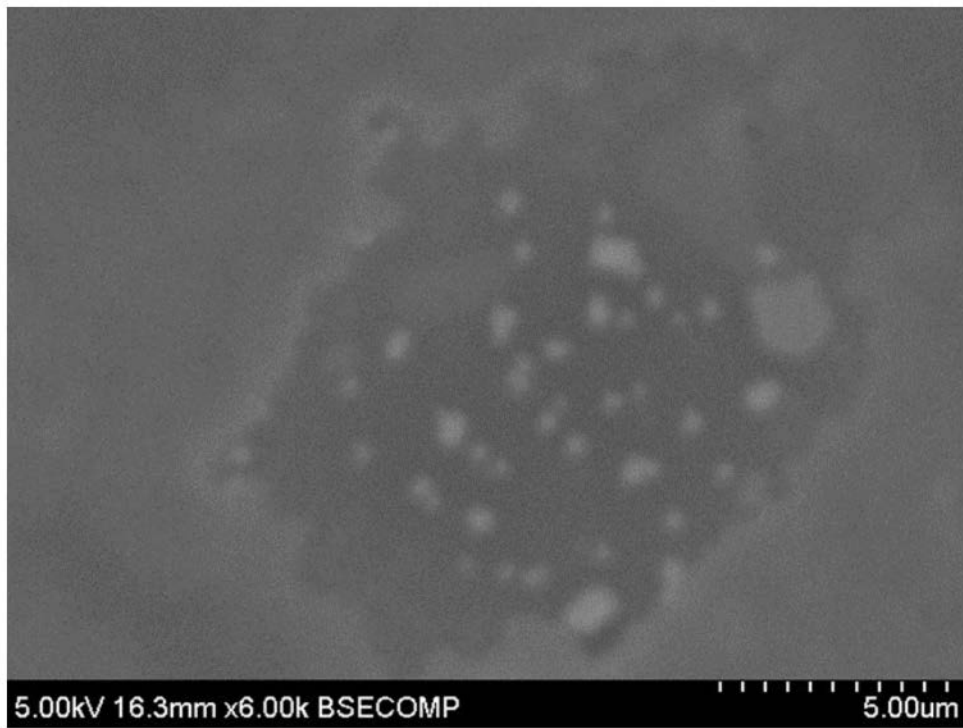


图8