



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102224251 A

(43) 申请公布日 2011. 10. 19

---

(21) 申请号 200980146664. 6 *C08G 63/06* (2006. 01)  
(22) 申请日 2009. 12. 02 *C08G 63/88* (2006. 01)  
(30) 优先权数据 *C08L 101/16* (2006. 01)  
2008-313331 2008. 12. 09 JP  
(85) PCT申请进入国家阶段日  
2011. 05. 24  
(86) PCT申请的申请数据  
PCT/JP2009/006546 2009. 12. 02  
(87) PCT申请的公布数据  
W02010/067543 JA 2010. 06. 17  
(71) 申请人 株式会社钟化  
地址 日本大阪府大阪市  
(72) 发明人 泷田昌辉 柳田义文  
(74) 专利代理机构 上海瀚桥专利代理事务所  
(普通合伙) 31261  
代理人 曹芳玲  
(51) Int. Cl.  
*C12P 7/62* (2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 9 页

---

(54) 发明名称

聚-3-羟基烷酸的生产方法及其凝集体

(57) 摘要

在工业性分离、精制微生物产生的聚-3-羟基烷酸时,能够在减少来源于菌体构成成分的杂质的同时,抑制有机溶剂的使用量,并且以高生产率获得任意体积平均粒径的聚-3-羟基烷酸凝集体。本发明中,将聚-3-羟基烷酸水性悬浊液的pH调节到酸性区域,而获得聚-3-羟基烷酸的凝集体。

1. 一种聚-3-羟基烷酸的制造方法,其特征在于,将聚-3-羟基烷酸水性悬浊液的 pH 调节到酸性区域,而获得聚-3-羟基烷酸的凝集体。

2. 根据权利要求 1 所述的聚-3-羟基烷酸的制造方法,其特征在于,酸性区域是 pH 2 以上的酸性区域。

3. 根据权利要求 2 所述的聚-3-羟基烷酸的制造方法,其特征在于,酸性区域是 pH 3 以上的酸性区域。

4. 根据权利要求 1 至 3 中任意一项所述的聚-3-羟基烷酸的制造方法,其特征在于,聚-3-羟基烷酸水性悬浊液中存在的有机氮量相对于聚-3-羟基烷酸重量为 6000ppm 以下。

5. 根据权利要求 4 所述的聚-3-羟基烷酸的制造方法,其特征在于,聚-3-羟基烷酸水性悬浊液中存在的有机氮量相对于聚-3-羟基烷酸重量为 4000ppm 以下。

6. 根据权利要求 1 至 5 中任意一项所述的聚-3-羟基烷酸的制造方法,其特征在于,聚-3-羟基烷酸水性悬浊液中包含的溶剂是水、与水具有相溶性的有机溶剂、或者水和所述有机溶剂的混合溶剂。

7. 根据权利要求 1 至 6 中任意一项所述的聚-3-羟基烷酸的制造方法,其特征在于,聚-3-羟基烷酸是从由 3-羟基丙酸、3-羟基丁酸、3-羟基戊酸、3-羟基己酸、3-羟基庚酸以及 3-羟基辛酸形成的组中选择的两种以上的 3-羟基烷酸所构成的共聚体。

8. 根据权利要求 7 所述的聚-3-羟基烷酸的制造方法,其特征在于,聚-3-羟基烷酸是 3-羟基己酸和 3-羟基丁酸的二元共聚体,或者是 3-羟基己酸、3-羟基丁酸和 3-羟基戊酸的三元共聚体。

9. 根据权利要求 1 至 8 中任意一项所述的聚-3-羟基烷酸的制造方法,其特征在于,使用微生物生产聚-3-羟基烷酸。

10. 根据权利要求 9 所述的聚-3-羟基烷酸的制造方法,其特征在于,微生物是属于气单胞菌属、产碱杆菌属、青枯菌属或者贪铜菌属的微生物。

11. 根据权利要求 10 所述的聚-3-羟基烷酸的制造方法,其特征在于,微生物是钩虫贪铜菌。

12. 根据权利要求 9 所述的聚-3-羟基烷酸的制造方法,其特征在于,微生物是转化株。

13. 根据权利要求 12 所述的聚-3-羟基烷酸的制造方法,其特征在于,微生物是导入了来源于豚鼠气单胞菌的聚-3-羟基烷酸合成酶基因和 / 或其变异体的转化株。

14. 一种根据权利要求 1 至 13 中任意一项所述的方法制造的、有机氮量为 500ppm 以下的聚-3-羟基烷酸凝集体。

15. 根据权利要求 14 所述的聚-3-羟基烷酸凝集体,其特征在于,所述聚-3-羟基烷酸凝集体的体积平均粒径为 20  $\mu\text{m}$  以上。

16. 根据权利要求 15 所述的聚-3-羟基烷酸凝集体,其特征在于,所述聚-3-羟基烷酸凝集体的体积平均粒径为 30  $\mu\text{m}$  以上。

17. 根据权利要求 16 所述的聚-3-羟基烷酸凝集体,其特征在于,所述聚-3-羟基烷酸凝集体的体积平均粒径为 100  $\mu\text{m}$  以上。

## 聚-3-羟基烷酸的生产方法及其凝集体

### 技术领域

[0001] 本发明涉及从聚-3-羟基烷酸水性悬浊液中形成聚-3-羟基烷酸凝集体的方法, 以及由此得到的凝集体。

### 背景技术

[0002] 聚-3-羟基烷酸(以下简称 PHA)是在很多微生物种的细胞中作为能量贮藏物质而生成、贮藏的热塑性聚酯, 具有生物降解性。现在由于环保意识提高, 非石油来源的塑料受到关注。其中尤其关注能进入自然界的物质循环、降解生成物为无害的如 PHA 那样的生物降解性塑料, 并期望其实用化。尤其是, 微生物菌体内生成、贮藏的 PHA 由于能进入自然界的碳循环, 因此预计对生态系统的不良影响较小。

[0003] 由于微生物生成的 PHA 通常形成颗粒体而在该微生物的菌体内贮藏, 因此为了将 PHA 作为塑料利用, 需要从微生物的菌体内分离并提取 PHA 的工序。另外, 为了作为塑料使用, 希望提高 PHA 的纯度, 降低菌体构成成分等杂质的含有量。

[0004] 作为降解和/或去除 PHA 以外的生物来源成分的方法, 已公开通过物理处理、化学处理或者生物处理使 PHA 以外的生物来源成分溶解并去除的方法。对含有 PHA 的微生物菌体的处理方法, 例如, 可以列举出将破碎处理与表面活性剂处理相结合的方法(专利文献 1), 添加碱进行加热处理之后、进行破碎处理的方法(专利文献 2)等。此外, 公开了用次氯酸钠、酶等处理微生物菌体的水性悬浊液, 溶解 PHA 以外的生物来源成分, 获得 PHA 的方法(专利文献 3)。

[0005] 另外, 作为从经破碎含有 PHA 的微生物的菌体或者溶解 PHA 以外的生物来源成分而得到的水性悬浊液中提取 PHA 的手段, 可以列举出离心分离机、过滤等分离操作, 或者喷雾干燥等干燥操作。但是将菌体生产的 PHA 粒子照原样作为原始粒子提取后, 存在细粉变多, 难以作为产品处理的问题。

[0006] 如通常所知, 添加盐等之后, 可以凝集微细的浆液状固液分散液中的固体粉末。但是, 在含有从破碎的细胞中漏出的细胞质成分的水性悬浊液中, 除了 PHA 之外, 还含有蛋白质等, 从中仅凝集目的物 PHA 是极其困难的, 至今没有这样的例子。即使使用在活性污泥处理等中广泛使用的硫酸铝等, 也由于使水性悬浊液中几乎全部成分均凝集, 因此不能只选择性地凝集目的物 PHA。另外, 即使能通过高分子凝集剂等选择性地凝集 PHA, 也难以将这些添加剂与 PHA 分离, 因此对作为高分子材料的品质产生了影响。

[0007] 作为不利用凝集剂的方法, 已知加热 PHA 悬浊液的方法(专利文献 4)、反复加热和冷却的方法(专利文献 5)等。这两种方法均需要加热直到 PHA 的熔点附近, 因此担心伴随加热的 PHA 分子量的降低。

[0008] 另一方面, 已知通过将 PHA 溶解在有机溶剂中之后, 添加溶解度低的有机溶剂或水, 来使溶解的 PHA 析出的方法。根据该方法, 由于能够精制 PHA 溶液, 因此能得到纯度最高的 PHA。作为这样的溶剂提取方法, 公开了以低级酮等为提取溶剂的例子(专利文献 6), 使用四氢呋喃的例子(专利文献 7)等。如果向溶解了 PHA 的有机溶剂中添加弱溶剂, 则能

够使 PHA 析出,根据添加的溶剂种类、温度或添加量等添加条件、添加时的搅拌条件等,能够比较任意地控制析出体的形状或大小。

[0009] 这样通过使 PHA 从有机溶剂中析出,来能控制析出物的形状或大小这一点,对使用水溶性溶剂精制的 PHA 中细粉太多的问题而言,是非常有效的解决方法。但是,存在提取时要使用大量有机溶剂,且存在为了使原本降解性高的 PHA 溶解而将其加热后,精制工序中 PHA 的分子量降低等根本性问题。

[0010] 因此,在工业性分离、精制微生物产生的 PHA 时,存在如下问题,即不能在减少来源于菌体构成成分的杂质的同时考虑环境,并且无法以高生产率获得任意体积平均粒径的 PHA 粒子的问题。而且,由于支配 PHA 凝集的参数不明确,因此,提出该问题的解决办法是极其困难的。

[0011] 现有技术文献

专利文献

专利文献 1: 日本特表平 08-502415 号公报;

专利文献 2: 国际公开第 2004/065608 号;

专利文献 3: 日本特开 2005-348640 号公报;

专利文献 4: 日本特表 2000-502399 号公报;

专利文献 5: 日本特表 2002-517582 号公报;

专利文献 6: 日本特表平 10-504460 号公报;

专利文献 7: 日本特开平 07-79788 号公报。

## 发明内容

[0012] 发明要解决的课题

本发明的课题在于,在工业性分离、精制微生物产生的 PHA 时,在减少来源于菌体构成成分的杂质的同时,抑制有机溶剂的使用量,不添加盐、高分子凝集剂等,以及不进行高温处理,并且能高生产率地获得任意体积平均粒径的 PHA 粒子。

[0013] 解决问题的手段

本发明的发明人发现,通过将含有 PHA 的水性悬浊液的 pH 调节到酸性区域,无需加热至 PHA 的熔点附近,而在相对较低的温度,即使不添加盐、高分子凝集剂等,PHA 也会凝集,而实现本发明。

[0014] 本发明涉及一种 PHA 的制造方法,其特征在于,将 PHA 水性悬浊液的 pH 调节到酸性区域,而获得 PHA 的凝集体。

[0015] 在本发明中,优选的是,酸性区域是 pH 2 以上的酸性区域。

[0016] 在本发明中,优选的是,PHA 水性悬浊液中存在的有机氮量相对于 PHA 重量为 6000ppm 以下。

[0017] 在本发明中,优选的是,PHA 水性悬浊液中包含的溶剂是水、与水具有相溶性的有机溶剂、或者水和所述有机溶剂的混合溶剂。

[0018] 在本发明中,优选的是,PHA 是从由 3-羟基丙酸、3-羟基丁酸、3-羟基戊酸、3-羟基己酸、3-羟基庚酸以及 3-羟基辛酸形成的组中选择的两种以上的 3-羟基烷酸所构成的共聚体。

[0019] 在本发明中,优选的是,PHA 是 3- 羟基己酸和 3- 羟基丁酸的二元共聚体,或者是 3- 羟基己酸、3- 羟基丁酸和 3- 羟基戊酸的三元共聚体。

[0020] 在本发明中,优选的是,使用微生物生产 PHA。

[0021] 在本发明中,优选的是,微生物是属于气单胞菌属、产碱杆菌属、青枯菌属或者贪铜菌属的微生物。

[0022] 在本发明中,优选的是,微生物是钩虫贪铜菌。

[0023] 另外,本发明还涉及利用上述方法制造的、有机氮量为 500ppm 以下的 PHA 凝集体。

[0024] 优选的是,所述 PHA 凝集体的体积平均粒径为 20  $\mu\text{m}$  以上。

[0025] 发明的效果

通过本发明,能够通过有机溶剂的提取操作而精制微生物产生 PHA,而且,能够不添加盐、高分子凝集剂等第三成分,而在比 PHA 的熔点低的温度下使 PHA 凝集。能在防止混入菌体构成成分的同时,高生产率地得到细粉少的 PHA 凝集体。得到的凝集体不用担心由于添加第三物质而对品质产生影响,另外,能够避免加热造成的 PHA 的分子量降低。

### 具体实施方式

[0026] 本发明中使用的微生物,只要是在细胞体内生成 PHA 的微生物即可,不特别限定。可以使用从自然分离出的微生物、菌株的保藏机构(例如 IFO、ATCC 等)保藏的微生物、或者基于这些微生物而制备得到的变异体或者转化株等。例如,可以列举出贪铜菌(*Cupriavidus*) 属、产碱杆菌(*Alcaligenes*) 属、青枯菌(*Ralstonia*) 属、假单胞菌(*Pseudomonas*) 属、芽胞杆菌(*Bacillus*) 属、固氮菌(*Azotobacter*) 属、诺卡氏菌(*Nocardia*) 属、气单胞菌(*Aeromonas*) 属的菌等。其中,优选的是属于气单胞菌属、产碱杆菌属、青枯菌属、或者贪铜菌属的微生物。尤其,更优选的是解脂产碱杆菌(*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*)、钩虫贪铜菌(*C. necator*)等菌株,钩虫贪铜菌最为优选。另外,在微生物本来没有 PHA 的生产能力的情况下,或者生产量低的情况下,也可以将作为目的的 PHA 的合成酶基因和 / 或其变异体导入该微生物,使用所得到的变异株。作为这样的变异株的制备中使用的 PHA 的合成酶基因,并不特别限定,但是优选的是来源于豚鼠气单胞菌的 PHA 合成酶的基因。通过在合适的条件下培养这些微生物,能够得到菌体内贮藏了 PHA 的微生物菌体。关于其培养方法,并不特别限定,例如,可以使用日本专利特开平 05-93049 号公报等中记载的方法。

[0027] 本发明中的 PHA 是以 3- 羟基烷酸为单体单元的聚合物的总称。作为构成的 3- 羟基烷酸并不特别限定,具体来说,可以列举出 3- 羟基丁酸(3HB) 和其他 3- 羟基烷酸的共聚体,或者包括 3- 羟基己酸(3HH) 在内的 3- 羟基烷酸的共聚体。另外,可以列举出从由 3- 羟基丙酸、3- 羟基丁酸、3- 羟基戊酸、3- 羟基己酸、3- 羟基庚酸及 3- 羟基辛酸形成的组中选择的两种以上的 3- 羟基烷酸为单体单元的共聚体。其中,从得到的聚酯的物理性质方面来说,包含 3HH 作为单体单元的共聚体,例如 3HB 和 3HH 的二元共聚体(PHBH) (*Macromolecules*, 28, 4822-4828 (1995)), 或者 3HB、3- 羟基戊酸(3HV) 和 3HH 的三元共聚体(PHBVH)(日本专利特许第 2777757 号公报,日本专利特开平 08-289797 号公报)更优选。这里对于构成 3HB 和 3HH 的二元共聚体 PHBH 的各单体单元的组成比并不特别限定,但是当以全部单体单元的合计作为 100 摩尔 % 时,3HH 单元为 1~99 摩尔 %, 优选 1~50 摩尔 %, 更优选

1~25 摩尔 % 的组成较佳。另外,构成 3HB、3HV 和 3HH 的三元共聚体 PHBVH 的各单体单元的组成比并不特别限定,但是以全部单体单元的合计作为 100 摩尔 % 时,例如,3HB 单元的组成比为 1~95 摩尔 %、3HV 单元的组成比为 1~96 摩尔 %,3HH 单元的组成比为 1~30 摩尔 % 的范围较佳。

[0028] 本发明中,在实施凝集工序时,为了将 PHA 水性悬浊液的 pH 调节到酸性区域,向 PHA 水性悬浊液中添加酸。为此使用的酸并不特别限定,有机酸或无机酸均可,有无挥发性均可。另外,例如,硫酸、盐酸等强酸、磷酸和醋酸等弱酸均可使用。另外,在凝集时,优选的是使 PHA 水性悬浊液的 pH 为 pH 2 以上的酸性区域,更优选的是 pH 3 以上的酸性区域,进一步优选的是 pH 4 以上的酸性区域。另外,优选的酸性区域的上限是 pH 7 以下的酸性区域,更优选的是 pH 6 以下的酸性区域,进一步优选的是 pH 5 以下的酸性区域。另外,为了进一步提高得到的 PHA 凝集体的粒度,可以在凝集工序中实施加热操作。此时的加热温度并不特别限定,但是加热温度为比 PHA 的熔点更低的温度,优选的是比 PHA 的熔点低 5℃ 以上,更优选的是低 10℃ 以上,进一步优选的是低 20~30℃ 以上。为了抑制 PHA 的分子量的降低,较低的温度是理想的。具体来说,优选的是 150℃ 以下,更优选的是 120℃ 以下,进一步优选的是 90℃ 以下。加热温度的下限并不特别限定,但是为了制造更大粒径的凝集体,优选 20℃ 以上,30℃ 以上更为优选。根据装置尺寸和能力,升温所需的时间有所不同,但是需要充分加热至达到 PHA 凝集、粒度提高的温度。加热时间从达到所述加热温度起算,大概 5 小时以下,优选的是 2 小时以下,更优选的是 1 小时以下,进一步优选的是 30 分钟以下。优选的是至少一秒钟以上的加热。另外,对于 PHA 水性悬浊液中的 PHA 浓度也不特别限定,但是考虑到搅拌对其影响等,优选的是 40 重量 % 以下,更优选的是 20 重量 % 以下,进一步优选的是 10 重量 % 以下。PHA 浓度的下限并不特别限定,但是为了高效地进行凝集,优选 1 重量 % 以上。这些操作可以是连续式也可以是分批式。另外,对水性悬浊液进行搅拌也可以,不进行搅拌也可以。本发明中的凝集是指,PHA 粒子的体积平均粒径是相对于凝集操作前的 PHA 体积平均粒径的 5 倍以上,理想的是 10 倍以上,更理想的是 15 倍以上。

[0029] 本发明中的水性悬浊液中包含的溶剂可以含有水、与水具有相溶性的有机溶剂、或者水和所述有机溶剂的混合溶剂。所述有机溶剂可以仅使用一种,也可以并用两种以上。另外,作为水和所述有机溶剂的混合溶剂中的所述有机溶剂的浓度,并不特别限定,只要在使用有机溶剂处于其在水中的溶解度以下即可。另外,作为与水具有相溶性的有机溶剂,并不特别限定,例如,可以列举出甲醇、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、甲基乙基酮等酮类、四氢呋喃、二氧六环等醚类、乙腈、丙腈等腈类、二甲基甲酰胺、乙酰胺等胺类、二甲基亚砷、吡啶、哌啶等。其中从去除的容易性方面,甲醇、乙醇、1-丙醇、2-丙醇、1-丁醇、2-丁醇、异丁醇、丙酮、甲基乙基酮、四氢呋喃、二氧六环、乙腈、丙腈等较佳。而且,从购买容易方面,优选甲醇、乙醇、1-丙醇、2-丙醇、1-丁醇、2-丁醇、异-丁醇、丙酮等。更优选的是甲醇、乙醇、丙酮。另外,只要不破坏本发明的宗旨,含有其他的溶剂、菌体来源成分以及精制时产生的化合物也没关系。

[0030] 在将 PHA 水性悬浊液的 pH 调节到酸性区域,来使 PHA 凝集的凝集工序之前,优选的是,通过预先实施将 PHA 水性悬浊液中包含的不纯物(尤其是 PHA 以外的生物来源成分或者培养基质来源成分)降解和 / 或去除的工序,来降低 PHA 水性悬浊液中的有机氮量。这样,后面的凝集工序中 PHA 高效凝集、有助于获得精制度高的 PHA。作为不纯物的降解和 /

或去除的标准,可以用相对于 PHA 水性悬浊液中包含的 PHA 的重量的有机氮量表示。该有机氮量,优选的是相对于 PHA 重量为 6000ppm 以下,更优选的是 4000ppm 以下,更优选的是 2000ppm 以下,进一步优选的是 1500ppm 以下,最优选的是 1000ppm 以下。

[0031] 本发明中,优选的是,在将 PHA 以外的生物来源成分等的不纯物降解和 / 或去除之前,预先采用物理处理、化学处理或者生物处理,来破碎含有 PHA 的细胞。这样,能有效实施后面降解和 / 或去除工序。作为破碎的方法,并不特别限定,但是可以使用现有的公知的弗氏细胞压碎器或均质器、X- 压碎器(X-press)、球磨机、胶体磨、DYNO 磨、超声波均质器等,利用流体剪切力或固体剪切力、磨碎的方法。另外,可以列举使用酸或碱、表面活性剂、有机溶剂、细胞壁合成抑制剂等药剂的方法、使用溶菌酶、果胶酶、纤维素酶、藤黄节杆菌酶等酶的方法、使用超临界流体的方法以及渗透压破碎法、冻结法、干燥粉碎法等。另外,作为破碎法的一种,还可以列举出利用细胞自身中包含的蛋白酶或酯酶等的作用的自溶法。上述破碎方法中,理想的是,选择通过一系列的处理抑制 PHA 的分子量降低的方法。另外,上述破碎方法可以单独使用,也可以多种方法组合使用。另外,分批处理也可以,进行连续处理也可以。

[0032] 通常,通过上述方法破碎含有 PHA 的菌体而得到的 PHA 水性悬浊液中,混入了细胞中的蛋白质、核酸、脂质、糖类以及其他菌体构成成分或者培养基残留成分。优选的是,在进行后述的降解和 / 或者去除工序之前,先实施将含有这些蛋白质等的水进行分离的脱水工序。由此,减少 PHA 水性悬浊液中含有的不纯物的量,以能够高效实施后面的降解和 / 或去除工序。作为脱水方法并不特别限定,可以列举利用过滤、离心分离、沉降分离的方法。供给降解和 / 或去除工序的水性悬浊液中的 PHA 的浓度并不特别限定,优选 50g/L 以上,更优选 100g/L 以上,进一步优选 200g/L 以上,更进一步优选 300g/L 以上。另外,也可以以调节水性悬浊液中的 PHA 的浓度为目的,实施上述脱水工序。

[0033] 作为降解和 / 或去除 PHA 以外的生物来源成分等不纯物的方法,并不特别限定,例如可以列举出使用酶的方法。作为使用的酶,可以列举出蛋白质分解酶、脂肪分解酶、细胞壁分解酶、核酸分解酶等。作为这些酶的具体示例,可以列举出下述示例。这些示例可以单独使用,也可以两种以上合并使用。

#### [0034] (1) 蛋白质分解酶

Esperase、碱性蛋白酶、胃蛋白酶、胰蛋白酶、木瓜蛋白酶、糜蛋白酶、氨肽酶、羧肽酶等。

#### [0035] (2) 脂肪分解酶

脂肪酶、磷脂酶、胆碱酯酶、磷酸酶等。

#### [0036] (3) 细胞壁分解酶

溶菌酶、淀粉酶、纤维素酶、麦芽糖酶、蔗糖酶、 $\alpha$ -葡萄糖苷酶、 $\beta$ -葡萄糖苷酶、N-葡萄糖苷酶等。

#### [0037] (4) 核酸分解酶

核糖核酸酶、脱氧核糖核酸酶等。

[0038] PHA 以外的生物来源成分等不纯物的降解中使用的酶,不一定限定于上述酶,只要能用于工业产品,也可以是具有降解生物来源成分的活性的任意酶。另外,可以使用一般市售的洗涤用酶洗涤剂。另外,例如,也可以是含有酶的稳定剂、再污染防止剂等和酶的酶

组成物,而并不仅限于酶。上述示例中所含的酶中,作为蛋白质分解酶,优选地,可以列举出天野酶公司(天野エンザイム社)生产的蛋白酶A、蛋白酶P、蛋白酶N、诺维信公司(ノボザイム社)生产的 Esperase、碱性蛋白酶、Savinase、Everlase 等作为能工业使用的酶,从降解活性这点上看,也能够较佳地使用。但是,并不限于此。

[0039] 酶处理时间,优选的是,一直进行到所希望的处理度,通常是 0.5~2 小时。酶的使用量取决于酶的种类和活性,并没有特别的限制,但是相对于 PHA 100 重量份,优选 0.001~10 重量份,而且从成本这点上看,更优选的是 0.001~5 重量份。

[0040] 作为降解 PHA 以外的生物来源成分等的不纯物的其他方法,可以列举出使用次氯酸、过氧化氢的方法。使用次氯酸时,在体系的 pH 为碱性范围、抑制与热或光接触、抑制与金属接触的条件下实施,由此能够得到氯残留量低的 PHA。理想的是 pH 为 8 以上、更理想的是 pH 为 10 以上,更理想的为 pH 12 以上。处理温度为 40℃ 以下是理想的,更理想的是 30℃ 以下,更理想的是 20℃ 以下,为了更可靠地发挥效果,在 10℃ 以下实施是理想的。

[0041] 如上述,在所述脱水工序中,为了将 PHA 和含有除 PHA 之外的其他生物来源成分等的不纯物的水相分离,可以实施过滤、离心分离等。过滤的方法并不特别限制,理想的是使用 Nutsche (ヌツチエ、过滤器) 等的方法、抽吸过滤、加压过滤等方法。工业上也可以选择压滤机、管压机、平板压力机、矫正压力机(ゲージプレス)、带式压力机、螺旋压力机、圆板压力机等具有压榨功能的过滤装置、离心脱水机、多腔缸过滤机等。在提高生产性的情况下,多腔缸过滤机等连续式设备是理想的。作为连续式过滤机的粒子的除渣方法,可以列举出绳索方式、刮刀方式、预涂助滤剂的刮刀(precoat scraper,プレコートスクレパー)方式等。另外,也可以使用膜分离方式。作为包含膜分离的过滤方法,可以选择死端过滤、错流过滤。其均可以根据滤过性、滤材、膜等的闭塞程度来进行选择。另外,减压或者真空进行也可以,加压进行也可以。另外,使用离心力的方法也可以。作为过滤材料,可以选择纸、织物、无纺布、滤网(screen)、烧结板、素烧陶瓷(素烧)、高分子膜、冲压金属、楔形丝等各种素材。其均可以根据生产性、闭塞的程度来进行选择。另外,可以使用助滤剂,也可以不用。在使用助滤剂的情况下,有在滤材上预先铺敷的方法(预敷方式)、在过滤原液中预先添加的方法(主体加料法)。

[0042] 所述脱水工序中的离心分离方法并不特别限定,可以使用离心沉降机或者离心脱水机等。如果是离心沉降机,可以列举出分离板型、圆筒型、倾析器型。如果是分离板型,则可以列举出盘型、自洁型、喷嘴型、螺旋沉降机型、撇沫型(skimming)等。根据各种沉降成分的排出方法,有分批式和连续式。另外,离心脱水机也可以列举出分批式和连续式。利用这些机器,可以根据比重差来分离含有 PHA 的沉降物和培养液成分。

[0043] 作为所述脱水工序中可以使用的其他方法,可以列举出浮选法、电泳法、旋风处理等。可以单独使用过滤、离心分离或者浮选等方法,也可以组合使用。

[0044] 在所述脱水工序中,用过滤、离心分离等方法回收 PHA 之后,通过将回收的 PHA 用水等洗净,可以得到精制程度进一步提高的 PHA。除了水之外,洗净还可以使用有机溶剂,也可以将水和有机溶剂混合使用。另外,也可以调节水的 pH。在使用有机溶剂作为洗净溶剂的情况下,优选的是使用亲水性溶剂,具体来说是甲醇、乙醇、丙酮、乙腈、四氢呋喃、酮类、胺类等。另外,也可以在水中添加表面活性剂等。也可以将这些有机溶剂或水多种混合使用。另外,如果时间短的话,也可以将水、这些有机溶剂加热或者作为蒸汽喷雾,来提高洗净



性。

[0045] 如以上所说明的,根据本发明的最佳的实施形态,通过依次实施培养具有在细胞内生成 PHA 的能力的微生物的培养工序、破碎含有 PHA 的所述微生物的破碎工序、从含有破碎的微生物的水性悬浊液中分离水的脱水工序、降解和 / 或去除不纯物的精制工序、洗净 PHA 的洗净工序、以及将所得的 PHA 水性悬浊液的 pH 调节到酸性区域而获得 PHA 凝集体的凝集工序,能够高效率地制造 PHA 凝集体。但是,本发明未必一定要实施上述全部工序。

[0046] 这样,通过在实施将菌体来源和培养基质来源的不纯物降解和 / 或去除的精制工序,和 / 或洗净 PHA 的洗净工序之后,进行本发明的凝集工序,能够获得精制度高的 PHA 凝集体。另外,根据需要,可以通过将得到的凝集体用上述洗净方法进一步洗净,来得到精制度更高的 PHA 凝集体。

[0047] 通过以上方法,能够制造有机氮量为 500ppm 以下,优选的是 400ppm 以下,更优选的是 300ppm 以下,进一步优选的是 200ppm 以下,尤其优选的是 100ppm 以下的 PHA 凝集体。另外,通过以上方法,能够获得细粉少的 PHA 凝集体。得到的 PHA 凝集体的体积平均粒径优选的是 20  $\mu\text{m}$  以上,更优选的是 30  $\mu\text{m}$  以上,进一步优选的是 100  $\mu\text{m}$  以上。上限并不特别限定,但是通过本发明能够得到体积平均粒径约 5000  $\mu\text{m}$  左右以下的 PHA 凝集体。

[0048] 这样制成的有机氮含量较低的 PHA 凝集体,从体积平均粒径的观点上看,也容易加工。另外,由于不纯物也少,因此诸如膜、瓶等商品之类的用途不在话下,由于低过敏原,还可望作为医疗用品广泛应用。

## 实施例

[0049] 以下,提出以下实施例,以对本发明进行更详细的说明,但是,本发明并不是仅限于这些实施例。

[0050] (PHA 水性悬浊液中的有机氮量(相对于 PHA 重量)的计算方法)

使 PHA 水性悬浊液中的水溶性溶剂全部蒸发,得到残留的固体成分。向该固体成分中添加 5M 的 NaOH,在 95°C 下实施水解反应。以等量的 60% 醋酸水溶液中和该水解反应液,添加醋酸缓冲液和茚三酮溶液,在 100°C 进行显色反应。利用日立制作所 Ratio Beam 分光光度计 U-1800 型对该显色反应液的吸光度进行测定。将该吸光度与用亮氨酸样品制成的标准曲线进行比较,计算出固体成分中的有机氮量。以相对于固体成分重量的有机氮量,作为 PHA 水性悬浊液中的有机氮量(相对于 PHA 重量)。

[0051] (PHA 凝集体中有机氮量(相对于 PHA 重量)的计算方法)

向 PHA 凝集体中添加 5M 的 NaOH,在 95°C 下实施水解反应。以等量的 60% 醋酸水溶液中和该水解反应液,添加醋酸缓冲液和茚三酮溶液,在 100°C 进行显色反应。利用日立制作所 Ratio Beam 分光光度计 U-1800 型对该显色反应液的吸光度进行测定。将该吸光度与用亮氨酸样品制成的标准曲线进行比较,计算出 PHA 凝集体中的有机氮量。以相对于 PHA 凝集体的重量的有机氮量,作为 PHA 凝集体中的有机氮量(相对于 PHA 重量)。

[0052] (实施例 1) 菌体培养液的制备

将国际公开第 2008/010296 号第【0049】段中记载的真氧产碱杆菌(*Ralstonia eutropha*) KNK-005 株,按照第【0050】-【0053】段中记载的方法进行培养,得到包含含有 PHA 的菌体的菌体培养液。另外,真氧产碱杆菌目前分类属于钩虫贪铜菌(*Cupriavidus*

Necator)。

[0053] (实施例 2) 灭菌的方法

对实施例 1 中得到的菌体培养液以内部温度 60~80℃加热、搅拌处理 20 分钟,进行灭菌处理。

[0054] (实施例 3)

向实施例 2 中得到的灭菌之后的菌体培养液,添加 0.2% 重量的十二烷基硫酸钠。然后,添加氢氧化钠以使 pH 变为 11.0 之后,在 50℃保温 1 小时。之后,利用高压破碎机(NINOSOABI 公司(ニロソアビ社)生产的高压均质机型号 PA2K 型)以 450~550kgf/cm<sup>2</sup> 的压力进行高压破碎。

[0055] 向高压破碎后的破碎液添加等量的蒸馏水。之后,在离心分离高压破碎后的破碎液之后,取出上清液(浓缩 3 倍)。在浓缩 3 倍后的 PHA 的水性悬浊液中,添加与取出的上清液等量的水,悬浊,添加 0.2% 重量的十二烷基硫酸钠和占 PHA 的 1/100 重量的蛋白酶(诺维信公司(ノボザイム社)生产的,Esperase),以 pH 10 保持 50℃的状态,搅拌 2 小时。之后,进行调节以使 PHA 浓度为 10 重量%。得到的 PHA 水性悬浊液中存在的有机氮量相对于 PHA 重量为 3415ppm。

[0056] 用硫酸将该 PHA 水性悬浊液的 pH 调节到 3、4、5、6 或 7,一边搅拌一边将温度调节到 30℃、50℃或者 70℃,并使之凝集。另外,加热时间是 60 分钟。使用粒度测定装置(岛津制作所(島津製作所)生产的 SALD-300V 型)测定得到的凝集体的体积平均粒径。结果示于表 1。由此,可以看出 PHA 水性悬浊液的 pH 调节到越强的酸性,即使在较低的温度,PHA 也越是容易凝集。

[0057] 【表 1】

	pH3	pH4	pH5	pH6	pH7
30℃	17.1 μm	14.5 μm	13.3 μm	3.3 μm	1.5 μm
50℃	30.2 μm	28.5 μm	30.5 μm	31.0 μm	1.5 μm
70℃	283.6 μm	280.1 μm	263.9 μm	241.3 μm	210.3 μm

[0058] (实施例 4)

向实施例 2 中得到的灭菌后的菌体培养液添加 0.2% 重量的十二烷基硫酸钠。然后,添加氢氧化钠使 pH 变为 11.0 之后,于 50℃保温 1 小时。之后,用高压破碎机(NINOSOABI 公司(ニロソアビ社)生产的高压均质机型号 PA2K 型),在 450~550kgf/cm<sup>2</sup> 的压力下,进行高压破碎。

[0059] 向高压破碎后的破碎液添加等量的蒸馏水。之后,在离心分离高压破碎后的破碎液之后,取出上清液(浓缩 2 倍)。在浓缩 2 倍后的 PHA 的水性悬浊液中,添加与取出的上清液等量的水并离心分离,取出上清液后再次添加水而悬浊,添加 0.2% 重量的十二烷基硫酸钠和占 PHA 的 1/100 重量的蛋白酶(诺维信公司(ノボザイム社)生产的,Esperase),以 pH 10 保持 50℃的状态,搅拌 2 小时。之后,进行调节以使 PHA 浓度为 10 重量%。得到的 PHA 水性悬浊液中存在的有机氮量相对于 PHA 重量为 5486ppm。

[0060] 用硫酸将该 PHA 水性悬浊液的 pH 调节到 4,一边搅拌一边将温度调节到 70℃,使之凝集 30 分钟。使用粒度测定装置(岛津制作所(島津製作所)生产的 SALD-300V 型)测定得到的凝集体的体积平均粒径后,相对于凝集操作前的体积平均粒径 1.5 μm,凝集操作后的体积平均粒径为 218.2 μm。并且将得到的凝集体用 pH 11.5 的碱性水和甲醇洗净。洗净

后的 PHA 凝集体的有机氮量相对于 PHA 为 426ppm。这样,获得了有机氮量 500ppm 以下的凝集体。