

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2006-204258

(P2006-204258A)

(43) 公開日 平成18年8月10日(2006.8.10)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 1/20 (2006.01)	C 1 2 N 1/20 Z N A A	4 B O 2 4
C 1 2 P 7/62 (2006.01)	C 1 2 P 7/62	4 B O 6 4
C 1 2 P 11/00 (2006.01)	C 1 2 P 11/00	4 B O 6 5
C 1 2 P 17/00 (2006.01)	C 1 2 P 17/00	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	
審査請求 未請求 請求項の数 14 O L (全 36 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2005-23977 (P2005-23977)

(22) 出願日 平成17年1月31日 (2005.1.31)

(71) 出願人 000001007

キヤノン株式会社

東京都大田区下丸子3丁目30番2号

(74) 代理人 100123788

弁理士 宮崎 昭夫

(74) 代理人 100106138

弁理士 石橋 政幸

(74) 代理人 100120628

弁理士 岩田 慎一

(74) 代理人 100127454

弁理士 緒方 雅昭

(72) 発明者 古崎 真也

東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キ

ヤノン株式会社内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 新規ポリヒドロキシアルカノエート合成微生物及びそれを用いたポリヒドロキシアルカノエートの製造方法

(57) 【要約】

【課題】 unusual - ポリヒドロキシアルカノエートを高効率、低コストに生産できる新規微生物及びそれを用いた unusual - ポリヒドロキシアルカノエートの製造方法を提供すること。

【解決手段】 安価な基質もしくは特定の培養条件において、従来よりも unusual - ポリヒドロキシアルカノエートの生産性の高い微生物を野生株及び変異株の中から取得した。これら微生物に基質を添加し、培養することによって unusual - ポリヒドロキシアルカノエートを合成する。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

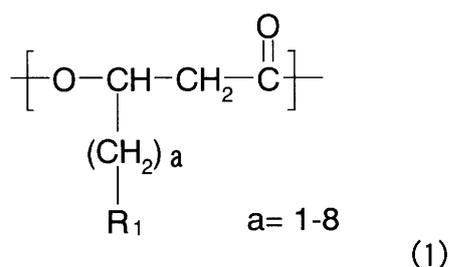
【請求項 1】

下記式(1)～(4)に示すユニットからなる群から選ばれた少なくとも1種類のユニットをポリマー分子中に含むポリヒドロキシアルカノエートを合成し得るシュードモナス・スピーズ・AG32株(Pseudomonas sp. AG32、FERM BP-8586)、シュードモナス・スピーズ・KF767株(Pseudomonas sp. KF767、FERM BP-8589)、シュードモナス・スピーズ・TM90株(Pseudomonas sp. TM90、FERM BP-8587)、シュードモナス・スピーズ・TM109株(Pseudomonas sp. TM109、FERM BP-8588)、及びシュードモナス・スピーズ・YN21M株(Pseudomonas sp. YN21M、FERM BP-8585)。

10

{ここで、式(1)は、

【化1】



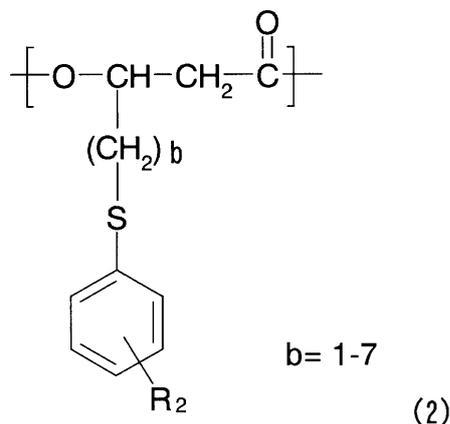
20

[a は式中に示した範囲内から選ばれた整数である ; R₁ は後記式(5)～(12)のいずれかで示される残基の少なくとも1種であって、式(1)のユニットが複数存在する場合ユニット毎に独立して上記の意味を表す。]

で示され、

式(2)は、

【化2】



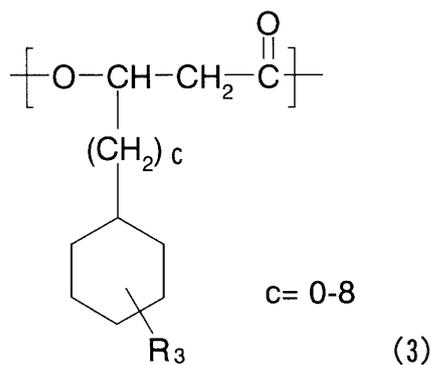
30

40

[式中、R₂ は芳香環への置換基を示し、R₂ は H 原子、ハロゲン原子、CN 基、NO₂ 基、COOR'、SO₂R" (R' : H、Na、K、CH₃、および C₂H₅ のいずれかを表し、R" : OH、ONa、OK、ハロゲン原子、OCH₃、および OC₂H₅ のいずれかを表す)、CH₃ 基、C₂H₅ 基、C₃H₇ 基、(CH₃)₂-CH 基または (CH₃)₃-C 基であり、b は式中に示した範囲から選ばれた整数であり、式(2)のユニットが複数存在する場合ユニット毎に独立して上記の意味を表す] で示され、

式(3)は、

【化 3】

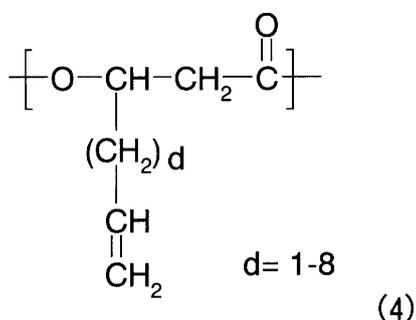


10

[式中、 R_3 はシクロヘキシル基への置換基を示し、 R_3 はH原子、CN基、 NO_2 基、ハロゲン原子、 CH_3 基、 C_2H_5 基、 C_3H_7 基、 CF_3 基、 C_2F_5 基または C_3F_7 基であり、 c は式中に示した範囲から選ばれた整数であり、式(3)のユニットが複数存在する場合ユニット毎に独立して上記の意味を表す]で示され、

式(4)は、

【化 4】



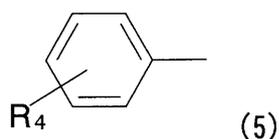
20

30

[d は式中に示した範囲内から選ばれた整数であり、式(4)のユニットが複数存在する場合ユニット毎に独立して上記の意味を表す]で示される。

ここで式(5)~(12)は、

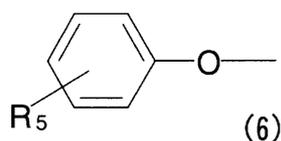
【化 5】



40

(式中、 R_4 は芳香環への置換基を示し、 R_4 はH原子、ハロゲン原子、CN基、 NO_2 基、 CH_3 基、 C_2H_5 基、 C_3H_7 基、 $\text{CH}=\text{CH}_2$ 基、 CF_3 基、 C_2F_5 基または C_3F_7 基であり、複数のユニットが存在する場合ユニット毎に独立して上記の意味を表す)

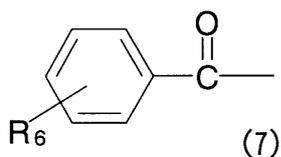
【化 6】



50

(式中、 R_5 は芳香環への置換基を示し、 R_5 はH原子、ハロゲン原子、CN基、 NO_2 基、 CH_3 基、 C_2H_5 基、 C_3H_7 基、 SCH_3 基、 CF_3 基、 C_2F_5 基または C_3F_7 基であり、複数のユニットが存在する場合ユニット毎に独立して上記の意味を表す)

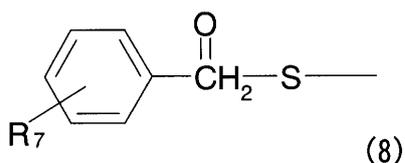
【化7】



10

(式中、 R_6 は芳香環への置換基を示し、 R_6 はH原子、ハロゲン原子、CN基、 NO_2 基、 CH_3 基、 C_2H_5 基、 C_3H_7 基、 CF_3 基、 C_2F_5 基または C_3F_7 基であり、複数のユニットが存在する場合ユニット毎に独立して上記の意味を表す)

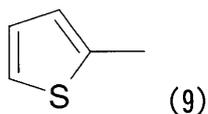
【化8】



20

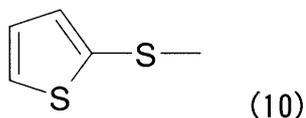
(式中、 R_7 は芳香環への置換基を示し、 R_7 はH原子、ハロゲン原子、CN基、 NO_2 基、 $COOR'$ 、 SO_2R'' (R' : H、Na、K、 CH_3 、および C_2H_5 のいずれかを表し、 R'' : OH、ONa、OK、ハロゲン原子、 OCH_3 、および OC_2H_5 のいずれかを表す)、 CH_3 基、 C_2H_5 基、 C_3H_7 基、 $(CH_3)_2-CH$ 基または $(CH_3)_3-C$ 基であり、複数のユニットが存在する場合ユニット毎に独立して上記の意味を表す)

【化9】

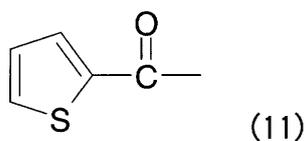


30

【化10】

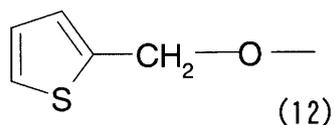


【化11】



40

【化 1 2】



で示される。}

【請求項 2】

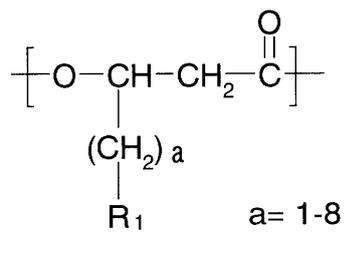
微生物にポリヒドロキシアлкаノートを合成させる工程を有するポリヒドロキシア
 カノエートの製造方法において、 10

前記微生物が、シュードモナス・スピーズ・AG32株 (Pseudomonas sp. AG32、FERM BP-8586)、シュードモナス・スピーズ・KF767株 (Pseudomonas sp. KF767、FERM BP-8589)、シュードモナス・スピーズ・TM90株 (Pseudomonas sp. TM90、FERM BP-8587)、シュードモナス・スピーズ・TM109株 (Pseudomonas sp. TM109、FERM BP-8588)、及びシュードモナス・スピーズ・YN21M株 (Pseudomonas sp. YN21M、FERM BP-8585)から選択された1種であり、

合成されるポリヒドロキシアлкаノエートが、下記式(1)~(4)に示すユニットか
 らなる群から選ばれた少なくとも1種類のユニットをポリマー分子中に少なくとも含むポ
 リヒドロキシアлкаノエートを合成することを特徴とするポリヒドロキシアлкаノエート
 の製造方法。 20

{ここで、式(1)は、

【化 1 3】



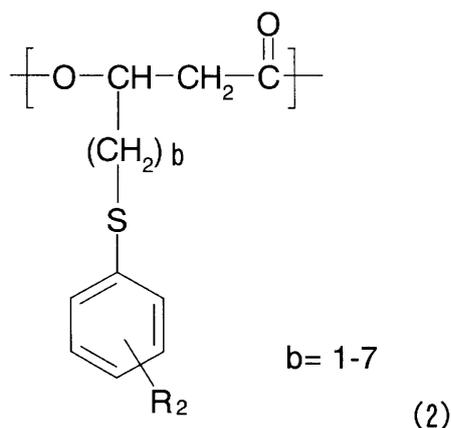
30

[a は式中に示した範囲内から選ばれた整数である； R₁ は後記式(5)~(12)のい
 ずれかで示される残基の少なくとも1種であって、式(1)のユニットが複数存在する場
 合ユニット毎に独立して上記の意味を表す。]

で示され、

式(2)は、

【化 1 4】



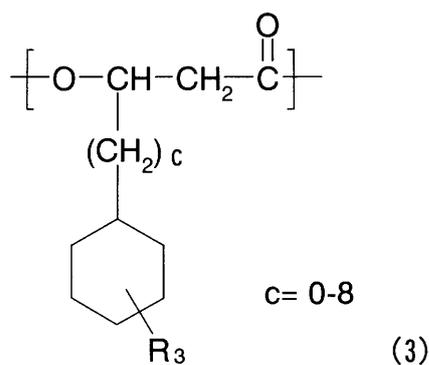
10

[式中、 R_2 は芳香環への置換基を示し、 R_2 はH原子、ハロゲン原子、CN基、 NO_2 基、 COOR' 、 $\text{SO}_2\text{R}''$ (R' : H、Na、K、 CH_3 、および C_2H_5 のいずれかを表し、 R'' : OH、ONa、OK、ハロゲン原子、 OCH_3 、および OC_2H_5 のいずれかを表す)、 CH_3 基、 C_2H_5 基、 C_3H_7 基、 $(\text{CH}_3)_2-\text{CH}$ 基または $(\text{CH}_3)_3-\text{C}$ 基であり、 b は式中に示した範囲から選ばれた整数であり、式(2)のユニットが複数存在する場合ユニット毎に独立して上記の意味を表す]で示され、

20

式(3)は、

【化 1 5】



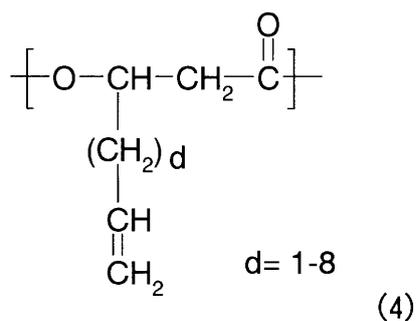
30

[式中、 R_3 はシクロヘキシル基への置換基を示し、 R_3 はH原子、CN基、 NO_2 基、ハロゲン原子、 CH_3 基、 C_2H_5 基、 C_3H_7 基、 CF_3 基、 C_2F_5 基または C_3F_7 基であり、 c は式中に示した範囲から選ばれた整数であり、式(3)のユニットが複数存在する場合ユニット毎に独立して上記の意味を表す]で示され、

40

式(4)は、

【化 1 6】

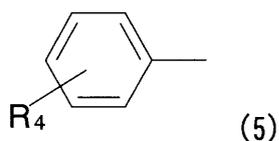


10

[d は式中に示した範囲内から選ばれた整数であり、式 (4) のユニットが複数存在する場合ユニット毎に独立して上記の意味を表す] で示される。

ここで式 (5) ~ (1 2) は、

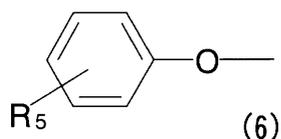
【化 1 7】



20

(式中、 R_4 は芳香環への置換基を示し、 R_4 は H 原子、ハロゲン原子、CN 基、 NO_2 基、 CH_3 基、 C_2H_5 基、 C_3H_7 基、 $\text{CH}=\text{CH}_2$ 基、 CF_3 基、 C_2F_5 基または C_3F_7 基であり、複数のユニットが存在する場合ユニット毎に独立して上記の意味を表す)

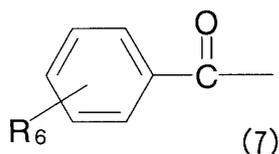
【化 1 8】



30

(式中、 R_5 は芳香環への置換基を示し、 R_5 は H 原子、ハロゲン原子、CN 基、 NO_2 基、 CH_3 基、 C_2H_5 基、 C_3H_7 基、 SCH_3 基、 CF_3 基、 C_2F_5 基または C_3F_7 基であり、複数のユニットが存在する場合ユニット毎に独立して上記の意味を表す)

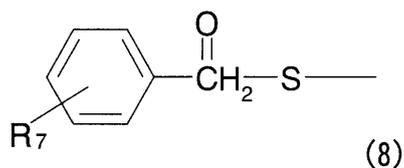
【化 1 9】



40

(式中、 R_6 は芳香環への置換基を示し、 R_6 は H 原子、ハロゲン原子、CN 基、 NO_2 基、 CH_3 基、 C_2H_5 基、 C_3H_7 基、 CF_3 基、 C_2F_5 基または C_3F_7 基であり、複数のユニットが存在する場合ユニット毎に独立して上記の意味を表す)

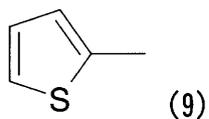
【化 2 0】



(式中、 R_7 は芳香環への置換基を示し、 R_7 はH原子、ハロゲン原子、CN基、 NO_2 基、 $COOR'$ 、 SO_2R'' (R' : H、Na、K、 CH_3 、および C_2H_5 のいずれか
を表し、 R'' : OH、ONa、OK、ハロゲン原子、 OCH_3 、および OC_2H_5 のい
ずれかを表す)、 CH_3 基、 C_2H_5 基、 C_3H_7 基、 $(CH_3)_2-CH$ 基または $(CH_3)_3-C$ 基
であり、複数のユニットが存在する場合ユニット毎に独立して上記の意味を表す)

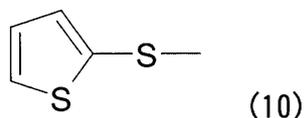
10

【化 2 1】

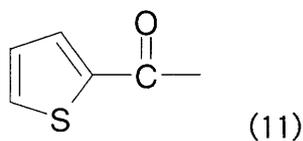


20

【化 2 2】

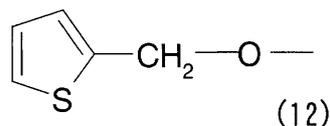


【化 2 3】



30

【化 2 4】



40

で示される。}

【請求項 3】

前記微生物を、アルカノエート及びアルカンから選ばれる少なくとも1種類を含む培地中で培養することによりポリヒドロキシアルカノエートを該微生物に合成させる請求項2記載の製造方法。

50

【請求項 4】

前記YN21M株を、5-フェニル吉草酸をアルカノエートとして少なくとも含む培地中で培養し、3-ヒドロキシ-5-フェニル吉草酸ユニットをポリマー分子中に少なくとも含むポリヒドロキシアルカノエートを合成させる請求項3記載の製造方法。

【請求項 5】

前記YN21M株を、n-アミルベンゼンをアルカンとして少なくとも含む培地中で培養し、3-ヒドロキシ-5-フェニル吉草酸ユニットをポリマー分子中に少なくとも含むポリヒドロキシアルカノエートを合成させる請求項3記載の製造方法。

【請求項 6】

前記TM109株を、5-フェノキシ吉草酸をアルカノエートとして少なくとも含む培地中で培養し、3-ヒドロキシ-5-フェノキシ吉草酸ユニットをポリマー分子中に少なくとも含むポリヒドロキシアルカノエートを合成させる請求項3記載の製造方法。 10

【請求項 7】

前記KF767株を、アルカノエート及びアルカンから選ばれる少なくとも1種類を含む中性乃至酸性培地中で培養する請求項3記載の製造方法

【請求項 8】

前記アルカノエートとして5-フェニル吉草酸を少なくとも前記培地中に含む請求項7記載の製造方法。

【請求項 9】

前記中性乃至酸性培地のpHが7.0~5.0である請求項7または8記載の製造方法。 20

【請求項 10】

AG32株もしくはTM90株を、アルカノエート及びアルカンから選ばれる少なくとも1種類を含む中性乃至塩基性培地中で培養する請求項3記載の製造方法。

【請求項 11】

前記アルカノエートとして5-フェニル吉草酸を培地中に少なくとも含む請求項10記載の製造方法。

【請求項 12】

前記中性乃至塩基性培地のpHが7.0~8.5である請求項10または11記載の製造方法。

【請求項 13】

前記培地中にアルカンを少なくとも含む場合において、分散剤を培地中に含む請求項3~12記載のいずれかに記載の製造方法。 30

【請求項 14】

前記分散剤が界面活性剤である請求項13記載の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は新規ポリヒドロキシアルカノエート合成微生物及びそれを用いたポリヒドロキシアルカノエートの製造方法に関する。

【背景技術】

【0002】

従来、多くの微生物がポリ-3-ヒドロキシ-n-酪酸(以下、PHBと略す場合もある)あるいはその他のポリヒドロキシアルカノエート(以下、PHAと略す場合がある)を生産し、菌体内に蓄積することが報告されてきた(非特許文献1参照)。これらのポリマーは従来のプラスチックと同様に、溶融加工等により各種製品の生産に利用することが出来る。さらに、生分解性であるがゆえに、自然界で微生物により完全分解されるという利点を有しており、従来の多くの合成高分子化合物のように自然環境に残留して汚染を引き起こすことが少ない。

【0003】

PHBは側鎖にアルキル基を有するモノマーユニットからなるPHA、即ち、「usual-PHA」の一種である。一方、PHAのより広範囲な応用、例えば機能性ポリマー 40 50

としての応用を考慮した場合、アルキル基以外の置換基を側鎖に導入したPHA、即ち、「*unusual-PHA*」が極めて有用であると期待される。置換基の例としては、芳香環を含むものや不飽和炭化水素などが挙げられ、導入しようとする置換基を有した置換アルカノエートや置換アルカンを経質として微生物に与えて培養することによって微生物菌体内にPHAを生産することができる。

【0004】

例えば、特許文献1では、フェニル基、フェノキシ基、シクロヘキシル基を側鎖に有する置換アルカノエートを基質として、シュードモナス・チコリアイ YN2株 (*Pseudomonas cichorii* YN2)、シュードモナス・チコリアイ H45株 (*Pseudomonas cichorii* H45)、シュードモナス・ジェッセニイ P161株 (*Pseudomonas jessenii* P161)、シュードモナス・プチダ P91株 (*Pseudomonas putida* P91)などの各種微生物によって*unusual-PHA*を生産している。また、特許文献2には側鎖に芳香環を含む各種置換アルカンを基質として、シュードモナス・チコリアイ YN2株 (*Pseudomonas cichorii* YN2)を用いた*unusual-PHA*の生産が報告されている。

10

【非特許文献1】「生分解性プラスチックハンドブック」, 生分解性プラスチック研究会編, (株)エヌ・ティー・エス, P178-197(1995)

【特許文献1】特開2002-80571号公報

【特許文献2】特開2003-310292号公報

20

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

前述のように機能的に有用な*unusual-PHA*がいくつかの微生物によって生産されているが、この*unusual-PHA*を高分子材料として各種製品に適用していくには、PHAの生産にかかるコストを従来より低減化していくことが不可欠である。そのため、一つには微生物による*unusual-PHA*の生産効率を向上させること、もう一つにはより低価格の基質を利用して*unusual-PHA*を生産していくことが課題となっている。特に、*unusual-PHA*の生産に必要な基質は、多くの場合化学的に合成されたものであり、その価格はPHAの生産コストを大きく左右する。基質として一般的に使用される置換アルカノエートでは、カルボキシル基が活性を有するため、カルボキシル基の保護、脱保護といった煩雑な操作が必要となる場合が多く、工程数が増えるため高価格である場合が多い。一方、置換アルカンを基質として用いた場合は工程数が少ないため比較的low価格となるが、置換アルカノエートと比べると微生物によるPHAの生産性は低く、培養方法も煩雑になる場合が多かった。これらのことから、低コストでPHAを生産するためには、置換アルカンを基質として従来より高い生産性を得ることが望まれている。

30

また、従来*unusual-PHA*の生産性の高い菌、例えばYN2株などでは、培地pHに対してPHA生産性が大きく左右される、すなわちpH7前後の至適pH以外ではPHA生産性が大きく低下することが問題となっていた。特に生産性を向上させるために基質や培地濃度を高めた場合には、培養経過と共に培地の緩衝能を超えてpHが変動しやすく、PHAの生産性が不安定であった。そのためpHの変動に対しても安定してPHAを生産できることが求められてきた。

40

【0006】

本発明の目的は、生分解性材料、機能性材料などとして有用なPHAを高効率、低コストに生産することを可能とする新規微生物及びそれを用いたPHAの生産方法を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明者らは、上記の課題を解決すべく鋭意研究を進めた結果、従来よりもPHA生産性

50

の高い微生物、及び従来より低価格のモノマーから効率的にPHAを生産できる微生物を野生株及び変異株の中から取得した。また、低pHもしくは高pHの培地中においても、PHAを効率的に生産性できる微生物を野生株中から取得した。さらに基質としてアルカンを利用する場合、培地中に分散剤を添加することによって、微生物によるPHAの生産効率がさらに向上することを見出した。

【0008】

すなわち、本発明にかかる *u n u s u a l* - P H A 生産菌には、後述する式(1)~(4)に示すユニットからなる群から選ばれた少なくとも1種類のユニットをポリマー分子中に含むポリヒドロキシアルカノエートを合成し得るシュードモナス・スピーズ・AG32株 (*Pseudomonas* sp. AG32、F E R M B P - 8 5 8 6)、シュードモナス・スピーズ・KF767株 (*Pseudomonas* sp. KF767、F E R M B P - 8 5 8 9)、シュードモナス・スピーズ・TM90株 (*Pseudomonas* sp. TM90、F E R M B P - 8 5 8 7)、シュードモナス・スピーズ・TM109株 (*Pseudomonas* sp. TM109、F E R M B P - 8 5 8 8)、及びシュードモナス・スピーズ・YN21M株 (*Pseudomonas* sp. YN21M、F E R M B P - 8 5 8 5)が含まれる。

10

【0009】

また、本発明にかかるポリヒドロキシアルカノエートの製造方法は、微生物にポリヒドロキシアルカノエートを合成させる工程を有するポリヒドロキシアルカノエートの製造方法において、前記微生物が、シュードモナス・スピーズ・AG32株 (*Pseudomonas* sp. AG32、F E R M B P - 8 5 8 6)、シュードモナス・スピーズ・KF767株 (*Pseudomonas* sp. KF767、F E R M B P - 8 5 8 9)、シュードモナス・スピーズ・TM90株 (*Pseudomonas* sp. TM90、F E R M B P - 8 5 8 7)、シュードモナス・スピーズ・TM109株 (*Pseudomonas* sp. TM109、F E R M B P - 8 5 8 8)、及びシュードモナス・スピーズ・YN21M株 (*Pseudomonas* sp. YN21M、F E R M B P - 8 5 8 5)から選択された1種であり、合成されるポリヒドロキシアルカノエートが、後述する式(1)~(4)に示すユニットからなる群から選ばれた少なくとも1種類のユニットをポリマー分子中に少なくとも含むポリヒドロキシアルカノエートを合成することを特徴とするポリヒドロキシアルカノエートの製造方法である。

20

【発明の効果】

【0010】

本発明の方法により、生分解性材料、機能性材料などとして有用なPHAを高効率、低コストに生産することが可能となる。

30

【発明を実施するための最良の形態】

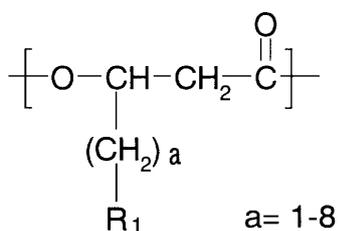
【0011】

本発明にかかるPHA合成能を有する菌株は、下記式(1)~(4)に示すユニットからなる群から選ばれた少なくとも1種類のユニットをポリマー分子中に含むポリヒドロキシアルカノエート (*u n u s u a l* - P H A) を高い生産性で合成し得る点において従来のPHA生産菌と明確に区別され得るものである。

【0012】

【化1】

40



(1)

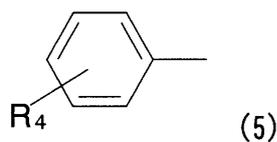
【0013】

50

[a は式中に示した範囲内から選ばれた整数である ; R_1 は下記式 (5) ~ (1 2) のいずれかで示される残基の少なくとも 1 種であって、式 (1) のユニットが複数存在する場合ユニット毎に独立して上記の意味を表す。

【 0 0 1 4 】

【 化 2 】



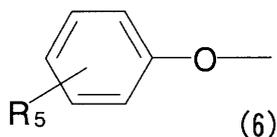
10

【 0 0 1 5 】

(式中、 R_4 は芳香環への置換基を示し、 R_4 は H 原子、ハロゲン原子、CN 基、 NO_2 基、 CH_3 基、 C_2H_5 基、 C_3H_7 基、 $CH=CH_2$ 基、 CF_3 基、 C_2F_5 基または C_3F_7 基であり、複数のユニットが存在する場合ユニット毎に独立して上記の意味を表す)

【 0 0 1 6 】

【 化 3 】



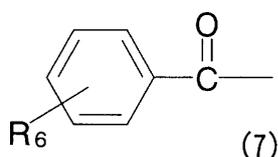
20

【 0 0 1 7 】

(式中、 R_5 は芳香環への置換基を示し、 R_5 は H 原子、ハロゲン原子、CN 基、 NO_2 基、 CH_3 基、 C_2H_5 基、 C_3H_7 基、 SCH_3 基、 CF_3 基、 C_2F_5 基または C_3F_7 基であり、複数のユニットが存在する場合ユニット毎に独立して上記の意味を表す)

【 0 0 1 8 】

【 化 4 】



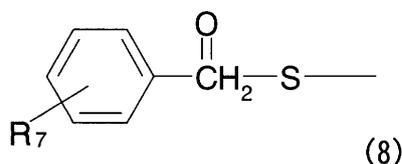
30

【 0 0 1 9 】

(式中、 R_6 は芳香環への置換基を示し、 R_6 は H 原子、ハロゲン原子、CN 基、 NO_2 基、 CH_3 基、 C_2H_5 基、 C_3H_7 基、 CF_3 基、 C_2F_5 基または C_3F_7 基であり、複数のユニットが存在する場合ユニット毎に独立して上記の意味を表す)

【 0 0 2 0 】

【 化 5 】



40

【 0 0 2 1 】

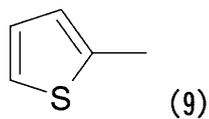
(式中、 R_7 は芳香環への置換基を示し、 R_7 は H 原子、ハロゲン原子、CN 基、 NO_2 基、 $COOR'$ 、 SO_2R'' (R' : H、Na、K、 CH_3 、および C_2H_5 のいずれか

50

を表し、R" : OH、ONa、OK、ハロゲン原子、OCH₃、およびOC₂H₅のいずれかを表す)、CH₃基、C₂H₅基、C₃H₇基、(CH₃)₂-CH基または(CH₃)₃-C基であり、複数のユニットが存在する場合ユニット毎に独立して上記の意味を表す)

【0022】

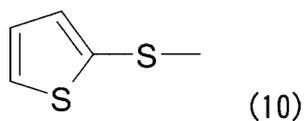
【化6】



10

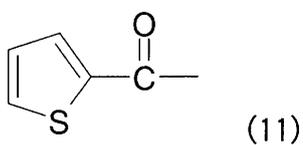
【0023】

【化7】



【0024】

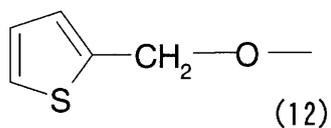
【化8】



20

【0025】

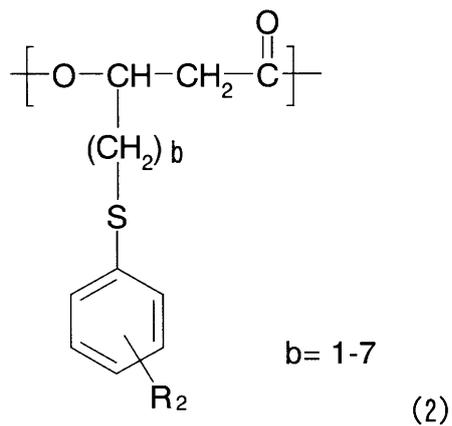
【化9】



30

【0026】

【化10】



40

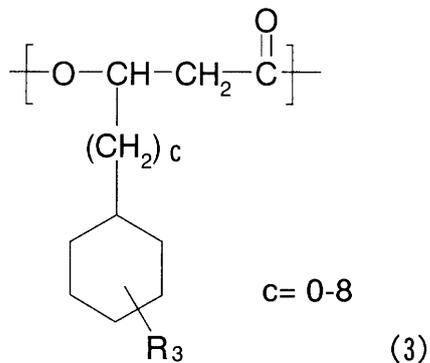
50

【 0 0 2 7 】

[式中、 R_2 は芳香環への置換基を示し、 R_2 はH原子、ハロゲン原子、CN基、 NO_2 基、 $COOR'$ 、 SO_2R'' (R' : H、Na、K、 CH_3 、および C_2H_5 のいずれかを表し、 R'' : OH、ONa、OK、ハロゲン原子、 OCH_3 、および OC_2H_5 のいずれかを表す)、 CH_3 基、 C_2H_5 基、 C_3H_7 基、 $(CH_3)_2-CH$ 基または $(CH_3)_3-C$ 基であり、 b は式中に示した範囲から選ばれた整数であり、式(2)のユニットが複数存在する場合ユニット毎に独立して上記の意味を表す]

【 0 0 2 8 】

【 化 1 1 】



10

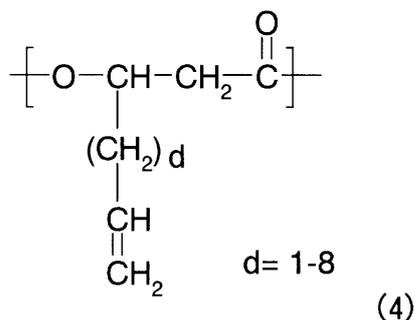
20

【 0 0 2 9 】

[式中、 R_3 はシクロヘキシル基への置換基を示し、 R_3 はH原子、CN基、 NO_2 基、ハロゲン原子、 CH_3 基、 C_2H_5 基、 C_3H_7 基、 CF_3 基、 C_2F_5 基または C_3F_7 基であり、 c は式中に示した範囲から選ばれた整数であり、式(3)のユニットが複数存在する場合ユニット毎に独立して上記の意味を表す]で示され、

【 0 0 3 0 】

【 化 1 2 】



30

【 0 0 3 1 】

[d は式中に示した範囲内から選ばれた整数であり、式(4)のユニットが複数存在する場合ユニット毎に独立して上記の意味を表す]で示される。

40

【 0 0 3 2 】

以下、項目を挙げて本発明及びその関連事項について更に説明する。

【 0 0 3 3 】

< P H A >

本発明で製造する *unusual-PHA* は、生分解性樹脂としての基本骨格を有しており、それゆえ、従来のプラスチックと同様、熔融加工等により各種製品の生産に利用することが出来ると共に、石油由来の合成高分子とは異なり、生物により分解され、自然界の物質循環に取り込まれるという際立った特性を有している。そのため、燃焼処理を行な

50

う必要もなく、大気汚染や地球温暖化を防止するという観点でも有効な材料であり、環境保全を可能とするプラスチックとして利用することが出来る。さらに、*unusual-PHA*の各種官能基に起因する機能・物性を利用して、各種の機能性材料、例えば、医療用軟質部材等としての利用も期待出来る。

【0034】

本発明で製造する*unusual-PHA*の一例として、前記式(1)~(4)に示すユニットからなる群から選ばれた少なくとも1種類を含む*PHA*を挙げることが出来る。また、上記*PHA*は一般にR体のみから構成されるアイソタクチックなポリマーである。

【0035】

< *PHA* 生産菌 >

本発明の新規微生物であるYN21M株、AG32株、KF767株、TM90株、TM109株は、アルカノエートもしくはアルカンを基質として用いて、当該アルカノエートもしくはアルカン由来の新規なモノマーユニットを含む*PHA*を生産し、菌体内に蓄積する微生物であり、特定の基質、もしくは特定の培地pHにおいて、従来知られている*unusual-PHA*生産菌よりも高い生産性を示す。これら新規微生物は、本発明者らのスクリーニングにより、環境中から、もしくは従来知られている*PHA*生産菌の変異株から見出されたものである。以下にYN21M株、AG32株、KF767株、TM90株、TM109株についての詳細を示す。なお、これらの菌株及びYN21M株の親株としてのYN21株は、いずれも、産業技術総合研究所、特許生物寄託センター(茨城県つくば市東1丁目1番地1中央第6)に寄託されている。各菌株の受託番号は、以下のとおりである。

シュードモナス・スピーズ・AG32株(*Pseudomonas* sp. AG32) : FERM BP-8586

シュードモナス・スピーズ・KF767株(*Pseudomonas* sp. KF767) : FERM BP-8589

シュードモナス・スピーズ・TM90株(*Pseudomonas* sp. TM90) : FERM BP-8587

シュードモナス・スピーズ・TM109株(*Pseudomonas* sp. TM109, FERM BP-8588

シュードモナス・スピーズ・YN21M株(*Pseudomonas* sp. YN21M)、FERM BP-8585

< YN21M株の菌学的性質 >

本菌株はシュードモナス・スピーズ・YN21株(*Pseudomonas* sp. YN21)を変異処理することによって得られた。本菌株の菌学的性質を以下に記載する。

1) 形態学的性質

細胞の形と大きさ : 桿菌、 $0.8\mu\text{m} \times 1.5 \sim 2.0\mu\text{m}$

細胞の多形性 : なし

運動性 : あり

胞子形成 : なし

グラム染色性 : -

コロニー形状 : 円形、全縁なめらか、低凸状、表層なめらか、光沢、半透明

2) 生理学的性質

カタラーゼ活性 : +

オキシダーゼ活性 : +

O/F試験 : 酸化型

硝酸還元 : +

インドール産生 : -

アルギニンジヒドロラーゼ : +

エスクリン加水分解 : -

ゼラチン加水分解 : -

King's B寒天での蛍光色素産生 : +

ポリ-β-ヒドロキシ酪酸の蓄積 : -

Tween 80の加水分解 : +

41 生育 : -

グルコン酸還元 : -

レバン産生 : -

ジャガイモ腐敗： -	
タバコ過敏反応： -	
スクロース： -	
カゼイン： -	
チロシナーゼ： +	
硫化水素： -	
ペクチン： -	
レシチナーゼ： -	
リトマスミルク： B	
デンプン： -	10
3) 基質資化能	
グルコース： +	
スクロース： -	
L-アラビノース： +	
D-アラビノース： -	
D-マンノース： +	
D-マンニトール： -	
マルトース： -	
グルコン酸： +	
D-キシロース： (+)	20
ラフィノース： -	
サリシン： -	
グリセリン： +	
D-セロビオース： -	
D-メレチトース： -	
ラクトース： -	
ガラクトース： +	
D-ソルビトール： -	
-メチル-D-グルコシド： -	
D-リボース： (+)	30
スクロース： -	
イノシトール： -	
D-フルクトース： +	
L-ラムノース： -	
ズルシトール： -	
メリビオース： -	
アドニトール： -	
デンプン： -	
エリスリトール： -	
トレハロース： -	40
ベタイン： +	
DL-乳酸： +	
D-酒石酸： -	
L-酒石酸： (+)	
メソ酒石酸： +	
n-カプリン酸： +	
L-リンゴ酸： (+)	
クエン酸： +	
D-サッカラート： +	
レブリン酸： +	50

メサコン酸：	-	
マロン酸：	+	
コハク酸：	+	
酢酸：	+	
プロピオン酸：	+	
n-酪酸：	+	
ギ酸：	-	
グルタル酸：	+	
D-キナ酸：	+	
セバシン酸：	+	10
p-ヒドロキシ安息香酸：	+	
アントラニル酸：	-	
ペラルゴン酸：	+	
グリセリン酸：	+	
-アミノ酪酸：	+	
L-ロイシン：	+	
L-セリン：	+	
ヒスチジン：	+	
L-イソロイシン：	+	
L-アルギニン：	+	20
-アラニン：	+	
L-チロシン：	+	
L-バリン：	+	
ホモセリン：	-	
サルコシン：	+	
トリアセチン：	+	
トリゴネリン：	+	
5-フェニル吉草酸：	+	
3-ヒドロキシ酪酸：	+	
L-アスパラギン：	+	30
< AG32株の菌学的性質 >		
本菌株は環境中から新たに取得された。本菌株の菌学的性質を以下に記載する。		
1) 形態学的性質		
細胞の形：桿菌		
グラム染色性：-		
2) 生理学的性質		
オキシダーゼ活性：+		
O/F試験：酸化型		
硝酸還元：-		
インドール産生：-		
アルギニンジヒドロラーゼ：+		
ゼラチン加水分解：+		
King's B寒天での蛍光色素産生：+		
Tween 80の加水分解：+		
40 生育：-		
グルコン酸還元：+		
レバン産生：-		
ジャガイモ腐敗：-		
タバコ過敏反応：-		
レシチナーゼ：+		
50		

カゼイン：+	
カタラーゼ：+	
PHB集積：-	
3) 基質資化能	
グルコース：+	
スクロース：-	
D-マンニトール：+	
マルトース：-	
ラクトース：-	
ガラクトース：+	10
D-ソルビトール：-	
イノシトール：+	
L-ラムノース：-	
アドニトール：-	
エリスリトール：-	
トレハロース：-	
DL-乳酸：+	
D-酒石酸：-	
L-酒石酸：+	
メソ酒石酸：+	20
D-サッカラート：+	
メサコン酸：-	
プロピオン酸：+	
n-酪酸：+	
エタノール：-	
プロピレングリコール：-。	
【0036】	
<KF767株の菌学的性質>	
本菌株は環境中から新たに取得された。本菌株の菌学的性質を以下に記載する。	
1) 形態学的性質	30
細胞の形：桿菌	
グラム染色性：-	
2) 生理学的性質	
オキシダーゼ活性：+	
O/F試験：酸化型	
インドール産生：-	
アルギニンジヒドロラーゼ：+	
King's B寒天での蛍光色素産生：+	
40 生育：-	
カタラーゼ：+	40
PHB集積：-	
3) 基質資化能	
グルコース：+	
スクロース：-	
マルトース：-	
ラクトース：-	
D-ソルビトール：-	
アドニトール：-	
エリスリトール：-	
トレハロース：-	50

DL-乳酸 : +
 D-サッカレート : +
 メサコン酸 : -
 プロピオン酸 : +
 n-酪酸 : +

4) 部分塩基配列

a) 16S rDNA (配列番号 1)

CTGGCGGCAGGCCAACACATGCAAGTCGAGCGGATGAAGAGAGCTTGCTCTCTGATTCAGCGGCGGACGGGTGAGTAAT
 GCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGACAACGTTTCGAAAGGAACGCTAATACCGCATACGTCCTACGGGAGAAAGCAG
 GGGACCTTCGGGCCCTTGCCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACG 10
 ATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAACCTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGG
 GAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAA
 GTTGGGAGGAAGGGCAGTAGATTAATACTCTGCTGTTTTGACGTTACCGACAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAG
 CAGCCGCGTAATACAGAGGGTGAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCTAGGTGGTTTTGTTAAGTTGG
 ATGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAACCTGCATTCAAACCTGACAAGCTAGAGTATGGTAGAGGGTGGTGAATTTCC
 TGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACCACCTGGACTGATACTGACACTGAGG
 TGCGAAAAGCGTGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTCAACTAGCCGTTGGGAGCC
 TTGAGCTCTTAGTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTTGACCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATT
 GACGGGGGCCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGCCTTGACATCCAA
 TGAACCTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACATTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTGCTCAGCTCGTGTCTGTGAG 20
 ATGTTGGGTTAAGTCCCGTAACGAGCGCAACCCTTGTCTTAGTTACCAGCACGTAATGGTGGGCACTCTAAGGAGACTG
 CCGGTGACAAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGGCCTGGGCTACACACGTGCTACAAT
 GGTCCGTACAGAGGTTGCCAAGCCGCGAGGTGGAGCTAATCCATAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAAC
 TCGACTGCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGAATGTCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACC
 GCCCGTCACACCATGGGAGTGGGTTGCACCAGAAGTAGCTAGTCTAACCTTCGGGGGACGGTTACCACGGTGTGATTCA
 TGAAGTGGGGGAAGTGAACAA

b) gyrB (配列番号 2)

TCCTACAAGGTATCCGGCGGCCTGCACGGCGTAGGTGTGTCCGGTAGTGAACGCCCTGTCTGAAGAGCTAGTCCTCACCGT
 TCGCCGTAGCGGCAAGATCTGGGAACAGACCTACGTCCATGGTGTTCGCGAGGAGCCGATGAAGATCGTTGGCGACAGCG
 AAACCACTGGCACCCAGATCCACTTCAAGGCTTCCAGCGAAACCTTCAAGAACATCCACTTACGCTGGGACATCCTGGCC 30
 AAGCGGATTCGTGAACTGTCTTCTCAACTCCGGTGTCCGGTATCGTCTCAAGGACGAGCGCAGCGGCAAGGAAGAGCT
 GTTCAAGTACGAAGGCGGCCTGCGTGCCTTCCGTTGAATACCTGAACACCAACAAGACCCCGGTCAACCAGGTGTTCCACT
 TCAACATCCAGCGTGAAGACGGCATTGGCGTGGAAATCGCCCTGCAGTGGAAACGACAGCTTCAACGAGAACCCTGTTGTGC
 TTCACCAACAACATTCCGCGAGCGCGATGGCGGTACTCACCTGGTGGGTTTTCCGTTCCGCACTGACGCGTAACCTCAACAC
 CTATATCGAAGCTGAAGGCCTGGCGAAGAAGCACAAGGTGCCACCACCGGTGACGACGCCCGTGAAGGCCTGACCGCGA
 TCATTTCCGTAAGTGGCGGATCCGAAGTTCAGCTCCCAGACCAAGGACAAGCTGGTCTCTTCCGAAGTGAAGACCGCG
 GTCGAACAGGAAATGGGCAAGTACTTCTCCGACTTCTGCTGGAAAACCCGAACGAAGCAAGCTGGTTGTGCGCAAGAT
 GATCGACGCGGCACGTGCTCGTGAAGCCGCGCGCAAGGCCCGTGAGATGACCCGCCGTAAGGCGCACTGGACATCGCTG
 GCCTGCCGGGCAAACTGGCTGAT

c) rpoD (配列番号 3)

GAGCTCCTCACGCGTGAAGGCGAAATCGAAATCGCCAAGCGTATTGAAGAGGGCATCCGTGAAGTGAAGGCGCAATCGC
 GCACTTCCCTGGCACGGTTGATCATATTCTCTCCGAATACACTCGCGTCACCACCGAAGGTGGCCGCTGTCCGACGTCC
 TGAGCGGTTATATCGACCCGGACGACGGTATTGCGCCGCTGCAGCGGAGGTGCCACCGCCGATCGACACCAAGACCGCG
 AAAGCGGATGACGATTCCGACGACGATGACGCCGAAGCTTCCGATGACGAAGAAGAAGCCGAAAGCGGTCCGGATCCGAT
 CATCGCCGCCAGCGCTTTGGTGTGTCGCCGATCAGATGGAAATCACCCGCAAGGCGCTGAAAAAGCACGGTCCGCCACA
 ACAAGCTGGCGATTGCCGAGCTGTTGGCCCTTGGCGACCTGTTTCATGCCGATCAAACCTGGTTCCGAAGCAATTCCGAAGGC
 CTGGTTCGAGCGTGTGCGCAGCGCCCTGGATCGTCTGCGTCAGCAAGAGCGTGCAATCATGCAGCTCTGCGTTCTGTGATGC
 ACGCATGCCGCGTGTGACTTCTGCGCCAGTTCGGGGCAACGAAGTGGACGAAAGCTGGAGCGATGCACTGGCCAAAG
 GCAAAAAGCAAATACGCTGAAGCCATCGGTGCGGTGCAGCCGGACATCATTCGCTGCCAGCAGAAGCTGACCGCGCTGGAA
 ACCGAAACCGGTTTACGATCGCCGAGATCAAGGACATCAACCGTGCATGTCGATCGGTGAGGCCAAGGCCCGCCGCGC 50

G。

【 0 0 3 7 】

< TM90株の菌学的性質 >

本菌株は環境中から新たに取得された。本菌株の菌学的性質を以下に記載する。

1) 形態学的性質

細胞の形：桿菌

グラム染色性： -

2) 生理学的性質

オキシダーゼ活性： +

O/F試験：酸化型

硝酸還元： -

インドール産生： -

アルギニンジヒドロラーゼ： +

ゼラチン加水分解： -

King's B寒天での蛍光色素産生： +

Tween 80 の加水分解： +

40 生育： -

グルコン酸還元： -

レバン産生： + -

ジャガイモ腐敗： -

タバコ過敏反応： -

レシチナーゼ： -

カゼイン： +

カタラーゼ： +

PHB集積： -

3) 基質資化能

グルコース： +

スクロース： -

D-マンニトール： -

マルトース： -

ラクトース： -

ガラクトース： +

D-ソルビトール： +

イノシトール： -

L-ラムノース： -

アドニトール： -

エリスリトール： -

トレハロース： -

DL-乳酸： +

D-酒石酸： -

L-酒石酸： -

メソ酒石酸： -

D-サッカラート： +

メサコン酸： -

プロピオン酸： +

n-酪酸： +

エタノール： +

プロピレングリコール： +。

【 0 0 3 8 】

< TM109株の菌学的性質 >

10

20

30

40

50

本菌株は環境中から新たに取得された。本菌株の菌学的性質を以下に記載する。

1) 形態学的性質

細胞の形：桿菌

グラム染色性：-

2) 生理学的性質

オキシダーゼ活性：+

O/F試験：酸化型

硝酸還元：-

インドール産生：-

アルギニンジヒドロラーゼ：+

10

ゼラチン加水分解：-

King's B寒天での蛍光色素産生：+ W

Tween 80 の加水分解：-

40 生育：-

グルコン酸還元：-

レバン産生：-

ジャガイモ腐敗：-

タバコ過敏感反応：-

レシチナーゼ：-

カゼイン：-

20

カタラーゼ：+

PHB集積：-

3) 基質資化能

グルコース：+

スクロース：-

D-マンニトール：+

マルトース：-

ラクトース：-

ガラクトース：+

D-ソルビトール：-

30

イノシトール：-

L-ラムノース：-

アドニトール：-

エリスリトール：-

トレハロース：-

DL-乳酸：+

D-酒石酸：+

L-酒石酸：-

メソ酒石酸：-

D-サッカラート：+

40

メサコン酸：-

プロピオン酸：+

n-酪酸：+

エタノール：+

プロピレングリコール：+。

【0039】

以上の菌学的性質から、バージェーズ・マニュアル・オブ・システマティック・バクテリオロジー・第1巻 (Bergeys Manual of Systematic Bacteriology, Volume 1) (1984年)、バージェーズ・マニュアル・オブ・ディタミネーティブ・バクテリオロジー (Bergeys Manual of Determinative Bacteriology) 第9版 (1994年)、及びKF767株において

50

は部分塩基配列による相同性検索に基づいて検索したところ、いずれの菌株もシュードモナス・スピーズ(*Pseudomonas* sp.)に属すると判明した。従って、これらの菌株をシュードモナス・スピーズ・YN21M株(*Pseudomonas* sp. YN21M)、シュードモナス・スピーズ・AG32株(*Pseudomonas* sp. AG32)、シュードモナス・スピーズ・KF767株(*Pseudomonas* sp. KF767)、シュードモナス・スピーズ・TM90株(*Pseudomonas* sp. TM90)、シュードモナス・スピーズ・TM109株(*Pseudomonas* sp. TM109)とそれぞれ命名した。

【0040】

なお、上記の5種の新規菌株の従来菌株との違いは以下のとおりである。

【0041】

YN21M、TM109は中性付近の培養条件において従来菌株より高いPHA生産性を有する。KF767は酸性の培養条件において従来菌株より高いPHA生産性を有する。AG32、TM90は塩基性の培養条件において従来菌株より高いPHA生産性を有する。これらの特性の他に、YN21M株は従来菌株である*Pseudomonas cichorii* YN2株(FERM BP-7375)と硝酸塩還元性、インドール生成、ブドウ糖酸性化、アルギニンジヒドロラーゼ活性、D-マンノース資化能などの生理学的性質及び基質資化能の違いを示すことができる。また同様に従来菌株である*Pseudomonas cichorii* H45株(FERM BP-7374)とは硝酸塩の還元性、アルギニンジヒドロラーゼ活性、L-アラビノース資化能、D-マンニトール資化能において、*Pseudomonas jessenii* P161株(FERM BP-7376)とはD-マンニトール資化能において、*Pseudomonas putida* P91株(FERM BP-7373)とは硝酸塩還元性、L-アラビノース資化能、D-マンノース資化能においてそれぞれ特性を異にする。

【0042】

また、AG32株に関しては、従来菌株であるYN2株とはインドール産生能、アルギニンジヒドロラーゼ活性、ゼラチン加水分解活性において、H45株とはアルギニンジヒドロラーゼ活性、ゼラチン加水分解活性において、P161株とはゼラチン加水分解活性において、P91株とはD-マンニトール資化能においてそれぞれ特性を異にする。また、KF767株に関しては、従来菌株のYN2株とはインドール産生能、アルギニンジヒドロラーゼ活性において、H45株とはアルギニンジヒドロラーゼ活性において、P91株とはインドール産生能においてそれぞれ特性を異にする。また、TM90株に関しては、従来菌株であるYN2株とはインドール産生能、アルギニンジヒドロラーゼ活性において、H45株とはアルギニンジヒドロラーゼ活性、D-マンニトール資化能において、P161株とは硝酸塩の還元性、D-マンニトール資化能においてそれぞれ特性を異にする。また、TM109株に関しては、従来菌株であるYN2株とはインドール産生能、アルギニンジヒドロラーゼ活性、D-マンニトール資化能において、P161株とは硝酸塩還元性において、P91株とはD-マンニトール資化能においてそれぞれ特性を異にする。

【0043】

<基質>

前記本発明の新規微生物を、前記式(1)~(4)に示すユニットの導入のための基質となるアルカノエートもしくはアルカンを含んだ培地で培養することで、前記式(1)~(4)に示すユニットからなる群から選ばれた少なくとも1種類を含むPHAを生産することが出来る。上記基質となるアルカノエートもしくはアルカンとしては、本発明における微生物により対応するPHAのモノマーユニットに変換され得るもので、目的とするPHAの構造に応じて側鎖に置換基を有するアルカノエートもしくはアルカンであれば、いかなる種類のものを用いても良いが、例えば、アルカノエートとしては式(13)~(16)で示す構造のものを好ましく用いることが出来る。

【0044】

ここで、式(13)は、

【0045】

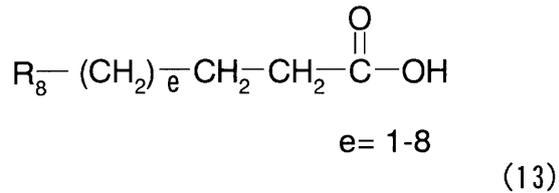
10

20

30

40

【化13】

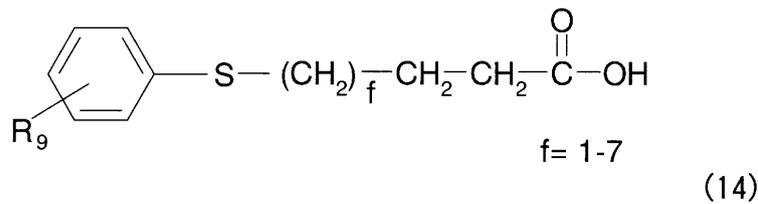


【0046】

(e は式の中に示した範囲内から選ばれた整数である ; R_8 はフェニル構造、或いはチエニル構造のいずれかの構造を有する残基を含んでいる) で示され、式(14)は、

【0047】

【化14】



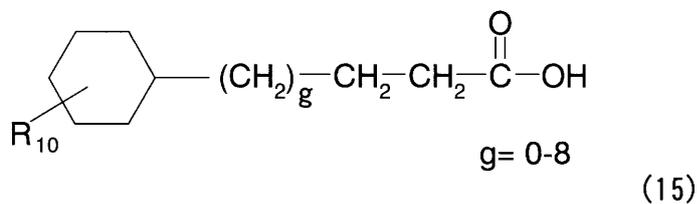
20

【0048】

(式中、 R_9 は芳香環への置換基を示し、 R_9 は H 原子、ハロゲン原子、CN 基、 NO_2 基、 COOR' 、 $\text{SO}_2\text{R}''$ (R' : H、Na、K、 CH_3 、および C_2H_5 のいずれかを表し、 R'' : OH、ONa、OK、ハロゲン原子、 OCH_3 、および OC_2H_5 のいずれかを表す)、 CH_3 基、 C_2H_5 基、 C_3H_7 基、 $(\text{CH}_3)_2 - \text{CH}$ 基または $(\text{CH}_3)_3 - \text{C}$ 基であり、 f は式の中に示した範囲内から選ばれた整数である) で示され、式(15)は、

【0049】

【化15】



30

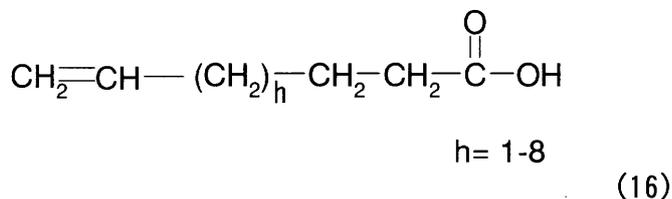
【0050】

(式中、 R_{10} はシクロヘキシル基への置換基を示し、 R_{10} は H 原子、CN 基、 NO_2 基、ハロゲン原子、 CH_3 基、 C_2H_5 基、 C_3H_7 基、 CF_3 基、 C_2F_5 基または C_3F_7 基であり、 g は式の中に示した範囲内から選ばれた整数である) で示され、式(16)は、

40

【0051】

【化16】



【0052】

50

(hは式中に示した範囲内から選ばれた整数である)で示される。また、同様に本発明に用い得るアルカンの例としては、上記式(13)~(16)のアルカノエートがアルカンとなった構造のものを用いることができる。

【0053】

本発明における新規微生物であるYN21M株及びTM109株は、上記基質を利用して高い収率でunusual-PHAを生産することができる。具体的に5-フェニル吉草酸を用いた場合、YN21M株は従来既知の微生物に比べて高収率に3-ヒドロキシ-5-フェニル吉草酸ユニットを有するPHAを生産することが出来る。また、5-フェノキシ吉草酸を用いた場合、TM109株は従来既知の微生物に比べて高収率に3-ヒドロキシ-5-フェノキシ吉草酸ユニットを有するPHAを生産することが出来る。また、一般的にアルカンはアルカノエートよりも低コストに化学合成できるため、アルカンを使用することでunusual-PHAの生産コストを低減することにつながる。本発明における新規微生物であるYN21M株は、アルカンを利用して従来より高い収率でunusual-PHAを生産することができる。具体的にn-アミルベンゼンを用いた場合、YN21M株は従来既知の微生物に比べて高収率に3-ヒドロキシ-5-フェニル吉草酸ユニットを有するPHAを生産することが出来る。上記基質の含有比率は、培地あたり0.01%~1%(w/v)の範囲に選択することが望ましい。

10

【0054】

<培養>

本発明における培養方法としては、液体培養法を用いることが出来、さらに、バッチ培養、フェドバッチ培養、半連続培養、連続培養、またこれらを組み合わせた方法等、種類を問わない。液体バッチ培養の形態としては、フラスコを用いた方法、ジャーファーマンターを用いた方法などがある。また、本発明の方法に利用可能な培地としては、リン源(例えば、リン酸塩等)、窒素源(例えば、アンモニウム塩、硝酸塩等)など、微生物が増殖し得る成分を適当な濃度で含んでいるものであればいかなるものも用いることが出来る。

20

更には、良好な菌体の増殖、それに伴うPHAの生産性の向上を図るためには、前記の培地に必須微量元素を適量添加することができ、例えば、以下に示す微量成分溶液を0.3%(v/v)程度添加することが極めて有効である。かかる微量成分溶液の添加は、微生物の増殖に際して使用される微量金属元素などを供給するものである。

30

【0055】

(微量成分溶液の組成)

ニトリコ三酢酸:1.5; MgSO₄:3.0; MnSO₄:0.5; NaCl:1.0; FeSO₄:0.1; CaCl₂:0.1; CoCl₂:0.1; ZnSO₄:0.1; CuSO₄:0.1; AlK(SO₄)₂:0.1; H₃BO₃:0.1; Na₂MoO₄:0.1; NiCl₂:0.1(g/L)

また、前記の培地に、微生物の増殖を促す基質として、酵母エキス、ポリペプトン、肉エキス、コーンスティープリカーといった栄養素をさらに添加することも可能である。

【0056】

また、前記の培地に、微生物の増殖により消費されるエネルギー源、炭素源として、糖類、例えば、グリセロアルデヒド、エリトロース、アラビノース、キシロース、グルコース、ガラクトース、マンノース、フルクトースといったアルドース、グリセロール、エリトリトール、キシリトール等のアルジトール、グルコン酸等のアルドン酸、グルクロン酸、ガラクトツロン酸等のウロン酸、マルトース、スクロース、ラクトースといった二糖等をさらに添加することも可能である。

40

【0057】

前記糖類に代えて、有機酸またはその塩、より具体的には、TCAサイクルに關与する有機酸、並びに、TCAサイクルから1段階や2段階の少ない生化学的反應により誘導される有機酸、またはそれらの水溶性の塩を利用することも出来る。有機酸またはその塩として、例えば、ピルビン酸、オキサロ酢酸、クエン酸、イソクエン酸、ケトグルタル酸、

50

コハク酸、フマル酸、リンゴ酸、乳酸などのヒドロキシカルボン酸やオキシカルボン酸類またはその水溶性の塩を用いることが可能である。あるいは、アミノ酸またはその塩、例えば、アスパラギン酸やグルタミン酸等のアミノ酸またはその塩を用いることが可能である。有機酸またはその塩を添加する際には、ピルビン酸、オキサロ酢酸、クエン酸、イソクエン酸、ケトグルタル酸、コハク酸、フマル酸、リンゴ酸、乳酸、並びにその塩からなる群から、一種または複数種を選択し、培地に添加し、溶解させることがより好ましい。あるいは、アミノ酸またはその塩を添加する際には、アスパラギン酸、グルタミン酸ならびにそれらの塩からなる群から、一種または複数種を選択し、培地に添加し、溶解させることがより好ましい。

【0058】

微生物増殖のための炭素源、並びに、PHA生産のためのエネルギー供給源として培地に添加される上記の共存基質の濃度は、通常、培地あたり0.05%~5%(w/v)の範囲、より好ましくは、0.2%~2%(w/v)の範囲に選択することが望ましい。

【0059】

また、PHA合成のための基質としてアルカンを用いた場合には、界面活性作用を有する分散剤を適当濃度で培地に添加することによって、PHAの生産性を上げることができる。この理由としては、分散剤によるアルカンの培地への溶解性の向上や揮発性の抑制、微生物の増殖やPHA生産に対する阻害作用の低減等が考えられる。アルカンを利用してPHAを高収率に生産できるYN21M株においても、分散剤を添加することによってより生産性を向上することが可能である。分散剤としては微生物の生育及び活性を大きく阻害せず、かつ微生物菌体から回収したPHAに残留しない界面活性剤であればいかなるものを使用しても良く、例えば非イオン系界面活性剤であるポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル、ポリオキシアルキレンエーテル、ポリオキシアルキレングリコール、ポリエーテルなどを用いることができる。これらの中には微生物の培養に一般的に使用される消泡剤も含まれており、消泡剤を兼ねて添加することも可能である。

【0060】

分散剤の濃度としては分散剤の種類や目的に応じて適宜設定すればよいが、例えば0.1~1ml/L、さらに0.5ml/L程度の濃度を好適に用いることができる。

【0061】

培養温度は、利用する微生物菌株が良好に増殖可能な温度であれば良く、通常、15~37の範囲、より好ましくは、20~30の範囲程度に選択することが適当である。

【0062】

培養pHは、使用する微生物の生育や目的とするPHAの生産にとって良好な範囲であれば良く、そのような範囲にpHを制御することも好ましい。pHの制御方法は、培地に予めpH緩衝能を持たせて制御する方法や、培養中の培地pHの変化に応じて酸、アルカリを適宜添加して制御する方法など、微生物の培養に一般に用いられる方法を採用することが可能であるが、生産性を向上させるために基質や培地濃度を高めた場合には、培養経過と共に培地の緩衝能を超えてpHが変動することもあり、また設備的な問題や、簡便さの点から培養中に酸・アルカリを添加して制御することも困難な場合が多い。

【0063】

本発明における新規微生物であるKF767株は、培養中の培地pHが酸性に傾斜しても比較的安定して高収率にunusual-PHAを生産することができる。具体的に5-フェニル吉草酸を基質として用いた場合、KF767株はpH5.0~6.5の酸性培地において従来既知の微生物に比べて高収率に3-ヒドロキシ-5-フェニル吉草酸ユニットを有するPHAを生産することが出来る。

【0064】

また、本発明における新規微生物であるAG32株及びTM90株は、培養中の培地pHが塩基性に傾斜しても比較的安定して高収率にunusual-PHAを生産することができる。具体的に5-フェニル吉草酸を基質として用いた場合、AG32株及びTM90株はpH7.5~8.5

10

20

30

40

50

の塩基性培地において従来既知の微生物に比べて高収率に3-ヒドロキシ-5-フェニル吉草酸ユニットを有するPHAを生産することが出来る。

【0065】

微生物にPHAを生産・蓄積せしめる手法としては、上述する、所定の濃度で基質を添加した、リン酸塩、並びにアンモニウム塩または硝酸塩等の窒素源を含む培地において微生物を培養する一段階培養法の他に、培養を二段階に分けて行なう二段階培養法を採用することも出来る。この二段階培養法では、一次培養として、所定の濃度で基質を添加した、リン酸塩、並びにアンモニウム塩または硝酸塩等の窒素源を含む培地において、微生物を一旦十分に増殖させた後、二次培養として、培地に含まれる塩化アンモニウムのような窒素源を制限した上で、所定の濃度で基質を添加した培地に、一次培養で得られた菌体を移し、更に培養して、微生物にPHAを生産・蓄積せしめる。この二段階培養法を採用すると、PHAの生産性が向上する場合がある。

10

【0066】

生産されるPHAは微生物の菌体内に蓄積されるので、培養により増殖させ、PHAを生産・蓄積している菌体を集菌することで、培地との分離が容易になされる。集菌した菌体を、洗浄・乾燥した後、PHAを回収することが出来る。

【0067】

微生物細胞からPHAを回収する方法としては、通常行なわれている方法を適用することが出来る。例えば、クロロホルム、ジクロロメタン、アセトンなどの有機溶媒による抽出が最も簡便である。前記の溶媒以外に、ジオキサソ、テトラヒドロフラン、アセトニトリルが用いられる場合もある。また、有機溶媒の使用が望ましくない作業環境中では、SDS等の界面活性剤による処理、リゾチーム等の酵素による処理、次亜塩素酸塩、アンモニア、EDTA等の薬剤による処理、超音波破碎法、ホモジナイザー法、圧力破碎法、ピーズ衝撃法、摩砕法、搗潰法、凍結融解法のいずれかの方法を用いて、微生物細胞を物理的に破碎した後、PHA以外の菌体成分を除去して、PHAを回収する方法を採用することも出来る。

20

【0068】

また、本発明で生産するunusual-PHAには、複数のモノマーユニットを含有せしむることも可能であり、必要とするポリマーの機能性、物性などを考慮の上、設計すると良い。即ち、目的とするPHAを生産するための基質であるアルカノエートやアルカンの複数種を培地中に共存させることにより、複数種のユニットを含むPHAを生産することが可能である。

30

【実施例】

【0069】

次に、実施例を挙げて本発明を更に詳細に説明する。なお、これら実施例は、本発明にかかる最良の実施形態の一例ではあるものの、本発明は、これら実施例の形態によって限定されるものではない。

<参考例1>

本発明にかかる新規菌株シュードモナス・スピーズ・AG32株、シュードモナス・スピーズ・KF767株、シュードモナス・スピーズ・TM90株及びシュードモナス・スピーズ・TM109株、並びに、シュードモナス・スピーズYN21Mの親株としてのシュードモナス・スピーズYN21株(FERM BP-08569)の取得は以下の方法で行なった。ポリペプトン0.5%、フェニル吉草酸0.1%、ミネラル溶液0.3%、粉末寒天1.2%を含むM9培地をオートクレーブ滅菌し、50℃に冷却後、ナイルレッドを0.05%含有するDMSO溶液を0.1%添加し、滅菌シャーレに15mlずつ分注し、寒天を固化させて寒天培地を作製した。なお、M9培地及びミネラル溶液の組成は以下に示す。

40

[M9培地]

Na₂HPO₄: 6.2g、KH₂PO₄: 3.0g、NaCl: 0.5g、NH₄Cl: 1.0g(培地1リットル中、pH7.0)

[ミネラル溶液]

50

ニトリロ三酢酸：1.5 g、MgSO₄：3.0 g、MnSO₄：0.5 g、NaCl：1.0 g、FeSO₄：0.1 g、CaCl₂：0.1 g、CoCl₂：0.1 g、ZnSO₄：0.1 g、CuSO₄：0.1 g、AlK(SO₄)₂：0.1 g、H₃BO₃：0.1 g、Na₂MoO₄：0.1 g、NiCl₂：0.1 g(1リットル中、pH7.0)

次に野外から採取した土壌試料5gを10mlの滅菌蒸留水に添加し、1分間攪拌した。この土壌懸濁液0.5mlを4.5mlの滅菌水に添加・攪拌し、10倍希釈液を作製した。同様の操作を繰り返し、100倍希釈液、1000倍希釈液、10000倍希釈液を作製した。

10倍～10000倍希釈液を先に作製した寒天培地に各0.1mlずつ分注し、寒天表面に均一になるように広げた。これを培養器に移し、30℃で5日間培養した。培養後、PHAを合成したと思われる赤色のコロニーのうち、形態の異なる株を分離した。こうして野生株を十数株取得した。

10

【0070】

次に、ポリペプトン0.5%、グルコース0.5%、フェニル吉草酸0.1%、ミネラル溶液0.3%を含むM9培地(pH7.0)50mlに上記野生株を保存寒天培地のコロニーから植菌し、500ml容坂口フラスコにて30℃、125ストローク/分で振盪培養した。また上記培地をpH5.0、pH8.5にそれぞれ調整した培地に関しても同様に培養を行った。

72時間後、菌体を遠心分離により回収し、冷メタノールにて洗浄した後、真空乾燥した。この乾燥菌体ペレットを酢酸エチル10mlに懸濁し、35℃で15時間攪拌してPHAを抽出した。抽出液を孔径0.45μmのメンブラン・フィルターで濾過した後、ロータリーエバポレーターで濃縮した。この濃縮液を冷メタノール中に加えて、PHAを再沈澱させ、沈澱物のみを回収して真空乾燥し、得られたPHAを秤量してポリマー乾燥重量(PDW)を求めた。得られたPHAのモノマーユニット比を、¹H-NMR(FT-NMR: Bruker DPX 400; 共鳴周波数: 400 MHz; 測定核種: ¹H; 使用溶媒: CDCl₃; reference: キャピラリー封入TMS/CDCl₃; 測定温度: 室温)によって求めた。以上により得られたポリマー乾燥重量(PDW)及びモノマーユニット比を各野生株及び従来菌株に関して比較することで、PHA生産性に優れた本発明にかかる新規菌株(AG32株、KF767株、TM90株、TM109株及びYN21株)を得た。更に、YN21株に変異を加え、PHA生産性が更に向上している菌を単離し、YN21M株とした。

20

【0071】

<実施例1>

リン酸水素二ナトリウム8.86g/L、リン酸二水素カリウム0.45g/L、塩化アンモニウム1.0g/L、塩化ナトリウム0.5g/L、微量成分溶液3ml/Lを含む無機培地に、ポリペプトン(日本製薬(株))0.5g/L、D-グルコース0.5g/Lの組成の培地50mlを500ml容振とうフラスコに入れ、これに基質としてアルカノエートである5-フェニル吉草酸を12mM、5-(4-ピニルフェニル)吉草酸を1.5mMの濃度となるように添加し、高温高圧殺菌し室温まで冷却して培地を調製した。培地pHは7.2であった。

30

【0072】

この振とうフラスコに本発明における新規微生物であるYN21M株を接種し、30℃、125ストローク/分で振盪培養した。40時間後、菌体を遠心分離により回収し、冷メタノールにて洗浄した後、真空乾燥した。

40

【0073】

この乾燥菌体ペレットを酢酸エチル10mlに懸濁し、35℃で15時間攪拌してPHAを抽出した。抽出液を孔径0.45μmのメンブラン・フィルターで濾過した後、ロータリーエバポレーターで濃縮した。この濃縮液を冷メタノール中に加えて、PHAを再沈澱させ、沈澱物のみを回収して真空乾燥し、得られたPHAを秤量してポリマー乾燥重量(PDW)を求めた。得られたPHAのモノマーユニット比を、¹H-NMR(FT-NMR: Bruker DPX 400; 共鳴周波数: 400 MHz; 測定核種: ¹H; 使用溶媒: CDCl₃; reference: キャピラリー封入TMS/CDCl₃; 測定温度: 室温)によって求めた。ポリマー乾燥重量(PDW)及びモノマーユニット比の結果を表1に示す

50

【 0 0 7 4 】

< 比較例 1 >

実施例 1 で使用した Y N 2 1 M 株の代わりに、シュードモナス・スピーシズ・Y N 2 1 株 (*Pseudomonas* sp. Y N 2 1 ; F E R M B P - 8 5 6 9)、シュードモナス・チコリアイ・Y N 2 株 (*Pseudomonas cichorii* Y N 2 ; F E R M B P - 7 3 7 5)、シュードモナス・チコリアイ H 4 5 株 (*Pseudomonas cichorii* H 4 5 ; F E R M B P - 7 3 7 4)、シュードモナス・ジェッセニイ P 1 6 1 株 (*Pseudomonas jessenii* P 1 6 1 ; F E R M B P - 7 3 7 6)、シュードモナス・プチダ P 9 1 株 (*Pseudomonas putida* P 9 1 ; F E R M B P - 7 3 7 3) の各菌株をそれぞれ別々に用いた他は、
 実施例 1 と同様に実験を行った。各菌株におけるポリマー乾燥重量 (PDW) 及びモノマーユニット比の結果を表 1 に示す。

10

【 0 0 7 5 】

【 表 1 】

表 1

	菌株	PDW (g/L)	モノマーユニット比 (モル%)	
			3HPV	3HVPV
実施例 1	YN21M	1.55	91.8	7.5
比較例 1	YN21	0.91	90.6	8.3
	YN2	1.24	91.5	8.1
	H45	0.59	89.4	8.7
	P161	0.65	90.5	7.6
	P91	0.14	90.9	8.4

20

30

【 0 0 7 6 】

PDW: ポリマー乾燥重量

3HPV: 3-ヒドロキシ-5-フェニル吉草酸ユニット

3HVPV: 3-ヒドロキシ-5-(4-ビニルフェニル)吉草酸ユニット

表 1 に示す実施例及び各比較例の結果より、実施例 1 の PDW は比較例 1 のいずれの PDW より高かった。これより、本基質及び本培養条件において、YN21M 株は YN21 株、YN2 株、H45 株、P161 株、P91 株よりも PHA 生産性の高いことが示された。

【 0 0 7 7 】

< 実施例 2 >

リン酸水素二ナトリウム 6.2 g / L、リン酸二水素カリウム 3 g / L、塩化アンモニウム 1.0 g / L、塩化ナトリウム 0.5 g / L、微量成分溶液 3 ml / L を含む無機培地に、ポリペプトン (日本製薬 (株)) 0.5 g / L、D - グルコース 0.5 g / L の組成の培地 50 ml を 500 ml 容振とうフラスコに入れ、これにさらに基質の分散剤として消泡剤 Antiform PE-M (和光純薬 (株) 社製) を 0.5 ml / L の濃度で添加し、高温高圧殺菌した。室温まで冷却後、これに基質としてアルカンである n - アミルベンゼンを 6 mM の濃度となるように添加した。培地 pH は 7.0 であった。この振とうフラスコに本発明における新規微生物であるシュードモナス・スピーシズ・Y N 2 1 M 株を接種し、30、125 ストローク / 分で振盪培養した。40 時間後、菌体を遠心分離により回収し、実施例 1 と同様に PHA を抽出し、得られた PHA を秤量してポリマー乾燥重量 (PDW ; g / l) を求めた。また、得られた PHA のモノマーユニット比を実施例 1 と同様に ¹ H - N M R によって求

40

50

めた。ポリマー乾燥重量（PDW）及びモノマーユニット比の結果を表2に示す。

【0078】

<比較例2>

実施例2で使用したYN21M株の代わりに、比較例1で使用したYN21株、YN2株、H45株、P161株、P91株の各菌株をそれぞれ別々に用いた他は、実施例2と同様に実験を行った。

各菌株におけるポリマー乾燥重量（PDW）及びモノマーユニット比の結果を表2に示す。

【0079】

【表2】

表2

	菌株	PDW (g/L)	モノマーユニット比(モル%)
			3HPV
実施例2	YN21M	0.52	95.2
比較例2	YN21	0.15	94.3
	YN2	0.17	94.8
	H45	0.08	91.2
	P161	0.12	93.5
	P91	0.03	87.6

10

20

【0080】

PDW:ポリマー乾燥重量

3HPV:3-ヒドロキシ-5-フェニル吉草酸ユニット

表2に示す実施例及び各比較例の結果より、実施例2のPDWは比較例2のいずれのPDWより高かった。これより、本基質及び本培養条件においてYN21M株はYN21株、YN2株、H45株、P161株、P91株よりもPHA生産性の高いことが示された。

30

【0081】

<実施例3>

実施例2において分散剤として使用した消泡剤Antiform PE-Mの代わりに、ツイーン20 (Tween20; キシダ化学(株)社製)、消泡剤カラリン102 (COLORIN 102; 三洋化成工業(株)社製)、消泡剤アデカノールLG-126 (旭電化工業(株)社製)、消泡剤ディスフォームC C-118 (Disfoam: 日本油脂(株)社製)を分散剤としてそれぞれ別々に用いた他は、実施例2と同様の実験を行った。培地pHは7.0であった。各分散剤におけるポリマー乾燥重量（PDW）及びモノマーユニット比の結果を実施例2の結果とともに表3に示す。

【0082】

<比較例3>

実施例2において分散剤として使用したAntiform PE-Mを添加せず、分散剤を使用しなかった他は、実施例2と同様の実験を行った。ポリマー乾燥重量（PDW）及びモノマーユニット比の結果を表3に示す。

40

【0083】

【表 3】

表 3

	分散剤	PDW (g/L)	モノマーユニット比 (モル%)
			3HPV
実施例 2	Antiform PE-M	0.48	94.4
実施例 3	Tween20	0.46	89.0
	カラリン 102	0.46	93.7
	アデカノール LG-126	0.46	93.1
	ディスフォーム	0.45	95.0
比較例 3	なし	0.15	91.5

10

【 0 0 8 4 】

PDW: ポリマー乾燥重量

3HPV: 3-ヒドロキシ-5-フェニル吉草酸ユニット

20

表 3 に示す実施例及び各比較例の結果より、実施例 2 及び実施例 3 の PDW はいずれも比較例 3 の PDW より高かった。これより、本基質及び本培養条件において界面活性剤や消泡剤を分散剤として用いることによって PHA 生産性が向上することが示された。

【 0 0 8 5 】

< 実施例 4 >

実施例 2 と同様の組成の培地 50ml を 500ml 容振とうフラスコに入れ、これに基質である 5-フェノキシ吉草酸を 6mM 濃度となるように添加し、高温高圧殺菌して室温まで冷却して培地を調製した。培地 pH は 7.0 であった。この振とうフラスコに本発明における新規微生物であるシュードモナス・スピーズ・TM109 株を接種し、30、125 ストローク/分で振盪培養した。40 時間後、菌体を遠心分離により回収し、実施例 1 と同様に PHA を抽出し、得られた PHA を秤量した。また、得られた PHA のモノマーユニット比を実施例 1 と同様に $^1\text{H-NMR}$ によって求めた。ポリマー乾燥重量 (PDW) 及びモノマーユニット比の結果を表 4 に示す。

30

【 0 0 8 6 】

< 比較例 4 >

実施例 4 で使用した TM109 株の代わりに、比較例 1 で使用した YN21 株、YN2 株、H45 株、P161 株、P91 株の各菌株をそれぞれ別々に用いた他は、実施例 4 と同様の方法で実験を行った。各菌株におけるポリマー乾燥重量 (PDW) 及びモノマーユニット比の結果を表 4 に示す。

【 0 0 8 7 】

40

【表 4】

表 4

	菌株	PDW (g/L)	モノマーユニ ット比(モル%)
			3HPxV
実施例 4	TM109	0.83	98.8
比較例 4	YN21	0.21	98.6
	YN2	0.22	99.1
	H45	0.10	97.6
	P161	0.15	98.3
	P91	0.02	95.2

10

【 0 0 8 8 】

PDW:ポリマー乾燥重量

3HPxV:3-ヒドロキシ-5-フェノキシ吉草酸ユニット

表 4 に示す実施例及び比較例の結果より、実施例 4 の PDW は比較例 4 のいずれの PDW より高かった。これより、本基質及び本培養条件において TM109 株は YN21 株、YN2 株、H45 株、P161 株、P91 株よりも PHA 生産性の高いことが示された。

20

【 0 0 8 9 】

< 実施例 5 >

実施例 2 と同様の組成の培地に基質である 5 - フェニル吉草酸を 6 mM 濃度となるように添加し、高温高圧殺菌して室温まで冷却した。次に塩酸を用いて培地の pH を 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0 に各々調製し、濾過滅菌をした後、各培地 50ml を滅菌した 500ml 容振とうフラスコに入れた。この振とうフラスコに本発明における新規微生物であるシュードモナス・スピーズ・KF767 株を接種し、30、125 ストローク/分で振盪培養した。62 時間後、菌体を遠心分離により回収し、実施例 1 と同様に PHA を抽出し、得られた PHA を秤量した。また、得られた PHA のモノマーユニット比を実施例 1 と同様に ¹H-NMR によって求めた。各培地におけるポリマー乾燥重量 (PDW) 及びモノマーユニット比の結果を表 5 に示す。

30

【 0 0 9 0 】

< 比較例 5 >

実施例 5 で実験に使用した KF767 株の代わりに、比較例 1 で使用した YN2 株を用いた他は、実施例 5 と同様の方法で実験を行った。各培地におけるポリマー乾燥重量 (PDW) 及びモノマーユニット比の結果を表 5 に示す。また、実施例 5 で実験に使用した各培地のうち、pH5.0 の培地のみを用い、さらに KF767 株の代わりに、比較例 1 で使用した YN21 株、H45 株、P161 株、P91 株の各菌株をそれぞれ別々に用いた他は、実施例 5 と同様の方法で実験を行った。各菌株におけるポリマー乾燥重量 (PDW) 及びモノマーユニット比の結果を表 5 に示す。

40

【 0 0 9 1 】

【表 5】

表 5

	菌株	pH	PDW (g/L)	モノマーユニ ット比(モル%)
				3HPV
実施例 5	KF767	5.0	0.77	94.5
		5.5	0.72	97.3
		6.0	0.69	98.4
		6.5	0.76	97.7
		7.0	0.74	96.2
比較例 5	YN2	5.0	0.29	92.2
		5.5	0.41	94.7
		6.0	0.49	96.4
		6.5	0.58	97.7
		7.0	0.78	98.5
	YN21	5.0	0.25	91.3
	H45	5.0	0	-
	P161	5.0	0.21	92.7
	P91	5.0	0.08	91.2

10

20

【 0 0 9 2 】

PDW:ポリマー乾燥重量

30

3HPV:3-ヒドロキシ-5-フェニル吉草酸ユニット

表 5 に示す実施例及び比較例の結果より、実施例 5 の pH 5.0, 5.5, 6.0, 6.5 における各 PDW は比較例 5 の pH 5.0, 5.5, 6.0, 6.5 のいずれの PDW より高く、かつ pH 5.0 ~ 7.0 で比較的一定であった。これより、本基質及び pH 5.0 ~ 6.5 の本培養条件において、KF767 株は YN21 株、YN2 株、H45 株、P161 株、P91 株よりも PHA 生産性が高く、酸性培地においても安定して PHA を生産できることが示された。

【 0 0 9 3 】

< 実施例 6 >

実施例 2 と同様の組成の培地に基質である 5 - フェニル吉草酸を 18 mM 濃度となるように添加し、高温高圧殺菌して室温まで冷却した。次に塩酸を用いて培地の pH を 8.5, 8.0, 7.5, 7.0 に各々調製し、濾過滅菌をした後、各培地 50ml を滅菌した 500ml 容振とうフラスコに入れた。この振とうフラスコに本発明における新規微生物であるシュードモナス・スピーズ・AG32 株または TM90 株を別々に接種し、30、125 ストローク/分で振盪培養した。40 時間後、菌体を遠心分離により回収し、実施例 1 と同様に PHA を抽出し、得られた PHA を秤量した。また、得られた PHA のモノマーユニット比を実施例 1 と同様に $^1\text{H-NMR}$ によって求めた。各菌株及び各培地におけるポリマー乾燥重量 (PDW) 及びモノマーユニット比の結果を表 6 に示す。

40

【 0 0 9 4 】

< 比較例 6 >

実施例 6 で使用した AG32 株及び TM90 株の代わりに、比較例 1 で使用した YN2 株を用い

50

た他は、実施例 6 と同様の方法で実験を行った。各培地におけるポリマー乾燥重量 (PDW) 及びモノマーユニット比の結果を表 6 に示す。また、実施例 5 で実験に使用した各培地のうち、pH8.0の培地のみを用い、さらにAG32株及びTM90株の代わりに、比較例 1 で使用した Y N 2 1 株、H 4 5 株、P 1 6 1 株、P 9 1 株の各菌株をそれぞれ別々に用いた他は、実施例 5 と同様の方法で実験を行った。各菌株におけるポリマー乾燥重量 (PDW) 及びモノマーユニット比の結果を表 6 に示す。

【 0 0 9 5 】

【 表 6 】

表 6

	菌株	pH	PDW (g/L)	モノマーユ ニット比(モル%)
				3HPV
実施例 6	AG32	8.5	0.21	92.5
		8.0	0.52	97.4
		7.5	0.58	98.2
		7.0	0.63	98.7
	TM90	8.5	0.15	93.2
		8.0	0.50	97.2
		7.5	0.66	98.7
		7.0	0.81	99.4
比較例 6	YN2	8.5	0	-
		8.0	0.01	90.5
		7.5	0.54	97.3
		7.0	0.78	98.7
	YN21	8.0	0.01	91.4
	H45	8.0	0	-
	P161	8.0	0.06	96.7
	P91	8.0	0.01	91.2

【 0 0 9 6 】

PDW:ポリマー乾燥重量

3HPV:3-ヒドロキシ-5-フェニル吉草酸ユニット

表 6 に示す実施例及び比較例の結果より、実施例 6 の pH8.5,8.0,7.5における各PDWは比較例 6 の pH8.5,8.0,7.5のいずれのPDWより高く、かつ pH8.5~7.0で比較的一定であった。これより、本基質及び8.5~7.5の本培養条件において、AG32株及びTM90株はYN21株、YN2株、H45株、P161株、P91株よりもPHA生産性が高く、塩基性培地においても安定してPHAを生産できることが示された。

【 0 0 9 7 】

< 実施例 7 >

実施例 2 と同様の組成の培地50mlを500ml容振とうフラスコに入れ、これにさらに実施例 2 と同様にAntiform PE-Mを0.5ml/Lの濃度で添加し、高温高圧殺菌した。

室温まで冷却後、これに基質としてアルカンであるアミルフェニルエーテルを6mMの濃

10

20

30

40

50

度となるように添加した。この振とうフラスコに本発明における新規微生物であるシュードモナス・スピーズ・YN21M株を接種し、30、125ストローク/分で振盪培養した。40時間後、菌体を遠心分離により回収し、実施例1と同様にPHAを抽出し、得られたPHAを秤量した。その結果、ポリマー乾燥重量(PDW)は0.20g/lであった。また、得られたPHAの構造決定を、実施例1と同様に¹H-NMRによって行ったところ、3-ヒドロキシ-5-フェノキシ吉草酸のモノマーユニット比は94.8モル%であった。以上より、YN21M株によりアミルフェニルエーテルから3-ヒドロキシ-5-フェノキシ吉草酸ユニットを有するPHAが合成されることが確認された。

【0098】

<実施例8>

リン酸水素二ナトリウム6.2g/L、リン酸二水素カリウム3g/L、塩化アンモニウム1.0g/L、塩化ナトリウム0.5g/L、微量成分溶液3ml/Lを含む無機培地に、ポリペプトン(日本製薬(株))1.0g/L、D-グルコース1.0g/Lの組成の培地50mlを500ml容振とうフラスコに入れ、これにさらに実施例2と同様にAntiform PE-Mを0.5ml/Lの濃度で添加し、高温高圧殺菌した。室温まで冷却後、これに基質としてアルカンであるn-アミルベンゼンを6mMの濃度となるように、また同じくアルカンである5-(4-ビニルフェニル)ペンタンを0.8mMの濃度となるように添加した。この振とうフラスコに本発明における新規微生物であるシュードモナス・スピーズ・YN21M株を接種し、30、125ストローク/分で振盪培養した。40時間後、菌体を遠心分離により回収し、実施例1と同様にPHAを抽出し、得られたPHAを秤量した。その結果、ポリマー乾燥重量(PDW)は0.72g/lであった。また、得られたPHAの構造決定を、実施例1と同様に¹H-NMRによって行ったところ、3-ヒドロキシ-5-フェニル吉草酸のモノマーユニット比は80.7モル%、3-ヒドロキシ-5-(4-ビニルフェニル)吉草酸のモノマーユニット比は15.3モル%であった。以上より、YN21M株によりn-アミルベンゼン及びビニルフェニルペンタンから3-ヒドロキシ-5-フェニル吉草酸ユニット及び3-ヒドロキシ-5-(4-ビニルフェニル)吉草酸ユニットからなるPHAが合成されることが確認された。

【0099】

<実施例9>

実施例2と同様の組成の培地50mlを500ml容振とうフラスコに入れ、これにさらに実施例2と同様にAntiform PE-Mを0.5ml/Lの濃度で添加し、高温高圧殺菌した。室温まで冷却後、これに基質としてアルカンであるn-アミルベンゼンを9mMの濃度となるように、また末端不飽和のアルカノエートである10-ウンデセン酸を2.25mMの濃度となるように添加した。この振とうフラスコに本発明における新規微生物であるシュードモナス・スピーズ・YN21M株を接種し、30、125ストローク/分で振盪培養した。40時間後、菌体を遠心分離により回収し、実施例1と同様にPHAを抽出し、得られたPHAを秤量した。その結果、ポリマー乾燥重量(PDW)は0.78g/lであった。また、得られたPHAの構造決定を、実施例1と同様に¹H-NMRによって行ったところ、3-ヒドロキシ-5-フェニル吉草酸のモノマーユニット比は56.7モル%、3-ヒドロキシ-5-(4-ビニルフェニル)吉草酸のモノマーユニット比は36.3モル%であった。以上より、YN21M株によりn-アミルベンゼン及び10-ウンデセン酸から3-ヒドロキシ-5-フェニル吉草酸ユニット及び3-ヒドロキシ-10-ウンデセン酸ユニットからなるPHAが合成されることが確認された。

【0100】

<実施例10>

実施例2と同様の組成の培地500mlを2L容振とうフラスコに入れ、基質としてアルカノエートである5-フェニル吉草酸を12mM、5-(4-ビニルフェニル)吉草酸を2.125mM濃度となるように添加し、高温高圧殺菌して室温まで冷却して培地を調製した。

また、同様に実施例2と同様の組成の培地5Lを耐圧瓶に入れ、基質としてアルカノエートである5-フェニル吉草酸を12mM、5-(4-ビニルフェニル)吉草酸を2.125mM濃度となるように添加し、高温高圧殺菌して室温まで冷却して培地を調製した。先の

10

20

30

40

50

振とうフラスコに本発明における新規微生物であるシュードモナス・スピーシズ・YN21M株を接種し、30、125ストローク/分で振盪培養した。8時間後、培養液を滅菌したケモスタット(エイブル(株)社製BMJ-01)に投入し、先の耐圧瓶中の培地を用いてマイクろチューブポンプにより連続培養を行った。このときの培養液量は500ml、流速は50ml/hr、曝気量は1L/min、攪拌速度は300rpm、温度は30とした。

64時間後、排出される培養液から50mlを採取し、菌体を遠心分離により回収し、実施例1と同様にPHAを抽出し、得られたPHAを秤量した。その結果、ポリマー乾燥重量(PDW)は0.89g/lであった。また、得られたPHAの構造決定を、実施例1と同様に¹H-NMRによって行ったところ、3-ヒドロキシ-5-フェニル吉草酸のモノマーユニット比は91.7モル%、3-ヒドロキシ-5-(4-ビニルフェニル)吉草酸のモノマーユニット比は7.3モル%であった。次に、曝気と攪拌及び温度制御を維持しながらケモスタットへの培地の流入を停止し、連続培養からバッチ培養に移行した。40時間後、培養槽から培養液50mlを採取し、菌体を遠心分離により回収し、実施例1と同様にPHAを抽出し、得られたPHAを秤量した。その結果、ポリマー乾燥重量(PDW)は2.11g/lであった。また、得られたPHAの構造決定を、実施例1と同様に¹H-NMRによって行ったところ、3-ヒドロキシ-5-フェニル吉草酸のモノマーユニット比は91.2モル%、3-ヒドロキシ-5-(4-ビニルフェニル)吉草酸のモノマーユニット比は7.5モル%であった。以上より、連続培養及び連続培養とバッチ培養を組み合わせた培養方法においても、YN21M株によりn-アミルベンゼン及び3-ヒドロキシ-5-(4-ビニルフェニル)吉草酸から3-ヒドロキシ-5-フェニル吉草酸ユニット及び3-ヒドロキシ-5-(4-ビニルフェニル)吉草酸ユニットからなるPHAが合成されることが確認された。

10

20

【配列表】

[2006204258000001.app](#)

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I テーマコード(参考)
C 1 2 R 1/38 (2006.01) C 1 2 N 1/20 A
C 1 2 R 1:38

(72)発明者 本間 務

東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤノン株式会社内

(72)発明者 矢野 哲哉

東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤノン株式会社内

Fターム(参考) 4B024 AA03 BA80 CA01 DA09 GA19

4B064 AD83 AE61 CA02 CB24 CC07 CD07 CD30 DA16

4B065 AA41 AC14 BB08 CA12