超高分子量ポリヒドロキシアルカン酸： 微生物生産とその物性

Ultrahigh-molecular-weight Polyhydroxyalkanoates: Microbial Production and Mechanical Properties

猪野 光太郎

住友林業株式会社
〒300-2646
茨城県つくば市緑ヶ原 3-2
テクノパーク豊里内

Kotaro INO
Sumitomo Forestry Co., LTD.
3-2 Midorigahara, Tsukuba-shi, Ibaraki
300-2646, Japan

佐藤 俊

国立研究開発法人産業技術総合研究所
機能化学研究部門
〒305-8565
茨城県つくば市東 1-1-1 中央 5-2

Shun SATO
Research Institute for Sustainable
Chemistry, National Institute of
Advanced Industrial Science and
Technology (AIST), Central
5-2, 1-1-1 Higashi, Tsukuba, Ibaraki
305-8565, Japan

論文要旨：気候変動や海洋プラスチック汚染などの問題から、再生可能なバイオマスから生産でき自然環境中で生分解されるバイオプラスチックへの注目が高まっている。ポリヒドロキシアルカン酸（PHA）は、一部の細菌や古細菌がエネルギー貯蔵物質として細胞内に蓄積する高分子であり、プラスチック材料として利用することができる。その中でも、特に重量平均分子量が300万を超える超高分子量PHAは力学物性に優れた材料に加工できることが知られている。本稿では、超高分子量PHAの微生物生産とその物性について概要を紹介する。

Abstract: Due to problems such as climate change and marine plastic pollution, biodegradable bioplastics have gained growing attention. Polyhydroxyalkanoates (PHAs) are intracellular storage polymers in some bacteria and archaea for energy and can be used as thermoplastics. Particularly, ultrahigh-molecular-weight PHAs, with weight average molecular weight of more than 3 million, have excellent mechanical properties. This review introduces outline of microbial production of ultrahigh molecular weight PHAs and mechanical properties.

Key words: bioplastics, biodegradable, polyhydroxyalkanoates, ultrahigh molecular weight, cold-drawn film

1 はじめに

気候変動や海洋プラスチック汚染などの問題から、再生可能なバイオマスから生産でき自然環境中で生分解される生分解性バイオマスプラスチックへの注目が高まっている。欧州バイオプラスチック協会によると、世界でのバイオマスプラスチックと生分解性プラスチックを合わせたバイオプラスチック製造能力は2019年には211万トンだったものが2024年には243万トンまで増加すると試算されており、今後より一層の発展が期待されて

いる¹⁾。特に、ポリヒドロキシアルカン酸（PHA）はバイオマスを原料に作られる生分解性プラスチックの一種で、世界でのPHAの生産量は2019年の2.5万トンから2024年には16万トンと6倍以上に増加すると見込まれている¹⁾。日本ではPHAの一種であるPHBHについて、株式会社カネカより年間0.5万トン規模で製造可能な工場の竣工がニュースリリースされている²⁾。

PHAとして最初に発見されたのは、1926年にフランスのLemoigne博士による*Bacillus megaterium*細胞内のポリ((R)-3-ヒドロキシブタン酸)（PHB, Fig. 1）である³⁾。その後の研究で、エネルギー貯蔵物質として微生物体内に蓄えられていること⁴⁻⁶⁾、熱可塑性をもつ

連絡者：猪野 光太郎
E-mail：INO_koutarou@star.sfc.co.jp

ラスチックであること⁷⁾が分かり、現在までにバイオマス由来の糖や植物油から様々な微生物がPHAを生産することが明らかにされている。使用後は土壌や海洋環境中で速やかに分解されることから生分解性バイオマスプラスチックとして注目されている。

PHBは、融点とガラス転移点がそれぞれ約180℃、約4℃の結晶性ポリマーである⁸⁾。剛直であるが、結晶化が遅くガラス転移点が室温より低いため、室温で放置すると2次結晶化を起こして脆化してしまうという課題があった。この課題を解決するために、共重合体化、高分子量化がこれまで検討されてきた。

共重合体化は、PHBの構成単位である3-ヒドロキシブタン酸(C4)に、側鎖長の長い第2成分を導入して柔軟性を付与する方法である。導入する第2成分としては、3-ヒドロキシバレリル酸(C5, 3HV)、3-ヒドロキ

シヘキサン酸(C6, 3HH)などが挙げられる(Fig. 1)。第2成分として3HVが導入されたものはポリ(3-ヒドロキシブタン酸-co-3-ヒドロキシバレリル酸, PHBV)、第2成分として3HHが導入されたものはポリ(3-ヒドロキシブタン酸-co-3-ヒドロキシヘキサン酸, PHBH)と呼ばれる。Table 1に各種PHAの熱物性と機械物性を示した。側鎖長が長くなるほど、第2成分分率が高くなるほど、融点は低下し物性は柔軟になる。一方で、高分子量化は、PHAの分子鎖の絡まり合いが増えるため引張強度や曲げ強度などの力学物性を向上させる。微生物種、培養条件を変えることにより第2成分の種類とモル分率、分子量を多様に変化させることができるため、これまで多くの研究がなされてきた。

住友林業は、【街を森に変える環境木化都市の実現】を研究開発の基本方針として掲げ、高層建築物の木造化・

Fig. 1 主なPHAの化学構造

Table 1 PHAの熱物性と機械物性

	第2成分分率 (mol%)	融点 T_m (°C)	ガラス転移点 T_g (°C)	引張強度 (MPa)	ヤング率 (GPa)	破壊伸び (%)	文献
PHB	0	180	4	40	3.5	5	【8】
PHBV	9 (3HV)	162	—	37	1.9	—	【9】
PHBV	20 (3HV)	145	—1	32	1.2	—	【9】
PHBH	5 (3HH)	151	0	—	—	—	【9】
PHBH	15 (3HH)	115	0	23	—	760	【10】

—：記載なし

木質化、環境配慮技術、樹木の開発に全社一丸となって取り組んでいる。環境木化都市の実現に向け、必要な部材の木質化を推進するべく木材等のバイオマス原料から化成品を生産する技術の開発を行う中で、ポリヒドロキシアルカン酸の生産・利用技術開発を進めている。本稿では、住友林業が工業生産を目指す超高分子量 PHBV を含めた超高分子量 PHA に焦点を当て、その生産と物性について概要を紹介する。

2 超高分子量 PHA とその生産

2・1 超高分子量 PHA

通常の PHA は重量平均分子量 (M_w) が $0.1 \times 10^6 \sim 2.0 \times 10^6$ 程度であるが、特に M_w が 300 万を超えるものは超高分子量 PHA と呼ばれ¹¹⁾、通常の PHA よりも優れた物性を示すことが知られている。PHA は、細胞内から PHA を抽出する過程や熱による成形加工中に分子量が低下してしまうことがある。通常の PHA の場合、この分子量低下により十分な材料物性が得られなくなってしまうことがあるが、超高分子量 PHA の場合は分子量低下したあとでもなお高い分子量を維持するという特長がある。なお、ここで PHA の分子量は多角度光散乱法 (MALS) を利用した絶対分子量 M_w (MALS) を指しているが、PHA の分子量としてより簡便な方法で測定で

きるサイズ排除クロマトグラフィー (SEC) で算出した相対分子量 M_w (SEC) が用いられることがある。また、MALS と SEC で算出される数値の関係は、

$$M_w \text{ (MALS)} = 0.7 \times M_w \text{ (SEC)}$$

で表される¹¹⁾。特に記載のない限り、本稿においては、分子量として SEC で算出した相対分子量 M_w (SEC) を用いるものとする。

2・2 超高分子量 PHA の微生物による生産

通常の PHA 生産では、上述の通り M_w は $0.1 \times 10^6 \sim 2.0 \times 10^6$ 程度となるが、遺伝子組換え株や一部の野生株では培養条件によっては超高分子量体を生産することが報告されている。Table 2 にこれまでの高分子量 PHA の生産に関する報告をまとめた。

大腸菌に PHA 生合成遺伝子を導入することで超高分子量 PHB が生産できることが知られている。Kusaka らは、PHB 合成菌として知られる *Cupriavidus necator* H16 から単離した PHB 生合成遺伝子 (*phbCAB*) を導入した組換え大腸菌 *Escherichia coli* XL1-Blue (pSYL105) を、炭素源としてグルコースを用いて培養すると、 M_w が 1,000 万を超える超高分子量 PHB を生産することを報告している¹²⁾。Kahar らは、同様に組換え大腸菌 *E. coli* を用いてジャーファーメンター培養を行うと、グル

Table 2 高分子量 PHA の生産に関する報告例

菌株	培養槽	PHA	第2成分分率 (mol%)	培養時間 (h)	乾燥菌体重量 (g/L)	PHA 生産量 (g/L)	PHA 含率 (%)	M_w ($\times 10^6$)	M_w/M_n	文献
recombinant <i>E. coli</i>	ジャー	PHB	0	12	8	4	(50)	20	—	【12】
recombinant <i>E. coli</i>	ジャー	PHB	0	54	190 ± 11	(146.3 ± 10.2)	77 ± 3	4.8 ± 0.1	1.5	【13】
recombinant <i>E. coli</i>	フラスコ	PHB	0	72	9.3 ± 0.1	(3.8 ± 0.14)	41 ± 1.4	5.0	2.2	【14】
<i>Methylocystis</i> sp.	ジャー	PHB	0	24	—	—	33.6	3.1	—	【15】
<i>Azobactor Vineleandii</i> (Phb Z1 mutant strain)	ジャー	PHB	0	36	(4.7)	4.2 ± 0.4	89 ± 4.6	9.4	—	【16】
<i>Haloferax mediterranei</i>	フラスコ	PHBV	20.6	213	5.5	1.2	20.7	3.4	2.5	【17】
<i>H. mediterranei</i>	フラスコ	PHBV	12 ± 0.6	72	4.2 ± 0.6	1.8 ± 0.3	43.7 ± 4.2	4.7 ± 0.2	1.7	【18】
<i>H. mediterranei</i>	ジャー	PHBV	6	146	7.7	4.0	51.7	5.0	1.5	【18】
<i>Cupriavidus necator</i>	フラスコ	PHBH	16.8 ± 0.1	72	2.8 ± 0	(2.3 ± 0.1)	82 ± 3	3.59	5.2	【19】
<i>Cupriavidus necator</i>	フラスコ	PHBH	3.5 ± 0.23	96	17.1 ± 1.7	12.8 ± 1.7	74.7 ± 3.3	2.9 ± 0.23	—	【20】

() 内の値は、文献内のデータから算出したもの

— : 記載なし

コースから培養時間 54 h で 146.3 g/L の超高分子量 PHB ($M_w = 4.8 \times 10^6$) を生産できることを明らかにした¹³⁾。一方, Hiroe らは, 大腸菌に *C. necator* H16 の PHA 生合成遺伝子 (*phaA*, *phaB*, *phaC*) のオペロン構成を検討し, *phaB*-*phaC*-*phaA* の順序が PHA の分子量と生産量のバランスに優れている構成であることを見出した¹⁴⁾。このとき, 72 h のフラスコ培養で $M_w = 5.0 \times 10^6$ の PHB が 3.8 g/L 生産されたと報告されている。

大腸菌以外の高分子量 PHB 生産の報告例では, 例えばメタン資化性細菌を含む混合培養の系 (dominant species *Methylocystis* sp. GB 25) がカリウム欠乏条件下で $M_w = 3.1 \times 10^6$ の PHB を生産した¹⁵⁾。また, 窒素固定菌 *Azotobacter vinelandii* の野性株は微好気培養により $M_w = 8.1 \times 10^6$ の PHB を生産することが報告されている。さらに, PHB 分解酵素遺伝子を欠損した窒素固定菌 (*Azotobacter vinelandii* Phb Z1 mutant strain) は野生株よりも分子量が高い ($M_w = 9.4 \times 10^6$) PHB を生産したと報告されている¹⁶⁾。*Azotobacter vinelandii* は野生株では数少ない超高分子量 PHB 生産菌である。

高分子量 PHA のうち, 共重合体の生産に関する報告もある。高分子量 PHBH について, Tsuge らは *Aeromonas caviae* の PHA 重合酵素変異体を導入した遺伝子組換え *C. necator* を用いることで $M_w = 3.59 \times 10^6$ の PHBH を生産することを明らかにしている¹⁹⁾。また, Arikawa らは, *C. necator* の PHA 分解遺伝子を欠損させることで $M_w = 3.1 \times 10^6$ の PHBH を生産することを示している²⁰⁾。

2・3 高度好塩菌の生産する超高分子量 PHBV

高度好塩菌は古細菌の一種で, 10%以上の塩存在下で生育する極限環境微生物である。これまで PHBV を生産することが知られていたが, 最近になって培養条件によっては超高分子量 PHBV を生産することが明らかになってきた。

Ferre-Guell らは, 炭素源として酪酸と吉草酸の比率を変えると 3HV 分率を制御しながら超高分子量 PHBV

を生産可能であることを明らかにした¹⁷⁾。特に 3HV 分率が 20.6 mol %, $M_w = 3.4 \times 10^6$ の PHBV が 213 時間の培養で 1.2 g/L 生産可能であることが報告されている。

一方で, 筆者らは, *H. mediterranei* に炭素源としてグルコースを与えると超高分子量 PHBV を効率的に生産することを明らかにした¹⁸⁾。フラスコで 72 h の培養を行うと, $M_w = 4.7 \times 10^6$, 第 2 成分分率は 12 mol % の PHBV が生産された。*C. necator* を用いて PHB を生産した場合には, $M_w = 1.6 \times 10^6$ であったことから, *H. mediterranei* はグルコースを炭素源として栄養源や培養条件を適切に設定することで超高分子量 PHBV を生産することが分かった。また, *H. mediterranei* のジャーファーメンターでの培養を検討すると, 146 h で 4.0 g/L の超高分子量 PHBV ($M_w = 5.0 \times 10^6$, 6 mol % 3HV) を生産した。

上記の通り, 有機酸やグルコースを用いると *H. mediterranei* は超高分子量 PHBV を安定的に生産可能である。一方で, *H. mediterranei* を用いて PHBV を生産するには培養液に大量の無機塩類が必要である (総塩濃度として 150~300 g/L 程度)。工業的に生産を行うことを考えると, 培養に必要な金属塩類を大量に購入して用いる方法は現実的ではない。この工業生産における培地の問題を解決できる手段として, 無機塩類を多量に含む濃縮した海水を培地として用いることが, コストや環境問題の観点から非常に有力であると考えられる。

3 超高分子量 PHA の物性

3・1 超高分子量 PHB

Table 3 は, 超高分子量 PHA と通常の PHA の冷延伸フィルム の物性に関する過去の報告をまとめたものである。PHA は, 延伸処理によって物性が向上することが知られている。PHA の延伸処理としてはガラス転移点以下の温度で行う冷延伸, 融点付近で行う熱延伸があるが, 本総説では様々な分子量と構造の PHA で多くの報

Table 3 PHA の冷延伸フィルムの各種物性

	第 2 成分分率 (mol %)	M_w ($\times 10^6$)	延伸倍率		引張強度 (MPa)	ヤング率 (GPa)	破壊伸び (%)	文献
			1st	2nd				
超高分子量 PHB	0	3.3 (MALS)	10	—	237	1.5	112	[21]
超高分子量 PHB	0	3.3 (MALS)	10	1.5	287	1.8	53	[21]
超高分子量 PHBV	7 (3HV)	4.4	10	—	258.7 ± 26.0	0.90 ± 0.02	49.4 ± 4.7	[18]
超高分子量 PHBH	3.2 (3HH)	4.0	8.0	1.6	208 ± 26	3.45 ± 0.30	42 ± 1	[22]
PHB	0	0.41	10	—	195	1.97	99	[23]
PHBV	8 (3HV)	1.0	10	—	117	0.5	109	[23]
PHBH	5 (3HH)	0.82	4	2.5	140	1.5	116	[23]

— : 適用なし

告がある冷延伸法で作成したフィルムの物性についてまとめた。冷延伸フィルムはIwataらが開発した方法²¹⁾をもとに以下の通りに作成できる。PHAの溶剤キャストフィルムを融点以上の温度で溶融し、その後ガラス転移点以下の温度に急冷する。本総説で紹介するPHAはガラス転移点が0℃付近なので、氷水中などで0℃にまで冷却する。急冷したフィルムは非晶であり、非晶状態のまま氷水中で延伸することで配向させる。その後ガラス転移点より高い温度で熱処理して結晶化させて冷延伸フィルムを得る。ガラス転移点より高い温度で延伸した場合、延伸中に結晶化が進み、うまく分子鎖を配向しながら結晶化できないという課題があった。しかし、冷延伸は配向と結晶化のステップを分離することで高い力学強度を有する配向結晶化フィルムを得ることができる。

通常のPHBフィルムの引張強度、破壊伸びはTable 1に示した通りそれぞれ40 MPa、5%であるが、10倍冷延伸フィルムでは195 MPa、99%と引張強度は約5倍に、破壊伸びは約20倍に向上している²³⁾。一方、超高分子量体を用いた場合、同様に10倍冷延伸した場合に超高分子量PHBでは引張強度が277 MPa、破断伸びは84%と通常のPHBに比べて破断伸びが高い値を維持したまま引張強度をさらに上昇させることができる²¹⁾。

超高分子量PHBに10倍冷延伸を行った後室温で一定時間放置し、さらに1.5倍に冷延伸して(計15倍の延伸倍率)熱処理を行った場合、引張強度は287 MPaまで上昇することが報告されている²¹⁾。超高分子量体は、同じ延伸倍率でも優れた力学物性を示す上に、より高い延伸倍率まで延伸可能なため、通常のPHBと比べて非常に優れた物性を発現する。なお、延伸処理を施したPHBでは二次結晶化が進み物性の劣化を引き起こすという課題があったが、延伸処理を施していないPHBでは通常の分子量のPHB、超高分子量体ともに4か月間室温に放置しても経時劣化が起こらないことも報告されており²¹⁾、延伸処理は物性の改善だけでなく耐久性の向上にも資する技術であるといえる。

3・2 超高分子量PHBVおよびPHBH

通常のPHBと同様に、通常のPHBV、通常のPHBHでも10倍冷延伸により分子鎖を配向させてから結晶化させることで100 MPaを超える引張強度を達成することが分かっている²³⁾。さらに、超高分子量PHBHについて8倍冷延伸を行った後室温で一定時間放置し、さらに1.6倍に冷延伸して(計12.8倍の延伸倍率)熱処理を行った場合、引張強度は208 MPaまで上昇することが報告されている²²⁾。

ここでは、筆者らが実施した超高分子量PHBVの冷

Fig. 2 超高分子量PHBVの冷延伸工程

Fig. 3 超高分子量PHBVの10倍冷延伸フィルム

延伸フィルムの作製とその物性について紹介する¹⁸⁾。冷延伸サンプルとしては、 $M_w = 4.4 \times 10^6$ 、3HV分率が7 mol%のPHBVを用いた。なお、 $T_m = 152.0^\circ\text{C}$ 、 $T_g = 1.7^\circ\text{C}$ であった。

乾燥した溶剤キャストフィルムを10×30 mmの小片に切断し、試験片を融点より高い170℃または200℃で30秒間溶融し、氷冷中で急冷した。このように生成した非晶フィルムを、手廻し延伸機を使用して氷冷水中で10倍に延伸し(Fig. 2)、結晶化を促進するために100℃のオーブンで2時間熱処理を行った。その後、室温で3日以上放置し、引張試験に供した。作成したフィルムはFig. 3に示した。170℃で溶融した際には、引張強度は258.7 MPaまで上昇し、延伸前の超高分子量PHBVキャストフィルム(29.9 MPa)の約8.7倍となった。さらに、このサンプルは、0.90 GPaのヤング率と49.4%の破断伸びを示した。冷延伸した超高分子量PHBVフィルムの引張強度は、同じ延伸倍率で作成した冷延伸超高分子量PHBフィルム(237 MPa)の引張強度と同等であった。

通常の PHBV では、同様に延伸処理を行うと引張強度は 117 MPa、ヤング率は 0.5 GPa、破壊伸びは 109% であることが報告されていることから、超高分子量 PHBV は通常の PHBV と比べて引張強度が高い値を示す材料であることが分かる。

一方で、超高分子量 PHBV フィルムを 200℃ で溶融して作成したフィルムでは、上述の 170℃ で溶融した PHBV フィルムよりも引張強度が低く (122.3 MPa)、破断伸びは 38.1% と物性が劣っていた¹⁸⁾。これは、200℃ で溶融した際に PHBV が熱分解されて分子量が低下したからであると考えられる。実際、本実験で用いられた PHBV フィルムの M_w は、熱処理前は 4.4×10^6 であったが、200℃ で溶融して作成したフィルムでは 0.91×10^6 、170℃ で溶融したサンプルでは 1.8×10^6 であり、200℃ で溶融したサンプルの分子量が大きく減少した。これらの結果は、PHBV の分子量が冷延伸 PHBV フィルムの機械的特性に大きく影響を与えることを意味している。

以上から、超高分子量 PHA を用いると、成形加工後にも一定以上の分子量を維持することで高い力学物性を発現する PHA が作製できることが分かった。

4 おわりに

本総説では、超高分子量 PHA に焦点を当て、その生産例と物性を概説した。また、筆者らが検討した高度好塩菌 *H. mediterranei* による PHA の生産とその冷延伸フィルムの物性について詳細に紹介した。超高分子量 PHA の報告例は少ないが、その物性については通常の PHA よりも優れた性質が明らかになり始めている。住友林業では高度好塩菌 *H. mediterranei* による効率的な PHA 生産技術や大量生産技術を開発・確立し、超高分子量 PHBV を上市できるような技術開発を進めていく。

文 献

- 1) 欧州バイオプラスチック協会, “Bioplastic Market Development Update 2019”, https://www.european-bioplastics.org/wp-content/uploads/2019/11/Report_Bioplastics-Market-Data_2019_short_version.pdf (European Bioplastics)
- 2) 株式会社カネカ, 2019 年 12 月 19 日ニュースリリース, <https://www.kaneka.co.jp/topics/news/nr20191219/> (Kaneka Corporation, December 19, 2019)
- 3) Lemoigne, M. *Bull. Soc. Chem. Bio.* **8**, 770-782 (1926).
- 4) Williamson, D.H.; Wilkinson, J.F. The isolation and estimation of the poly- β -hydroxybutyrate inclusions of *Bacillus* species. *J. Gen. Microbiol.* **19**, 198-209 (1958).
- 5) Macrae, R.M.; Wilkinson, J.R. Poly- β -hydroxybutyrate metabolism in washed suspensions of *Bacillus cereus* and *Bacillus megaterium*. *J. Gen. Microbiol.* **19**, 210-222 (1958).
- 6) Doudoroff, M.; Stanier, R.Y. Role of poly- β -hydroxybutyric acid in the assimilation of organic carbon by bacteria. *Nature* **183**, 1440-1442 (1959).
- 7) Baptist, J.N. *US Patent* 3,044,942 (1962).
- 8) Sudesh, K.; Abe, H.; Doi, Y. Synthesis, structure, and properties of polyhydroxyalkanoates: Biological polyesters. *Prog. Polym. Sci.* **25**, 1503-1555 (2000).
- 9) Anjum, A.; Zuber, M.; Zia, K.M.; Noreen, A.; Anjum, M.N.; Tabasum, S. Microbial production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) and its copolymers: A review of recent advancements. *Int. J. Biol. Macromol.* **89**, 161-174 (2016).
- 10) 佐藤俊輔, 有川尚志, 小林新吾, 藤本哲也, 松本圭司. 微生物による生分解性ポリマー PHBH 製造法の開発. 生物工学会誌 **97** (2), 66-74 (2019). (Sato, S. *et al. Seibutsu-kogaku Kaishi* **97**, 66-74 (2019))
- 11) Kusaka, S.; Iwata, T.; Doi, Y. Microbial synthesis and physical properties of ultra-high-molecular-weight poly [(R)-3-hydroxybutyrate]. *J. Macromol. Sci. Pure Appl. Chem. A* **35**, 319-335 (1998).
- 12) Kusaka, S.; Abe, H.; Lee, S.Y.; Doi, Y. Molecular mass of poly [(R)-3-hydroxybutyric acid] produced in a recombinant *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **47**, 140-143 (1997).
- 13) Kahar, P.; Agus, J.; Kikkawa, Y.; Taguchi, K.; Doi, Y.; Tsuge, T. Effective production and kinetic characterization of ultra-high-molecular-weight poly [(R)-3-hydroxybutyrate] in recombinant *Escherichia coli*. *Polym. Degrad. Stab.* **87**, 161-169 (2005).
- 14) Hiore, A.; Tsuge, K.; Nomura, C. T.; Itaya, M.; Tsuge, T. Rearrangement of gene order in the phaCAB operon leads to effective production of ultrahigh-molecular-weight poly [(R)-3-hydroxybutyrate] in genetically engineered *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**, 3177-3184 (2011).
- 15) Helm, J.; Wendlandt, K.-D.; Jechorek, M.; Stottmeister, U. Potassium deficiency results in accumulation of ultra-high-molecular weight poly- β -hydroxybutyrate in amethane-utilizing mixed culture. *J. Appl. Microbiol.* **105**, 1054-1061 (2008).
- 16) Elsa, G.-H.; Holjes, S.-L.; Daniel, S.; Andrés, G.; Alvaro, D.-B.; Carlos, P. Production of poly-3-hydroxybutyrate (P3HB) with ultra-high molecular weight (UHMW) by mutant strains of *Azotobacter vinelandii* under microaerophilic conditions. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **193**, 79-95 (2021).
- 17) Ferre-Guell, A.; Winterburn, J. Biosynthesis and characterization of polyhydroxyalkanoates with controlled composition and microstructure. *Biomacromolecules* **19**, 996-1005 (2018).
- 18) Ino, K.; Sato, S.; Ushimaru, K.; Saika, A.; Fukuoka, T.; Ohshiman, K.; Morita, T. Mechanical properties of cold-drawn films of ultrahigh-molecular-weight poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) produced

- by *Haloferax mediterranei*. *Polym. J.* **52**, 1299-1306 (2020).
- 19) Tsuge, T.; Watanabe, S.; Shimada, D.; Abe, H.; Doi, Y.; Taguchi, S. Combination of N149S and D171G mutations in *Aeromonas caviae* polyhydroxyalkanoate synthase and impact on polyhydroxyalkanoate biosynthesis. *FEMS Microbiol. Lett.* **277**, 216-222 (2007).
- 20) Arikawa, H.; Sato, S.; Fujiki, T.; Matsumoto, K. A study on the relation between poly (3-hydroxybutyrate) depolymerases of oligomer hydrolases and molecular weight of polyhydroxyalkanoates accumulating in *Cupriavidus necator* H16. *J. Biotechnol.* **227**, 94-102 (2016).
- 21) 岩田忠久. 微生物産生脂肪族ポリエステルの高性能化, 高次構造および生分解性. 高分子論文集 **60**, 377-390 (2003). (Iwata, T. *KOBUNSHI RONBUNSHU* **60**, 377-390 (2003))
- 22) Kabe, T.; Sugiura, T.; Hikima, T.; Takata, M.; Iwata, T. Effect of molecular weight on physical and crystallization properties of UHMW-poly [(R)-3-hydroxybutyrate-co-(R)-3-hydroxyhexanoate]. *J. Fiber Sci. Technol.* **74**, 30-39 (2018).
- 23) Iwata, T.; Doi, Y. Mechanical properties of uniaxially cold-drawn films of poly [(R)-3-hydroxybutyrate] and its copolymers. *Macromol. Symp.* **224**, 11-19 (2005).