

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5365004号
(P5365004)

(45) 発行日 平成25年12月11日 (2013.12.11)

(24) 登録日 平成25年9月20日 (2013.9.20)

(51) Int. Cl. F 1
C O 7 C 209/86 (2006.01) C O 7 C 209/86
C O 7 C 211/09 (2006.01) C O 7 C 211/09
C O 7 C 209/68 (2006.01) C O 7 C 209/68
C O 7 C 209/84 (2006.01) C O 7 C 209/84
C O 7 C 55/14 (2006.01) C O 7 C 55/14

請求項の数 3 (全 21 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2008-4759 (P2008-4759)
 (22) 出願日 平成20年1月11日 (2008.1.11)
 (65) 公開番号 特開2008-189661 (P2008-189661A)
 (43) 公開日 平成20年8月21日 (2008.8.21)
 審査請求日 平成22年8月30日 (2010.8.30)
 (31) 優先権主張番号 特願2007-3650 (P2007-3650)
 (32) 優先日 平成19年1月11日 (2007.1.11)
 (33) 優先権主張国 日本国 (JP)

(73) 特許権者 000005968
 三菱化学株式会社
 東京都千代田区丸の内一丁目1番1号
 (74) 代理人 100118201
 弁理士 千田 武
 (74) 代理人 100104880
 弁理士 古部 次郎
 (72) 発明者 人見 達也
 福岡県北九州市八幡西区黒崎城石1番1号
 三菱化学株式会社内
 (72) 発明者 山本 正規
 福岡県北九州市八幡西区黒崎城石1番1号
 三菱化学株式会社内

審査官 斉藤 貴子

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 カダベリン塩水溶液の製造方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

分子量12,000以上の高分子不純物を限外濾過膜(UF膜)処理により除去するカダベリン塩水溶液の製造方法であって、

カダベリンが、リジン脱炭酸酵素、リジン脱炭酸酵素活性の向上した組み換え微生物又はリジン脱炭酸酵素を産生する細胞もしくは当該細胞の処理物を使用して、当該リジンから産出されたものであることを特徴とするカダベリン塩水溶液の製造方法。

【請求項2】

さらに、分子量5,000以上の高分子不純物を除去することを特徴とする請求項1に記載のカダベリン塩水溶液の製造方法。

【請求項3】

カダベリン塩が、ジカルボン酸塩であることを特徴とする請求項1または2に記載のカダベリン塩水溶液の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、カダベリン塩水溶液の製造方法等に関し、より詳しくは、高分子不純物が除去されるカダベリン塩水溶液の製造方法等に関する。

【背景技術】

【0002】

プラスチック原料として、その殆どにいわゆる化石原料が用いられている。再生利用する場合を除き、プラスチックを廃棄する場合、燃焼等による廃棄は炭酸ガスの放出を招くことから近年問題となりつつある。そこで、地球温暖化防止及び循環型社会の形成に向けて、プラスチックの製造原料をバイオマス由来の原料に置き換えることが囑望されている。このようなニーズは、フィルム、自動車部品、電気・電子部品、機械部品等の射出成形品、繊維、モノフィラメント等、多岐にわたる。

【 0 0 0 3 】

ところで、ポリアミド樹脂は、機械的強度、耐熱性、耐薬品性等に優れており、いわゆるエンジニアリングプラスチックの1つとして多くの分野で用いられている。中でもフィルムは、二軸延伸ポリプロピレンフィルムや二軸延伸ポリエステルフィルム等に比べ、優れた機械的特性、耐熱性、透明性、ガスバリア性等の特徴を有しており、食品、医薬品、雑貨等の包装用フィルムとして広く利用されている。

10

【 0 0 0 4 】

ポリアミド樹脂のフィルムは強度やガスバリア性を付与するため、二軸延伸等の延伸処理を施して使用される場合が多い。この際、フィッシュアイと称される粒状欠陥があると、それを起点に延伸破断を起こし生産性を損なうだけでなく、フィルムの外観を悪化させ商品価値を著しく損なう。このため、フィッシュアイを極力低減することが求められている。

また、ポリアミド樹脂はその優れた性能を生かし、繊維やモノフィラメントの分野でも広く用いられている。これらの用途でも、上述のフィルム同様、フィッシュアイは成形時の延伸破断や表面外観の悪化を招くため、その低減が求められている。

20

【 0 0 0 5 】

一方、ポリアミド樹脂からなる射出成形品には、自動車部品、電気・電子部品、機械部品等が挙げられる。いずれの場合も、部品のコンパクト化や軽量化を目的に薄肉化が望まれている。この場合、ポリアミド樹脂本来の物性を維持するため分子量（数平均分子量）を下げることなく、高い流動性を有するポリアミド樹脂が必要となる。

【 0 0 0 6 】

バイオマス由来の原料を使用して製造されるポリアミド樹脂としては、カダベリンを原料とするものが知られている。例えば、特許文献1、特許文献2にはその原料であるカダベリン・ジカルボン酸塩の製造方法、精製方法が提案されている。

30

【 0 0 0 7 】

【特許文献1】特開2004-208646号公報

【特許文献2】特開2005-006650号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【 0 0 0 8 】

ところが、前記特許文献には、ポリアミド樹脂フィルムのフィッシュアイ（F/E）や射出成形時の流動性と、ポリアミド樹脂に含まれる高分子不純物との関連性については何ら言及されていない。

【 0 0 0 9 】

40

本発明は、上述したバイオマス由来の原料から得られたポリアミド樹脂における課題を解決するためになされたものである。

即ち、本発明の目的は、高分子不純物が除去されたカダベリン塩水溶液の製造方法を提供することにある。

本発明の目的は、高分子不純物が減少したカダベリン塩水溶液を提供することにある。

本発明の目的は、カダベリン塩水溶液から得られるカダベリン塩を提供することにある。

。

本発明の目的は、バイオマス由来の原料から得られたポリアミド樹脂を提供することにある。

本発明の目的は、斯かるポリアミド樹脂から得られる成形品を提供することにある。

50

【課題を解決するための手段】**【0010】**

上記課題を解決するために、本発明者らは鋭意検討を行った結果、バイオマス由来の原料から得られたカダベリン塩水溶液から高分子不純物を除去しポリアミド樹脂を製造すると、著しくフィッシュアイが少なく表面外観に優れたポリアミド樹脂フィルムを得ることが可能であり、且つ、著しく射出成形時の流動性が優れることを見出し、斯かる知見に基づき本発明を完成した。

【0011】

かくして本発明によれば、分子量12,000以上の高分子不純物を除去することを特徴とするカダベリン塩水溶液の製造方法が提供される。

10

ここで、本発明が適用されるカダベリン塩水溶液の製造方法において、さらに分子量5,000以上の高分子不純物を除去することが好ましい。

また、斯かる高分子不純物は、膜処理による除去を行うことが好ましい。

また、斯かる膜処理としては、限外濾過膜（UF膜）処理を行うことが好ましい。

ここで、本発明が適用されるカダベリン塩水溶液の製造方法において、カダベリンが、リジン脱炭酸酵素、リジン脱炭酸酵素活性の向上した組み換え微生物又はリジン脱炭酸酵素を産生する細胞もしくはこの細胞の処理物を使用して、リジンから産出されたものであることが好ましい。

また、カダベリン塩が、ジカルボン酸塩であることが好ましい。

20

【0012】

次に、本発明によれば、上述したカダベリン塩水溶液の製造方法に記載の製造方法で得られたことを特徴とするカダベリン塩水溶液が提供される。

【0013】

本発明によれば、上述したカダベリン塩水溶液を晶析することにより製造したことを特徴とするカダベリン塩が提供される。

【0014】

本発明によれば、斯かるカダベリン塩水溶液を原料とする重縮合反応により得られたことを特徴とするポリアミド樹脂が提供される。

【0015】

30

本発明によれば、上述したカダベリン塩の重縮合反応により、又はカダベリン塩と他の共重合成分との重縮合反応により得られることを特徴とするポリアミド樹脂が提供される。

【0016】

さらに、本発明によれば、所定の成形方法により、斯かるポリアミド樹脂を成形してなることを特徴とする成形品が提供される。

ここで、成形品としては、フィルム、射出成形品、繊維、モノフィラメントが好ましい。

【発明の効果】**【0017】**

40

本発明によれば、高分子不純物が除去されるカダベリン塩水溶液が得られる。

【発明を実施するための最良の形態】**【0018】**

以下、本発明を実施するための最良の形態（実施の形態）について詳細に説明する。尚、以下に記載する説明は、本発明の実施の形態の代表例であり、これらの内容に本発明は限定されるものではない。

【0019】**（カダベリン）**

本実施の形態におけるカダベリンは、例えば、リジン溶液に、同溶液のpHが酵素的脱炭酸反応に適したpHに維持されるように酸を加えながら、リジンの酵素的脱炭酸反応を

50

行うことにより、製造することができる。

ここで用いる酸としては、塩酸、硫酸、リン酸等の無機酸や、酢酸等の有機酸が挙げられる。得られた反応生成液から、通常分離精製方法を用いて遊離カダベリンを採取することができる。

更には、上記酸としてジカルボン酸を用いて、直接ポリアミドの製造原料となるカダベリン・ジカルボン酸塩を採取することも可能である。

【 0 0 2 0 】

(カダベリン・アジピン酸塩の製造方法)

以下に、酸としてアジピン酸を用いて、リジンの酵素的脱炭酸反応により、カダベリン・アジピン酸塩を製造する方法について詳細に説明する。

10

原料として用いるリジンは、通常、遊離塩基（リジンベース。即ち、遊離リジン。）であることが好ましいが、リジンのアジピン酸塩であってもよい。リジンは、酵素的脱炭酸反応によりカダベリンを生成するものであれば、L - リジン、D - リジンのいずれであってもよいが、通常は入手のしやすさから L - リジンが好ましい。

また、リジンは、精製されたリジンであってもよく、酵素的脱炭酸反応により生成するカダベリンがアジピン酸と塩を形成することが可能であれば、リジンを含む発酵液であってもよい。

【 0 0 2 1 】

リジン溶液を調製する溶媒としては、好適には水が用いられる。反応液の pH は、アジピン酸によって調整するため、他の pH 調整剤や緩衝剤を用いる必要はないが、前記溶媒として緩衝液を用いてもよい。

20

このような緩衝液としては、酢酸ナトリウム緩衝液等が挙げられる。但し、カダベリンとアジピン酸との塩を形成させるという点からは、緩衝剤等は用いないか、用いる場合であっても低濃度に抑えることが好ましい。

【 0 0 2 2 】

リジンとして遊離リジンを用いる場合は、リジン溶液にアジピン酸を加えて酵素的脱炭酸反応に適した pH となるように調整する。具体的には、pH としては、通常 4 . 0 以上、好ましくは 5 . 0 以上、より好ましくは 5 . 5 以上で、通常 8 . 0 以下、好ましくは 7 . 0 以下、より好ましくは 6 . 5 以下が挙げられる。

尚、リジンとして、リジンのアジピン酸塩を用いる場合は、反応液調製時にアジピン酸を加える必要はない。以下、このように、反応液の pH を酵素的脱炭酸反応に適した pH に調整することを、「中和」と称す場合がある。

30

【 0 0 2 3 】

リジンの酵素的脱炭酸反応の際には、生産速度及び反応収率向上のため、ピリドキシン、ピリドキサミン、ピリドキサル及びピリドキサルリン酸から選ばれる少なくとも 1 種のビタミン B 6 を配合することが好ましく、なかでもピリドキサルリン酸が特に好ましい。

ビタミン B 6 を添加する方法には特に制限はない。反応中に適宜添加しても良い。

【 0 0 2 4 】

リジンの酵素的脱炭酸反応は、例えば、上記のようにして中和されたリジン溶液にリジン脱炭酸酵素（LDC）を添加することによって行うことができる。

40

LDC としては、リジンに作用してカダベリンを生成させるものであれば特に制限はない。LDC としては、精製酵素を用いてもよいし、LDC を産生する微生物、植物細胞又は動物細胞等の細胞を用いてもよい。LDC 又はそれを産生する細胞は、1 種でもよく、2 種以上の混合物であってもよい。

また、細胞をそのまま用いてもよく、LDC を含む細胞処理物を用いてもよい。細胞処理物としては、細胞破碎液及びその分画物が挙げられる。

【 0 0 2 5 】

前記微生物としては、E . c o l i 等のエシェリヒア属細菌、ブレヴィバクテリウム・ラクトファーメンタム（B r e v i b a c t e r i u m l a c t o f e r m e n t u m）等のコリネ型細菌、バチルス・サチリス（B a c i l l u s s u b t i l i s）等のバ

50

チルス属細菌、セラチア・マルセッセンス (*Serratia marcescens*) 等のセラチア属細菌等の細菌、サッカロマイセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) 等の真核細胞が挙げられる。これらの中では細菌、特に *E. coli* が好ましい。

【0026】

前記微生物は、LDCを産生する限り、野生株でもよく、変異株であってもよい。また、LDC活性が上昇するように改変された組換え株であってもよい。植物細胞又は動物細胞も、LDC活性が上昇するように改変された組換え細胞を用いることができる。組換え細胞については、後述する。

【0027】

リジン溶液にLDCを添加して反応を開始した後は、反応の進行に伴い、リジンから遊離される炭酸ガスが反応液から放出され、pHが上昇する。従って、反応液のpHが前記範囲となるように、アジピン酸を反応液に添加する。アジピン酸は連続的に添加してもよく、pHが前記範囲に維持される限り、分割して添加してもよい。

反応温度は、LDCがリジンに作用してカダベリンを生成させる温度であれば特に制限はないが、温度は、通常20 以上、好ましくは30 以上で、通常60 以下、好ましくは40 以下で行う。

【0028】

原料のリジン又はリジン・アジピン酸塩は、反応開始時に反応液に全量添加してもよく、LDC反応の進行に応じて、分割して添加してもよい。

【0029】

酵素反応は、バッチ式によって行くと、アジピン酸の添加を容易に行うことができる。また、LDC、LDCを産生する細胞又はその処理物を固定化した担体を用いた移動床ラムクロマトグラフィーによって、反応を行うこともできる。

その場合は、反応系のpHが所定の範囲に維持されたまま反応が進行するように、リジン及びアジピン酸をカラムの適当な部位に注入すればよい。

【0030】

上記のようにして、リジンの酵素的脱炭酸反応によるカダベリン生成に伴って上昇するpHを、アジピン酸を用いて逐次中和することにより、酵素反応が良好に進行する。このようにして生成するカダベリンは、アジピン酸塩として反応液中に蓄積する。

【0031】

本実施の形態においては、LDCを用いて得られたカダベリン塩水溶液から、分子量12,000以上、好ましくは5,000以上、特に好ましくは1,000以上の高分子不純物を除去することを特徴とする。

上記高分子不純物をカダベリン水溶液から除去する時期についての制限はなく、上記LDCによる反応が終了した時点で得られたカダベリン・塩酸塩水溶液、カダベリン・硫酸塩水溶液、カダベリン・リン酸塩水溶液、カダベリン・炭酸塩水溶液、カダベリン・ジカルボン酸塩水溶液等から直接除去しても良い。

【0032】

菌体を用いた場合には、LDCで得られたカダベリン塩水溶液中の菌体を滅菌処理し、遠心分離等の方法で菌体等の不溶物を除去した後に実施しても良い。

また、カダベリン塩水溶液がカダベリン・ジカルボン酸塩水溶液ではない場合には、カダベリン塩水溶液からイオン交換樹脂等を用いてカダベリン水溶液とした後、高分子不純物を除去する操作を行ってから、ジカルボン酸を添加してカダベリン・ジカルボン酸塩水溶液を得ても良い。さらに、前記カダベリン水溶液にジカルボン酸を添加し、カダベリン・ジカルボン酸塩水溶液を得た後、高分子不純物を除去する操作を行っても良い。

【0033】

中でも、操作の煩雑さを軽減し、高分子不純物除去の効率を上げるために、LDCによる反応終了後に不溶物を除去したカダベリン・ジカルボン酸塩水溶液から高分子不純物を除去する方法が好ましい。

10

20

30

40

50

特に、カダベリン・ジカルボン酸塩水溶液から晶析を行い、カダベリン・ジカルボン酸塩を得る場合には、晶析した塩に高分子不純物が混入すると品質の良いポリアミド樹脂が得られないため、晶析操作の前に高分子不純物を除去しておくことが好ましい。

【0034】

分子量12,000以上の高分子不純物を除去する方法について制限はなく、吸着剤を用いる方法や膜処理等が挙げられる。中でも簡便性と除去効果の観点から、限外濾過膜(UF膜)を用いる方法が好ましい。

限外濾過膜は、その種類により除去できる分子量範囲が定められている。本実施の形態においては、除去できる分子量は12,000以上が好ましく、さらに好ましくは5,000以上、特に好ましくは1,000以上である。

除去する高分子不純物としては、タンパクや核酸、多糖等が挙げられる。特に、微生物を用いた反応を伴う場合には、タンパクが混入しやすいので、本実施の形態により得られる効果が顕著である。

【0035】

限外濾過膜の材質や膜形状に制限はない。具体的な材質としては、例えば、酢酸セルロース、ポリエーテルスルホン、ポリスルホン、ポリフッ化ビニリデン、ポリビニルベンジルトリメチルアンモニウムクロリド、ポリスチレンスルホン酸ナトリウム、アクリロニトリル共重合体、ポリアミド12等が挙げられる。中でも、アクリロニトリル共重合体が好ましい。

膜形状としては、平膜、中空糸、板、管、スパイラル巻き等が挙げられ、中でも中空糸が好ましい。

また、種々の限外濾過膜モジュールが各社から販売されているが、操作のしやすさからモジュール化したものが好ましい。

【0036】

カダベリン塩水溶液から高分子不純物を除去せずに、これを原料の少なくとも一部として重合した場合、得られたポリアミド樹脂中には多くのゲルが存在する。このようなゲルは、射出成形品では、流動性や機械物性等の低下原因となり、フィルムやフィラメントでは、フィッシュアイ(F/E)による表面外観の低下や延伸破断の原因となる。

また、分子量が過度に低い物質を除去しようとすると、操作が煩雑になったり、生産性が低下したりするため好ましくない。

【0037】

高分子不純物を除去したカダベリン塩水溶液は、必要に応じ公知の方法を組み合わせることにより精製し、ポリアミド樹脂の原料として使用することができる。

【0038】

次に、一例として晶析法にて、本実施の形態におけるカダベリン・アジピン酸塩水溶液からカダベリン・アジピン酸塩を得る方法を具体的に説明する。

【0039】

バイオマス原料から得られたカダベリン・アジピン酸塩水溶液は着色しているため、晶析前に脱色することが好ましく、脱色剤としては活性炭、合成吸着剤、活性白土、シリカ、ゼオライト等が挙げられ、中でも活性炭が好ましい。

脱色は、脱色剤を充填した塔にカダベリン・アジピン酸塩水溶液を通液する方法や、カダベリン・アジピン酸塩水溶液中に脱色剤を添加、攪拌する方法等が挙げられ、中でも前者が好ましい。

【0040】

脱色後のカダベリン・アジピン酸塩水溶液は、窒素バブリングにより溶存酸素を追い出した後、カダベリン・アジピン酸塩濃度が50重量%~69重量%、好ましくは60重量%~67重量%まで濃縮する。カダベリン・アジピン酸塩濃度が過度に小さい場合は晶析後の収率が低くなり、過度に大きいとカダベリン・アジピン酸塩に混入する不純物濃度が高くなるので好ましくない。具体的には、リジン、アルギニン等の3官能以上のアミノ酸等の含有量が高くなるので好ましくない。

10

20

30

40

50

濃縮は、カダベリン・アジピン酸塩水溶液の温度 50 ~ 70、減圧度 150 Torr 以下で行うのが好ましい。温度が過度に低いと濃縮時間が長くなり、温度が過度に高いとカダベリン・アジピン酸塩が分解するので好ましくない。また、減圧度が 150 Torr を超えると濃縮時間が長くなるので好ましくない。

【0041】

晶析は、冷却してカダベリン・アジピン酸塩を析出させて行う。この場合、冷却している降温途中で種晶を添加することが好ましい。種晶は、種晶としての効果が得られるものであれば特に限定されない。例えば、析出するカダベリン・アジピン酸塩が好ましい。

冷却時の降温速度は、通常 1 / h 以上、好ましくは 2 / h 以上、さらに好ましくは 3 / h 以上である。また、通常 30 / h 以下、好ましくは 20 / h 以下、さらに好ましくは 10 / h 以下である。降温速度が過度に遅いと、晶析に時間を要する傾向となるので好ましくない。降温速度が過度に早いと、結晶サイズが小さくなる傾向があり、精製度合いが低下する方向となるので好ましくない。

晶析終了温度は、通常 1 以上、好ましくは 5 以上、さらに好ましくは 10 以上である。また、通常 30 以下、好ましくは 25 以下、さらに好ましくは 20 以下である。晶析終了温度が過度に高いと、収率が低くなる傾向があるので好ましくない。晶析終了温度が過度に低いと、カダベリン・アジピン酸塩スラリーを移送する際に、配管を閉塞しやすくなるので好ましくない。

【0042】

晶析率は、濃縮液のカダベリン・アジピン酸塩濃度と晶析終了温度により決められる。通常 1 重量% 以上、好ましくは 5 重量% 以上、さらに好ましくは 10 重量% 以上である。また、通常 46 重量% 以下、好ましくは 39 重量% 以下、さらに好ましくは 35 重量% 以下に制御することが好ましい。晶析率が過度に低いと、収率が低くなる傾向となるので好ましくない。晶析率が過度に高いと、カダベリン・アジピン酸塩に混入するリジン、アルギニン等の 3 官能以上のアミノ酸等の不純物濃度が高くなるので好ましくない。

【0043】

晶析後のカダベリン・アジピン酸塩スラリーは、常法に従い固液分離して、結晶として得られる。例えば、遠心濾過を行う場合は、母液を振り切った後に、遠心濾過器が回転している状態で少量の脱塩水をシャワー状にふりかけ、カダベリン・アジピン酸塩に付着している母液をさらに洗い流すと精製度が上がり好ましい。

脱塩水量は、wet ケーキ（若干の水を含んだカダベリン・アジピン酸塩）に対して、通常 1 重量% 以上、好ましくは 5 重量% 以上である。また、通常 40 重量% 以下、好ましくは 30 重量% 以下である。脱塩水量が過度に少ないと、洗浄効果が小さくなる傾向となるので好ましくない。脱塩水量が過度に多いと、収率が低下する傾向にあるので好ましくない。このようにして得られた結晶を 1 番晶と称する。

【0044】

固液分離後の母液や洗浄液は回収して、再度、濃縮、晶析、固液分離を行い、2 番晶を得る。同様に、3 番晶、4 番晶等を得ることができる。

【0045】

次に、微生物を、LDC 活性が上昇するように改質する方法について例示する。尚、他の細胞についても、それに適するように下記の方法を適宜改変することによって、同様に LDC 活性を上昇させることができる。

【0046】

LDC 活性は、例えば、LDC をコードする遺伝子（LDC 遺伝子）の発現を増強することによって上昇する。LDC 遺伝子の発現の増強は、LDC 遺伝子のコピー数を高めることによって達成される。例えば、LDC 遺伝子断片を、微生物で機能するベクター、好ましくは、マルチコピー型のベクターと連結して組換え DNA を作製し、これを適当な宿主に導入して形質変換すればよい。

【0047】

LDC 遺伝子のコピー数を高めることは、LDC 遺伝子を微生物の染色体 DNA 上に多

10

20

30

40

50

コピー存在させることによっても達成できる。微生物の染色体DNA上に遺伝子を多コピーで導入するには、染色体DNA上に多コピー存在する配列を標的に利用して相同組換えにより行う。

染色体DNA上に多コピー存在する配列としては、レペティティブDNA、転移因子の端部に存在するインバーテッド・リピートが利用できる。或いは、特開平2-109985号公報に開示されているように、目的遺伝子をトランスポゾンに搭載してこれを転移させて染色体DNA上に多コピー導入することも可能である。

【0048】

LDC活性の上昇は、上記の遺伝子増幅による以外に、染色体DNA上又はプラスミド上のLDC遺伝子のプロモーター等の発現調節配列を強力なものに置換することによっても達成される。例えば、lacプロモーター、trpプロモーター、trcプロモーター等が強力なプロモーターとして知られている。

また、国際公開第00/18935号パンフレットに開示されているように、遺伝子のプロモーター領域に塩基置換を導入し、より強力なものに改変することも可能である。これらのプロモーター置換又は改変によりLDC遺伝子の発現が強化され、LDC活性が上昇する。これら発現調節配列の改変は、遺伝子のコピー数を高めることと組み合わせてもよい。

【0049】

発現調節配列の置換は、例えば、温度感受性プラスミドを用いた遺伝子置換と同様にして行うことができる。E.coliの温度感受性複製起点を有するベクターとしては、例えば、国際公開第99/03988号パンフレットに記載されたプラスミドpMAN997等が挙げられる。また、ファージのレッド・リコンビナーゼ(Red recombinase)を利用した方法(Datsenko, K.A., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (2000) 97(12), 6640-6645)によっても、発現調節配列の置換を行うことができる。

【0050】

LDC遺伝子としては、コードされるLDCが、リジンの脱炭酸反応に有効利用できるものであれば特に制限されないが、例えば、バクテリアム カダベリス、E.coli等の細菌や、ガラス豆等の植物、さらには、特開2002-223770号公報に記載の微生物のLDC遺伝子が挙げられる。

【0051】

宿主微生物としてE.coliを用いる場合は、E.coli由来のLDC遺伝子が好ましい。

E.coliのLDC遺伝子としては、cadA遺伝子及びldc遺伝子(米国特許第5,827,698号)が知られているが、これらの中ではcadA遺伝子が好ましい。

E.coliのcadA遺伝子は配列が知られており(N. Watson et al., Journal of bacteriology (1992) vol. 174, p. 530-540; S.Y. Meng et al. Journal of bacteriology (1992) vol. 174, p. 2659-2668; GenBank accession M76411)、その配列に基づいて作成したプライマーを用いたPCRにより、E.coli染色体DNAから単離することができる。

このようなプライマーとしては、配列番号1(配列; GTTGCGTGTTCTGCTTCATCGCGCTGATG)及び配列番号2(配列; ACCAAGCTGATGGGTGAGATAGAGAATGAGTAAG)に示す塩基配列を有するプライマーが挙げられる。

【0052】

取得されたLDC遺伝子とベクターを連結して組換えDNAを調製するには、LDC遺伝子の末端に合うような制限酵素でベクターを切断し、T4 DNAリガーゼ等のリガーゼを用いて前記遺伝子とベクターを連結すればよい。

E.coli用のベクターとしては、pUC18、pUC19、pSTV29、pHS

10

20

30

40

50

G 2 9 9、p H S G 3 9 9、p H S G 3 9 8、R S F 1 0 1 0、p B R 3 2 2、p A C Y C 1 8 4、p M W 2 1 9 等が挙げられる。

【 0 0 5 3 】

L D C 遺伝子は、野生型であってもよいし、変異型であってもよい。例えば c a d A 遺伝子は、コードされる L D C の活性が損なわれない限り、1 若しくは複数の位置での 1 若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、又は付加を含む L D C をコードするものであってもよい。

ここで、「数個」とは、アミノ酸残基のタンパク質の立体構造における位置や種類によっても異なるが、具体的には 2 個～50 個、好ましくは 2 個～30 個、より好ましくは 2 個～10 個である。

【 0 0 5 4 】

上記のような L D C と実質的に同一のタンパク質をコードする D N A は、例えば部位特異的変異法によって、特定の部位のアミノ酸残基が置換、欠失、挿入、付加又は逆位を含むように c a d A 遺伝子の塩基配列を改変することによって得られる。

また、上記のような改変された D N A は、従来知られている変異処理によっても取得され得る。変異処理としては、変異処理前の D N A をヒドロキシルアミン等でインビトロ処理する方法、及び変異処理前の D N A を保持する微生物、例えばエシェリヒア属細菌を、紫外線又は N - メチル - N ' - ニトロ - N - ニトロソグアニジン (N T G) もしくはエチルメタンスルホン酸 (E M S) 等の通常変異処理に用いられている変異剤によって処理する方法が挙げられる。

【 0 0 5 5 】

上記のような変異を有する D N A を、適当な細胞で発現させ、発現産物の活性を調べることにより、L D C と実質的に同一のタンパク質をコードする D N A が得られる。

また、変異を有する L D C をコードする D N A 又はこれを保持する細胞から、例えば、c a d A 遺伝子 (G e n B a n k a c c e s s i o n M 7 6 4 1 1) のコード領域の配列、又は同配列の一部を有するプローブとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、L D C と同等の活性を有するタンパク質をコードする D N A が得られる。

【 0 0 5 6 】

ここで言う「ストリンジェントな条件」とは、いわゆる特異的なハイブリッドが形成され、非特異的なハイブリッドが形成されない条件をいう。この条件を明確に数値化することは困難であるが、一例を示せば、相同性が高い D N A 同士、例えば 70 % 以上、好ましくは 80 % 以上、より好ましくは 90 % 以上の相同性を有する D N A 同士がハイブリダイズし、それにより相同性が低い D N A 同士がハイブリダイズしない条件、或いは通常のサザンハイブリダイゼーションの洗いの条件である 60 、1 × S S C、0 . 1 % S D S、好ましくは、0 . 1 × S S C、0 . 1 % S D S に相当する塩濃度でハイブリダイズする条件が挙げられる。

【 0 0 5 7 】

プローブとして c a d A 遺伝子の一部の配列を用いることもできる。そのようなプローブは、公知の c a d A 遺伝子の塩基配列に基づいて作成したオリゴヌクレオチドをプライマーとし、c a d A 遺伝子を含む D N A 断片を鋳型とする P C R によって作製することができる。プローブとして、300 b p 程度の長さの D N A 断片を用いる場合には、ハイブリダイゼーションの洗いの条件は、50 、2 × S S C、0 . 1 % S D S が挙げられる。

【 0 0 5 8 】

L D C と実質的に同一のタンパク質をコードする D N A として具体的には、公知の c a d A 遺伝子がコードするアミノ酸配列と、好ましくは 70 % 以上、より好ましくは 80 % 以上、さらに好ましくは 90 % 以上の相同性を有し、かつ L D C 活性を有するタンパク質をコードする D N A が挙げられる。

【 0 0 5 9 】

組換え D N A を微生物に導入するには、これまでに報告されている形質転換法に従って行えばよい。例えば、エシェリヒア・コリ K - 1 2 について報告されているような、受

10

20

30

40

50

容菌細胞を塩化カルシウムで処理してDNAの透過性を増す方法(Mandel, M. and Higa, A., J. Mol. Biol., 53, 159 (1970))があり、バチルス・サチリスについて報告されているような、増殖段階の細胞からコンピテントセルを調製してDNAを導入する方法(Ducan, C. H., Wilson, G. A. and Young, F. E., Gene, 1, 153 (1997))がある。

或いは、バチルス・サチリス、放線菌類及び酵母について知られているような、DNA受容菌の細胞を、組換えDNAを容易に取り込むプロトプラスト又はスフェロプラストの状態にして組換えDNAをDNA受容菌に導入する方法(Chang, S. and Cho, S. N., Molec. Gen. Genet., 168, 111 (1979); Bibb, M. J., Ward, J. M. and Hopwood, O. A., Nature, 274, 398 (1978); Hinnen, A., Hicks, J. B. and Fink, G. R., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 1929 (1978))も応用できる。また、電気パルス法(特開平2-207791号公報)によっても、微生物の形質転換を行うことができる。

【0060】

LDCを産生する微生物又は細胞を得るための培養は、用いる微生物又は細胞に応じて、LDCの産生に適した方法によって行えばよい。

例えば、培地は、炭素源、窒素源、無機イオン及び必要に応じその他の有機成分を含有する通常の培地でよい。炭素源としては、グルコース、ラクトース、ガラクトース、フラクトース、アラビノース、マルトース、キシロース、トレハロース、リボースや澱粉の加水分解物等の糖類;グリセロール、マンニトールやソルビトール等のアルコール類;グルコン酸、フマル酸、クエン酸やコハク酸等の有機酸類を用いることができる。

【0061】

窒素源としては、硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、リン酸アンモニウム等の無機アンモニウム塩、大豆加水分解物等の有機窒素、アンモニアガス、アンモニア水等を用いることができる。

有機微量栄養素としては、ビタミンB1等のビタミン類、アデニンやRNA等の核酸類等の要求物質又は酵母エキス等を適量含有させることが望ましい。これらの他に、必要に応じて、リン酸カルシウム、硫酸マグネシウム、鉄イオン、マンガンイオン等が少量添加される。

【0062】

培養は、エシェリヒア・コリの場合は、好氣的条件下で16時間~72時間程度実施するのがよく、培養温度は30~45に、培養中のpHは5~8に制御する。尚、pH調整には無機或いは有機の酸性又はアルカリ性物質、更にアンモニアガス等を使用することができる。

尚、LDC遺伝子が、誘導可能なプロモーターによって発現が調節されている場合には、誘導剤を培地に添加する。

【0063】

培養後、細胞は、遠心分離機や膜により集めることにより、培養液から回収することができる。細胞は、そのまま用いてもよいが、LDCを含むそれらの処理物を用いる場合は、細胞を超音波、フレンチプレス、又は酵素的処理により破碎し酵素を抽出させ、無細胞抽出液とし、さらにそこからLDCを精製する場合には、常法に従い、硫酸塩析、各種クロマトグラフィーを使用することによって精製することができる。

【0064】

(ポリアミド樹脂)

本実施の形態が適用されるポリアミド樹脂は、カダベリン単位、ジカルボン酸単位を構成成分として含み、本発明の効果を損なわない範囲において、それ以外の共重合成分が含まれていてもよい。

【0065】

この場合、共重合成分としては、例えば、6-アミノカプロン酸、11-アミノウンデ

10

20

30

40

50

カン酸、12-アミノドデカン酸、パラアミノメチル安息香酸等のアミノ酸； - カプロラクタム、 - ラウロラクタム等のラクタム；シュウ酸、マロン酸、コハク酸、グルタル酸、アジピン酸、ピメリン酸、スベリン酸、アゼライン酸、セバシン酸、ウンデカン二酸、ドデカン二酸、プラシリン酸、テトラデカン二酸、ペンタデカン二酸、オクタデカン二酸等の脂肪族ジカルボン酸；シクロヘキサジカルボン酸等の脂環式ジカルボン酸；フタル酸、イソフタル酸、テレフタル酸、ナフタレンジカルボン酸等の芳香族ジカルボン酸；

【0066】

エチレンジアミン、1,3-ジアミノプロパン、1,4-ジアミノブタン、1,6-ジアミノヘキサン、1,7-ジアミノヘプタン、1,8-ジアミノオクタン、1,9-ジアミノノナン、1,10-ジアミノデカン、1,11-ジアミノウンデカン、1,12-ジアミノドデカン、1,13-ジアミノトリデカン、1,14-ジアミノテトラデカン、1,15-ジアミノペンタデカン、1,16-ジアミノヘキサデカン、1,17-ジアミノヘプタデカン、1,18-ジアミノオクタデカン、1,19-ジアミノノナデカン、1,20-ジアミノエイコサン、2-メチル-1,5-ジアミノペンタン等の脂肪族ジアミン；シクロヘキサジアミン、ビス-(4-アミノヘキシル)メタン等の脂環式ジアミン；キシリレンジアミン等の芳香族ジアミンが挙げられる。

【0067】

また、本実施の形態で使用するジカルボン酸は、前述した芳香族ジカルボン酸、脂肪族ジカルボン酸、脂環式ジカルボン酸と同様の化合物を挙げることができる。

これらの共重合成分は1種を単独で用いてもよく、2種以上を併用してもよい。

【0068】

(ポリアミド樹脂の製造方法)

本実施の形態が適用されるポリアミド樹脂の製造方法としては、公知の方法が使用でき、具体的には「ポリアミド樹脂ハンドブック」(日刊工業社出版：福本修編)等が開示されている。例えば、ポリアミド56の製造方法としては、カダベリン・アジピン酸塩を、水の共存下で混合し、加熱して脱水反応を進行させる方法(加熱重縮合)が好ましい。

【0069】

尚、本実施の形態における上記加熱重縮合とは、ポリアミド樹脂の製造における重合反応物の最高到達温度を200℃以上に上昇させる製造プロセスである。最高到達反応温度の上限としては、重合反応時の熱安定性を考慮して、通常300℃以下である。重合方式には特に制限は無く回分式、連続方式が採用できる。

【0070】

上記の方法で製造されたポリアミド樹脂は加熱重縮合後に更に固相重合することができる。これにより、ポリアミド樹脂の分子量を高くすることができる。固相重合は、例えば、100℃以上融点以下の温度で真空中、或いは不活性ガス中で加熱することにより行うことができる。

【0071】

本実施の形態が適用されるポリアミド樹脂の重合度は、特に制限がなく、濃度0.01g/mlとした98%硫酸溶液の25℃における相対粘度(η_r)が1.5~8.0であることが好ましく、2.0~5.5であることがさらに好ましい。

相対粘度(η_r)が過度に低いと、実用的強度が不十分であり、一方、過度に高いと、流動性が低下し、成形加工性が損なわれるので好ましくない。

相対粘度(η_r)は、成形性の観点から、フィルム、繊維、モノフィラメント等の押出成形では3.0~5.5、射出成形では2.0~3.5が特に好ましい。

【0072】

本実施の形態におけるポリアミド樹脂には、本発明の効果を損なわない範囲で他の成分を、ポリアミド樹脂の重合から成形までの任意の段階で配合することができる。

このような他の成分としては、例えば、酸化防止剤や熱安定剤(ヒンダードフェノール系、ヒドロキノン系、ホスファイト系及びこれらの置換体、ハロゲン化銅、ヨウ素化合物等)；耐候剤(レゾルシノール系、サリシレート系、ベンゾトリアゾール系、ベンゾフェ

10

20

30

40

50

ノン系、ヒンダードアミン系等)；離型剤及び滑剤(脂肪族アルコール、脂肪族アミド、脂肪族ビスアミド、ビス尿素及びポリエチレンワックス等)；顔料(硫化カドミウム、フタロシアニン、カーボンブラック等)；染料(ニグロシン、アニリンブラック等)；可塑剤(p-オキシ安息香酸オクチル、N-ブチルベンゼンスルホンアミド等)；

【0073】

帯電防止剤(アルキルサルフェート型アニオン系帯電防止剤、4級アンモニウム塩型カチオン系帯電防止剤、ポリオキシエチレンソルビタンモノステアレート等の非イオン系帯電防止剤、ベタイン系両性帯電防止剤等)；難燃剤(メラミンシアヌレート、水酸化マグネシウム、水酸化アルミニウム等の水酸化物、ポリリン酸アンモニウム、臭素化ポリスチレン、臭素化ポリフェニレンオキシド、臭素化ポリカーボネート、臭素化エポキシ樹脂又はこれらの臭素系難燃剤と三酸化アンチモンとの組み合わせ等)；他の重合体(他のポリアミド、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリエステル、ポリカーボネート、ポリフェニレンエーテル、ポリフェニレンスルフィド、液晶ポリマー、ポリスルホン、ポリエーテルスルホン、ABS樹脂、SAN樹脂、ポリスチレン等)が挙げられる。

これらの他の成分は、ドライブレンド又は押出機を用いて熔融混練するのが好ましい。

【0074】

また、本実施の形態のポリアミド樹脂をフィルム用途に用いる場合には、滑り性向上のため、タルク、カオリン、焼成カオリン、シリカ、ゼオライト等の無機フィラー、特に微粒子状の無機フィラーを配合することが好ましい。更に好ましくは、無機フィラーと離型剤及び/または滑剤とを併用する態様が挙げられる。

無機フィラーの配合量としては、ポリアミド樹脂100重量部当り0.005重量部～0.1重量部が好ましく用いられる。また、離型剤及び/または滑剤は、ポリアミド樹脂100重量部当り0.01重量部～0.5重量部が好ましく用いられる。

【0075】

また、本実施の形態のポリアミド樹脂は、射出成形、フィルム成形、熔融紡糸、ブロー成形、真空成形等の任意の成形方法により、所望の形状に成形することができる。成形品としては、例えば、射出成形品、フィルム、シート、フィラメント、テープードフィラメント、繊維等が挙げられる。また、ポリアミド樹脂は、接着剤、塗料等にも使用することができる。

【0076】

また、本実施の形態のポリアミド樹脂の具体的な用途例としては、自動車・車両関連部品として、例えば、インテークマニホールド、ヒンジ付きクリップ(ヒンジ付き成形品)、結束バンド、レゾネーター、エアークリーナー、エンジンカバー、ロッカーカバー、シリンダーヘッドカバー、タイミングベルトカバー、ガソリントank、ガソリンサブタンク、ラジエータータンク、インタークーラータンク、オイルリザーバタンク、オイルパン、電動パワステギヤ、オイルストレーナー、キャニスター、エンジンマウント、ジャンクションプロック、リレーブロック、コネクタ、コルゲートチューブ、プロテクター等の自動車用アンダーフード部品；ドアハンドル、フェンダー、フードバルジ、ルーフレールレグ、ドアミラーステー、バンパー、スポイラー、ホイールカバー等の自動車用外装部品；カップホルダー、コンソールボックス、アクセルペダル、クラッチペダル、シフトレバー台座、シフトレバーノブ等の自動車用内装部品が挙げられる。

【0077】

さらに、本実施の形態のポリアミド樹脂は、釣り糸、漁網等の漁業関連資材、スイッチ類、超小型スライドスイッチ、DIPスイッチ、スイッチのハウジング、ランプソケット、結束バンド、コネクタ、コネクタのハウジング、コネクタのシェル、ICソケット類、コイルボビン、ボビンカバー、リレー、リレーボックス、コンデンサーケース、モーターの内部部品、小型モーターケース、ギヤ・カム、ダンシングプーリー、スパーサー、インシュレーター、キャスター、端子台、電動工具のハウジング、スターターの絶縁部分、ヒューズボックス、ターミナルのハウジング、ベアリングリテーナー、スピーカー振動板、耐熱容器、電子レンジ部品、炊飯器部品、プリンタリボンガイド等に代表される電気・電

子関連部品、家庭・事務電気製品部品、コンピューター関連部品、ファクシミリ・複写機関連部品、機械関連部品等各種用途に使用することができる。

【0078】

(ポリアミド樹脂フィルムの成形方法)

本実施の形態におけるポリアミド樹脂フィルムは、公知の方法で成形することができる。例えば、ポリアミド樹脂に離型剤や滑剤等をドライブレンドしたポリアミド樹脂組成物の溶融体を連続的にT-ダイより押出し、キャストイングロールにて冷却しながらフィルム状に成形するT-ダイ法；環状のダイスより連続的に押出し、水を接触させて冷却する水冷インフレーション法；同じく環状のダイスより押出し、空気によって冷却する空冷インフレーション法等が用いられる。また、これらの成形法で他の材料を同時に押し出す共押出法で多層のフィルムを得ることもできる。

10

【0079】

必要に応じて一軸または二軸延伸フィルムとして使用することも可能である。延伸方法は公知の方法が応用できる。例えば、T-ダイ法にて成形したフィルムの場合、縦延伸（一軸延伸）はロール方式を用いる。さらに横方向に延伸する際には、テンター方式を使用した逐次二軸延伸法が挙げられる。環状ダイより成形したチューブ状フィルムについては、上記の逐次二軸延伸法以外に縦横同時に延伸できるチューブラー延伸法が用いられる。

共押出しフィルムについても同様の方法で各層を同時に延伸（共延伸）することができる。尚、延伸倍率は縦方向、横方向とも2倍～4倍、好ましくは2倍～3.5倍である。

【0080】

20

本実施の形態におけるポリアミド樹脂のフィルムの厚みは、好ましくは1 μ m～70 μ mである。フィルムの厚みが過度に小さいと強度が不十分になりやすく、過度に大きいと繰り返し屈曲疲労性が低下しやすい。

フィルムがポリアミド樹脂単層フィルムの場合、より好ましくは5 μ m～50 μ m、更に好ましくは10 μ m～30 μ mであり、多層フィルムの場合、ポリアミド樹脂層としての厚みは、より好ましくは2 μ m～50 μ m、更に好ましくは5 μ m～30 μ mである。

【0081】

本実施の形態におけるポリアミド樹脂のフィルムは、印刷性の改良や、ラミネート性（接着性）の改良のために片面、または両面にコロナ処理した後使用することもできる。

本実施の形態では、射出成形方法により、所望の形状に成形されたポリアミド樹脂の射出成形品を得ることができる。

30

【実施例】

【0082】

以下に実施例を示し、本発明を更に具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例の記載に限定されるものではない。

[相対粘度 (η_r)]

試料を98%濃硫酸に溶解して濃度0.01g/mlとし、25℃でオストワルド式粘度計を用いて測定を行い、(試料溶液の落下時間)/(濃硫酸の落下時間)を相対粘度(η_r)とした。

【0083】

40

[DSC (示差走査熱量測定)]

セイコー電子工業製口ポットDSCを用い、窒素雰囲気下、試料約5mgを採取し、次の条件で測定した。

ポリアミド樹脂を完全に融解させて3分間保持した後、20℃/分の降温速度で、30℃まで降温したときに現れる発熱ピークの温度(降温結晶化温度 T_c)と、これに続いて、30℃で3分間保持した後、30℃から20℃/分の昇温速度で昇温したときに観測される吸熱ピークの温度(融点 T_m)を求めた。吸熱ピークが複数の場合は、最も高い温度を融点 T_m とした。

【0084】

[静止摩擦係数 (滑り性)]

50

相対湿度 65 %、温度 23 の条件下、平行移動式により静止摩擦係数を測定した。

【0085】

[F / E (フィッシュアイ) 数]

ポリアミド樹脂原料を、押出機シリンダー径が 30 mm の T - ダイ式製膜機を用いて 40 μm 厚みのポリアミド樹脂フィルムを製膜する。製膜条件は、押出機のシリンダー設定温度が 280 、ポリアミド樹脂フィルムを巻き取る冷却ロール温度が 90 、吐出量が 2 kg / 時である。

面積が 900 cm² 中における、大きさが 50 μm 以上の粒状欠陥をフィッシュアイとし、当該フィッシュアイの数を数えた (単位 : 個 / 900 cm²)。

【0086】

[数平均分子量]

(1) 末端アミノ基

ポリアミド樹脂の試料 0.1 g ~ 2 g を正確に秤量し、フェノール 50 ml 中に溶解した後、自動滴定装置 (三菱化学株式会社製、GT - 06) を用いて 0.1 N 塩酸で滴定し、算出した (単位 : eq / g)。

(2) 末端カルボキシル基

ポリアミド樹脂の試料 0.1 g ~ 2 g を正確に秤量し、ベンジルアルコール 50 ml 中に溶解した後、自動滴定装置 (三菱化学株式会社製、GT - 06) または通常のビュレット型滴定装置を用いて 0.1 N 水酸化ナトリウムで滴定し算出した (単位 : eq / g)。

(3) 数平均分子量

上記 (1)、(2) の方法で求めた末端の総数から次式に従って算出した。

【0087】

【数1】

$$\text{数平均分子量} = \frac{1}{\text{末端濃度 (当量 / g)} / 2}$$

【0088】

[スパイラル流動長]

スパイラルフロー試験片の成形、日本製鋼所社製 J75 EII 型射出成形機を使用し、樹脂温度 265 、金型温度 75 、射出圧力 50 MPa、スパイラルフロー試験片厚み 3 mm にて行った。スパイラルフロー試験片の長さを測定し、スパイラル流動長とした (単位 : mm)。

【0089】

[リジン脱炭酸酵素遺伝子 (cadA) 増強株の作製]

(A) 大腸菌 DNA 抽出

LB 培地 [組成 : トリプトン 10 g、イーストエキストラクト 5 g、NaCl 5 g を蒸留水 1 L に溶解] 10 mL に、大腸菌 (*Escherichia coli*) JM109 株を対数増殖期後期まで培養し、得られた菌体を 10 mg / mL のリゾチームを含む 10 mM NaCl / 20 mM トリス緩衝液 (pH 8.0) / 1 mM EDTA・2Na 溶液 0.15 mL に懸濁した。

【0090】

次に、上記懸濁液にプロテナーゼ K を、最終濃度が 100 μg / mL になるように添加し、37 で 1 時間保温した。さらにドデシル硫酸ナトリウムを最終濃度が 0.5 % になるように添加し、50 で 6 時間保温して溶菌した。この溶菌液に、等量のフェノール / クロロフォルム溶液を添加し、室温で 10 分間ゆるやかに振盪した後、全量を遠心分離 (5,000 × g、20 分間、10 ~ 12) し、上清画分を分取し、酢酸ナトリウムを 0.3 M となるように添加した後、2 倍量のエタノールを加え混合した。遠心分離 (15,000 × g、2 分間) により回収した沈殿物を 70 % エタノールで洗浄した後、風乾した。得られた DNA に 10 mM トリス緩衝液 (pH 7.5) - 1 mM EDTA・2Na

10

20

30

40

50

a 溶液 5 mL を加え、4 で一晩静置し、以後の PCR の鋳型 DNA に使用した。

【0091】

(B) cadA のクローニング

大腸菌 cadA の取得は、上記 (A) で調製した DNA を鋳型とし、全ゲノム配列が報告されている大腸菌 K12 - MG1655 株の該遺伝子の配列 (GenBank Database Accession No. U00096) を基に設計した合成 DNA (配列番号 1 (配列; GTTGCGTGTTCTGCTTCAATCGCGCTGATG) 及び配列番号 2 (配列; ACCAAGCTGATGGGTGAGATAGAGAATGAGTAA G)) を用いた PCR によって行った。

【0092】

(反応液組成)

鋳型 DNA 1 μ L、Pfx DNA ポリメラーゼ (インビトロジェン社製) 0.2 μ L、1 倍濃度添付バッファー、0.3 μ M 各々プライマー、1 mM MgSO₄、0.25 μ M dNTPs を混合し、全量を 20 μ L とした。

【0093】

(反応温度条件)

DNA サーマルサイクラー (MJ Research 社製 PTC-200) を用い、94 で 20 秒間、60 で 20 秒間、72 で 2.5 分間からなるサイクルを 35 回繰り返し続けた。但し、1 サイクル目の 94 での保温は 1 分 20 秒間、最終サイクルの 72 での保温は 10 分間とした。

【0094】

図 1 は、cadA のクローニングの手順を説明する図である。

図 1 に示すように、PCR 反応終了後、増幅産物をエタノール沈殿により精製した後、制限酵素 KpnI 及び制限酵素 SphI で切断した。この DNA 標品を、0.75% アガロース (SeaKem GTG agarose: FMC BioProducts 製) ゲル電気泳動により分離後、臭化エチジウム染色により可視化することにより cadA を含む約 2.6 kb の断片を検出し、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN 製) を用いて目的 DNA 断片の回収を行った。

【0095】

回収した DNA 断片を、大腸菌プラスミドベクター pUC18 (宝酒造株式会社製) を制限酵素 KpnI 及び制限酵素 SphI で切断して調整した DNA 断片と混合し、ライゲーションキット ver. 2 (宝酒造株式会社製) を用いて連結後、得られたプラスミド DNA を用いて大腸菌 (JM109 株) を形質転換した。

この様にして得られた組換え大腸菌を、50 μ g/mL アンピシリン、0.2 mM IPTG (イソプロピル - D - チオガラクトピラノシド) 及び 50 μ g/mL X-Gal を含む LB 寒天培地に塗抹した。

【0096】

この培地上で白色のコロニーを形成したクローンを、常法により液体培養した後、プラスミド DNA を精製した。得られたプラスミド DNA を制限酵素 KpnI 及び制限酵素 SphI で切断することにより、約 2.5 kb の挿入断片が認められることを確認し、これを pCAD1、pCAD1 を含む大腸菌株を JM109 / pCAD1 とそれぞれ命名した。

【0097】

[カダベリン・アジピン酸塩水溶液の調製 (1)]

以下の実施例で使用した反応液 (カダベリン・アジピン酸塩水溶液) は、cadA 増幅株を用い、リジン・アジピン酸塩を原料とし、以下の方法で調製した。

(1) cadA 増幅株の培養

E. coli JM109 / pCAD1 を LB 培地入りフラスコ 10 本で前培養した後、1 L の培養液を 99 L の LB 培地が入った 200 L 容ジャーファーマンターに接種し、通気量 0.5 vvm、35、250 rpm で通気攪拌培養を行った。

培養開始 6 時間後、この培養液全量を、 3 m^3 の $2 \times \text{LB}$ 培地が入った 5 m^3 容培養タンクに接種して更に培養を行った。 5 m^3 容培養タンクでの培養条件は、通気量 0.5 vvm 、 35 であった。攪拌回転数は溶存酸素濃度が十分高い値になるように $60\text{ rpm} \sim 100\text{ rpm}$ の範囲で調節した。培養 4 時間目に、滅菌した IPTG (イソプロピル - D - チオガラクトピラノシド) を終濃度で 0.5 mM になるように添加し、その後 14 時間培養を継続した。

【0098】

(2) 菌体の分離

$6,400\text{ rpm}$ 、フィード速度 750 L/hr の条件下で、アルファラバル分離機により培養液からの菌体回収を行った。回収された菌体の湿重量は 36.9 kg であった。この湿菌体を 10 mM の酢酸ナトリウム溶液 160 L に懸濁したのち、 $15,000\text{ rpm}$ 、フィード速度 1.0 L/min の条件下でシャープレス遠心機により再度菌体回収を行い、 18.7 kg の湿菌体を取得した。

10

【0099】

(3) カダベリン・アジピン酸塩の製造

50% (w/v) リジンベース溶液 (協和醗酵工業株式会社製) に pH が 6.0 となるようにアジピン酸を添加して、リジン・アジピン酸塩の濃厚溶液を調製した。リジン濃度で 60 g/L となるように基質溶液 (3 m^3) を作成し、 5 m^3 容培養タンクにはり込んだ。ピリドキサルリン酸を 0.1 mM となるように基質溶液に添加し、さらに *E. coli* JM109 / pCAD1 の菌体を OD_{660} が 0.5 になるように添加して反応を開始した。

20

【0100】

反応条件は、 37 、 0.5 vvm 通気、 70 rpm とした。反応中の溶液の pH は、 250 kg のアジピン酸をイオン交換水 400 L に懸濁したスラリーを添加し、 6.5 になるように制御した。

また、リジン濃度 318 g/L の基質濃厚溶液 (600 L) を開始から約 130 L/h で連続的にフィードし、約 4.5 時間で全量を添加した。さらに反応を継続して計 22 時間反応させた。

【0101】

反応終了時には、リジン残存濃度が 0.03 g/L 以下であり、ほぼ 100% のリジンがカダベリンに変換されていた。

30

反応後の溶液は、菌体の不活化処理 (80 、 30 min) を行い、カダベリンとアジピン酸とを略等モル含むカダベリン・アジピン塩水溶液 (約 3.9 m^3) を取得した。

【0102】

(4) UF 膜処理

(A) 分子量 $13,000$ 以上の高分子不純物の除去

分子量 $13,000$ 以上の高分子不純物を除去する UF 膜モジュール ACP-3053 (旭化成工業株式会社製) を通して高分子量体の不純物除去を行ない、約 1.3 m^3 のカダベリン・アジピン酸塩水溶液 (a) を得た。UF 膜処理による回収率は 99.4% であった。

40

【0103】

(B) 分子量 $6,000$ 以上の高分子不純物の除去

分子量 $6,000$ 以上の高分子不純物を除去する UF 膜モジュール AIP-0013 UF (旭化成工業株式会社製) を通して高分子量体の不純物除去を行ない、約 1.3 m^3 のカダベリン・アジピン酸塩水溶液 (b) を得た。UF 膜処理による回収率は 99.1% であった。

【0104】

(C) UF 膜未処理

UF 膜処理を行わず、約 1.3 m^3 のカダベリン・アジピン酸塩水溶液 (c) を得た。

【0105】

50

[カダベリン・アジピン酸塩の精製・単離 (A)]

(1) 活性炭による脱色

直径 5 0 0 m m の活性炭塔に三菱化学カルゴン株式会社製活性炭 M M - 1 1 (3 5 k g 、約 1 5 0 L) を仕込み、2 日間脱塩水を通水した。次に、前記カダベリン・アジピン酸塩水溶液 (a) (約 1 . 3 m ³) を 1 . 3 2 m ³ / h の速度で通液し、最後に 2 0 0 L の脱塩水を通水した。初期 1 5 0 L をパージした後、活性炭処理したカダベリン・アジピン酸塩水溶液を採取した。

【 0 1 0 6 】

(2) 濃縮

P P ブリーツカートリッジフィルター T C P - J X を通して、前記活性炭処理後のカダベリン・アジピン酸塩水溶液 (a) を 2 m ³ 攪拌槽に仕込み、ジャケット温度 1 1 0 、内温 5 7 、真空度 1 4 0 ~ 1 5 0 T o r r にて濃縮を行ない、カダベリン・アジピン酸塩濃度は 6 3 . 5 w t % に調整して、濃縮液を得た。

【 0 1 0 7 】

尚、上記濃縮液等のカダベリン・アジピン酸塩水溶液中のカダベリン濃度は、1 N - H C l 水溶液にて滴定して、p H の変曲点までの滴定量から算出した。同様に上記濃縮液等のカダベリン・アジピン酸塩水溶液中のアジピン酸濃度は、1 N - N a O H 水溶液にて滴定して、p H の変曲点までの滴定量から算出した。滴定には、自動滴定装置 (三菱化学株式会社製 G T - 0 6 型) を使用した。

【 0 1 0 8 】

(3) 晶析

次に、濃縮液同一の 2 m ³ 攪拌槽にて、晶析を行った。攪拌翼は 3 枚後退翼、攪拌速度は 4 0 r p m 、降温速度は 8 / h 、内温 3 8 の時に予め作成したカダベリン・アジピン酸塩を種晶として 3 5 0 g 添加して結晶を析出させ、内温 1 0 で晶析終了として、カダベリン・アジピン酸塩スラリーを得た。尚、種晶としてのカダベリン・アジピン酸塩は、本実施例に準じてラボスケールにて準備した。

【 0 1 0 9 】

(4) 遠心濾過

直径 1 . 2 2 m の遠心濾過器を用い、前記カダベリン・アジピン酸塩スラリーを遠心濾過した。回転数は 9 8 0 r p m 、母液振り切り時間は 1 5 分、母液振り切り後に 1 0 の脱塩水約 1 5 k g をシャワー状に振りかけて洗浄し、その脱塩水の振り切り時間は 1 5 分とした。1 番晶として得られた w e t ケーキは約 7 0 k g 、カダベリン・アジピン酸塩 (a) として約 6 0 k g を得た。

尚、上記カダベリン・アジピン酸塩重量は、w e t ケーキの水分量を水分計 (三菱化学株式会社製電量滴定式水分測定装置 C A - 0 6 型、及び水分気化装置 V A - 0 6 型) にて測定して算出した。

【 0 1 1 0 】

[カダベリン・アジピン酸塩の精製・単離 (B)]

前記カダベリン・アジピン酸塩水溶液 (b) (約 1 . 3 m ³) を使用して、[カダベリン・アジピン酸塩の精製・単離 (A)] と同様にして、w e t ケーキは約 7 0 k g 、カダベリン・アジピン酸塩 (b) として約 6 0 k g を得た。

【 0 1 1 1 】

[カダベリン・アジピン酸塩の精製・単離 (C)]

前記カダベリン・アジピン酸塩水溶液 (c) (約 1 . 3 m ³) を使用して、[カダベリン・アジピン酸塩の精製・単離 (A)] と同様にして、w e t ケーキは約 7 0 k g 、カダベリン・アジピン酸塩 (c) として約 6 0 k g を得た。

【 0 1 1 2 】

[実施例 1]

< ポリアミド樹脂の製造 >

前記カダベリン・アジピン酸塩 (a) 2 5 k g に水 2 5 k g を添加した後、亜磷酸 1 .

10

20

30

40

50

25 gを添加し、窒素雰囲気下で混合物を完全に溶解させ、原料水溶液を得た。プランジャーポンプにて予め窒素置換したオートクレーブに、上記の原料水溶液を移送した。ジャケット温度を280℃に、オートクレーブの圧力を1.47 MPaにそれぞれ調節し、内容物を270℃に昇温した。

【0113】

次に、オートクレーブ内の圧力を除々に放圧した後、更に減圧して所定の攪拌動力に到達した時点で反応終了とした。反応終了後に窒素にて復圧し、内容物をストランド状に冷却水槽へ導入した後、回転式カッターでペレット化した。得られたペレットは、120℃、1 torr (0.13 kPa)の条件で、水分量が0.1%以下となる迄乾燥を行い、ポリアミド樹脂を得た。相対粘度(η_r)は3.51であった。

10

【0114】

<フィルム成形>

得られたポリアミド樹脂100重量部に対し、平均粒子径が3.0 μ mのタルク0.03重量部、及びエチレンビスステアリン酸アマイド(花王株式会社製、カオーワックスEB-FF)0.1重量部をドライブレンドして得たポリアミド樹脂組成物を原料として、押出機シリンダ径40 mmのT-ダイ式製膜機を用い、押出機シリンダ設定温度260℃、冷却ロール温度90℃にて、厚み25 μ mのフィルムを製膜した。

製膜開始後、1時間目のフィルムを用い、耐熱性(融点)、滑り性(静止摩擦係数)、フィッシュアイ(F/E)の評価を行った。結果を表1に示す。

【0115】

20

[実施例2]

実施例1において、カダベリン・アジピン酸塩(b)を用いた以外は実施例1と同様にして、ポリアミド樹脂の取得(相対粘度(η_r)3.52)、フィルム成形、及びその評価を行った。結果を表1に示す。

【0116】

[実施例3]

重合終了時の攪拌動力を変更した以外は、実施例1と同様にしてポリアミド樹脂を取得(相対粘度(η_r)2.72)した。得られたポリアミド樹脂を用いて、末端アミノ基、末端カルボキシル基を測定して数平均分子量を算出した。結果を表1に示す。

【0117】

30

<スパイラルフロー試験片の成形>

得られたポリアミド樹脂100重量部に対し、結晶核剤として平均粒子径が3.0 μ mのタルク0.03重量部をドライブレンドして得たポリアミド樹脂組成物を原料として、スパイラルフロー試験片の成形を行った。

成形は、日本製鋼所社製J75EII型射出成形機を使用し、樹脂温度265℃、金型温度75℃、射出圧力50 MPa、スパイラルフロー試験片厚み3 mmにて行った。スパイラル流動長を表1に示す。

【0118】

[実施例4]

重合終了時の攪拌動力を変更した以外は、実施例2と同様にしてポリアミド樹脂を取得(相対粘度(η_r)2.72)した。得られたポリアミド樹脂を用いて、末端アミノ基、末端カルボキシル基を測定して数平均分子量を算出した。結果を表1に示す。

40

【0119】

<スパイラルフロー試験片の成形>

得られたポリアミド樹脂100重量部に対し、結晶核剤として平均粒子径が3.0 μ mのタルク0.03重量部をドライブレンドして得たポリアミド樹脂組成物を原料として、スパイラルフロー試験片の成形を行った。

成形は、日本製鋼所社製J75EII型射出成形機を使用し、樹脂温度265℃、金型温度75℃、射出圧力50 MPa、スパイラルフロー試験片厚み3 mmにて行った。スパイラル流動長を表1に示す。

50

【 0 1 2 0 】

[比較例 1]

実施例 1 において、カダベリン・アジピン酸塩 (c) を用いた以外は実施例 1 と同様にして、ポリアミド樹脂の取得 (相対粘度 (η_r) 3 . 5 4)、フィルム成形、及びその評価を行った。結果を表 1 に示す。

【 0 1 2 1 】

[比較例 2]

< ポリアミド樹脂の製造 >

重合終了時の攪拌動力を変更した以外は、比較例 1 と同様にしてポリアミド樹脂を取得 (相対粘度 (η_r) 3 . 0 3) した。得られたポリアミド樹脂を用いて、末端アミノ基、
末端カルボキシル基を測定して数平均分子量を算出した。結果を表 1 に示す。

【 0 1 2 2 】

< スパイラルフロー試験片の成形 >

実施例 4 と同様にして、スパイラルフロー試験片の成形を行った。スパイラル流動長を表 1 に示す。

【 0 1 2 3 】

【 表 1 】

		実施例				比較例	
		1	2	3	4	1	2
UF膜モジュール		ACP -3053	AIP -0013UF	ACP -3053	AIP -0013UF	-	-
ポリアミド 樹脂	相対粘度	3.51	3.52	2.72	2.72	3.54	3.03
	末端アミノ基 eq/g	-	-	63×10^{-6}	64×10^{-6}	-	64×10^{-6}
	末端カルボ キシル基 eq/g	-	-	73×10^{-6}	73×10^{-6}	-	73×10^{-6}
	数平均分子量	-	-	14706	14599	-	14599
ポリアミド 樹脂 フィルム	融点 °C	255	255	-	-	255	-
	静止摩擦係数	0.7	0.7	-	-	0.8	-
	F/E数 個/900cm ²	115	80	-	-	1209	-
射出 成形品	スパイラル流動長 mm	-	-	608	605	-	517

【 0 1 2 4 】

以上、詳述したように、本実施の形態におけるカダベリン塩水溶液の製造方法は、タンパク、核酸、多糖等の高分子不純物を除去することが特徴である。これを原料にしてなるポリアミド樹脂は、架橋等によるゲルの発生が少なく、フィルム、射出成形品、繊維、モノフィラメント等に極めて好適に使用することが可能である。具体的には、著しくフィッシュアイが少なく表面外観に優れたポリアミド樹脂フィルム、繊維、モノフィラメントを得ることが可能であり、且つ、著しく射出成形時の流動性が優れるものである。

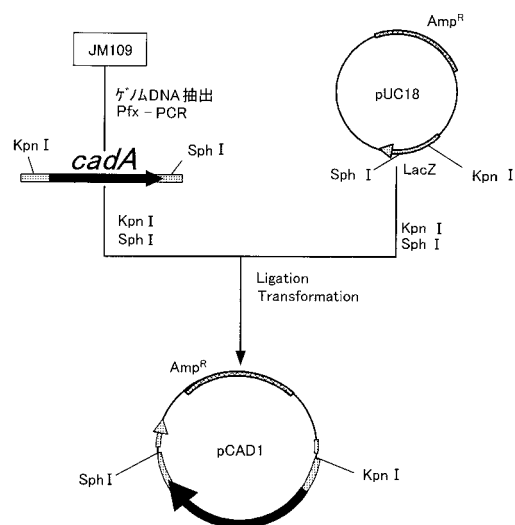
さらにバイオマス由来の原料を用いることが可能であるため、地球温暖化の防止や循環型社会を形成する上で極めて有効である。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 1 2 5 】

【図 1】 *cadA* のクローニングの手順を説明する図である。

【図 1】



 フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00		A
C 1 2 P 13/00 (2006.01)	C 1 2 P 13/00		
C 0 8 G 69/26 (2006.01)	C 0 8 G 69/26		

(56)参考文献 特開 2 0 0 4 - 2 0 3 8 3 7 (J P , A)
 特開 2 0 0 4 - 2 2 2 5 6 9 (J P , A)
 特開 2 0 0 5 - 0 0 6 6 5 0 (J P , A)
 国際公開第 2 0 0 6 / 1 2 3 7 7 8 (W O , A 1)

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

C 0 7 C	5 5 / 1 4
C 0 7 C	2 0 9 / 8 4
C 0 7 C	2 1 1 / 0 9
C 0 8 G	6 9 / 2 6
C 1 2 N	1 5 / 0 6
C 1 2 P	1 3 / 0 2