

(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2006-321996

(P2006-321996A)

(43) 公開日 平成18年11月30日(2006.11.30)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C O 8 G 63/78 (2006.01)	C O 8 G 63/78 Z N 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 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	4 J O 2 9

審査請求 未請求 請求項の数 6 O L (全 29 頁)

(21) 出願番号	特願2006-118432 (P2006-118432)	(71) 出願人	000005968
(22) 出願日	平成18年4月21日 (2006.4.21)		三菱化学株式会社
(31) 優先権主張番号	特願2005-125320 (P2005-125320)		東京都港区芝4丁目14番1号
(32) 優先日	平成17年4月22日 (2005.4.22)	(74) 代理人	100103997
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		弁理士 長谷川 暁司
		(72) 発明者	青島 敬之
			三重県四日市市東邦町1番地 株式会社三
			菱化学科学技術研究センター内
		(72) 発明者	三木 康彰
			神奈川県横浜市青葉区鴨志田町1000番
			地 株式会社三菱化学科学技術研究センタ
			ー内
		Fターム(参考)	4B024 AA03 AA17 BA80 CA04 CA05
			CA06 DA10 EA04 FA02 FA10
			GA11 GA19 HA03 HA08 HA14
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ポリエステルの製造方法

(57) 【要約】

【課題】

本発明は、バイオマス資源由来のジカルボン酸をポリエステル原料として用いる場合において、貯蔵タンク内の腐食やジカルボン酸粉末のブロック化が防止でき、経済的且つ効率的にバイオマス資源由来のポリエステルを製造する方法を提供する。

【解決手段】

ジカルボン酸とジオールとの反応によりポリエステルを製造する方法において、ジカルボン酸がバイオマス資源から誘導されたものであり、重合に供するジカルボン酸を貯蔵するタンク内の湿度を80% R. H. 以下とする。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ジカルボン酸とジオールとの反応によりポリエステルを製造する方法において、ジカルボン酸がバイオマス資源から誘導されたものであり、重合に供するジカルボン酸の貯蔵を 80% R. H. 以下の湿度で行うことを特徴とするポリエステルの製造方法。

【請求項 2】

バイオマス資源が植物資源であることを特徴とする請求項 1 に記載のポリエステルの製造方法。

【請求項 3】

ポリエステルの還元粘度 (η_{sp}/c) が 1.4 以上であることを特徴とする請求項 1 または 2 のいずれかに記載のポリエステルの製造方法。 10

【請求項 4】

ポリエステルが、3 官能以上の多価アルコール、3 官能以上の多価カルボン酸および 3 官能以上のオキシカルボン酸からなる群から選ばれる少なくとも 1 種の 3 官能以上の多官能化合物単位を含有することを特徴とする請求項 1～3 のいずれか 1 項に記載のポリエステルの製造方法。

【請求項 5】

3 官能以上の多官能化合物単位の含有量が、ポリエステルの全単量体単位 100 モル%に対して、0.0001 モル%以上 0.5 モル%以下であることを特徴とする請求項 1～4 のいずれか 1 項に記載のポリエステルの製造方法。 20

【請求項 6】

ジカルボン酸中の硫黄原子含有量が、該カルボン酸に対して質量比で 0.001 ppm 以上、1000 ppm 以下であることを特徴とする請求項 1～5 のいずれか 1 項に記載のポリエステルの製造方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ポリエステルの製造方法に関する。詳しくは、原料としてバイオマス資源由来のジカルボン酸を用いたポリエステルの製造方法に関する。

【背景技術】

30

【0002】

芳香族ポリエステル、脂肪族ポリエステル、全芳香族ポリエステル、半芳香族ポリエステル、ポリ炭酸エステル等のポリエステルは、現在、化石燃料資源由来の原料を重縮合することにより製造される代表的なポリマーの一つであるが、近年の化石燃料資源枯渇への危惧や大気中の二酸化炭素増加という地球規模での環境問題の背景から、バイオマス資源からこれらのポリマーの原料を誘導する手法に注目が注がれている。これらの手法は、この資源が再生可能な資源である為、カーボンニュートラルの観点から今後特に重要なプロセスになると予想されている。

【0003】

これまでに、発酵法を利用したバイオマス資源由来のグルコース、ブドウ糖、セルロース、油脂などからコハク酸、アジピン酸などのジカルボン酸を製造する技術が開発されてきた（特許文献 1、非特許文献 1、2、3 参照）。 40

しかしながら、これらのプロセスは、発酵により一旦ジカルボン酸を有機酸塩として得た後に中和、抽出、晶析等の工程を経て目的とするジカルボン酸を製造するプロセスである為、ジカルボン酸中には、バイオマス資源に含まれる窒素元素の他、発酵菌由来の窒素元素やアンモニアならびに金属カチオン等の多くの不純物が混入する特徴がある。

【特許文献 1】特開 2005-27533 号公報

【非特許文献 1】Biotechnology and Bioengineering Symp. No. 17 (1986) 355-363

【非特許文献 2】Journal of the American Chemical S 50

ociety No. 116 (1994) 399-400

【非特許文献3】Appl. Microbiol Biotechnol No. 51 (1999) 545-552

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

本発明者らの検討によれば、上述したような不純物を含有するバイオマス資源由来のジカルボン酸は、通常、酸による中和工程を含む精製処理により不純物量を低減させた上で用いられるが、そのような精製処理を経たジカルボン酸は、精製処理工程由来の硫酸、硫酸塩、亜硫酸、有機スルホン酸、有機スルホン酸塩等の硫黄成分が含まれてしまう問題があった。そして、このようなバイオマス資源由来のジカルボン酸をポリエステルの原料として用いると、ジカルボン酸を貯蔵するタンク内が腐食し、溶出金属により重合反応が遅延化してしまうという問題があった。

10

【0005】

そこで、本発明は、バイオマス資源由来のジカルボン酸をポリエステルの原料として用いる場合において、経済的且つ効率的にてポリエステルを製造する方法を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明者らは、上記の課題を解決すべく鋭意研究を行った結果、バイオマス資源由来のジカルボン酸を貯蔵するタンク内の湿度を特定範囲内に制御することにより、貯蔵タンク内の腐食が防止でき、経済的且つ効率的にバイオマス資源由来のポリエステルを製造する方法を見出し、本発明を完成するに至った。

20

即ち本発明の要旨は、ジカルボン酸とジオールとの反応によりポリエステルを製造する方法において、ジカルボン酸がバイオマス資源から誘導されたものであり、重合に供するジカルボン酸の貯蔵を80% R. H. 以下の湿度で行うことを特徴とするポリエステルの製造方法に存する。

【発明の効果】

【0007】

本発明の製造方法によれば、バイオマス資源由来のジカルボン酸をポリエステルの原料として用いる場合において、貯蔵タンク内の腐食が防止でき、経済的且つ効率的にバイオマス資源由来のポリエステルを製造することができる。

30

【発明を実施するための最良の形態】

【0008】

以下、本発明につき詳細に説明する。

<ポリエステル>

本発明の対象とするポリエステルは、ジカルボン酸単位およびジオール単位を必須成分とする。

(1) ジカルボン酸単位

ジカルボン酸単位を構成するジカルボン酸としては、芳香族ジカルボン酸、脂肪族ジカルボン酸或いはこれらの混合物が挙げられる。芳香族ジカルボン酸としては、テレフタル酸及びイソフタル酸等が挙げられ、芳香族ジカルボン酸の誘導体としては、芳香族ジカルボン酸の低級アルキルエステル、具体的には、メチルエステル、エチルエステル、プロピルエステル及びブチルエステル等が挙げられる。この内、芳香族ジカルボン酸としては、テレフタル酸が好ましく、芳香族ジカルボン酸の誘導体としては、ジメチルテレフタレートが好ましい。脂肪族ジカルボン酸成分としては、脂肪族ジカルボン酸又はその誘導体を使用される。脂肪族ジカルボン酸としては、具体的には、シュウ酸、コハク酸、グルタル酸、アジピン酸、セバシン酸、ドデカン二酸、ダイマー酸ならびにシクロヘキサンジカルボン酸等の、通常、炭素数が2以上40以下の鎖状或いは脂環式ジカルボン酸が挙げられる。また、脂肪族ジカルボン酸の誘導体として、上記脂肪族ジカルボン酸のメチルエステ

40

50

ル、エチルエステル、プロピルエステル及びブチルエステル等の低級アルキルエステルや例えば無水コハク酸等の上記脂肪族ジカルボン酸の環状酸無水物も使用できる。これらの内、脂肪族ジカルボン酸としては、得られる重合体の物性の面から、アジピン酸、コハク酸、ダイマー酸またはこれらの混合物が好ましく、脂肪族ジカルボン酸の誘導体としては、アジピン酸及びコハク酸のメチルエステル、またはこれらの混合物が好ましい。

【0009】

これらのジカルボン酸は単独でも2種以上混合して使用することもできる。

本発明において、これらのジカルボン酸は、バイオマス資源から誘導されるものである。

バイオマス資源としては、例えば、木材、稲わら、籾殻、米ぬか、古米、とうもろこし、サトウキビ、キャッサバ、サゴヤシ、おから、コーンコブ、タピオカカス、バガス、植物油カス、芋、そば、大豆、油脂、古紙、製紙残渣、水産物残渣、家畜排泄物、下水汚泥、食品廃棄物等が挙げられる。この中でも木材、稲わら、籾殻、米ぬか、古米、とうもろこし、サトウキビ、キャッサバ、サゴヤシ、おから、コーンコブ、タピオカカス、バガス、植物油カス、芋、そば、大豆、油脂、古紙、製紙残渣等の植物資源が好ましく、より好ましくは、木材、稲わら、籾殻、古米、とうもろこし、サトウキビ、キャッサバ、サゴヤシ、芋、油脂、古紙、製紙残渣であり、最も好ましくはとうもろこし、さとうきび、キャッサバ、サゴヤシである。これらのバイオマス資源は、一般に、窒素元素やNa、K、Mg、Ca等の多くのアルカリ金属、アルカリ土類金属を含有する。

【0010】

そしてこれらのバイオマス資源は、特に限定はされないが、例えば酸やアルカリ等の化学処理、微生物を用いた生物学的処理、物理的処理等の公知の前処理・糖化の工程を経て炭素源へ誘導される。その工程には、例えば、通常、特に限定はされないが、バイオマス資源をチップ化する、削る、擦り潰す等の前処理による微細化工程が含まれる。必要に応じて、更にグラインダーやミルで粉碎工程が含まれる。こうして微細化されたバイオマス資源は、更に前処理・糖化の工程を経て炭素源へ誘導されるが、その具体的な方法としては、硫酸、硝酸、塩酸、燐酸等の強酸で酸処理、アルカリ処理、アンモニア凍結蒸着爆砕法、溶媒抽出、超臨界流体処理、酸化剤処理等の化学的方法や、微粉碎、蒸着爆砕法、マイクロ波処理、電子線照射等の物理的方法、微生物や酵素処理による加水分解等生物学的処理が挙げられる。

【0011】

上記のバイオマス資源から誘導される炭素源としては、通常、グルコース、マンノース、ガラクトース、フルクトース、ソルボース、タガトース等のヘキソース、アラビノース、キシロース、リボース、キシルロース、リブロース等のペントース、ペントサン、サッカロース、澱粉、セルロース等の2糖・多糖類、酪酸、カプロン酸、カプリル酸、カプリン酸、ラウリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、パルミトレイン酸、ステアリン酸、オレイン酸、リノール酸、リノレン酸、モノクテン酸、アラキジン酸、エイコセン酸、アラキドン酸、ベヘニン酸、エルカ酸、ドコサペンタエン酸、ドコサヘキサエン酸、リグノセリン酸、セラコレン酸等の油脂、グリセリン、マンニトール、キシリトール、リビトール等のポリアルコール類等の発酵性糖質が用いられ、このうちグルコース、フルクトース、キシロースが好ましく、特にグルコースが好ましい。より広義の植物資源由来の炭素源としては、紙の主成分であるセルロースが好ましい。

【0012】

これらの炭素源を用いて、微生物変換による発酵法や加水分解・脱水反応・水和反応・酸化反応等の反応工程を含む化学変換法ならびにこれらの発酵法と化学変換法の組み合わせによりジカルボン酸が合成される。これらの中でも微生物変換による発酵法が好ましい。

微生物変換に用いる微生物としては、ジカルボン酸の生産能を有すれば特に限定されないが、例えば、*Anaerobiospirillum*属（米国特許第5143833号明細書）等の嫌気性細菌、*Actinobacillus*属（米国特許第550400

10

20

30

40

50

4号明細書)、*Escherichia*属(米国特許第5770435号明細書)等の通性嫌気性細菌(*E. coli*(*J. Bacteriol.*, 57:147-158)又は*E. coli*の株の変異体(特表2000-500333号公報、米国特許第6159738号明細書)など)、*Corynebacterium*属(特開平11-113588号公報)などの好気性細菌、*Bacillus*属、*Rizobium*属、*Brevibacterium*属、*Arthrobacter*属に属する好気性細菌(特開2003-235593号公報)、*Bacteroides ruminicola*、*Bacteroides amylophilus*等の嫌気性ルーメン細菌などを用いることができる。

【0013】

より具体的には、本発明に使用できる細菌の親株は、コリネ型細菌(*coryneform bacterium*)、バチルス属細菌、又はリゾビウム属細菌が好ましく、コリネ型細菌がより好ましい。これらの菌は、微生物変換により琥珀酸の生産能を有する。

コリネ型細菌としては、コリネバクテリウム属に属する微生物、ブレビバクテリウム属に属する微生物又はアースロバクター属に属する微生物が挙げられ、このうち好ましくは、コリネバクテリウム属又はブレビバクテリウム属に属するものが挙げられ、更に好ましくは、コリネバクテリウム・グルタミカム(*Corynebacterium glutamicum*)、ブレビバクテリウム・フラバム(*Brevibacterium flavum*)、ブレビバクテリウム・アンモニアゲネス(*Brevibacterium ammoniagenes*)又はブレビバクテリウム・ラクトファーメンタム(*Brevibacterium lactofermentum*)に属する微生物が挙げられる。

【0014】

上記細菌の親株の特に好ましい具体例としては、ブレビバクテリウム・フラバムMJ-233(FERM BP-1497)、同MJ-233 AB-41(FERM BP-1498)、ブレビバクテリウム・アンモニアゲネス ATCC 6872、コリネバクテリウム・グルタミカム ATCC 31831、及びブレビバクテリウム・ラクトファーメンタム ATCC 13869等が挙げられる。なお、ブレビバクテリウム・フラバムは、現在、コリネバクテリウム・グルタミカムに分類される場合もあることから(Liebl, W., Ehrmann, M., Ludwig, W. and Schleifer, K. H., *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1991, vol. 41, p255-260)、本発明においては、ブレビバクテリウム・フラバムMJ-233株、及びその変異株MJ-233 AB-41株はそれぞれ、コリネバクテリウム・グルタミカムMJ-233株及びMJ-233 AB-41株と同一の株であるものとする。

【0015】

なお、ブレビバクテリウム・フラバムMJ-233は、1975年4月28日に、通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所(現独立法人 産業技術総合研究所 特許寄託センター)(〒305-8566日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6)に受託番号FERM P-3068として寄託され、1981年5月1日にブダペスト条約に基づく国際寄託に移管され、受託番号FERM BP-1497が付与されている。

【0016】

微生物変換における反応温度、圧力等の反応条件は、選択される菌体、カビなど微生物の活性に依存することになるが、ジカルボン酸を得るための好適な条件を各々の場合に依りて選択すればよい。

微生物変換においては、pHが低くなると微生物の代謝活性が低くなったり、或いは微生物が活動を停止するようになり、製造歩留まりが悪化したり、微生物が死滅するため、通常には中和剤を使用する。通常はpHセンサーによって反応系内のpHを計測し、所定のpH範囲となるように中和剤の添加によりpHを調節する。中和剤の添加方法については特に制限はなく、連続添加であっても間欠添加であってもよい。

【0017】

中和剤としてはアンモニア、炭酸アンモニウム、尿素、アルカリ金属の水酸化物、アル

10

20

30

40

50

カリ土類金属の水酸化物、アルカリ金属の炭酸塩、アルカリ土類金属の炭酸塩が挙げられる。好ましくはアンモニア、炭酸アンモニウム、尿素である。なお上記アルカリ（土類）金属の水酸化物としては NaOH 、 KOH 、 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 、 $\text{Mg}(\text{OH})_2$ 等、或いはこれらの混合物などが挙げられ、アルカリ（土類）金属の炭酸塩としては、 Na_2CO_3 、 K_2CO_3 、 CaCO_3 、 MgCO_3 、 NaKCO_3 等、或いはこれらの混合物などが挙げられる。

【0018】

pH値は、用いる菌体、カビ等の微生物の種類に応じて、その活性が最も有効に発揮される範囲に調整されるが、一般的には、pH4～10、好ましくは6～9程度の範囲である。

10

発酵法を含む製造方法により得られるジカルボン酸の精製方法は、電気透析を用いる方法、イオン交換樹脂を用いる方法、塩交換法等が知られている。例えばジカルボン酸塩を分離し純粋な酸を生成する電気透析および水分解工程を組み合わせることで用いることによって製造し、更なる精製を、一連のイオン交換カラムに生成物ストリームを通すことによって達成しても良いし、ジカルボン酸の過飽和溶液に変換するための水分解電気透析を用いても良い（米国特許第5,034,105号明細書）。また、塩交換法としては、例えばジカルボン酸のアンモニア塩を硫酸水素アンモニウム及び／または硫酸と十分に低いpHで混合して反応させジカルボン酸及び硫酸アンモニウムを生成させても良い（特表2001-514900号公報）。イオン交換樹脂を用いる具体的方法としては、ジカルボン酸の溶液から遠心分離、濾過等により菌体等の固形分を除去した後、イオン交換樹脂で脱塩し、その溶液から結晶化或いはカラムクロマトグラフィーによりジカルボン酸を分離精製する方法が挙げられる。その他の精製方法としては、特開平3-30685に記載のように水酸化カルシウムを中和剤として醗酵し、硫酸により硫酸カルシウムを析出させて除去した後、強酸性イオン交換樹脂、弱塩基性イオン交換樹脂を用いて処理する方法や特開平2-283289に記載のように発酵法により生成した琥珀酸塩を、電気透析した後、強酸性イオン交換樹脂、弱塩基性イオン交換樹脂を用いて処理する方法が例示される。更には、USP6284904、ならびに特開2004-196768に記載の方法も好適に使用される。すなわち、本発明においては、精製方法はどのような方法を用いても良く、上記の、電気透析を用いる方法、イオン交換樹脂を用いる方法、硫酸等の酸で処理する方法、水、アルコール、カルボン酸或いはそれらの混合物を用いた晶析ならびに洗浄、ろ過、乾燥などの上記の公知文献や本発明の参考例に記載の任意の単位操作を任意の組み合わせで、必要に応じて繰り返し実施することにより本発明に適した精製されたモノマー原料を製造することができる。これらの中では、特に、コスト、効率の点でイオン交換法又は塩交換法が好ましく、工業的生産性の点で塩交換法が特に好ましい。

20

30

【0019】

精製によりジカルボン酸中に含まれる不純物の窒素化合物や金属カチオンの量を減らすことが、通常、実用的な重合体を得るために必要である。

上述の方法にてバイオマス資源から誘導されたジカルボン酸には、バイオマス資源由来、発酵処理ならびに酸による中和工程を含む精製処理に起因して不純物として窒素元素が含まれてくる。具体的には、アミノ酸、たんぱく質、アンモニウム塩、尿素、発酵菌由来等の窒素元素が含まれてくる。

40

【0020】

上述の方法にてバイオマス資源から誘導されたジカルボン酸中に含まれる窒素原子含有量は、ジカルボン酸中に、該ジカルボン酸に対して質量比で、上限は通常2000ppm以下、好ましくは、1000ppm以下、より好ましくは100ppm以下、最も好ましくは50ppm以下である。下限は通常、0.01ppm以上、好ましくは、精製工程の経済性の理由から0.1ppm以上である。本発明でいうppmとは、質量ppmである。

【0021】

窒素原子含有量は、元素分析法等の公知の方法や、アミノ酸分析計を用い、生体アミノ

50

酸分離条件にて試料中のアミノ酸やアンモニアを分離し、これらをニンヒドリン発色させて検出する方法により測定される値である。

窒素原子含有量が上記の範囲にあるジカルボン酸を用いることで、得られるポリエステルの着色の減少に有利になる。また、ポリエステルの重合反応の遅延化を抑制する効果も併せ持つ。

【0022】

ジカルボン酸中に含まれる不純物のアンモニアの量を効率的に減らす具体的な方法として、目的とするジカルボン酸よりもpHの高い弱酸性の有機酸を使用した反応晶析方法が挙げられる。

また、発酵法により製造したジカルボン酸を用いる場合には、酸による中和工程を含む精製処理により硫黄原子が含まれてくる場合がある。具体的に、硫黄原子が含有される不純物としては、硫酸、硫酸塩、亜硫酸、有機スルホン酸、有機スルホン酸塩等が挙げられる。

【0023】

ジカルボン酸中に含まれる硫黄原子含有量は、ジカルボン酸中に、該ジカルボン酸に対して質量比で、上限は通常1000ppm以下、好ましくは、100ppm以下、より好ましくは、上限が5ppm以下、最も好ましくは、上限は0.5ppm以下である。一方、下限は通常、0.001ppm以上、好ましくは、0.01ppm以上、より好ましくは、0.1ppm以上である。多すぎると、重合反応が遅延化したり、ポリマーの安定性が低下する傾向がある。また、本発明のように貯蔵容器の腐食の問題も発生する。一方、少なすぎる系は、好ましい形態であるが、精製工程が煩雑となり経済的に不利になる。硫黄原子含有量は、公知の元素分析法により測定される値である。

【0024】

本発明において、上述の方法で得られたバイオマス資源由来のジカルボン酸をポリエステル原料として使用するにあたり、重合系に連結される該ジカルボン酸を貯蔵するタンク内の酸素濃度を一定値以下に制御することが好ましい。これによりポリエステルの不純物である窒素源などの酸化反応による着色を防止することができる。

酸素濃度を制御し原料を貯蔵するためには、通常タンクが用いられる。しかし、タンク以外でも酸素濃度を制御できる装置であれば特に限定されない。貯蔵タンクの種類は具体的には限定は無く、公知の金属製もしくはこれらの内面にガラス、樹脂などのライニングを施したもの、さらにはガラス製、樹脂製の容器などが用いられる。強度の面などから金属製もしくはそれらにライニングを施したものが好んで用いられる。金属製タンクの材としては、公知のものが使用され、具体的には、炭素鋼、フェライト系ステンレス鋼、SUS410等のマルテンサイト系ステンレス鋼、SUS310、SUS304、SUS316等のオーステナイト系ステンレス鋼、クラッド鋼、鋳鉄、銅、銅合金、アルミニウム、インコネル、ハステロイ、チタン等が挙げられる。

【0025】

ジカルボン酸の貯蔵タンク内の酸素濃度は、貯蔵タンク全体積に対して、下限は特に限定されないが、通常0.00001%以上、好ましくは0.01%以上である。一方、上限が16%以下、好ましくは14%以下、より好ましくは、12%以下である。酸素濃度が低すぎる場合には、設備や管理工程が煩雑になり経済的に不利であり、一方、高すぎる場合には、製造されるポリマーの着色が増加する傾向がある。

【0026】

ジカルボン酸の貯蔵タンク内の温度は、下限が通常-50℃以上、好ましくは0℃以上である。一方、上限が通常200℃以下、好ましくは100℃以下、より好ましくは、50℃以下であるが、温度管理の必要がない理由から室温で貯蔵する方法が最も好ましい。温度が低すぎる場合には、貯蔵コストが増大する傾向があり、また、高すぎる場合には、カルボン酸の脱水反応等が併発する傾向がある。

【0027】

ジカルボン酸の貯蔵タンク内の湿度は、貯蔵タンク全体積に対して、下限は特に限定さ

10

20

30

40

50

れないが、通常 0.0001% R. H. 以上、好ましくは、0.001% R. H. 以上であり、より好ましくは、0.01% R. H. 以上、最も好ましくは、0.1% R. H. 以上であり、上限が 80% R. H. 以下、好ましくは 60% R. H. 以下、より好ましくは 40% R. H. 以下、更に好ましくは 30% R. H. 以下、最も好ましくは 10% R. H. 以下である。湿度が低すぎる場合には、管理工程が煩雑で経済的に不利になる傾向があり、また、高すぎる場合には、貯蔵タンクや配管へのジカルボン酸の付着、ジカルボン酸のブロック化、貯蔵タンクが金属製の場合にはタンクの腐食等が問題になる傾向がある。

特に、不純物硫黄原子含有量が高くなる程その傾向が増大する傾向がある。

ジカルボン酸の貯蔵タンク内の圧力は、通常、大気圧（常圧）である。

【0028】

10

（２）ジオール単位

本発明においてジオール単位とは、芳香族ジオール及び／又は脂肪族ジオールから誘導されるものであり、公知の化合物を用いることができるが、脂肪族ジオールを使用するのが好ましい。

脂肪族ジオールとは、２個のOH基を有する脂肪族及び脂環式化合物であれば特に制限はされないが、炭素数の下限値が２以上であり、上限値が通常１０以下、好ましくは６以下の脂肪族ジオールが挙げられる。

【0029】

脂肪族ジオールの具体例としては、例えば、エチレングリコール、１，３－プロピレングリコール、ネオペンチルグリコール、１，６－ヘキサメチレングリコール、デカメチレングリコール、１，４－ブタンジオール及び１，４－シクロヘキサジメタノール等が挙げられる。これらは、単独でも２種以上の混合物として使用してもよい。

20

この内、エチレングリコール、１，４－ブタンジオール、１，３－プロピレングリコール及び１，４－シクロヘキサジメタノールが好ましく、その中でも、エチレングリコール及び１，４－ブタンジオールが好ましく、更には、１，４－ブタンジオールが特に好ましい。

【0030】

芳香族ジオールとしては、２個のOH基を有する芳香族化合物であれば、特に制限はされないが、炭素数の下限値が６以上であり、上限値が通常１５以下の芳香族ジオールが挙げられる。芳香族ジオールの具体例としては、例えば、ヒドロキノン、１，５－ジヒドロキシナフタレン、４，４’－ジヒドロキシジフェニル、ビス（p－ヒドロキシフェニル）メタン及びビス（p－ヒドロキシフェニル）－２，２－プロパン等が挙げられる。本発明において、ジオール全量中、芳香族ジオールの含有量は、通常、３０モル％以下、好ましくは２０モル％以下、より好ましくは１０モル％以下である。

30

【0031】

また、両末端ヒドロキシポリエーテルを上記の脂肪族ジオールと混合して使用してもよい。両末端ヒドロキシポリエーテルとしては、炭素数は下限値が通常４以上、好ましくは１０以上であり、上限値が通常１０００以下、好ましくは２００以下、更に好ましくは１００以下である。

両末端ヒドロキシポリエーテルの具体例としては、例えば、ジエチレングリコール、トリエチレングリコール、ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、ポリテトラメチレングリコール、ポリ１，３－プロパンジオール及びポリ１，６－ヘキサメチレングリコール等が挙げられる。また、ポリエチレングリコールとポリプロピレングリコールとの共重合ポリエーテル等を使用することもできる。これらの両末端ヒドロキシポリエーテルの使用量は、ポリエステル中の含量として、通常９０重量％以下、好ましくは５０重量％以下、より好ましくは３０重量％以下に計算される量である。

40

【0032】

本発明において、これらのジオールは、バイオマス資源から合成されたものを用いてもよい。具体的には、ジオール化合物はグルコース等の炭素源から発酵法により直接製造してもよいし、発酵法により得られたジカルボン酸、ジカルボン酸無水物、環状エーテルを

50

化学反応によりジオール化合物に変換しても良い。

例えば 1, 4-ブタンジオールをコハク酸、コハク酸無水物、コハク酸エステル、マレイン酸、マレイン酸無水物、マレイン酸エステル、テトラヒドロフラン、 γ -ブチロラクトン等から化学合成により 1, 4-ブタンジオールを製造しても良いし、発酵法により得られた 1, 3-ブタジエンから 1, 4-ブタンジオールを製造してもよい。この中でもコハク酸を還元触媒により水添して 1, 4-ブタンジオールを得る方法が効率的で好ましい。

【0033】

コハク酸を水添する触媒の例として、Pd、Ru、Re、Rh、Ni、Cu、Co 及びその化合物が挙げられ、より具体的には、Pd/Ag/Re、Ru/Ni/Co/ZnO、Cu/Zn 酸化物、Cu/Zn/Cr 酸化物、Ru/Re、Re/C、Ru/Sn、Ru/Pt/Sn、Pt/Re/アルカリ、Pt/Re、Pd/Co/Re、Cu/Si、Cu/Cr/Mn、ReO/CuO/ZnO、CuO/CrO、Pd/Re、Ni/Co、Pd/CuO/CrO₃、リン酸 Ru、Ni/Co、Co/Ru/Mn、Cu/Pd/KOH、Cu/Cr/Zn が挙げられる。この中でも Ru/Sn 又は Ru/Pt/Sn が触媒活性の点で好ましい。

10

【0034】

更に、バイオマス資源から公知の有機化学触媒反応の組み合わせによりジオール化合物を製造する方法も積極的に用いられる。例えば、バイオマス資源としてペントースを利用する場合には公知の脱水反応、触媒反応の組み合わせで容易にブタンジオール等のジオールを製造できる。

20

バイオマス資源由来から誘導されたジオールには、バイオマス資源由来、発酵処理ならびに酸による中和工程を含む精製処理に起因して不純物として窒素原子が含まれてくる場合がある。この場合、具体的には、アミノ酸、たんぱく質、アンモニア、尿素、発酵菌由来の窒素原子が含まれてくる。

【0035】

発酵法により製造したジオール中に含まれる窒素原子含有量は、ジオール中に、ジオールに対して質量比で、上限は通常 2000 ppm 以下、好ましくは、1000 ppm 以下、より好ましくは 100 ppm 以下、最も好ましくは 50 ppm 以下である。下限は特に制限されないが、通常、0.01 ppm 以上、好ましくは、精製工程の経済性の理由から 0.1 ppm 以上である。

30

【0036】

発酵法により製造したジオールを用いる場合には、酸による中和工程を含む精製処理により硫黄原子が含まれてくる場合がある。この場合、具体的に、硫黄原子が含有される不純物としては、硫酸、亜硫酸、有機スルホン酸塩等が挙げられる。

ジオール中に含まれる硫黄原子含有量は、ジオール中に、ジオールに対して質量比で、上限は通常 100 ppm 以下、好ましくは、10 ppm 以下、より好ましくは、上限が 5 ppm 以下、最も好ましくは、上限は 0.5 ppm 以下である。一方、下限は特に制限されないが、通常、0.001 ppm 以上、好ましくは、0.01 ppm 以上、より好ましくは、0.1 ppm 以上である。多すぎると、重合反応が遅延化したり、製造するポリマーの安定性が低下する傾向がある。一方、硫黄原子含有量が少ない程、好ましい形態であるが、精製工程が煩雑となり経済的に不利になる。硫黄原子含有量は、公知の元素分析法により測定される値である。

40

【0037】

本発明において、上述の方法で得られたバイオマス資源由来のジオールをポリエステル原料として使用するにあたり、上記不純物に起因するポリエステルの着色を抑制するため、重合系に連結されるジオールを貯蔵するタンク内の酸素濃度や温度を制御してもよい。この制御により、不純物により促進されるジオールの酸化反応が抑制され、不純物自身の着色やジオール酸化生成物によるポリエステルの着色を防止することができる。

【0038】

50

酸素濃度を制御し原料を貯蔵するためには、通常タンクが用いられる。しかし、タンク以外でも酸素濃度を制御できる装置であれば特に限定されない。貯蔵タンクの種類は具体的には限定は無く、公知の金属製もしくはこれらの内面にガラス、樹脂などのライニングを施したものの、さらにはガラス製、樹脂製の容器などが用いられる。強度の面などから金属製もしくはそれらにライニングを施したものが好んで用いられる。金属製タンクの材としては、公知のものが使用され、具体的には、炭素鋼、フェライト系ステンレス鋼、SUS 410等のマルテンサイト系ステンレス鋼、SUS 310、SUS 304、SUS 316等のオーステナイト系ステンレス鋼、クラッド鋼、鋳鉄、銅、銅合金、アルミニウム、インコネル、ハステロイ、チタン等が挙げられる。

【0039】

ジオールの貯蔵タンク内の酸素濃度は、貯蔵タンク全体積に対して、下限は特に限定されないが、通常0.00001%以上、好ましくは0.0001%以上であり、より好ましくは、0.001%以上、最も好ましくは、0.01%以上であり、上限が通常10%以下、好ましくは5%以下、より好ましくは、1%以下、最も好ましくは、0.1%以下である。酸素濃度が低すぎる場合には、管理工程が煩雑となり経済的に不利になる傾向があり、また、高すぎる場合には、ジオールの酸化反応生成物によるポリマーの着色が増大する傾向がある。

【0040】

ジオールの貯蔵タンク内の貯蔵温度は、下限が15℃以上、好ましくは30℃以上であり、より好ましくは、50℃以上、最も好ましくは、100℃以上であり、上限が230℃以下、好ましくは200℃以下、より好ましくは、180℃以下、最も好ましくは、160℃以下である。温度が低すぎる場合には、ポリエステル製造時の昇温に時間を要し、ポリエステル製造が経済的に不利になる傾向があるばかりかジオールの種類によっては固化してしまう場合がある。一方、高すぎる場合には、ジオールの気化により高圧対応の貯蔵設備が必要となり経済的に不利になるばかりかジオールの劣化が増大する傾向がある。

【0041】

ジオールの貯蔵タンク内の圧力は、通常大気圧である。圧力が低すぎたり、高すぎる場合には、管理設備が煩雑になり経済的に不利となる。

本発明においては、上記のジオール成分とジカルボン酸成分に加えて、共重合成分を加えてもよい。

共重合成分の具体的な例としては、2官能のオキシカルボン酸や、架橋構造を形成するために3官能以上の多価アルコール、3官能以上の多価カルボン酸及び／又はその無水物並びに3官能以上のオキシカルボン酸からなる群から選ばれる少なくとも1種の多官能化合物が挙げられる。これらの共重合成分の中では、高重合度のポリエステルが容易に製造できる傾向があるため、特に2官能及び／又は3官能以上のオキシカルボン酸が好適に使用される。その中でも、3官能以上のオキシカルボン酸の使用は、後述する鎖延長剤を使用することなく、極少量で容易に高重合度のポリエステルを製造できるのでもっとも好ましい方法である。

【0042】

2官能のオキシカルボン酸としては、具体的には、乳酸、グリコール酸、ヒドロキシ酪酸、ヒドロキシカプロン酸、2-ヒドロキシ3,3-ジメチル酪酸、2-ヒドロキシ3-メチル酪酸、2-ヒドロキシイソカプロン酸等が挙げられるが、これらはオキシカルボン酸のエステルやラクトン、或いはオキシカルボン酸重合体等の誘導体であっても良い。また、これらオキシカルボン酸は単独でも、二種以上の混合物として使用することもできる。これらに光学異性体が存在する場合には、D体、L体、またはラセミ体のいずれでもよく、形態としては固体、液体、または水溶液であってもよい。これらの中では、入手の容易な乳酸またはグリコール酸が特に好ましい。形態は、30～95%の水溶液のものが容易に入手することができるので好ましい。高重合度のポリエステルを容易に製造する目的で2官能のオキシカルボン酸を共重合成分として使用する場合、その効果が発現する使用量の下限としては、通常、原料モノマーに対して通常、0.02モル%以上、好ましく

10

20

30

40

50

は0.5モル%以上、より好ましくは1.0モル%以上である。一方、使用量の上限は、通常30モル%以下、好ましくは20モル%以下、より好ましくは10モル%以下である。

【0043】

3官能以上の多価アルコールとしては、具体的には、グリセリン、トリメチロールプロパン、ペンタエリスリトール等が挙げられ、単独でも、二種以上の混合物として使用することもできる。

3官能以上の多価カルボン酸またはその無水物としては、具体的には、プロパントリカルボン酸、無水ピロメリット酸、ベンゾフェノンテトラカルボン酸無水物、シクロペンタテトラカルボン酸無水物等が挙げられ、単独でも、二種以上の混合物として使用することもできる。

10

【0044】

3官能以上のオキシカルボン酸としては、具体的には、リンゴ酸、ヒドロキシグルタル酸、ヒドロキシメチルグルタル酸、酒石酸、クエン酸、ヒドロキシイソフタル酸、ヒドロキシテレフタル酸等が挙げられ、単独でも、二種以上の混合物として使用することもできる。特に、入手のし易さから、リンゴ酸、酒石酸、クエン酸ならびにその混合物が好ましい。

【0045】

上記の3官能以上の多官能化合物単位の量は、ゲルの発生原因となるため通常、ポリエステルを構成する全単量体単位に対して、上限値が通常、5モル%以下、好ましくは1モル%以下、更に好ましくは、0.50モル%以下、特に好ましくは0.3モル%以下である。一方、高重合度のポリエステルを容易に製造する目的で3官能以上の化合物を共重成分として使用する場合、その効果が発現する使用量の下限値としては、通常、0.0001モル%以上、好ましくは、0.001モル%以上、より好ましくは、0.005モル%以上、特に好ましくは0.01モル%以上である。

20

【0046】

また、ポリエステルの融点の下限は、通常、50℃以上あり、好ましくは、60℃以上、より好ましくは、80℃以上である。また上限は、脂肪族ポリエステルの場合、140℃以下であり、好ましくは130℃以下である。

本発明の脂肪族ポリエステルは、カーボネート化合物やジイソシアネート化合物等の鎖延長剤を使用することもできるが、その量は、通常、ポリエステルを構成する全単量体単位に対し、カーボネート結合ならびにウレタン結合が10モル%以下である。しかしながら、本発明のポリエステルを生分解性樹脂として使用する場合には、ジイソシアネートやカーボネート結合が存在すると、生分解性を阻害する可能性があるため、その使用量は、ポリエステルを構成する全単量体単位に対し、カーボネート結合が1モル%未満、好ましくは、0.5モル%以下、より好ましくは0.1モル%以下であり、ウレタン結合が、0.06モル%未満、好ましくは0.01モル%以下、より好ましくは0.001モル%以下である。

30

【0047】

カーボネート化合物としては、具体的には、ジフェニルカーボネート、ジトリールカーボネート、ビス(クロロフェニル)カーボネート、*m*-クレジルカーボネート、ジナフチルカーボネート、ジメチルカーボネート、ジエチルカーボネート、ジブチルカーボネート、エチレンカーボネート、ジアミルカーボネート、ジシクロヘキシルカーボネートなどが例示される。その他、フェノール類、アルコール類のようなヒドロキシ化合物から誘導される、同種、または異種のヒドロキシ化合物からなるカーボネート化合物が使用可能である。

40

【0048】

ジイソシアネート化合物としては、具体的には、2,4-トリレンジイソシアネート、2,4-トリレンジイソシアネートと2,6-トリレンジイソシアネートとの混合体、ジフェニルメタンジイソシアネート、1,5-ナフチレンジイソシアネート、キシリレンジ

50

イソシアネート、水素化キシリレンジイソシアネート、ヘキサメチレンジイソシアネート、イソホロンジイソシアネート等の公知のジイソシアネートなどが例示される。

【0049】

また、その他の鎖延長剤として、ジオキサゾリン、珪酸エステルなどを使用してもよい。珪酸エステルとしては、具体的には、テトラメトキシシラン、ジメトキシジフェニルシラン、ジメトキシジメチルシラン、ジフェニルジヒドロキシシラン等が例示される。

珪酸エステルは、環境保全ならびに安全性の面の理由からは、特にその使用量に制限はされないが、操作が煩雑になったり、重合速度に影響を与える可能性があるため、その使用量は少ない方がよい場合がある。従って、この含有量は、0.1モル%以下とするのが好ましく、 10^{-5} モル%以下とするのが更に好ましい。

10

【0050】

本発明においては実質上鎖延長剤を含有しないポリエステルが最も好ましい。但し、熔融テンションを高めるために、毒性の低い化合物を添加する限り、少量のパーオキサイドを添加してもよい。

また本発明においては、ポリエステル末端基をカルボジイミド、エポキシ化合物、単官能性のアルコール又はカルボン酸で封止しても良い。

【0051】

＜ポリエステルの製造方法＞

ジオール単位及びジカルボン酸単位を主体とするポリエステルの製造は、反応に供するジカルボン酸を貯蔵するタンク内の湿度を前述した範囲とする他は、ポリエステルを製造する公知技術で行うことができる。このポリエステルを製造する際の重合反応は、従来から採用されている適切な条件を設定することができ、特に制限されない。具体的には、上記のジカルボン酸成分とジオール成分、更にオキシカルボン酸単位や3官能以上の成分を導入する場合には、それらの成分も含めたジカルボン酸成分とジオール成分とのエステル化反応及び／又はエステル交換反応を行った後、減圧下での重縮合反応を行うといった溶融重合の一般的な方法や、有機溶媒を用いた公知の溶液加熱脱水縮合方法によって製造することができるが、経済性ならびに製造工程の簡略性の観点から、無溶媒下で行う溶融重合法が好ましい。

20

【0052】

ポリエステルを製造する際に用いるジオールの使用量は、ジカルボン酸またはその誘導体100モルに対し、実質的に等モルであるが、一般には、エステル化及び／又はエステル交換反応及び／又は縮重合反応中の留出があることから、0.1～20モル%過剰に用いられる。

30

また、重縮合反応は、重合触媒の存在下に行うのが好ましい。重合触媒の添加時期は、重縮合反応以前であれば特に限定されず、原料仕込み時に添加しておいてもよく、減圧開始時に添加してもよい。

【0053】

重合触媒としては、一般には、周期表で、水素、炭素を除く1族～14族金属元素を含む化合物が挙げられる。具体的には、チタン、ジルコニウム、錫、アンチモン、セリウム、ゲルマニウム、亜鉛、コバルト、マンガン、鉄、アルミニウム、マグネシウム、カルシウム、ストロンチウム、ナトリウム及びカリウムからなる群から選ばれた、少なくとも1種以上の金属を含むカルボン酸塩、アルコキシ塩、有機スルホン酸塩又はβ-ジケトナート塩等の有機基を含む化合物、更には前記した金属の酸化物、ハロゲン化物等の無機化合物及びそれらの混合物が挙げられる。

40

【0054】

これらの中では、チタン、ジルコニウム、ゲルマニウム、亜鉛、アルミニウム、マグネシウム及びカルシウムを含む金属化合物、並びにそれらの混合物が好ましく、その中でも、特に、チタン化合物及びゲルマニウム化合物が好ましい。また、触媒は、重合時に溶融或いは溶解した状態であると重合速度が高くなる理由から、重合時に液状であるか、エステル低重合体やポリエステルに溶解する化合物が好ましい。

50

【0055】

チタン化合物としては、テトラアルキルチタネートが好ましく、具体的には、テトラ-*n*-プロピルチタネート、テトライソプロピルチタネート、テトラ-*n*-ブチルチタネート、テトラ-*t*-ブチルチタネート、テトラフェニルチタネート、テトラシクロヘキシルチタネート、テトラベンジルチタネート及びこれらの混合チタネートが挙げられる。また、チタン（オキシ）アセチルアセトネート、チタンテトラアセチルアセトネート、チタン（ジイソプロキシド）アセチルアセトネート、チタンビス（アンモニウムラクテイト）ジヒドロキシド、チタンビス（エチルアセトアセテート）ジイソプロポキシド、チタン（トリエタノールアミネート）イソプロポキシド、ポリヒドロキシチタンステアレート、チタンラクテート、チタントリエタノールアミネート、ブチルチタネートダイマー等も好んで用いられる。更には、酸化チタンや、チタンと珪素を含む複合酸化物（例えば、A c o r d i s Industrial Fibers 社製のチタニア／シリカ複合酸化物（製品名：C-94））も好んで用いられる。これらの中では、テトラ-*n*-プロピルチタネート、テトライソプロピルチタネート及びテトラ-*n*-ブチルチタネート、チタン（オキシ）アセチルアセトネート、チタンテトラアセチルアセトネート、チタンビス（アンモニウムラクテイト）ジヒドロキシド、ポリヒドロキシチタンステアレート、チタンラクテート、ブチルチタネートダイマー、酸化チタン、チタニア／シリカ複合酸化物（例えば、A c o r d i s Industrial Fibers 社製の製品名：C-94）が好ましく、テトラ-*n*-ブチルチタネート、チタン（オキシ）アセチルアセトネート、チタンテトラアセチルアセトネート、ポリヒドロキシチタンステアレート、チタンラクテート、ブチルチタネートダイマー、チタニア／シリカ複合酸化物（例えば、A c o r d i s Industrial Fibers 社製の製品名：C-94）がより好ましく、特に、テトラ-*n*-ブチルチタネート、ポリヒドロキシチタンステアレート、チタン（オキシ）アセチルアセトネート、チタンテトラアセチルアセトネート、チタニア／シリカ複合酸化物（例えば、A c o r d i s Industrial Fibers 社製の製品名：C-94）が好ましい。

【0056】

ジルコニウム化合物としては、具体的には、ジルコニウムテトラアセテイト、ジルコニウムアセテイトヒドロキシド、ジルコニウムトリス（ブトキシ）ステアレート、ジルコニルジアセテイト、シュウ酸ジルコニウム、シュウ酸ジルコニル、シュウ酸ジルコニウムカリウム、ポリヒドロキシジルコニウムステアレート、ジルコニウムエトキシド、ジルコニウムテトラ-*n*-プロポキシド、ジルコニウムテトライソプロポキシド、ジルコニウムテトラ-*n*-ブトキシド、ジルコニウムテトラ-*t*-ブトキシド、ジルコニウムトリブトキシアセチルアセトネートならびにそれらの混合物が例示される。更には、酸化ジルコニウムや、例えばジルコニウムと珪素を含む複合酸化物も好適に使用される。これらの中では、ジルコニルジアセテイト、ジルコニウムトリス（ブトキシ）ステアレート、ジルコニウムテトラアセテイト、ジルコニウムアセテイトヒドロキシド、シュウ酸ジルコニウムアンモニウム、シュウ酸ジルコニウムカリウム、ポリヒドロキシジルコニウムステアレート、ジルコニウムテトラ-*n*-プロポキシド、ジルコニウムテトライソプロポキシド、ジルコニウムテトラ-*n*-ブトキシド、ジルコニウムテトラ-*t*-ブトキシドが好ましく、ジルコニルジアセテイト、ジルコニウムテトラアセテイト、ジルコニウムアセテイトヒドロキシド、ジルコニウムトリス（ブトキシ）ステアレート、シュウ酸ジルコニウムアンモニウム、ジルコニウムテトラ-*n*-プロポキシド、ジルコニウムテトラ-*n*-ブトキシドがより好ましく、特にジルコニウムトリス（ブトキシ）ステアレートが着色のない高重合度のポリエステルが容易に得られる理由から好ましい。

【0057】

ゲルマニウム化合物としては、具体的には、酸化ゲルマニウムや塩化ゲルマニウム等の無機ゲルマニウム化合物、テトラアルコキシゲルマニウムなどの有機ゲルマニウム化合物が挙げられる。価格や入手の容易さなどから、酸化ゲルマニウム、テトラエトキシゲルマニウム及びテトラブトキシゲルマニウムなどが好ましく、特に、酸化ゲルマニウムが好ま

しい。

【0058】

これらの重合触媒として金属化合物を用いる場合の触媒添加量は、生成するポリエステルに対する金属量として、下限値が通常5ppm以上、好ましくは10ppm以上であり、上限値が通常30000ppm以下、好ましくは1000ppm以下、より好ましくは250ppm以下、特に好ましくは130ppm以下である。使用する触媒量が多すぎると、経済的に不利であるばかりでなくポリマーの熱安定性が低くなるのに対し、逆に少なすぎると重合活性が低くなり、それに伴いポリマー製造中にポリマーの分解が誘発されやすくなる。

【0059】

ジカルボン酸成分とジオール成分とのエステル化反応及び／又はエステル交換反応の反応温度は、下限が通常150℃以上、好ましくは180℃以上、上限が通常260℃以下、好ましくは250℃以下である。反応雰囲気は、通常、窒素、アルゴン等の不活性ガス雰囲気下である。反応圧力は、通常、常圧～10kPaであるが、常圧が好ましい。

反応時間は、下限が通常1時間以上であり、上限が通常10時間以下、好ましくは、4時間以下である。

【0060】

ジカルボン酸成分とジオール成分とのエステル化反応及び／又はエステル交換反応後の重縮合反応は、圧力を、下限が通常 0.01×10^3 Pa以上、好ましくは 0.05×10^3 Pa以上であり、上限が通常 1.4×10^3 Pa以下、好ましくは 0.4×10^3 Pa以下の真空度下として行う。この時の反応温度は、下限が通常150℃以上、好ましくは180℃以上であり、上限が通常260℃以下、好ましくは250℃以下の範囲である。反応時間は、下限が通常2時間以上であり、上限が通常15時間以下、好ましくは10時間以下である。

【0061】

本発明においてポリエステルを製造する反応装置としては、公知の縦型あるいは横型攪拌槽型反応器を用いることができる。例えば、同一又は異なる反応装置を用いて、熔融重合のエステル化及び／又はエステル交換の工程と減圧重縮合の工程の2段階で行い、減圧重縮合の反応器としては、真空ポンプと反応器を結ぶ減圧用排気管を具備した攪拌槽型反応器を使用する方法が挙げられる。また、真空ポンプと反応器とを結ぶ減圧用排気管の間には凝縮器を結合し、該凝縮器にて重縮合反応中に生成する揮発成分や未反応ジカルボン酸を回収する方法が好んで用いられる。

【0062】

本発明においては、ポリエステルの製造方法として、従来の、上記の脂肪族ジカルボン酸を含むジカルボン酸成分と脂肪族ジオール成分とのエステル化反応及び／又はエステル交換反応を行った後、減圧下で、ポリエステルのアルコール末端のエステル交換反応により生成するジオールを留去しながらポリエステルの重合度を高める方法、或いは、ポリエステルの脂肪族カルボン酸末端から脂肪族ジカルボン酸及び／又はその酸無水物環状体を留去させながらポリエステルの重合度を高める方法が用いられる。後者の場合、脂肪族カルボン酸及び／又はその無水物環状体の除去は、通常、上記熔融重合工程における後段の減圧下での重縮合反応中に脂肪族ジカルボン酸及び／又はその酸無水物環状体を加熱留出させる方法が採られるが、重縮合反応条件下では、脂肪族ジカルボン酸は容易に酸無水物環状体になりやすいため、酸無水物環状体の形態で加熱留出させる場合が多い。また、その際、ジオールから誘導される鎖状又は環状エーテル及び／又はジオールもまた脂肪族ジカルボン酸及び／又はその酸無水物環状体と共に除去されてもよい。更に、ジカルボン酸成分とジオール成分の環状単量体を共に留去させる方法は、重合速度が向上するため、好ましい態様である。

【0063】

また、ポリエステルの製造工程の途中、又は製造されたポリエステルには、その特性が損なわれない範囲において各種の添加剤、例えば、可塑剤、紫外線安定化剤、着色防止剤

10

20

30

40

50

、艶消し剤、消臭剤、難燃剤、耐候剤、帯電防止剤、糸摩擦低減剤、離型剤、抗酸化剤、イオン交換剤あるいは着色顔料等として無機微粒子や有機化合物を必要に応じて添加してもよい。着色顔料としては、カーボンブラック、酸化チタン、酸化亜鉛、酸化鉄などの無機顔料の他、シアニン系、スチレン系、フタロシアイン系、アンスラキノ系、ペリノン系、イソインドリノン系、キノフタロン系、キノクリドン系、チオインディゴ系などの有機顔料等を使用することができる。また、炭酸カルシウムやシリカなどの改質剤も使用することができる。

【0064】

＜ポリエステルの物性＞

本発明のポリエステルの数平均分子量は、ポリスチレン換算で通常、下限が通常5000以上、好ましくは1万以上、より好ましくは、1.5万以上であり、上限が通常50万以下、好ましくは30万以下である。

本発明のポリエステル中に共有結合された官能基以外で含まれる窒素原子含有量は100ppm以下である。ポリエステル中に共有結合された官能基以外で含まれる窒素原子含有量は好ましくは500ppm以下、より好ましくは100ppm以下、更に好ましくは50ppm以下であり、その中でも40ppm以下が好ましく、更には30ppm以下が好ましく、20ppm以下が最も好ましい。重合体中のポリエステル中に共有結合された官能基以外で含まれる窒素原子含有量は主に原料中の窒素元素に由来するものであるが、ポリエステル中に共有結合された官能基以外で含まれる窒素原子含有量が1000ppm以下であると成型時の着色や異物の発生が少なく、成型後製品の熱または光等の劣化や加水分解が起こりにくく好ましい。また、ポリエステル中に共有結合された官能基以外で含まれる窒素原子含有量が100ppm以下であるとポリエステルの着色や異物の発生が少なく用途によってはより好ましい。その含有量がより少ないとその効果は顕著となる。一方、共有結合された官能基以外でポリエステル中に含まれる窒素原子含有量は、0.01ppm以上が好ましい。より好ましくは0.05ppm以上、さらに好ましくは0.1ppm以上、特に好ましくは1ppm以上である。窒素原子含有量が0.01ppm未満では原料の精製の際の負荷がかかりエネルギー上不利であり、環境に対しての影響も無視できない。また窒素原子含有量が1ppm以上であると脂肪族ポリエステルの場合は土壌における生分解速度が促進され好ましい。窒素原子含有量が上記の範囲にある原料を用いることで、通常には、重合反応において、ポリエステルの重合速度を低下させず、かつ得られるポリエステルの生分解性を促進させることができる。窒素原子含有量は、後述するような従来公知の方法である化学発光法により測定することができる。

また、本発明においては、ポリエステル中に共有結合された官能基とは、上記のジイソシアネート化合物やカルボジイミド化合物から誘導されたウレタン官能基、未反応のイソシアネート官能基、尿素官能基、イソ尿素官能基ならびに未反応のカルボジイミド官能基を指す。従って、本発明においては、ポリエステル中に共有結合された官能基以外で含まれる窒素原子含有量は、ポリエステル中に含まれる総窒素原子含有量から上記のウレタン官能基、未反応のイソシアネート官能基、尿素官能基、イソ尿素官能基ならびに未反応のカルボジイミド官能基に帰属される窒素原子含有量を差し引いた値である。ウレタン官能基、未反応のイソシアネート官能基、尿素官能基、イソ尿素官能基ならびに未反応のカルボジイミド官能基の含有量は、上記の ^{13}C NMRやIR等の分光学的測定やポリエステルの製造時の仕込み量から算出される。

【0065】

本発明のポリエステル中に含まれる窒素含有量と原料中に含まれるアンモニア含有量の比は0より大きく0.9以下であるが好ましく、より好ましくは0より大きく0.6以下である。

本発明のポリエステル中の硫黄原子含有量は、原子換算として、上限が、500ppm以下、好ましくは、50ppm以下、より好ましくは、3ppm以下、最も好ましくは、0.3ppm以下である。一方、下限は、特に限定されないが、0.0001ppm以上、好ましくは、0.001ppm以上、より好ましくは、0.01ppm以上であり、最

も好ましくは、0.1 ppm以上である。硫黄含有量が多すぎるとポリエステル熱安定性や耐加水分解性が低下する傾向があり、少なすぎる系は精製コストが著しく高くなりポリエステルの製造においては経済的に不利になる傾向がある。

【0066】

本発明で製造されるポリエステルの還元粘度 (η_{sp}/c) 値は、実用上十分な力学特性が得られる理由から、下限は1.4以上であり、1.6以上が好ましく、更には1.8以上が好ましく、2.0以上が特に好ましい。還元粘度 (η_{sp}/c) 値の上限は、ポリエステルの重合反応後の抜き出し易さならびに成形のし易さ等の操作性の観点から、通常、6.0以下、好ましくは5.0以下、更に好ましくは4.0以下である。

【0067】

本発明でいう還元粘度は以下の測定条件により測定されたものである。

〔還元粘度 (η_{sp}/c) 測定条件〕

粘度管：ウベローデ粘度管

測定温度：30℃

溶媒：フェノール／テトラクロロエタン（1：1重量比）溶液

ポリエステル濃度：0.5 g/dl

本発明のポリエステルは、ポリエステル（0.5 g）をフェノール／テトラクロロエタン（1：1重量比）溶液（容量：1 dl）に室温で溶解させた際、均一に溶解するポリエステルが好ましく、ポリエステルの不溶成分が生じる場合、通常、不溶成分量は全ポリエステル中、1重量%以下、より好ましくは、0.1重量%以下、特に好ましくは0.01重量%以下であることが好ましい。

【0068】

本発明のポリエステルのカルボキシル基末端濃度は、通常、100当量／トン以下であるが、より好ましくは、その濃度は、50当量／トン以下、特に、35当量／トン以下、更には25当量／トン以下であることが好ましく、0.1当量／トン以上、好ましくは0.5当量／トン以上、特に1当量／トン以上が好ましい。この量が多くなると、ポリマーの成形時の熱安定性や比較的長期の使用・保管時の耐加水分解性が低下する傾向があり、カルボキシル基が少なすぎるポリマーは、より好ましい形態ではあるが、このようなポリマーを製造するには極めて高額な設備投資を要する他、多大な製造時間を要するなど経済的に不利な点である。末端カルボキシル基量は、通常、公知の滴定方法により算出されるが、本発明においては、得られたポリエステルのベンジルアルコールに溶解し0.1 N NaOHにて滴定した値であり、 1×10^6 g当たりのカルボキシル基当量である。

本発明で製造されるポリエステルは、通常、着色の少ないポリエステルであることが好ましい。本発明のポリエステルの黄色度（YI値）は、その上限が、通常、50以下、好ましくは30以下、より好ましくは20以下、更に好ましくは15以下、特に好ましくは10以下であり、一方、その下限は、特に限定されないが、通常-20以上、好ましくは、-10以上、より好ましくは、-5以上、特に好ましくは-3以上、最も好ましくは-1以上である。高いYI値を示すポリエステルは、フィルムやシート等の使用用途が制限される欠点を有する。一方、低いYI値を示すポリエステルは、より好ましい形態ではあるが、このようなポリマーを製造するには製造プロセスが煩雑で極めて高額な設備投資を要するなど経済的に不利な点がある。本発明において、YI値は、JIS K 7105に基づく方法で測定される値である。

＜ポリエステル組成物の用途＞

本発明に係るポリエステルは、射出成形法、中空成形法および押出成形法などの汎用プラスチック成形法などにより、フィルム、ラミネートフィルム、シート、板、延伸シート、モノフィラメント、マルチフィラメント、不織布、フラットヤーン、ステープル、捲縮繊維、筋付きテープ、スプリットヤーン、複合繊維、ブローボトル、発泡体などの成形品に利用可能である。その際、結晶核剤、酸化防止剤、滑剤、着色剤、離型剤、フィラー、他のポリマーなど、必要に応じ添加することができる。

【0069】

さらに、本発明に係るポリエステルは、従来の石油由来のポリマーに比較し環境に対する負荷が少ないため今後、ショッピングバッグ、ゴミ袋、農業用フィルム、化粧品容器、洗剤容器、漂白剤容器、釣り糸、漁網、ロープ、結束材、手術糸、衛生用カバーストック材、保冷箱、クッション材、医療材料、電気機器材料、家電筐体、自動車材料などの用途への使用が期待される。

【実施例】

【0070】

以下、本発明を実施例により具体的に説明するが、本発明はその要旨を超えない限り、これら実施例に限定されるものではない。なお、以下の例における特性値は、次の方法により測定した。

10

希薄溶液粘度（還元粘度）：ポリエステルを濃度 0.5 g/dL となるようにフェノール／テトラクロロエタン（1／1（質量比）混合液）に溶解し、溶液が 30°C の恒温槽中で粘度管を落下する時間 t （sec）を測定した。また溶媒のみの落下する時間 t_0 （sec）を測定し 30°C での還元粘度 η_{sp}/C （ $= (t - t_0) / t_0 \cdot C$ ）を算出した（ C は溶液の濃度）。

【0071】

硫黄原子含有量：試料約 0.1 g を白金製ボートに採取して石英管管状炉（三菱化学社製 A Q F - 100（濃縮システム））で燃焼し、燃焼ガス中の硫黄分を 0.1% - 過酸化水素水で吸収させた。その後、吸収液中の硫酸イオンをイオンクロマトグラフ（Dionex 社製 ICS - 1000 型）を用いて測定した。

20

YI 値：JIS K 7105 の方法に基づいて測定した。

【0072】

参考例 1

< 遺伝子破壊用ベクターの構築 >

（A）枯草菌ゲノム DNA の抽出

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、枯草菌（*Bacillus subtilis* ISW 1214）を対数増殖期後期まで培養し、菌体を集めた。得られた菌体を 10 mg/mL の濃度にリゾチームを含む $10 \text{ mM NaCl} / 20 \text{ mM}$ トリス緩衝液（ $\text{pH} 8.0$ ）／ $1 \text{ mM EDTA} \cdot 2 \text{ Na}$ 溶液 0.15 mL に懸濁した。

30

【0073】

次に、上記懸濁液にプロテナーゼ K を、最終濃度が $100 \mu\text{g/mL}$ になるように添加し、 37°C 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°C 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（ $5,000 \times g$ 、20 分間、 $10 \sim 12^\circ\text{C}$ ）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（ $15,000 \times g$ 、2 分）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（ $\text{pH} 7.5$ ）－ $1 \text{ mM EDTA} \cdot 2 \text{ Na}$ 溶液 5 mL を加え、 4°C で一晩静置し、以後の PCR の鋳型 DNA に使用した。

40

【0074】

（B）PCR による SacB 遺伝子の増幅およびクローニング

枯草菌 SacB 遺伝子の取得は、上記（A）で調製した DNA を鋳型とし、既に報告されている該遺伝子の塩基配列（GenBank Database Accession No. X02730）を基に設計した合成 DNA（配列番号 1 および配列番号 2）を用いた PCR によって行った。

【0075】

反応液組成：鋳型 DNA $1 \mu\text{L}$ 、Pfx DNA ポリメラーゼ（インビトロジェン社製） $0.2 \mu\text{L}$ 、1 倍濃度添付バッファー、 $0.3 \mu\text{M}$ 各々プライマー、 1 mM MgSO_4 、 $0.25 \mu\text{M}$ dNTPs を混合し、全量を $20 \mu\text{L}$ とした。

50

反応温度条件：DNAサーマルサイクラー PTC-200 (MJ Research 社製) を用い、94℃で20秒、68℃で2分からなるサイクルを35回繰り返した。但し、1サイクル目の94℃での保温は1分20秒、最終サイクルの68℃での保温は5分とした。

【0076】

増幅産物の確認は、0.75%アガロース (SeaKem GTG agarose : MCBioProducts 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行い、約2kbの断片を検出した。ゲルからの目的DNA断片の回収は、QIAQuick Gel Extraction Kit (QIAGEN 製) を用いて行った。

10

【0077】

回収したDNA断片は、T4 ポリヌクレオチドキナーゼ (T4 Polynucleotide Kinase : 宝酒造製) により5'末端をリン酸化した後、ライゲーションキット ver. 2 (宝酒造製) を用いて大腸菌ベクター (pBluescript II : STRATEGENE 製) のEcoRV部位に結合し、得られたプラスミドDNAで大腸菌 (DH5α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50μg/mLアンピシリンおよび50μg/mL X-Galを含むLB寒天培地 [トリプトン10g、イーストエキストラクト5g、NaCl 5g及び寒天15gを蒸留水1Lに溶解] に塗抹した。

【0078】

この培地上で白色のコロニーを形成したクローンを、次に50μg/mLアンピシリンおよび10%ショ糖を含むLB寒天培地に移し37℃で24時間培養した。これらのクローンのうち、ショ糖を含む培地で生育できなかったものについて、常法により液体培養した後、プラスミドDNAを精製した。SacB遺伝子が大腸菌内で機能的に発現する株は、ショ糖含有培地にて生育不能となるはずである。得られたプラスミドDNAを制限酵素SalIおよびPstIで切断することにより、約2kbの挿入断片が認められ、該プラスミドをpBS/SacBと命名した。

20

【0079】

(C) クロラムフェニコール耐性SacBベクターの構築

大腸菌プラスミドベクターpHSG396 (宝酒造：クロラムフェニコール耐性マーカー) 500ngに制限酵素PshBI10ユニットを37℃で一時間反応させた後、フェノール/クロロホルム抽出およびエタノール沈殿により回収した。クレノウフラグメント (Klenow Fragment : 宝酒造製) により両末端を平滑化した後、ライゲーションキット ver. 2 (宝酒造製) を用いてMluIリンカー (宝酒造) を連結、環状化させ、大腸菌 (DH5α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34μg/mLクロラムフェニコールを含むLB寒天培地に塗抹した。得られたクローンから常法によりプラスミドDNAを調製し、制限酵素MluIの切断部位を有するクローンを選抜し、pHSG396Mluと命名した。

30

【0080】

一方、上記(B)にて構築したpBS/SacBを制限酵素SalIおよびPstIで切断した後、クレノウフラグメントにて末端を平滑化した。これにライゲーションキット ver. 2 (宝酒造製) を用いてMluIリンカーを連結したのち、0.75%アガロースゲル電気泳動によりSacB遺伝子を含む約2.0kbのDNA断片を分離、回収した。このSacB遺伝子断片を、制限酵素MluI切断後、アルカリフォスファターゼ (Alkaline Phosphatase Calf intestine : 宝酒造) にて末端を脱リン酸化したpHSG396Mlu断片とライゲーションキット ver. 2 (宝酒造製) を用いて連結させ、大腸菌 (DH5α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34μg/mLクロラムフェニコールを含むLB寒天培地に塗抹した。こうして得られたコロニーを、次に34μg/mLクロラムフェニコールおよび10%ショ糖を含むLB寒天培地に移し37℃で24時間培養した。これらのクローンのうち、

40

50

ショ糖を含む培地で生育できなかったものについて、常法によりプラスミドDNAを精製した。こうして得られたプラスミドDNAをMluI切断により解析した結果、約2.0 kbの挿入断片を持つことが確認され、これをpCMB1と命名した。

【0081】

(D) カナマイシン耐性遺伝子の取得

カナマイシン耐性遺伝子の取得は、大腸菌プラスミドベクターpHSG299（宝酒造：カナマイシン耐性マーカー）のDNAを鋳型とし、配列番号3および配列番号4で示した合成DNAをプライマーとしたPCR法によって行った。

反応液組成：鋳型DNA 1 ng、Pyrobest DNAポリメラーゼ（宝酒造） 0.1 μL、1倍濃度添付バッファー、0.5 μM各々プライマー、0.25 μM dNTPsを混合し、全量を20 μLとした。 10

【0082】

反応温度条件：DNAサーマルサイクラー PTC-200（MJ Research社製）を用い、94℃で20秒、62℃で15秒、72℃で1分20秒からなるサイクルを20回繰り返した。但し、1サイクル目の94℃での保温は1分20秒、最終サイクルの72℃での保温は5分とした。

増幅産物の確認は、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行い、約1.1 kbの断片を検出した。ゲルからの目的DNA断片の回収は、QIAquick Gel Extraction Kit（QIAGEN製） 20
を用いて行った。回収したDNA断片は、T4ポリヌクレオチドキナーゼ（T4 Polynucleotide Kinase：宝酒造製）により5'末端をリン酸化した。

【0083】

(E) カナマイシン耐性SacBベクターの構築

上記(C)で構築したpCMB1を制限酵素Van91IおよびScaIで切断して得られた約3.5 kbのDNA断片を0.75%アガロースゲル電気泳動により分離、回収した。これを上記(D)で調製したカナマイシン耐性遺伝子と混合し、ライゲーションキットver. 2（宝酒造製）を用いて連結し、得られたプラスミドDNAで大腸菌（DH5α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 μg/mLカナマイシンを含むLB寒天培地に塗抹した。 30

【0084】

このカナマイシン含有培地上で生育した株は、ショ糖含有培地にて生育不能であることが確認された。また、同株から調製したプラスミドDNAは、制限酵素HindIII消化により354、473、1807、1997 bpの断片を生じたことから、図1に示した構造に間違いがないと判断し、該プラスミドをpKMB1と命名した。

【0085】

参考例2

<LDH遺伝子破壊株の作製>

(A) ブレバクテリウム・フラバムMJ233-ES株ゲノムDNAの抽出

A培地〔尿素 2 g、(NH₄)₂SO₄ 7 g、KH₂PO₄ 0.5 g、K₂HPO₄ 0.5 g、MgSO₄・7H₂O 0.5 g、FeSO₄・7H₂O 6 mg、MnSO₄・4-5 H₂O 6 mg、ビオチン 200 μg、チアミン 100 μg、イーストエキストラクト 1 g、カザミノ酸 1 g、グルコース 20 g、蒸留水1 Lに溶解〕10 mLに、ブレバクテリウム・フラバムMJ-233株を対数増殖期後期まで培養し、得られた菌体から上記参考例1の(A)に示す方法にてゲノムDNAを調製した。 40

【0086】

(B) ラクテートデヒドロゲナーゼ遺伝子のクローニング

MJ233株ラクテートデヒドロゲナーゼ遺伝子の取得は、上記(A)で調製したDNAを鋳型とし、特開平11-206385に記載の該遺伝子の塩基配列を基に設計した合成DNA（配列番号5および配列番号6）を用いたPCRによって行った。 50

反応液組成：鋳型DNA 1 μ L、Taq DNAポリメラーゼ（宝酒造） 0.2 μ L、1倍濃度添付バッファー、0.2 μ M各々プライマー、0.25 μ M dNTPsを混合し、全量を20 μ Lとした。

【0087】

反応温度条件：DNAサーマルサイクラー PTC-200（MJ Research社製）を用い、94℃で20秒、55℃で20秒、72℃で1分からなるサイクルを30回繰り返した。但し、1サイクル目の94℃での保温は1分20秒、最終サイクルの72℃での保温は5分とした。

増幅産物の確認は、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行い、約0.95 kbの断片を検出した。ゲルからの目的DNA断片の回収は、QIA Quick Gel Extraction Kit（QIAGEN製）を用いて行った。

【0088】

回収したDNA断片を、PCR産物クローニングベクターpGEM-T Easy（Promega製）と混合し、ライゲーションキットver. 2（宝酒造製）を用いて連結後、得られたプラスミドDNAで大腸菌（DH5 α 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アンピシリンおよび50 μ g/mL X-Galを含むLB寒天培地に塗抹した。

【0089】

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SacIおよびSphIで切断することにより、約1.0 kbの挿入断片が認められ、これをpGEMT/CgLDHと命名した。

（C）ラクテートデヒドロゲナーゼ遺伝子破壊用プラスミドの構築

上記（B）で作製したpGEMT/CgLDHを制限酵素EcoRVおよびXbaIで切断することにより約0.25 kbからなるラクテートデヒドロゲナーゼのコーディング領域を切り出した。残った約3.7 kbのDNA断片の末端をクレノウフラグメントにて平滑化し、ライゲーションキットver. 2（宝酒造製）を用いて環状化させ、大腸菌（DH5 α 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アンピシリンを含むLB寒天培地に塗抹した。

【0090】

この培地上で生育した株を、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SacIおよびSphIで切断することにより、約0.75 kbの挿入断片が認められたクローンを選抜し、これをpGEMT/ Δ LDHと命名した。

次に、上記pGEMT/ Δ LDHを制限酵素SacIおよびSphIにて切断して生じる約0.75 kbのDNA断片を、0.75%アガロースゲル電気泳動により分離、回収し、欠損領域を含むラクテートデヒドロゲナーゼ遺伝子断片を調製した。このDNA断片を、制限酵素SacIおよびSphIにて切断した参考例1にて構築したpKMB1と混合し、ライゲーションキットver. 2（宝酒造製）を用いて連結後、得られたプラスミドDNAで大腸菌（DH5 α 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カナマイシンおよび50 μ g/mL X-Galを含むLB寒天培地に塗抹した。

【0091】

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SacIおよびSphIで切断することにより、約0.75 kbの挿入断片が認められたものを選抜し、これをpKMB1/ Δ LDHと命名した（図2）。

（D）ブレヴィバクテリウム・フラバムMJ233-E S株由来ラクテートデヒドロゲナ

ーゼ遺伝子破壊株の作製

ブレビバクテリウム・フラバムMJ-233株の形質転換に用いるプラスミドDNAは、pKMB1/ Δ L DHを用いて塩化カルシウム法 (Journal of Molecular Biology, 53, 159, 1970) により形質転換した大腸菌JM110株から調製した。

【0092】

ブレビバクテリウム・フラバムMJ233-ES株の形質転換は、電気パルス法 (Res. Microbiol., Vol. 144, p. 181-185, 1993) によって行い、得られた形質転換体をカナマイシン $50 \mu\text{g}/\text{mL}$ を含むLBG寒天培地 [トリプトン10g、イーストエキストラクト5g、NaCl 5g、グルコース 20g、及び寒天15gを蒸留水1Lに溶解] に塗抹した。 10

【0093】

この培地上に生育した株は、pKMB1/ Δ L DHがブレビバクテリウム・フラバムMJ233-ES株菌体内で複製不可能なプラスミドであるため、該プラスミドのラクテートデヒドロゲナーゼ遺伝子とブレビバクテリウム・フラバムMJ-233株ゲノム上の同遺伝子との間で相同組み換えを起こした結果、同ゲノム上に該プラスミドに由来するカナマイシン耐性遺伝子およびSacB遺伝子が挿入されているはずである。

【0094】

次に、上記相同組み換え株をカナマイシン $50 \mu\text{g}/\text{mL}$ を含むLBG培地にて液体培養した。この培養液の菌体数約100万相当分を10%ショ糖含有LBG培地に塗抹にした。結果、2回目の相同組み換えによりSacB遺伝子が脱落しショ糖非感受性となったと考えられる株約10個得た。 20

この様にして得られた株の中には、そのラクテートデヒドロゲナーゼ遺伝子がpKMB1/ Δ L DHに由来する変異型に置き換わったものと野生型に戻ったものが含まれる。ラクテートデヒドロゲナーゼ遺伝子の変異型であるか野生型であるかの確認は、LBG培地にて液体培養して得られた菌体を直接PCR反応に供し、ラクテートデヒドロゲナーゼ遺伝子の検出を行うことによって容易に確認できる。ラクテートデヒドロゲナーゼ遺伝子をPCR増幅するためのプライマー (配列番号7および配列番号8) を用いて分析すると、野生型では720bp、欠失領域を持つ変異型では471bpのDNA断片を認めるはずである。 30

【0095】

上記方法にてショ糖非感受性となった菌株を分析した結果、変異型遺伝子のみを有する株を選抜し、該株をブレビバクテリウム・フラバムMJ233/ Δ L DHと命名した。

(E) ラクテートデヒドロゲナーゼ活性の確認

上記(D)で作製したブレビバクテリウム・フラバムMJ233/ Δ L DH株をA培地に植菌し、30℃で15時間好氣的に振とう培養した。得られた培養物を遠心分離 (3,000×g、4℃、20分間) して菌体を回収後、ナトリウムーリン酸緩衝液 [組成: 50mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.3)] で洗浄した。

【0096】

次いで、洗浄菌体0.5g (湿重量) を上記ナトリウムーリン酸緩衝液2mLに懸濁し、氷冷下で超音波破碎器 (ブランソン社製) にかけて菌体破碎物を得た。該破碎物を遠心分離 (10,000×g、4℃、30分間) し、上清を粗酵素液として得た。対照として、ブレビバクテリウム・フラバム MJ233-ES株の粗酵素液を同様に調製し、以下の活性測定に供した。 40

【0097】

ラクテートデヒドロゲナーゼ酵素活性の確認は、両粗酵素液について、ピルビン酸を基質とした乳酸の生成に伴い、補酵素NADHが NAD^+ に酸化されるのを、340nmの吸光度変化として測定した [L. Kanarek and R. L. Hill, J. Biol. Chem. 239, 4202 (1964)]。反応は、50mM カリウムーリン酸緩衝液(pH7.2)、10mM ピルビン酸、0.4mM NADH存在下、37℃に 50

て行った。その結果、ブレビバクテリウム・フラバム MJ 233-E S 株から調製された粗酵素液におけるラクテートデヒドロゲナーゼ活性に対し、ブレビバクテリウム・フラバム MJ 233 / ΔLDH 株から調製された粗酵素液におけるラクテートデヒドロゲナーゼ活性は、10 分の 1 以下であった。

【0098】

参考例 3

< コリネ型細菌発現ベクターの構築 >

(A) コリネ型細菌用プロモーター断片の調製

コリネ型細菌で強力なプロモーター活性を有することが報告された特開平 7-95891 の配列番号 4 に記載の DNA 断片（以降 T Z 4 プロモーターと称する）を利用することとした。本プロモーター断片の取得は、参考例 2 の (A) で調製したブレビバクテリウム・フラバム MJ 233 ゲノム DNA を鋳型とし、特開平 7-95891 の配列番号 4 に記載の配列を基に設計した合成 DNA（配列番号 9 および配列番号 10）を用いた PCR によって行った。

【0099】

反応液組成：鋳型 DNA 1 μL、P f x DNA ポリメラーゼ（インビトロジェン社製）0.2 μL、1 倍濃度添付バッファー、0.3 μM 各々プライマー、1 mM MgSO₄、0.25 μM dNTPs を混合し、全量を 20 μL とした。

反応温度条件：DNA サーマルサイクラー PTC-200 (MJ Research 社製) を用い、94℃で 20 秒、60℃で 20 秒、72℃で 30 秒からなるサイクルを 35 回繰り返した。但し、1 サイクル目の 94℃での保温は 1 分 20 秒、最終サイクルの 72℃での保温は 2 分とした。

【0100】

増幅産物の確認は、2.0% 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行い、約 0.25 kb の断片を検出した。ゲルからの目的 DNA 断片の回収は、QIAQuick Gel Extraction Kit (QIAGEN 製) を用いて行った。

【0101】

回収した DNA 断片は、T4 ポリヌクレオチドキナーゼ (T4 Polynucleotide Kinase: 宝酒造製) により 5' 末端をリン酸化した後、ライゲーションキット ver. 2 (宝酒造製) を用いて大腸菌ベクター pUC19 (宝酒造) の SmaI 部位に結合し、得られたプラスミド DNA で大腸菌 (DH5α 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 μg/mL アンピシリンおよび 50 μg/mL X-Gal を含む LB 寒天培地に塗抹した。

【0102】

この培地上で白色のコロニーを形成した 6 クローンについて、常法により液体培養した後、プラスミド DNA を精製し、塩基配列を決定した。これ中で T Z 4 プロモーターが pUC19 の lac プロモーターと逆方向に転写活性を有するように挿入されたクローンを選抜し、これを pUC/T Z 4 と命名した。

次に、pUC/T Z 4 を制限酵素 BamHI および PstI で切断して調製した DNA 断片に、5' 末端がリン酸化された合成 DNA（配列番号 11 および配列番号 12）から成り、両末端にそれぞれ BamHI と PstI に対する粘着末端を有する DNA リンカーを混合し、ライゲーションキット ver. 2 (宝酒造製) を用いて連結後、得られたプラスミド DNA で大腸菌 (DH5α 株) を形質転換した。本 DNA リンカーには、リボソーム結合配列 (AGGAGG) およびその下流に配したクロニングサイト (上流から順に、PacI、NotI、ApaI) が含まれている。

【0103】

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 の中から制限酵素 NotI によって

切断されるものを選抜し、これを pUC/TZ4-SD と命名した。

この様にして構築した pUC/TZ4-SD を制限酵素 Pst I で切断後、クレノウフラグメントにて末端を平滑化し、次いで制限酵素 Kpn I で切断することにより生じた約 0.3 kb のプロモーター断片を、2.0 % アガロースゲル電気泳動により分離、回収した。

【0104】

(B) コリネ型細菌発現ベクターの構築

コリネ型細菌にて安定的に自立複製可能なプラスミドとして、特開平12-93183 記載の pHSG298 par-rep を利用する。本プラスミドは、ブレビバクテリウム・スタチオニス IF012144 株が保有する天然型プラスミド pBY503 の複製領域 および安定化機能を有する領域と大腸菌ベクター pHSG298 (宝酒造) に由来するカナマイシン耐性遺伝子および大腸菌の複製領域を備える。pHSG298 par-rep を制限酵素 Sse I で切断後、クレノウフラグメントにて末端を平滑化し、次いで制限酵素 Kpn I で切断することによって調製した DNA を、上記 (A) で調製した TZ4 プロモーター断片と混合し、ライゲーションキット ver. 2 (宝酒造製) を用いて連結後、得られたプラスミド DNA で大腸菌 (DH5α 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 μg/mL カナマイシンを含む LB 寒天培地に塗抹した。

10

【0105】

この培地上で生育した株を、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 の中から制限酵素 Not I によって切断されるものを選抜し、該プラスミドを pTZ4 と命名した (図3に構築手順を示した)。

20

【0106】

参考例4

＜ピルベートカルボキシラーゼ活性増強株の作製＞

(A) ピルベートカルボキシラーゼ遺伝子の取得

ブレビバクテリウム・フラバム MJ233 株由来ピルベートカルボキシラーゼ遺伝子の取得は、参考例2の (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コリネバクテリウム・グルタミカム ATCC13032 株の該遺伝子の配列 (GenBank Database Accession No. AP005276) を基に設計した合成 DNA (配列番号13および配列番号14) を用いた PCR によって行った。

30

【0107】

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

反応温度条件：DNA サーマルサイクラー PTC-200 (MJ Research 社製) を用い、94℃で20秒、68℃で4分からなるサイクルを35回繰り返した。但し、1 サイクル目の 94℃での保温は1分20秒、最終サイクルの 68℃での保温は10分とした。PCR 反応終了後、Takara Ex Taq (宝酒造) を 0.1 μL 加え、さらに 72℃で30分保温した。

【0108】

増幅産物の確認は、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行い、約 3.7 kb の断片を検出した。ゲルからの目的 DNA 断片の回収は、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN 製) を用いて行った。

40

【0109】

回収した DNA 断片を、PCR 産物クローニングベクター pGEM-T Easy (Promega 製) と混合し、ライゲーションキット ver. 2 (宝酒造製) を用いて連結後、得られたプラスミド DNA で大腸菌 (DH5α 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 μg/mL アンピシリンおよび 50 μg/mL X-Gal を含む LB

50

寒天培地に塗抹した。

【0110】

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PacIおよびApaIで切断することにより、約3.7kbの挿入断片が認められ、これをpGEM/MJPCと命名した。

pGEM/MJPCの挿入断片の塩基配列は、アプライドバイオシステム社製塩基配列解読装置（モデル377XL）およびピックダイターミネーターサイクルシーケンスキットver3を用いて決定した。その結果得られたDNA塩基配列および推測されるアミノ酸配列を配列番号15に記載する。また、アミノ酸配列のみを配列番号16に記載する。本アミノ酸配列はコリネバクテリウム・グルタミカムATCC13032株由来のそれと極めて高い相同性（99.4%）を示すことから、pGEM/MJPCの挿入断片がブレバクテリウム・フラバムMJ233株由来のピルベートカルボキシラーゼ遺伝子であると断定した。

10

【0111】

（B）ピルベートカルボキシラーゼ活性増強用プラスミドの構築

上記（A）で作製したpGEM/MJPCを制限酵素PacIおよびApaIで切断することにより生じる約3.7kbからなるピルベートカルボキシラーゼ遺伝子断片を、0.75%アガロースゲル電気泳動により分離、回収した。

このDNA断片を、制限酵素PacIおよびApaIにて切断した、参考例3にて構築したpTZ4と混合し、ライゲーションキットver.2（宝酒造製）を用いて連結後、得られたプラスミドDNAで大腸菌（DH5α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50μg/mLカナマイシンを含むLB寒天培地に塗抹した。

20

【0112】

この培地上で生育した株を、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PacIおよびApaIで切断することにより、約3.7kbの挿入断片が認められたものを選抜し、これをpMJPC1と命名した（図4）。

（C）ブレバクテリウム・フラバムMJ233/ΔLDH株への形質転換

ブレバクテリウム・フラバムMJ233株内で複製可能なpMJPC1による形質転換用のプラスミドDNAは、上記（B）で形質転換した大腸菌（DH5α株）から調製した。

30

【0113】

ブレバクテリウム・フラバムMJ233/ΔLDH株への形質転換は、電気パルス法（Res. Microbiol., Vol. 144, p. 181-185, 1993）によって行い、得られた形質転換体をカナマイシン 50μg/mLを含むLBG寒天培地〔トリプトン10g、イーストエキストラクト5g、NaCl 5g、グルコース 20g、及び寒天15gを蒸留水1Lに溶解〕に塗抹した。

【0114】

この培地上に生育した株から、常法により液体培養した後、プラスミドDNAを抽出、制限酵素切断による解析を行った結果、同株がpMJPC1を保持していることを確認し、該株をブレバクテリウム・フラバムMJ233/PC/ΔLDH株と命名した。

40

（D）ピルベートカルボキシラーゼ酵素活性

上記（C）で得られた形質転換株ブレバクテリウム・フラバムMJ233/PC/ΔLDH株をグルコース2%、カナマイシン25mg/Lを含むA培地100mlで終夜培養を行った。得られた菌体を集菌後、50mMリン酸カリウム緩衝液（pH7.5）50mlで洗浄し、同組成の緩衝液20mlに再度懸濁させた。懸濁液をSONIFIER 350（BRANSON製）で破碎し、遠心分離した上清を無細胞抽出液とした。得られた無細胞抽出液を用いピルベートカルボキシラーゼ活性を測定した。酵素活性の測定は100mM Tris/HCl緩衝液（pH7.5）、0.1mg/10mlビオチン、5

50

mM 塩化マグネシウム、50 mM 炭酸水素ナトリウム、5 mM ピルビン酸ナトリウム、5 mM アデノシン三リン酸ナトリウム、0.32 mM NADH、20 units / 1.5 ml リンゴ酸デヒドロゲナーゼ（WAKO製、酵母由来）及び酵素を含む反応液中で25℃で反応させることにより行った。1Uは1分間に1 μ molのNADHの減少を触媒する酵素量とした。ピルベートカルボキシラーゼを発現させた無細胞抽出液における比活性は0.2 U / mg蛋白質であった。なお親株であるMJ233 / Δ LDH株をA培地を用いて同様に培養した菌体では、本活性測定方法によりピルベートカルボキシラーゼ活性は検出されなかった。

【0115】

参考例5

<発酵液の調製>

尿素：4 g、硫酸アンモニウム：14 g、リン酸1カリウム：0.5 g、リン酸2カリウム0.5 g、硫酸マグネシウム・7水和物：0.5 g、硫酸第一鉄・7水和物：20 mg、硫酸マンガン・水和物：20 mg、D-ビオチン：200 μ g、塩酸チアミン：200 μ g、酵母エキス：1 g、カザミノ酸：1 g、及び蒸留水：1000 mLの培地100 mLを500 mLの三角フラスコにいれ、120℃、20分加熱滅菌した。これを室温まで冷やし、あらかじめ滅菌した50%グルコース水溶液を4 mL、無菌濾過した5%カナマイシン水溶液を50 μ L添加し、参考例4（C）で作製したブレヴィバクテリウム・フラバムMJ233 / PC / Δ LDH株を接種して24時間30℃にて種培養した。

【0116】

尿素：12 g、硫酸アンモニウム：42 g、リン酸1カリウム：1.5 g、リン酸2カリウム1.5 g、硫酸マグネシウム・7水和物：1.5 g、硫酸第一鉄・7水和物：60 mg、硫酸マンガン・水和物：60 mg、D-ビオチン：600 μ g、塩酸チアミン：600 μ g、酵母エキス3 g、カザミノ酸3 g、消泡剤（アデカノールLG294：旭電化製）：1 mL及び蒸留水：2500 mLの培地を5 Lの発酵槽に入れ、120℃、20分加熱滅菌した。これを室温まで冷やした後、あらかじめ滅菌した12%グルコース水溶液を500 mL添加し、これに前述の種培養液を全量加えて、30℃に保温した。通気は毎分500 mL、攪拌は毎分500回転で本培養を行った。12時間後にグルコースがほぼ消費されていた。

【0117】

硫酸マグネシウム・7水和物：1.5 g、硫酸第一鉄・7水和物：60 mg、硫酸マンガン・水和物：60 mg、D-ビオチン：600 μ g、塩酸チアミン：600 μ g、消泡剤（アデカノールLG294：旭電化製）：5 mL及び蒸留水：1.5 Lの培地を3 Lの三角フラスコに入れ、120℃、20分加熱滅菌した。室温まで冷やした後、上記の本培養により得られた培養液を10000 g、5分の遠心分離により集菌した菌体を添加して、O.D.（660 nm）が60になるように再懸濁した。この懸濁液1.5 Lとあらかじめ滅菌した20%グルコース溶液1.5 Lを5 Lのジャーファーメンターに入れて混合し、35℃に保温した。pHは2 M炭酸アンモニウムを用いて7.6に保ち、毎分500 mLで通気、毎分300回転で攪拌しながら反応を行った。反応開始後約50時間でグルコースがほぼ消費されていた。コハク酸が57 g / L蓄積されていた。この発酵液を10000 g、5分間の遠心分離、限外濾過（日東電工（株）製 NTU-3000-C1R）により菌体と上清に分離した。以上の操作を30回行うことにより、コハク酸発酵液上清を103 L得ることが出来た。

【0118】

<コハク酸醗酵液からの琥珀酸精製>

上記のようにして得られたコハク酸発酵液上清を103 L（琥珀酸含有量5.87 kg）を、減圧しながらジャケット付き攪拌槽にて濃縮し、琥珀酸の濃度が32.9%、アンモニア11.9%の濃縮液：17.8 kg（計算値）を得た。これに酢酸（ダイセル化学社製）を8.58 kg加えて30℃まで冷却し、更にメタノール（キシダ化学社製）を4.0 kg加えて15℃まで冷却し1時間攪拌した後、20℃にて4時間攪拌を継続した。

10

20

30

40

50

【0119】

結晶が析出しており、これを遠心ろ過器にてろ過を行い、琥珀酸を74.6%、酢酸3.5%、アンモニア12.2%を含有する結晶4.95kgを得た。

酢酸11.3kgに得られた結晶4.9kgをいれ、85℃にて溶解し、直ちに20℃まで冷却した。既に結晶は析出していたが、そのまま更に3時間攪拌を続けた後、遠心ろ過器にてろ過を行い、琥珀酸87.9%、酢酸8.4%、アンモニア0.6%を含有する結晶2.44kgを得た。

【0120】

5℃に冷やした脱塩水3.5Lにて得られた結晶を懸洗し、これを遠心ろ過器にてろ過すると、琥珀酸90%、酢酸1.7%、アンモニア0.05%（およそ500ppm）含有する2.08kgの結晶が得られた。 10

この粗琥珀酸結晶2.0kgを28.5Lの脱塩水に溶解し、1Lのイオン交換樹脂（三菱化学社製SK1BH）をつめた塔にSV=2にて通液し、約33Lの処理液を得た。これを減圧したロータリーエバポレータに連続フィードしながら、およそ5.2Lまで濃縮した。この段階で既に結晶が析出していた。更に、5℃に冷却し、2時間攪拌を継続した後、これをろ過すると、琥珀酸96.7%の結晶1.76kgを得た。

【0121】

これを真空乾燥機にて乾燥すると1.68kgの琥珀酸を得る事が出来た。

実施例1

上述のような方法で得られた硫黄含有量5ppmのバイオマス資源由来のコハク酸を、ポリエステル製造前、乾燥空気雰囲気下(10%RH.以下の湿度)、2ヶ月間室温でスチール缶内で貯蔵した。貯蔵後のスチール缶を観察した結果、腐食の兆候は観測されなかった。 20

【0122】

攪拌装置、窒素導入口、加熱装置、温度計及び減圧用排気口を備えた反応容器に、上記のように貯蔵した硫黄原子含有量5ppmのバイオマス資源由来のコハク酸100重量部、三菱化学社製工業グレードの1,4-ブタンジオール88.5重量部、リンゴ酸0.37重量部ならびに触媒として二酸化ゲルマニウムを予め0.98重量%溶解させた88%乳酸水溶液5.4重量部を仕込み、窒素-減圧置換によって系内を窒素雰囲気下にした。 30

【0123】

次に、系内を攪拌しながら220℃に昇温し、この温度で1時間反応させた。次に、30分かけて230℃まで昇温し、同時に1.5時間かけて 0.07×10^3 Paになるように減圧し、同減圧度で2時間反応にて行い重合を終了し、白色のポリエステル（黄色度YIは22）を得た。得られたポリエステルの還元粘度（ η_{sp}/c ）は2.3であった。

実施例2

上述のような方法で得られた硫黄原子含有量5ppmのバイオマス資源由来のコハク酸を、ポリエステル製造前、50%RH.の湿度雰囲気下、2ヶ月間室温でスチール缶内で貯蔵した以外は実施例1と同様に評価した。本方法を用いても、特に容器の腐食、原料のブロック化等の問題は見当たらず、実施例1と同様のポリエステルを得た。

比較例1

得られたコハク酸を、ポリエステル製造前、90%RH.の湿度雰囲気下にて1ヶ月間室温でスチール缶内に貯蔵した。貯蔵後のコハク酸の一部は色みを帯びスチール缶の腐食が示唆された。またコハク酸の一部ブロック化が観測され、配管移送時の仕込みの困難さが示唆された。このコハク酸を用いて実施例1と同様に重合を行った結果、得られたポリエステルの還元粘度（ η_{sp}/c ）は2.4であったが、ポリマーの着色（淡黄色（黄色度YIは32））と重合反応の遅延化（ 0.07×10^3 Pa減圧度での重合時間：2.5時間）が観測された。 40

【図面の簡単な説明】

【0124】

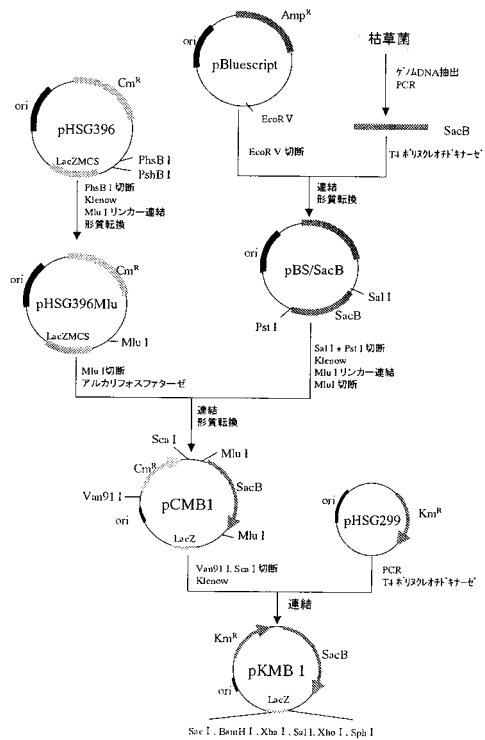
【図1】pKMB1の構築の概略を示す。 50

【図2】 pKMB1 / ΔLDHの構築の概略を示す。

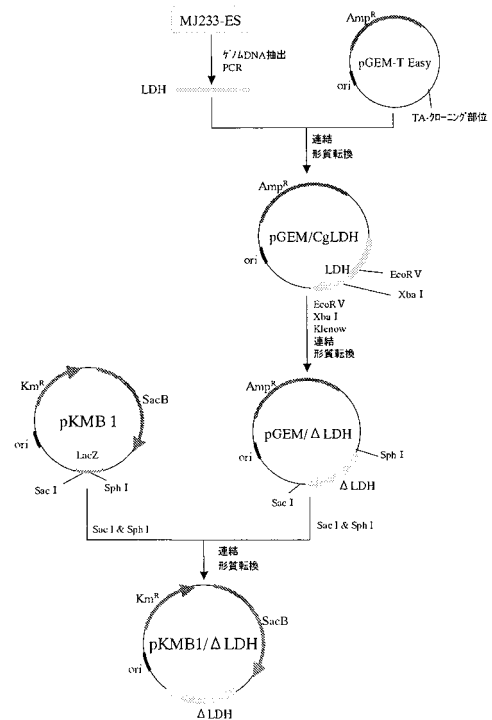
【図3】 pTZベクターの構築の概略を示す。

【図4】 pMJPC1の構築の概略を示す。

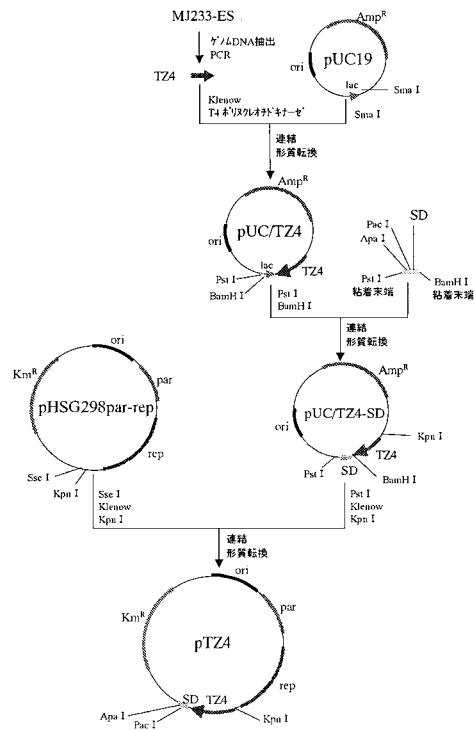
【図1】



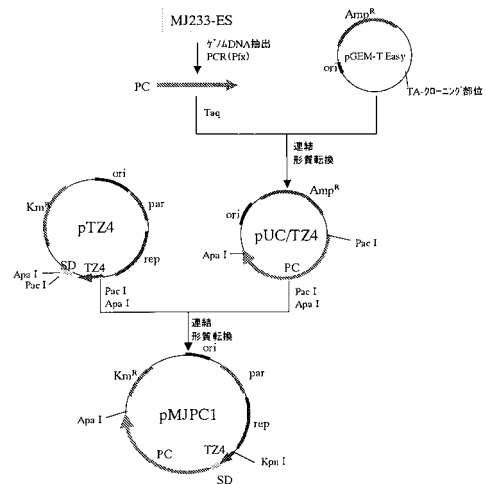
【図2】



【図 3】



【図 4】



【配列表】

2006321996000001.app

フロントページの続き

Fターム(参考) 4B064 AD83 CA02 CA19 CC24 CD06 CD07 CD24 CE11 CE15 DA16
4J029 AA03 AB04 AC02 AD01 AE02 AE03 AE06 BA02 BA03 BA05
BA08 CA04 CA06 FC03 FC04 FC08 FC12 FC14 FC16 FC17
KA02 KE03 KE05