

戦略的創造研究推進事業(ALCA)  
「特別重点技術領域(ホワイトバイオテクノロジー)」  
「糖質に依存しないムコン酸のバイオ生産」

終了報告書

研究開発期間 平成27年10月～令和 2年 3月

研究開発代表者:園木 和典  
(弘前大学農学生命科学部、准教授)

## ○報告書要約（和文）

研究開発代表研究者：弘前大学 准教授 園木 和典

研究開発課題名：糖質に依存しないムコン酸のバイオ生産

### 1. 研究開発の目的

非可食バイオマスから石油化学由来ポリマーを代替できる材料を製造する技術は、低炭素社会の実現に貢献する技術の1つである。本研究開発では「バイオマスからポリマーを創出するための技術的ボトルネック」の1つである「バイオ生産の原料である糖質の需要競合」に着目し、その解決に取り組んだ。具体的には「非可食バイオマスの主要成分であるリグニン由来のフェノール類からムコン酸など有用物質のバイオ生産に資する微生物株の作出」を目的とした。ムコン酸は水素添加により、ナイロン原料となるアジピン酸へと容易に変換できる化合物である。アジピン酸はポリアミド（Nylon-6,6 など）やポリウレタンなどの樹脂原料として幅広く利用できる。また非常に汎用性の高い樹脂原料であるテレフタル酸の合成を経たポリエチレンテレフタレート（PET）の原料としても利用できるなど、ムコン酸は多様なポリマーの合成に利用できる基幹化合物であり、本研究開発の低炭素社会実現への寄与は大きい。

### 2. 研究開発の概要

#### (1) 内容:

リグニンは物理化学的・生物学的な分解によって不均一なフェノール類の混合物が生成するため、特定の化合物を収率よく獲得することは容易ではない。しかしこれら多様なリグニン由来のフェノール類を利用して増殖できる微生物株は、これらフェノール類の混合物を特異的な酵素反応系により変換する代謝経路を保持している。このような微生物株の代謝経路の改良、そして培養条件の最適化を進め、[i] リグニン由来フェノール類から高い収率でムコン酸を生産できる微生物株と、[ii] リグニン由来フェノール類だけを炭素源としてムコン酸を生産できる微生物株の作出に取り組んだ。

#### (2) 成果:

##### [i] リグニン由来フェノール類から高い収率でムコン酸を生産できる微生物株の作出

*P. putida* KT2440 株の代謝経路を利用して、リグニン由来フェノール類モデルの混合物から理論収量のムコン酸を生産できる微生物株を作出した。この微生物株はスギを酸化分解して調製したリグニン分解物からもムコン酸を生産できた。

##### [ii] リグニンだけを炭素源として ccMA を生産できる微生物株の作出

a. *P. putida* KT2440 株（針葉樹リグニン用）と *Sphingobium* sp. SYK-6 株（広葉樹リグニン用）のリグニン由来フェノール類の分解・資化能をそれぞれ利用して、リグニン由来のフェノール類を利用して増殖し、ムコン酸を生産できる微生物株を作出した。

b. *Pseudomonas* sp. NGC7 株を新たに単離し、針葉樹リグニン・広葉樹リグニン・草本リグニン由来の多様なフェノール類を利用して、ムコン酸を生産できる微生物株を作出した。

#### (3) 今後の展開:

本研究では、微生物の代謝を利用して不均一な構造の混合物を特定の化合物へと収束するというコンセプトを実証した。このコンセプトを工業利用できる脂肪族・芳香族化合物を生産する微生物反応創出へと応用していき、石油化学由来のポリマーを代替するバイオマス由来のポリマーや高機能性ポリマーをリグニンから作り出すことができる微生物株の作出へと展開する。また、効率よくリグニンを低分子化でき、かつ大量に調製可能な技術を有するチームとの連携を推進して、リグニンからの有用物質生産技術の実用化に向けて展開する。

## ○Report summary (English)

Principal investigator: Hirosaki University, Associate Professor, Tomonori SONOKI  
R & D title: Sugar-free muconic acid production from lignin.

### 1. Purpose of R & D

The production of the materials that substitute for petrochemical-derived polymers from lignocellulose is one of the technologies contributing to realize a Low carbon society. In this R & D, we focused on the availability of sugars that are highly used as feedstocks in bioproduction, a technical bottleneck in developing materials production from biomass. Thus, in this study, we aimed to create the microbial strains enabling the bioproduction of useful chemicals such as muconic acid (ccMA) from lignin-derived phenols. ccMA has potential use as a platform chemical to synthesize a variety of petrochemical-derived polymers such as polyamides (Nylon-6,6, etc.), polyurethanes, and polyethylene terephthalate. Therefore, the establishment of ccMA production from lignin-derived phenols contributes to realizing a Low carbon society.

### 2. Outline of R & D

#### (1) Contents:

Since lignin produces a heterogeneous mixture of phenols by physicochemical and biological degradation, it is not easy to obtain a specific compound in high yield. However, microbial strains that can grow using these various lignin-derived phenols retain a metabolic pathway that converts a mixture of these phenols by a specific enzyme reaction system. In this study, improvement of the metabolic pathways and optimization of the culture conditions were conducted to develop [i] the microbial strains capable of producing ccMA from lignin-derived phenols in high yield and [ii] the ccMA-producing strains without using glucose.

#### (2) Achievements:

[i] Development of a microbial strain capable of producing ccMA in high yield from lignin-derived phenols.

A *Pseudomonas putida* KT2440-based engineered strain capable of producing theoretical yields of ccMA from a mixture of lignin-related phenols was developed. This microbial strain was also able to produce ccMA from lignin-derived phenols extracted from cedar (a softwood).

[ii] Development of ccMA-producing strains without consuming sugars.

a. two kinds of bacterial strains producing ccMA without using glucose were developed, one is preferable for softwood lignin (*P. putida* KT2440-based) and the other is preferable for hardwood lignin (*Sphingobium* sp. SYK-6 based).

b. Using the metabolic pathway of a newly isolated *Pseudomonas* sp strain NGC7 that is able to grow on a variety of lignin-related phenols, microbial strains capable of producing ccMA from various types of lignin-related phenols based on the composition of softwood lignin, hardwood lignin, and herbaceous lignin were developed.

#### (3) Future developments:

In this study, the concept of biological funneling of the heterogeneous mixture of lignin-derived phenols into a specific chemical was proved. We are going to apply this concept to develop the microbial reactions that produce aliphatic and aromatic compounds for industrial use and lead the activity to produce biomass-based and emerging polymers that will be able to substitute for petrochemical-derived polymers from lignin. In addition, we will promote cooperative works with the teams that have technologies that can efficiently depolymerize lignin in large quantities, and develop practical technologies for producing useful polymer feedstocks from lignin.