



Metabolic Engineering of Yeast for Production of Lactic Acid and Lactate-containing Polymer

Pangestu, Radityo

(Degree)

博士 (工学)

(Date of Degree)

2024-03-25

(Date of Publication)

2027-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第8940号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/0100490165>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



(Attachment: Form 3)

Dissertation Abstract

Name: Radityo Pangestu

Department: Chemical Science and Engineering

Dissertation Title (If written in a foreign language, provide a Japanese translation as well.)

Metabolic Engineering of Yeast for Production of Lactic Acid
and Lactate-containing Polymer

(酵母の代謝工学による乳酸および乳酸含有ポリマーの生
産)

Academic Supervisor: Chiaki Ogino

The discourse surrounding the sustainability of plastics has emerged as a crucial challenge in contemporary times. Given the deep integration of plastics in daily life, the prospect of their complete elimination appears highly impractical. The recent transformation towards a sustainable plastic industry is marked by a shift focusing on biodegradability, the use of non-fossil-based resources, and the adoption of manufacturing processes with reduced carbon footprint. These three pivotal aspects are the focus of this research. In this context, microbial synthesis of polymers represents an ideal model for manufacturing biodegradable plastics from renewable sources in the cleanest possible way. Unlike polyhydroxyalkanoates (PHAs), which can be synthesized entirely through fermentation, polylactic acid (PLA) is typically produced industrially by combining fermentation (for monomer production) and metal-based synthesis (for polymerization). Recent studies have begun to explore the possibility of producing PLA entirely through fermentation, employing metabolic engineering of microbial hosts. However, these studies predominantly use bacterial hosts, despite eukaryotic systems offering a more sophisticated cellular architecture suitable for polymer bioproduction. This study, therefore, aims to utilize budding yeasts as microbial factories for producing lactic acid and lactate-based polymers.

Firstly, the study pursued a method to produce lactic acid, the primary building block of PLA, from renewable substrates via a simplified upstream process. This process eliminates the need for neutralizing treatments during fermentation, leading to more efficient product recovery and waste treatment. A newly isolated yeast strain, *Saccharomyces cerevisiae* BTCC3, was harnessed as a microbial host due to its robust ability to tolerate a mixture of byproducts frequently generated from lignocellulose pretreatment compared to commonly studied laboratory and industrial yeast strains, namely *S. cerevisiae* BY4741 and Ethanol-red, respectively. This prospective budding yeast strain was metabolically engineered by introducing an exogenous L-lactate dehydrogenase gene (*L-LDH*) from *Lactobacillus casei* and disrupting pyruvate decarboxylase isozymes 1 and 5 (*PDC1* and *PDC5*). The engineered strain, named BTCC3LA2, demonstrated the capability to produce lactic acid with a productivity of $3.68 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ under neutralizer-free conditions—only a 23% reduction compared to productivity in a semi-neutralized cultivation—whereas other studies reported a more than 50% reduction under the former settings. Additionally, catalyzed by the BTCC3LA2 strain, a hydrolysate derived from sugarcane bagasse could be converted to lactic acid at a productivity of $1.69 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ without prior detoxification, neutralizer addition, or pH control during fermentation. This contrasts with other studies valorizing similar biomass, which required such treatments for achieving comparable productivity levels. Therefore, using this recombinant strain under similar cultivation conditions could eliminate the need for pre-detoxification and post-acidification, significantly reducing the economic and environmental impacts of lactic acid production.

Secondly, the study explored the benefits of using a flocculant yeast strain, *S. cerevisiae* F118, for lactic acid fermentation. Its flocculation ability facilitates instant cell separation from the fermentation broth, thereby simplifying subsequent filtration, cell recycling, and product recovery. This feature in yeast has indeed been well-studied for industrial ethanol production, yet its potential application for lactic acid fermentation remains largely unexplored. Comparative metabolic profiles and transcriptome landscapes between F118L and BTCC3L—flocculating and nonflocculating strains incorporating an exogenous L-LDH from *L. casei* in their locus of L-lactate cytochrome-c oxidoreductase (*CYB2*) gene—revealed that the flocculation trait in the former yeast resulted in higher and more stable metabolic flows, particularly in glycolysis and pyruvate metabolism, even under varying cell densities and chemical stresses, suggesting superior performance of the flocculating strain over the non-flocculating counterpart for industrial lactic acid fermentation. Additionally, the flocculating trait appears to be linked with distinct sequences in flocculin (*FLO*) genes, namely *FLO1*, *FLO5* and *FLO9*, and mutations in the cyclin 8 (*CYC8*) and transcriptional underproduction 1 (*TUP1*) genes as the sequence of those key genes in the F118 strain were relatively distinct compared to the nonflocculating BTCC3 and S228C (reference) strains. These findings highlight the potential of flocculating yeasts in robust lactic acid production, representing an underexplored yet promising strategy for sustainable industrial applications.

Thirdly, the study proposed a one-step process to produce lactate-containing polymer, wherein the entire reaction occurs intracellularly in yeast at near-room temperature without using organic solvents. This fully fermented approach enables bypassing the conventional PLA production that still requires multi-stage monomer purification and metal-catalyzed polymerization. The employment of yeast offers several advantages over bacterial systems, including its larger cell size, the capacity for compartmentalization, distinct protein folding mechanisms, and enhanced tolerance to various stressors. The metabolic engineering technique in the studied strain, BTCC3LA2, involved introducing exogenous L-LDH from *L. casei*, propionate CoA-transferase (*PCT*) from *Firmicutes bacterium* and mutated polyhydroxyalkanoate synthase 1 (*PHAC1*) from *Pseudomonas* sp. 61-3 (S325T/Q481K) into its locus of the *CYB2* gene, which endowed the engineered yeast strain, named BTCC3LA2FbPLA, with the ability to synthesize a lactate-containing copolymer with higher molecular weight in comparison to other similar works. The hydrolysis reaction confirmed the incorporation of the L-enantiomer of lactate—the first achievement in this area of research—as well as 3-hydroxybutyrate in the structure of biopolymer obtained. Indeed, given the resilience of the BTCC3 strain against a range of byproducts associated with pretreatment processes, the microbial synthesis of L-lactate-based polymers utilizing various lignocellulosic feedstocks is feasible with this

(Name : Radityo Pangestu NO. 3)

genetically modified strain. These results are significant for advancing the effort to synthesize biopolymers using a greener technique, that is, by employing microorganisms as biocatalysts, hence diminishing the energy consumption and environmental impact of the production process.

In summary, the metabolic engineering strategies employed in this work, which includes the integration of *L-LDH*, *PCT*, and mutated *PHAC1* genes, along with the disruption of *PDC* genes, presented a feasible approach for manufacturing bio-based lactic acid and biodegradable lactate-containing polymers. This method utilizes renewable resources while aiming to minimize the carbon footprint of the overall production stages. In particular, the robust *S. cerevisiae* platforms could assist in developing optimized and streamlined upstream and downstream processes, enhancing overall efficiency compared to conventional production strategies. Undoubtedly, further enhancements are necessary to augment and optimize the production capabilities of the genetically engineered strains. Having said that, the insights derived from this study are crucial in bridging the existing knowledge gap within this nascent and emerging area of research. Finally, this work, in concert with preceding studies, paves the way to a transition towards a sustainable plastic industry, contributing to the global endeavor for environmental stewardship and a more sustainable future.

氏名	Radityo Pangestu		
論文 題目	Metabolic Engineering of Yeast for Production of Lactic Acid and Lactate-containing Polymer (酵母の代謝工学による乳酸および乳酸含有ポリマーの生産)		
審査委員	区分	職名	氏名
	主査	教授	荻野 千秋
	副査	教授	西野 孝
	副査	准教授	勝田 知尚
	副査	教授	Kumar Sudesh (マレーシア・サインズ大学(USM) 生物科学部)
	副査		

要 旨

本研究は生分解性ポリマーであるポリ乳酸の生物学的製造において、生分解性、非化石ベースのバイオマス資源の利用、そして二酸化炭素排出量を削減した製造プロセスの採用に焦点を当て、バイオベースプラスチック産業の持続可能性に向けた変革を目指しています。出芽酵母を微生物工場(Cell Factory)のモデルとして採用し、ポリ乳酸(PLA)を生産するためのクリーンで効率的な微生物合成の方法を提案しています。この提案手法の達成により、製品の回収と廃棄物処理の手順を簡素化でき、リグノセルロース系バイオマスから中和剤を使用しないバイオベース乳酸の製造プロセスを達成する事が期待される。

本学位論文の構成は以下のとおりである。まず乳酸、およびポリ乳酸の生物学的製造方法のこれまでの経緯について第1章にて総括している。第2章では外来性乳酸デヒドロゲナーゼ遺伝子(LDH)の遺伝子導入を行った *Saccharomyces cerevisiae* (サッカロマイセス セレビスイエ)株を使用し、乳酸発酵プロセスの合理化を報告した。この組換え酵母株は、バイオマスの前処理から生じるさまざまなバイオマス由来副産物に対して高い生物学的な耐性を示しており、その生物学的特性についても、乳酸生産に関連するプロセス軽減の側面から報告を行っている。第3章では、酵母のポリ乳酸製造特性について、酵母の有する凝集性と非凝集性の特性に注目して、その違いによる物質生産への影響の有無を報告している。第4章では乳酸製造ではなく、ポリ乳酸を直接的に製造する新しい代謝工学的手法について報告を行っている。以下に各章における概要を報告する。

第一章では研究背景について総括し、報告をしている。これまでに、様々な微生物を用いた生分解性ポリマーの製造方法がされてきているが、その多くが乳酸菌を用いた手法であり、乳酸製造に関するものが殆どである。本研究の構成と比較する形で、本申請者が提案している乳酸製造方法の新規性(非中和による迅速的な乳酸発酵、およびポリ乳酸の直接的発酵生産)について取りまとめている。この総括に向けて、リグノセルロースバイオマスからのバイオベースプラスチック製造に関して、以下の2本の学術論文に総説を投稿し、掲載されていることを確認した。P. Kahar, N. Rachmadona, **R. Pangestu**, R. Palar, D. T. N. Adi, A. B. Juanssilfero, Yopi, I. Manurung, S. Hama, C. Ogino, An integrated biorefinery strategy for the utilization of palm-oil wastes. *Bioresource Technology*, 344(B), 126266 (2022)、および H. Kawaguchi, K. Takada, T. Elkasaby, **R. Pangestu**, M. Toyoshima, P. Kahar, C. Ogino, T. Kaneko, A. Kondo, Recent advances in lignocellulosic biomass white biotechnology for bioplastics. *Bioresource Technology*, 344(B), 126165, (2022)。

第二章では、再生可能なバイオマス資源からポリ乳酸のモノマー原料となるL-乳酸を製造するための簡略化された方法を報告した。原料としては、サトウキビ由来の搾汁後の残差となるサトウキビバガス(Sugar Cane Bagasse: SCB)の加水分解糖液である。SCBは一般的にリグノセルロースバイオマスとして分類され、その加水分解物には糖以外にもギ酸や酢酸と言った多様な副生成物が混入している。多くの場合、これらの混入されている化学物質は酵母の生理学的な機能を低下させることが明らかとなっており、乳酸製造の大きなボトルネックとなっている。本章で報告している手法は、乳酸の複雑な製品回収と副産物処理手順を必要とせず、SCBを基質として乳酸を生産する堅牢な酵母株 *S. cerevisiae* BTCC3LA2 を構築し、適用したものである。この酵母株は本来低 pH 領域および多様な化学品の存在下において耐性を有していることが明らかとなっており、外因性乳酸デヒドロゲナーゼ遺伝子を発現するように代謝操作されている。これにより化学物質の除去や解毒、および酸性化後の糖原料培地からの直接的な物質生産を可能とします。このアプローチは SCB だけでなく、多様な農業廃棄物から得られるさまざまな低コストのリグノセルロース系バイオマスにも拡張可能です。この酵母株の有する毒性物質に対する固有の耐性は、これらの原料

氏名

Radityo Pangestu

中に含まれる様々な有害物質に対する高い耐性を示し、乳酸生産の経済的および環境的負担を著しく軽減する可能性があります。実際に、組み換え酵母を用いた乳酸発酵では、炭酸カルシウムによる中和工程が不要であり、高い乳酸製造を可能とした。更にはL-乳酸のみならず、D-乳酸の非中和での物質生産も可能である事を報告している。この研究内容については以下の学術論文に報告されていることを確認した。R. Pangestu, P. Kahar, L. N. Kholida, U. Perwitasari, A. Thontowi, Fahrurrozi, P. Lisdiyanti, Yopi, C. Ogino, B. Prasetya, A. Kondo, Harnessing originally robust yeast for rapid lactic acid bioproduction without detoxification and neutralization. *Scientific Reports*. 12(1), 1-13 (2022).

第三章では、乳酸の発酵プロセスにおいて、非凝集性酵母と凝集性酵母株を使用しその発酵特性の比較検討を行った。複数の酵母は培養の工程で凝集する挙動を有している。この凝集性は発酵液からの細胞の分離が容易になり、それによって濾過、細胞のリサイクル、および生成物の回収段階を簡素化する事が可能となる。本研究では、第二章で実施したLDH遺伝子導入を、凝集性酵母、および非凝集性酵母に適用し、その両者における乳酸製造に関して比較検討を行った。代謝プロファイルとトランスクリプトームの比較分析によれば、凝集性は乳酸生成のための代謝フラックスを安定化させることが示されており、細胞密度や化学的ストレスの変化においても優れた発酵特性を維持する事が示された。この凝集性酵母株 *S. cerevisiae* F118L は、非凝集性の対照酵母株(BTCC3)に比べて優れた性能を持っており、代謝経路と培養条件のさらなる改善によって、乳酸収率を向上させることが期待される。この研究から得られた知見は、凝集性酵母の乳酸生産への潜在的な可能性を示し、持続可能な産業応用において貢献する余地が大きいことを示唆している。この研究内容については以下の学術論文として、学術誌に掲載が決定していることも確認した R. Pangestu, P. Kahar, C. Ogino, A. Kondo, Comparative responses of flocculating and nonflocculating yeasts to cell density and chemical stress in lactic acid fermentation. In press in *Yeast Journal*.

第四章では、ポリ乳酸の生物学的な直接製造方法について検討を行った。一般的には乳酸の発酵生産後に、その精製を行い、生成された乳酸を化学触媒の存在下において重合反応を行うのが一般的な手法である。これに反して本研究では、室温条件で *in vivo* (微生物学的) で乳酸含有ポリマーを合成する1段階のプロセスを提案した。この方法は、主流のポリ乳酸製造技術よりも効率的で、金属触媒や有機溶媒などによる重合を必要としません。この技術の提案において、酵母に外因性乳酸デヒドロゲナーゼ(LDH)、プロピオン酸 CoA トランスフェラーゼ(PCT)、および変異型ポリヒドロキシアルカノエートシンターゼ遺伝子(PhaCSTQK)を組み込むように改変し、高分子量のL-乳酸含有ポリマーの合成を検討した。このプロセスは微生物によるL-乳酸ポリマー生産では初であり、先駆的な研究であると判断する。この研究結果を裏付けるためには、さらなる実験と分析が必要で、ポリL-乳酸ポリマーの生物学的生産に向けた機構解明の進展に寄与するものと判断する。この研究内容については、現在、特許出願に向けたデータ取得と手続きを行っており、論文としての投稿は、特許出願後に行う必要があると判断した。

第五章では、第二章から第四章で行った研究を総括し、将来的な展望について議論を行っている。

以上のように、本研究は持続可能な乳酸および乳酸塩含有ポリマーを生産するための細胞工場として代謝的に改変された酵母株の使用の実現可能性を研究したものであり、ポリ乳酸製造に向けた、上流プロセス(バイオマス前処理)と下流プロセス(ポリ乳酸の化学的合成の回避)の両方を最適化することにより、人工酵母プラットフォームは従来の生産技術に比べて大幅な改善について重要な知見を得たものとして価値ある集積である。この研究の成果は、持続可能なバイオプラスチック合成のためのバイオテクノロジー手法の進歩に貢献するだけでなく、持続可能性に向けたプラスチック産業の将来の発展に大きく寄与するものである。提出された論文は工学研究科学学位論文評価基準を満たしており、学位申請者のRadityo Pangestuは、博士(工学)の学位を得る資格があると認める。