

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 616 428**

51 Int. Cl.:

C12N 15/09 (2006.01)

C12N 1/19 (2006.01)

C12P 7/56 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.12.2008 PCT/JP2008/072129**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.06.2009 WO09072593**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.12.2008 E 08856191 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.02.2017 EP 2221373**

54 Título: **Casete de expresión para lactasa deshidrogenasa, levadura transformada y método para producir ácido láctico**

30 Prioridad:

07.12.2007 JP 2007317566

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

13.06.2017

73 Titular/es:

**TORAY INDUSTRIES, INC. (100.0%)
1-1, NIHONBASHI-MUROMACHI 2-CHOME
CHUO-KU, TOKYO 103-8666, JP**

72 Inventor/es:

**SAWAI, KENJI y
SAWAI, HIDEKI**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 616 428 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Casete de expresión para lactasa deshidrogenasa, levadura transformada y método para producir ácido láctico

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a un método de producción de ácido láctico que comprende cultivar una cepa de levadura transformante, en donde se utiliza un casete que expresa lactato deshidrogenasa con una eficacia de ácido láctico superior, en particular, una cepa de levadura transformante que contiene el casete.

Técnica anterior

10 Recientemente, los polímeros que se preparan mediante el uso de biomasa tales como plantas en forma de materia prima están atrayendo la atención en una tendencia hacia la creación de una sociedad de recursos circulantes. En particular, se ha demostrado que el poli(ácido láctico) (en adelante, referido como "PLA") tiene propiedades favorables como polímero procedente de materia prima de biomasa.

15 El ácido láctico, la materia prima para el PLA, se produce por fermentación de microbios, generalmente denominados bacterias lácticas, representados por las especies de *Lactobacillus* y las especies de *Lactococcus*. La producción de ácido láctico mediante el uso de bacterias lácticas tiene un rendimiento superior a partir de la tasa de producción de azúcar y ácido láctico. Sin embargo, el ácido láctico obtenido es una mezcla de ácidos - y D-láctico. Por lo tanto, hay un problema en la pureza óptica. Se necesita una elevada pureza óptica para la utilización de ácido láctico en la producción de PLA.

20 Ha habido varios intentos de producir ácido láctico de elevada pureza óptica. Por ejemplo, la producción de ácidos L- y D-lácticos mediante el uso de una cepa de levadura transformante fue estudiada (por ejemplo, Documentos de Patente 1 a 3 y Bibliografía que no son Patentes 1). Las levaduras no tienen capacidad de producir ácido láctico inherentemente. Se informó en estas bibliografías de que el ácido láctico de elevada pureza óptica se podría obtener a través de la introducción de un gen que codifique la lactato deshidrogenasa, que convierte el ácido pirúvico en ácido láctico, en levadura mediante tecnología de recombinación genética. Por otra parte, el rendimiento de ácido láctico y la tasa de producción de ácido láctico durante la producción de ácido láctico por la levadura son más bajos, en comparación con los de las bacterias lácticas. Por lo tanto, es necesario mejorar tanto el rendimiento de ácido láctico como la tasa de producción de ácido láctico para la producción de ácido láctico mediante el uso de una levadura de bajo coste.

30 Para la mejora del rendimiento de ácido láctico y la tasa de producción de ácido láctico al mismo tiempo, se desarrolló un método de cultivo de una cepa de levadura que tenía capacidad de producir ácido láctico, mientras que la solución de fermentación se filtraba a través de una membrana de separación (véase, por ejemplo, el Documento de Patente 4). Sin embargo, incluso si se utilizaba el método, éste causaba el problema de que tanto el rendimiento de ácido láctico como la tasa de producción de ácido láctico se reducían durante la fermentación.

Documento de Patente 1: JP-A Núm. 2001-516584

Documento de Patente 2: JP-A Núm. 2003-93060

35 Documento de Patente 3: JP-A Núm. 2005-137306

Documento de Patente 4: folleto WO 2007/97260

Bibliografía no de Patente 1: Ishida, Takahashi et al., *J. Biosci. Bioeng.*, 101 (2), p.172-177, (2006)

El documento JP 2006 288 318 se refiere a la producción de ácido L-láctico mediante la transformación de *Saccharomyces cerevisiae* con el gen de la deshidrogenasa L-láctica.

40 Los documentos JP 2003 265 177 y JP 2005 245 335 describen que el promotor de SED1 tiene una inducibilidad de la expresión muy fuerte en condiciones de cultivo incluso en condiciones de estrés, en particular que el promotor de SED1 está muy influenciado por la fluctuación de pH.

Compendio de la invención**Problemas a resolver por la invención**

45 El objeto de la presente invención, que se hizo para resolver los problemas anteriores, es proporcionar un método como se define en la reivindicación 1 en donde se utiliza un gen que expresa un casete que comprende un gen que codifica lactato deshidrogenasa conectado a un sitio aguas debajo de un promotor del gen supresor de defecto exponencial 1 (gen SED1) que se necesita para la prevención del deterioro en el rendimiento de ácido láctico y la tasa de producción de ácido láctico en cultivo continuo con filtración simultánea de una cepa de levadura que tiene una capacidad de producir ácido láctico, que alcanza una pureza óptica alta, alta producción de ácido láctico y alta
50 tasa de producción de ácido láctico a la vez.

Medios para resolver los problemas

Después de estudios intensivos para resolver los problemas anteriores, los autores de la presente invención han encontrado que era posible llevar a cabo el cultivo continuo de manera constante durante un período prolongado de tiempo sin deterioro del rendimiento de ácido láctico y la tasa de producción de ácido láctico, cultivando una cepa de levadura que tiene un casete que expresa lactato deshidrogenasa que contiene un promotor de un gen SED1. Este promotor muestra una cantidad de expresión del gen 5 veces o más grande que la cantidad de expresión relativa media de todos los genes después de 50 horas desde el inicio del cultivo mientras se filtra la levadura a través de una membrana de separación, en cultivo continuo con filtración simultánea por medio de una membrana de separación de una cepa de levadura que tiene capacidad de producción de ácido láctico.

Por lo tanto, la presente invención se refiere a un método como se define en la reivindicación 1.

Preferiblemente, el promotor utilizado tiene una secuencia de nucleótidos seleccionada entre las siguientes secuencias (a) a (b):

(a) un promotor que tiene la secuencia de nucleótidos mostrada por el SEQ ID NO: 1;

(b) un promotor que tiene una secuencia de nucleótidos que hibrida con la secuencia de nucleótidos mostrada por uno cualquiera de los SEQ ID NO: 1 o una secuencia de nucleótidos que tiene parte de ella bajo condiciones rigurosas.

Por otra parte, se prefiere utilizar una levadura en la que al menos un gen supresor del defecto exponencial 1 (gen SED1), e) esta sustituido con el casete que expresa la lactato deshidrogenasa.

La cepa de levadura transformante utilizada en el método reivindicado pertenece preferiblemente al género *Saccharomyces*. La cepa de levadura transformante es más preferiblemente *Saccharomyces cerevisiae*.

[0012] De acuerdo con la presente invención, la etapa de cultivo es una fermentación continua, preferiblemente una fermentación continua de filtración de la solución de cultivo a través de una membrana de separación, recuperación del ácido láctico a partir del producto filtrado, mantenimiento o retro-alimentación de la solución no filtrada a la solución de cultivo, y adición de medio a la solución de cultivo.

Efectos ventajosos de la invención

De acuerdo con la presente invención, una cepa de levadura que tiene un casete de expresión de lactato deshidrogenasa que contiene el promotor del gen SED1 que muestra una cantidad de expresión del gen 5 veces más grande o más que la cantidad de expresión relativa media de todos los genes después de 50 horas desde el inicio del cultivo es cultivada, mientras que la solución de cultivo se filtra a través de una membrana de separación, en cultivo continuo con la filtración simultánea de la cepa de levadura que tiene una capacidad de producción de ácido láctico. Como resultado es posible producir ácido láctico de alta pureza óptica con un alto rendimiento y una alta tasa de producción de manera constante durante un período prolongado de tiempo.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es una vista lateral esquemática que explica una realización del aparato de fermentación continua de membrana de separación para su uso en la presente invención.

La Figura 2 es una vista lateral esquemática que explica otra realización del aparato de fermentación continua para su uso en la invención distinta de la membrana de separación.

La Figura 3 es una vista en perspectiva esquemática que explica una realización del elemento de membrana de separación para su uso en la presente invención.

La Figura 4 es una vista en perspectiva esquemática que explica otra realización del elemento de membrana de separación para su uso en la presente invención.

La Figura 5 es un gráfico que explica el vector de expresión pTRS11.

Explicación de las referencias

- 1: Tanque de reacción de fermentación
- 2: Elemento de membrana de separación de 2
- 3: Unidad de control de la diferencia de altura
- 4: Segunda secuencia etiqueta
- 5: Agitador

- 6: Sensor de nivel
- 7: Bomba de suministro de medio
- 8: Bomba de suministro de la solución de pH ajustado
- 9: Unidad de control del sensor de pH
- 5 10: Controlador de temperatura
- 11: Bomba de circulación de la solución de cultivo de fermentación
- 12: Tanque de separación con membrana
- 13: Placa de soporte
- 14: Material del canal
- 10 15: Membrana de separación
- 16: Mella
- 17: Tubo colector de agua
- 18: Conjunto de membranas de separación
- 19: Capa de sellado de resina superior
- 15 20: Capa de sellado de resina inferior
- 21: Marco de soporte
- 22: Tubo colector de agua

Mejor modo de llevar a cabo la invención

[Casete de expresión de lactato deshidrogenasa]

- 20 El casete de expresión de la lactato deshidrogenasa de acuerdo con la presente invención es un casete de expresión de lactato deshidrogenasa (en adelante, referido como "LDH"), en el que un gen que codifica la lactato deshidrogenasa (gen *ldh*) está conectado a un sitio aguas abajo del promotor del mismo, en donde el promotor es un promotor del gen SED1. El promotor del gen SED1 que tiene una cantidad de expresión del gen más de 5 veces más grande o más que la cantidad de expresión relativa media de todos los genes después de 50 horas desde el inicio del cultivo, en cultivo continuo con una filtración simultánea por membrana de separación de una cepa de levadura que tiene una capacidad de producción de ácido láctico.
- 25

El "gen de *ldh*" en la presente memoria descriptiva es un gen que codifica LDH que tiene una actividad para convertir el dinucleótido de nicotinamida y adenina (NADH) reducido y el ácido pirúvico en un dinucleótido de nicotinamida y adenina (NAD⁺) oxidado y ácido L-láctico o NAD⁺ y ácido D-láctico.

- 30 El gen *ldh* para su uso en la presente invención es un gen que codifica LDH que tiene la actividad descrita anteriormente, pero es preferiblemente un gen *ldh* derivado de un microbio tal como una bacteria láctica o *Bacillus subtilis* o un gen *ldh* derivado de un organismo eucariota, tal como ser humano, bóvido, rana o malaria. Son particularmente favorables los genes derivados de microbios tales como *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Leuconostoc lactis*, *Lactococcus lactis*, *Pediococcus pentosaceus*, *Pediococcus acidilactici*, *Bacillus subtilis* y *Bacillus stearothermophilus*. Los ejemplos de los genes *ldh* derivados de organismos eucariotas utilizados favorablemente incluyen los derivados de *Rhizopus oryzae*, *Homo sapiens*, *Bos taurus*, *Xenopus laevis*, *Canis familiaris*, *Alligator mississippiensis*, *Monodelphis domestica*, *Pelodiscus sinensis*, *Squalus acanthias*, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium marariae* y *Plasmodium ovale*.
- 35
- 40

- Los genes *ldh* para su uso en la presente invención incluyen genes mutantes, por ejemplo, causados por polimorfismo genético y mutagénesis. El polimorfismo genético, según se utiliza en la presente memoria, es el cambio parcial de la secuencia de nucleótidos de un gen causado por mutación natural del gen. Alternativamente, la mutagénesis es la mutación artificial de un gen, y se lleva a cabo, por ejemplo, mediante un método de utilización de un kit de mutación específica de sitio (Mutan-K (fabricado por Takara Bio Inc.)) o un método de utilización de un kit de mutación aleatoria (BD Diversify PCR Random Mutagenesis (fabricado por CLONTECH)).
- 45

El método de la clonación del gen *ldh* para su uso en la presente invención puede ser cualquier método conocido.

Los ejemplos del mismo incluyen un método de amplificación y obtención de una región del gen deseado por PCR (Reacción en cadena de la Polimerasa), basándose en la información genética conocida, un método para clonarla mediante el uso de la homología y la actividad enzimática en las bibliotecas del genoma y las bibliotecas de ADNc como indicadores, y similares. Alternativamente, se puede preparar por síntesis química o ingeniería genética, basándose en la información de proteínas conocidas.

El casete de expresión de lactato deshidrogenasa (LDH) para su uso en la presente invención comprende un gen que codifica la lactato deshidrogenasa conectada a un sitio aguas debajo de un promotor del gen SED1. Por otra parte la cepa de levadura transformante utilizada comprende al menos un casete de expresión de la deshidrogenasa en el cromosoma.

La "cepa de levadura que tiene capacidad de producción de ácido láctico" para su uso en la presente invención es una levadura que puede producir ácido láctico por el consumo de azúcares tales como glucosa, sacarosa, fructosa etcétera, preferiblemente, una levadura que contiene un gen *ldh* introducido por recombinación genética.

Más adelante, se describirá el método de introducción de un gen *ldh* en la levadura. El gen *ldh* se introduce en levadura, por ejemplo, por un método de transformación de una levadura con un vector de expresión del gen *ldh* que contiene un gen *ldh* recombinado en el vector de expresión, un método de inserción de un gen *ldh* en una posición deseada del cromosoma por recombinación homóloga, o un método de inserción de un gen *ldh* en el cromosoma de forma aleatoria por recombinación heteróloga.

Los vectores de expresión utilizados comúnmente en la levadura se pueden utilizar como vectores de expresión para la recombinación del gen *ldh*. El vector de expresión de uso común en la levadura tiene una secuencia necesaria para la replicación autónoma en células de levadura, una secuencia necesaria para la replicación autónoma en células de *Escherichia coli*, un marcador seleccionable de levadura y un marcador seleccionable de *Escherichia coli*, y preferiblemente tiene, además, las denominadas secuencias reguladoras que regulan la expresión del gen *ldh* recombinante por ejemplo como operador, promotor, terminador y potenciador.

La secuencia necesaria para la replicación autónoma en células de levadura es, por ejemplo, la secuencia combinada de una secuencia de levadura de replicación autónoma (ARS1) y una secuencia de centrómero o la secuencia del origen de replicación del plásmido de 2 μ m de levadura. La secuencia necesaria para la replicación autónoma en *Escherichia coli* es, por ejemplo, la secuencia del origen de replicación ColE1 de *Escherichia coli*. Alternativamente, los ejemplos de los marcadores seleccionables de levadura incluyen un gen complementario auxótrofo tal como URA3 y TRP1 y genes de resistencia a fármacos tales como gen de resistencia a G418 y el gen de resistencia a neomicina. Los ejemplos del marcador seleccionable de *Escherichia coli* incluyen genes de resistencia a antibióticos, tales como gen de resistencia a ampicilina y el gen de resistencia a kanamicina. La secuencia reguladora es preferiblemente una secuencia que puede expresar el gen *ldh*, y los ejemplos de la misma incluyen secuencias promotoras tales como la del gen de la fosfatasa ácida (PHO5), los genes de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (TDH1, 2 y 3), los genes de la alcohol deshidrogenasa (ADH1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7), los genes relacionados con el metabolismo de la galactosa (GAL1, 7 y 10), el gen del citocromo c (CYC1), el gen de la triosafosfato isomerasa (TPI1), el gen de la fosfoglicerato quinasa (PGK1), el gen de la fosfofructosa quinasa (PFK1), los genes de la piruvato descarboxilasa (PDC1, 5 y 6) y las secuencias de terminación, tales como la del gen TDH3.

Es posible obtener un vector capaz de expresar un gen *ldh* mediante la introducción del gen *ldh* en un sitio aguas abajo del promotor del vector de expresión. Es posible introducir el gen *ldh* en levadura mediante la transformación de la levadura con el vector de expresión del gen *ldh* obtenido por el método descrito a continuación.

También es posible introducir un gen *ldh* en levadura mediante la inserción del gen *ldh* en el cromosoma. El método de inserción del gen *ldh* en el cromosoma por ejemplo, por un método de transformación de levadura con un gen *ldh* que contiene ADN mediante el método descrito a continuación e inserción del gen *ldh* en una posición aleatoria en el cromosoma por recombinación heteróloga o por un método de inserción de un gen *ldh* que contiene ADN en una posición deseable por recombinación homóloga. Preferiblemente el método es por recombinación homóloga.

El método de inserción de un ADN que contiene el gen *ldh* en una posición deseada en el cromosoma por recombinación homóloga es, por ejemplo, un método de realización de PCR utilizando un cebador diseñado para añadir una región homóloga en las posiciones deseadas aguas arriba y aguas abajo del ADN que contiene el gen *ldh* y transformación de una levadura con los fragmentos de PCR obtenidos por el método descrito a continuación, pero no se limita a los mismos. Además, el fragmento de PCR contiene preferiblemente un marcador seleccionable de levadura para facilitar la selección del transformante.

El fragmento de PCR para su uso se prepara, por ejemplo, en las etapas 1 a 3, como se muestra a continuación en los apartados (1) a (3). Aquí, se describirá como ejemplo un método de introducción de un gen *ldh* en una posición aguas abajo del promotor del gen de la piruvato descarboxilasa 1 (gen PDC1).

(1) Etapa 1: Un fragmento que contiene un gen *ldh* y un terminador es amplificado por PCR, mediante el uso de un molde de un plásmido que tiene un terminador conectado aguas abajo de un gen *ldh* como molde y un conjunto de cebadores 1 y 2. Aquí, el cebador 1 está diseñado para añadir una secuencia homóloga de 40 pb o más en una posición aguas arriba del gen de PDC1, mientras que el cebador 2 está diseñado, basándose en la secuencia

derivada del plásmido aguas abajo del terminador.

(2) Etapa 2: Un fragmento que contiene un marcador seleccionable de levadura es amplificado mediante PCR, utilizando un plásmido que contiene un marcador seleccionable de levadura, tal como pRS424 o pRS426, como molde y un conjunto de cebadores 3 y 4. Aquí, el cebador 3 está diseñado para añadir una secuencia de 30 pb o más, que es homóloga a la secuencia aguas abajo del terminador en el fragmento de PCR de la Etapa 1, mientras que el cebador 4 está diseñado para añadir una secuencia de 40 pb o más que es homóloga al lado aguas abajo del gen PDC 1.

(3) Etapa 3: Se obtiene un fragmento de PCR que contiene un gen *ldh*, un terminador y un marcador seleccionable de levadura, al que se añaden las secuencias correspondientes a los lados de aguas arriba y aguas abajo del gen PDC1, llevando a cabo la PCR mediante el uso de una mezcla de los fragmentos de PCR obtenidos en las etapas 1 y 2 como molde y un conjunto de cebadores 1 y 4.

Preferiblemente para la introducción del casete de expresión de LDH en el cromosoma, se utiliza un plásmido que lleva un promotor cualquiera, un gen *ldh* y un terminador como plásmido molde de PCR utilizado en la Etapa 1, y el cebador 1 está diseñado para añadir una secuencia homóloga de 40 pb o más en una posición de introducción deseada para la amplificación del promotor, el gen *ldh* y el terminador.

Se puede utilizar un método, por ejemplo, de transformación, transducción, transfección, cotransfección o electroporación para la introducción del vector de expresión del gen *ldh* o el fragmento de PCR obtenido de este modo en la levadura. Los ejemplos típicos de los mismos incluyen un método de utilización de acetato de litio, un método de protoplastos, y similares.

El transformante obtenido puede cultivarse por cualquier método conocido, por ejemplo por el método descrito en "M. D. Rose et al., "Methods in Yeast Genetics", Cold Spring Harbor Laboratory Press (1990)". Se puede seleccionar la levadura que lleva el vector de expresión del gen *ldh* o el fragmento de PCR introducido, basándose en el marcador seleccionable de levadura contenido en el vector de expresión o el fragmento de PCR, cuando la levadura se cultiva en un medio libre de nutrientes o un medio con fármaco añadido.

El "cultivo continuo con filtración simultánea" en la presente invención significa un cultivo continuo en el que la solución de cultivo se filtra a través de una membrana de separación, se recupera a partir del producto filtrado, la solución no filtrada se retiene o se envía de vuelta a la solución de cultivo, y materiales de fermentación en bruto se añaden a la solución de cultivo. La membrana de separación que se utiliza es preferiblemente una membrana porosa que es resistente a la obstrucción por la levadura utilizada en los cultivos y por lo tanto proporciona un rendimiento de filtración favorable de manera constante durante un período prolongado de tiempo. El material para la membrana de separación que se utiliza en la presente invención es un material cerámico o un polímero orgánico, preferiblemente un polímero orgánico.

De aquí en adelante, se describirá el "gen expresado en una cantidad de expresión génica 5 veces más grande o más que la cantidad de expresión relativa media de todos los genes" en la presente invención. La cantidad de expresión de genes en la presente invención representa la cantidad del RNA mensajero (ARNm) transcrita de un gen, y la cantidad de expresión relativa media de todos los genes es la cantidad de expresión media preferiblemente de todos los genes registrados en la Base de Datos del Genoma de *Saccharomyces* (<http://www.yeastgenome.org/>), pero uno o más genes pueden estar ausentes. Por lo tanto, el "gen expresado en una cantidad de expresión de genes 5 veces más grande o más que la cantidad de expresión relativa media de todos los genes" representa un gen que se transcribe a su ARNm en una cantidad 5 veces mayor o más que la cantidad media de los ARNm de todos los genes. Debido a que la presente invención se caracteriza por el uso de un promotor de un gen *SED1* que tiene una cantidad de expresión de genes más grande, por ejemplo 5 veces mayor o más, preferiblemente 7 veces mayor o más, mas preferiblemente 10 veces mayor o más, que la cantidad de expresión relativa media de todos los genes.

Los ejemplos del método de determinación de la cantidad de expresión relativa media de todos los genes en la presente invención incluyen método de transferencia Northern, el método de qPCR (PCR cuantitativa), el método de PCR en tiempo real, el método de micromatrices de ADN y similares. Aunque los anteriores tres métodos son métodos normalmente para medir las cantidades de expresión de genes individuales, el método de las micromatrices de ADN es un método para medir la cantidad de expresión de todos los genes presentes en una matriz por medio de la hibridación de una sonda inmovilizada sobre la matriz con ARNm marcados fluorescentemente con anterioridad y la medición de la intensidad de fluorescencia con un escáner especial, y por esa razón, el uso del método de micromatrices de ADN es preferible. Durante la medición de la intensidad de fluorescencia con un escáner, es deseable medirla a una intensidad de láser a la cual el número de los puntos que muestran la saturación de la intensidad de fluorescencia se puede reducir tanto como sea posible y toda la intensidad de la fluorescencia se puede elevar. Tal intensidad del láser, que varía de acuerdo con la muestra de ensayo, se puede determinar mediante un examen sencillo.

Es preferiblemente una micromatriz que lleva todos los genes de la levadura, y, por ejemplo, se pueden utilizar favorablemente "GeneChip" fabricado por Affymetrix y "3D-Gen" fabricado por Toray Industries Inc. Es más

preferible "3D-Gen".

Aquí, cuando la intensidad de fluorescencia de todos los genes se determina mediante el uso de la micromatriz de ADN, un gen que muestra una intensidad de fluorescencia 5 veces más grande o más que la media se define como el "gen expresado en una cantidad de expresión de genes 5 veces más grande o más que la cantidad de expresión relativa media de todos los genes". Un gen que muestra un valor 7 veces más grande o más se definirá como el "gen expresado en una cantidad de expresión de genes 7 veces más grande o más que la cantidad de expresión relativa media de todos los genes". Además, un gen que muestra un valor 10 veces más grande o más se definirá como el "gen expresado en una cantidad de expresión de genes 10 veces más grande o más que la cantidad de expresión relativa media de todos los genes".

5 En la presente invención, el promotor del gen SED1 expresado en una cantidad de expresión de genes 5 veces más grande o más, preferiblemente 7 veces o mas y mas preferiblemente 10 veces o más que la cantidad de expresión relativa media de todos los genes después de 50 horas desde el inicio del cultivo en cultivo continuo con filtración simultánea de una cepa de levadura que tiene una capacidad de producir ácido láctico es el promotor de un gen SED1 que puede ser determinado por medición de micromatriz de ADN mediante el muestreo de la cepa de levadura en un punto después de 50 horas desde el inicio del cultivo en cultivo continuo con filtración simultánea de una cepa de levadura que tiene una capacidad de producción de ácido láctico y que utiliza los ARN totales extraídos de la levadura.

10 El "promotor" en la presente invención representa una secuencia de nucleótidos implicada en el inicio de la transcripción de un gen SED1 a ARNm, y normalmente indica una secuencia del lado terminal 5' del gen presente en el cromosoma. La longitud de la secuencia de nucleótidos del promotor es preferiblemente de 1 a 3000 pb, más preferiblemente de 1 a 1000 pb, pero no está particularmente limitada, si es una secuencia de nucleótidos que puede iniciar la transcripción de su gen aguas abajo a ARNm. La mutación y la operación de mejora en la actividad de transcripción del promotor ya se conocen, y los promotores de acuerdo con la presente invención también incluyen promotores modificados por métodos conocidos.

15 Son más preferibles los promotores que tienen una secuencia de nucleótidos seleccionada entre las siguientes secuencias (a) a (b):

(a) Los promotores que tiene una secuencia de nucleótidos representada por los siguientes SEQ ID NO: 1; y

(b) Los promotores que tiene una secuencia de nucleótidos que puede hibridar con una secuencia de nucleótidos representada por el SEQ ID NO: 1 o una secuencia de nucleótidos que tiene parte de ella bajo condiciones rigurosas.

30

SEQ ID NO: 1: (gen SED1: derivado de *Saccharomyces cerevisiae*)

```
aggattttaa tctgttgag ttaagtgaa tacgttttc catattgggg tatgcagctc
gaacctaaag tggatgtac acatccctc aagcacacc attacctta taggattaat
gtaagcaaca gcttacacgg aattggaat actattcaac gatccatgca tctgccagat
teggacatgc atattccca attggatata gaaaattaac gtaaggcagt atctttcac
aatgtacttg caacgcggcg acttaaagtt gaagtacaac ctgcagcagc ggcttttgt
acggtacgcc aaactgtcaa tggataatat tgcgtagacc gaaaaaggta atcctcaaca
ctaccctgg tggatgacct aaagcagtaa tattggttg aattatctcc cagacggcac
cgtctcccc agaaagctta gccccgaggt ctacctcca tacaccactg attgtccac
gtcatgccc cttcttctga ggacaaaaag gcatatatcg ctaaattag ccatcagaac
cgttattgtt attatattt cattacgaaa gaggagagg cccagcgcg cagagcacac
acggtcattg attactttt ttggctaaag atccatccct tctgatgct atcttttcc
attcttgtgt attttgatt gaaaatgatt tttgtccac taatttctaa aaataagaca
aaaagcctt aagcagttt tcatccatt tactacggt aaatgaatta gtacggatg
gtcccagtc gcattattt tagattggcc gtaggggctg gggtagaact agagtaagga
acattgctc gccctcttt gaactgcat ataaatacct gacctattt attctcatt
atcgtattat ctcacctc ttttctatt ctctgtaat tattgattta tagtcgtaac
tacaagaca agcaaaataa aatacgttc ctctattaag
```

Otros promotores que no están en el alcance de la presente invención pueden tener las siguientes secuencias de nucleótidos:

SEQ ID NO: 2: (gen CWP2: derivado de *Saccharomyces cerevisiae*)

ctaatagaca aggtgctatg agtgaattgc tagcctcccc tttttatfff gtgcggtcac
 cgcaagggac aaagcttttc ttagaaaacc gtctgagaag cataacgtac gccatccct
 agacatatta ataatgctac agatactatg ctgctcgtct tttttgacg accctttat
 tgcaatgtgc aactaatggc aaacaaccac atagtatcac agtattacat tgctccacc
 gatgcgatg ttagggcgcc aagtctgtca tgaagcatgt tctgtcata atcttgatg
 caaaataccg cgttctgagc cactgatatg ctaggcagca gcaacctatg cagaagattg
 cttttccac gctgtttta cgtctccagg gcaattgaaa caatgcagcg atcgcgcca
 caacacgcca aagagaagcg aaagtgggccc tgggcgccct cagtttcggc agaggtaaac
 aacacgaact gaactgcctt agctccgaag ggcaattcca caggcactcc gcggggcccc
 gccaaagccc aaaaggcgtg gaatatgagc gttttggggc cataacacc agtaccacgg
 ccggaacggg ccatataata agttttcac tctcaagaat ggtaaaccgta aataggaaca
 tcccactacc ctgaaaattg cggaaatttc gcgcttatca ttagaaaatc tggaaccgct
 cttttctc tttcttgc at ttcctttcc gtattattgc cattctttaa ctgcatttg
 ggaaccgtag accaaaagcc aaacagagaa atgtaacggt ctaaaaaaaaa aacaacgaaa
 aaattgaaaa ataagataca ataactgtat ataatcagg cttctgttc atcattttca
 attctctct tgccatccct tttctatct ttgtttttt cttctcataa tcaagaataa
 ataacttcat cacattcgt acacactaac aagaaaaaaaa

5

SEQ ID NO: 3: (gen ENO1: derivado de *Saccharomyces cerevisiae*)

tagaaagcat actatactat tcgacacttc ctttcaatcc tggaattaac agtcacttt
 aaaaaagaca tctaccgtga aggtgccgta gagtatcgcg ttaccatate gccaaaaact
 gatatacgcc gcggaaacca ggcaacaat tgaagagaaa aattttgagg aactctctgc
 atcgaagccg tctagagtta cactagtca gatgcccggg gcaattgagc acctcatgca
 cagcaataac acaacacaat ggttagtagc aacctgaatt cggtcattga tgcattcatg
 tgccgtgaag cgggacaacc agaaaagtcg tctataaatg ccggcacgtg cgatcatcgt
 ggccggggtt taagagtga taccacaaat tctgcatta ccgaggaaacc gccagatatt
 cattacttga cgaaaagcg tttgaaataa tgacgaaaaa gaaggaagaa aaaaaagaa
 aaataccgct tctaggcggg ttatctactg atccgagctt cactaggat agcaccaaa
 cacctgcata tttgagcagc ctttacttac accacaaaa accactttcg cctctccc
 cctgataac gtccaactat tgagcgatta cctgagcggc cctcttttgt ttgcagcatg
 agacttgc atctgaaate gtaagtagca acgtctcaag gtcaaaactg tatggaacc
 ttgtcacctc acttaattct agctagccta cctgcaagt caagaggctt ccgtgattcc
 tagccacctc aaggtatgcc tctcccggga aactgtggcc tttctggca cacatgatct
 ccacgatttc aacatataaa tagcttttga taatggcaat ataatcaaa tttattttac
 ttcttcttg taacatctct cttgtaatcc cttattcctt ctgctatfff ttcataaaaa
 accaagcaac tgcttatcaa cacacaaaca ctaaatcaaa

Las "condiciones rigurosas" en la presente descripción son unas condiciones en las que una sonda hibrida con su secuencia diana en un grado más alto que con otras secuencias (p. ej., al menos dos veces mayor que el fondo).

Las condiciones rigurosas dependen de la secuencia y varían de acuerdo con el entorno en el que se lleva a cabo la hibridación. Aquí, las condiciones rigurosas consisten en una temperatura de hibridación de 37°C en presencia de formamida al 50%, y unas condiciones más severas consisten en una temperatura de aproximadamente 42°C. Unas condiciones rigurosas adicionales consisten en una temperatura de hibridación de aproximadamente 65°C en presencia de formamida.

Otro casete de expresión de lactato deshidrogenasa que no está dentro del alcance de la presente invención contiene un promotor seleccionado entre el siguiente grupo (a) y un gen que codifica lactato deshidrogenasa seleccionado del grupo (b):

(a)

10 (1) Los promotores que tienen una secuencia de nucleótidos representada por uno cualquiera de los SEQ ID NO: 2-3;

(2) Los promotores que tienen una secuencia de nucleótidos que hibrida con una secuencia de nucleótidos representada por uno cualquiera de los SEQ ID NO: 2 a 3 o una secuencia de nucleótidos que tiene parte de ella bajo condiciones rigurosas; y

15 (3) Los promotores que tienen una secuencia de nucleótidos obtenida por delección, sustitución y/o adición de una o más bases de la secuencia de nucleótidos representada por uno cualquiera de los siguientes SEQ ID NO: 2-3; y

(b)

(1) Los genes que codifican lactato deshidrogenasa que tiene una secuencia de nucleótidos representada por uno cualquiera de los siguientes SEQ ID NO: 4-6;

20 (2) Los genes que codifican lactato deshidrogenasa que tiene una secuencia de nucleótidos que hibrida con una secuencia de nucleótidos representada por uno cualquiera de los siguientes SEQ ID NO: 4-6 o una secuencia de nucleótidos que tiene parte de ella bajo condiciones rigurosas; y

25 (3) Los genes que codifican lactato deshidrogenasa que tiene una secuencia de nucleótidos obtenida por delección, sustitución y/o adición de una o más bases en las secuencias de nucleótidos representada por uno cualquiera de los siguientes SEQ ID NO: 4-6.

SEQ ID NO: 4: derivado de *Xenopus laevis*

```

atggcaactg tgaaggataa actcatccac aatgtggtca aggaggagtc gtcccccag
aacaaggta ccattgtggg tgtgggggcc gtgggcatgg cctgtgcat cagtgtcctg
cagaaggatt tggcagatga gcttgcaact gttgatgtga tagaagaca actgaagggg
gaaatgatgg atctccagca tggcagtctg ttccttcgta ccccaagat tgtctcaggg
aaagattaca gcgtcactgc aaactccaag ctggtagtgtg tgacggccgg ggcccgtcag
caggaggag agagtcgct gaatctgggt cagcgaatg tcaacatctt caaattcatc
attccaaca ttgtcaagta cagcccaac tgcacctgc tcatcgtctc caaccagtg

gacattctga catatgtggc ctggaagatc agtggattcc ccaaaaaccg tgtcattggc
agcggctgca atttggactc tgcccgttc cgttacctca tggggcagaa gtttgggatc
cacaccaga gctgccacgg ttgggtcatt ggggaacacg gagactcgag tgtgccagtg
tggagtgggg tgaatgtggtc tggcgtgtcc ctgaaaacc tgcacccga tattgggagt
gacgcagaca aggagaactg gaaggaggtg cacaagcagg ttgtggacag cgctatgaa
gtgatcaagc tgaagggcta cacctcctgg gctattggcc tgtccgtagc tgacctgtct
gagagtatcc tgaagaacct ccgccgagtc catccattt ccacaatggt caagggcattg
tacggcgtga ataatgatgt tttcctcagt gtcccctgtg tgttgggcaa cttgggcatc
acagacgtgg ttaacatgac gctgaaggca gatgaagagg atcgcttacg caagagcgca
gacacctgt gggccatcca gaaggagctg cagttctag
    
```

SEQ ID NO 5: derivado de Homo sapiens

atggcaactc taaaggatca gctgattat aatcttctaa aggaagaaca gacccccag
aataagatta cagttgttg ggttggtgct gttggcatgg cctgtgcat cagtatctta
atgaaggact tggcagatga acttgctctt gttgatgtca tcgaagacaa attgaaggga
gagatgatgg atctccaaca tggcagcctt ttccttagaa caccaaagat tgtctctggc
aaagactata atgtaactgc aaactccaag ctggtcatta tcacggctgg ggcacgtcag
caagagggag aaagccgtct taatttgctc cagcgtaacg tgaacatatt taaattcatc
attcctaagt ttgtaaaata cagcccgaac tgcaagttgc ttattgttc aaatccagtg
gatacttga cctacgtggc ttggaagata agtggtttc caaaaaccg tgttattgga
agtggttgca atctggattc agcccattc cgttacctga tgggggaaag gctgggagtt
caccattaa gctgtcatgg tgggtcctt ggggaacatg gagattccag tgtcctgta
tggagtggaa tgaatgttc tgggtctct ctgaagactc tgcaccaga ttagggact
gataagata aggaacagt gaaagaggt cacaagcagg tgggtgagag tgcttatgag
gtgatcaaac tcaaggcta cacatcctgg gctattggac tctctgtac agattggca
gagagtataa tgaagaatct taggcgggtg caccagttt ccacatgat taagggtctt
tacggaataa aggatgatgt ctcttagt gttccttga tttgggaca gaatggaatc
tcagacctg tgaaggtag tctgactct gaggaagagg cccgtttgaa gaagagtgca
gatacactt ggggatcca aaaggagctg caattttaa

SEQ ID NO: 6: derivado de Leuconostoc mesenteroides

atgaagattt ttgctacgg cattcgtgat gatgaaaagc catcacttga agaatggaaa
gcgctaacc cagagattga agtggactac acacaagaat tattgacacc tgaacagct
aagttggctg agggatcaga ttcagctgtt gttatcaac aattggacta tacacgtgaa
acattgacag ctttagctaa cgttgggtt actaactgt cattgcgtaa cgttggta
gataacattg atttgatgc agcagctgaa ttaacttta acattcaaa tttcctgtt
tattaccaa atgctattgc agaactca atgctcaat tatctctgtt gctacgtgc
acgaaagcat tggatgcaa aattgctaag cgagacttgc gttgggacc acaactgga
cgtgaaatgc gtagcaaac agttgggtt attggtacag gtcattatgg ccgtgttct
attaacattt tgaaggctt tggggccaag gttattgctt atgacaagta cccaatgct
gaattacaag cagaaggtt gtacgttgc acattagacg aattatatgc acaagctgat
gcaatttcat tgtatgttc tgggtacct gaaaaccatc atctaataa tgcagatgct
attgctaaga tgaaggatgg tgtggttatc atgaacgctg cgcgtggtaa tttgatggac
attgacgcta ttattgatgg ttgaattct ggtaagatt cagactcgg tatggactt
tatgaaaatg aagttgctt tcaatgaag attggtctg taaagaattc cccagatgct
aagattgctg acttgattgc acgcgaaaat gttatgatca cccacacac ggcttctat
acaactaaag ctgttctaga aatgggtcac caatcattg atgcagcagt tgcttccg
aagggtgaga agccagctat tgctgtttaa tatta

5

[Cepa de levadura transformante]

La presente invención se refiere a una cepa de levadura transformante que tiene al menos un casete de expresión de lactato deshidrogenasa en el cromosoma. La cepa de levadura transformante de acuerdo con la presente invención puede tener el casete de expresión de lactato deshidrogenasa introducido en cualquier posición del

cromosoma en la que se pueda expresar la LDH desde el casete de expresión de lactato deshidrogenasa. Preferiblemente, en la levadura al menos un gen SED1 esta sustituido por el casete de expresión de lactato deshidrogenasa.

- 5 La levadura para su uso en la presente invención se puede utilizar favorablemente, si es una levadura en la que se puede introducir el casete de expresión de lactato deshidrogenasa. Un ejemplo de la misma es una levadura que pertenece a las especies de *Saccharomyces*, las especies de *Schizosaccharomyces*, las especies de *Zygosaccharomyces*, las especies de *Kluyveromyces* o las especies de *Candida*. Es preferiblemente una levadura que pertenece a las especies de *Saccharomyces*. Es más preferiblemente *Saccharomyces cerevisiae*.

[Método de producción de ácido láctico]

- 10 La presente invención se refiere a un método de producción de ácido láctico, que comprende cultivar la cepa de levadura transformante como se define en la reivindicación 1. Es preferiblemente un cultivo continuo de filtración de la solución de cultivo a través de una membrana de separación, recuperación de ácido láctico a partir del producto filtrado, mantenimiento o retro-alimentación de la solución no filtrada a la solución de cultivo y reposición del medio a la solución de cultivo.

- 15 Los materiales de fermentación brutos para la levadura utilizada en la presente invención son capaces de aceleran el crecimiento de la levadura en el cultivo de fermentación y el producto de fermentación de ácido láctico deseable se produce de manera eficiente. Una materia prima de fermentación favorable es un medio líquido que contiene fuentes de carbono, fuentes de nitrógeno, sales inorgánicas y, según sea necesario, aminoácidos y nutrientes vestigiales orgánicos, tales como vitaminas en cantidades adecuadas.

- 20 Los ejemplos de las fuentes de carbono que se van a utilizar incluyen azúcares tales como glucosa, sacarosa, fructosa, galactosa y la lactosa; mezclas que contengan estos azúcares tales como producto hidrolizado de almidón, jarabe de batata, jarabe de remolacha, melazas Hi Test y extracto de caña de azúcar; ácidos orgánicos tales como ácido acético y ácido fumárico; alcoholes tales como etanol; glicerol; y similares. Los azúcares anteriores son carbohidratos que tienen un grupo aldehído o un grupo cetona, que son los primeros productos de oxidación de los alcoholes polivalentes, y se agrupan en aldosas que tienen grupos aldehído y cetosas que tienen grupos cetona.

- 25 Los ejemplos de las fuentes de nitrógeno incluyen amoniaco gaseoso, agua amoniaco, sales de amonio, urea, sales nitrato, otras fuentes de nitrógeno orgánico utilizadas auxiliares (tales como tortas de aceite, producto hidrolizado de haba de soja, productos de descomposición de caseína, otros aminoácidos, vitaminas, aguas de infusión de maíz, levadura o extracto de levadura, extractos de filete, péptidos tales como peptona, varios microbios de fermentación y los productos hidrolizados de los mismos) y similares.

- 30 Los ejemplos de las sales inorgánicas añadidas, según sea necesario incluyen sales fosfato, sales de magnesio, sales de calcio, sales de hierro, sales de manganeso y similares.

- 35 Cuando se necesita un nutriente en particular para el crecimiento de la levadura que se utiliza en la presente invención, el nutriente se puede añadir en forma de un reactivo convencional o un producto natural que contenga el mismo. Además, se puede añadir un agente antiespumante si es necesario.

- 40 La solución de cultivo de fermentación, según se utiliza en la presente invención, representa una solución obtenida después del crecimiento de la cepa de levadura con las materias primas de fermentación. La composición de las materias primas de fermentación que se añaden se puede alterar adecuadamente de acuerdo con la composición de las materias primas de fermentación utilizadas cuando se inicia el cultivo. Si la composición de las materias primas de fermentación añadidas es diferente de la de la materia prima de fermentación añadida al principio, es preferible una modificación que conduzca a un aumento de la productividad de ácido láctico deseable. A menudo es posible disminuir el coste de producción de ácido láctico, es decir, aumentar la productividad de ácido láctico en un sentido amplio, por ejemplo disminuyendo los porcentajes en peso de la fuente de nitrógeno, las sales inorgánicas, los aminoácidos y los nutrientes orgánicos en cantidades vestigiales tales como vitaminas con respecto a la fuente de carbono. Por otra parte, puede ser posible mejorar la productividad de ácido láctico, aumentando el porcentaje en peso de fuente de nitrógeno, las sales inorgánicas, los aminoácidos y los nutrientes orgánicos en cantidades vestigiales, tales como vitaminas con respecto a la fuente de carbono.

- 50 En la presente invención, las concentraciones de las materias primas de fermentación tales como azúcar en la solución de cultivo de fermentación se mantienen preferiblemente a 5 g/L o menos. Las concentraciones se mantienen más preferiblemente al 3 g/L o menos, más preferiblemente a 1 g/L o menos. Tiene el objetivo de minimizar la pérdida de las materias primas de fermentación por la retirada de la solución de cultivo de fermentación. Por lo tanto, las concentraciones de las materias primas de fermentación en la solución de cultivo de fermentación son deseablemente lo más bajas posible.

- 55 El cultivo de fermentación de levadura se lleva a cabo normalmente, con frecuencia a un pH de 3 a 8 y una temperatura en el intervalo de 20 a 40°C. Debido a que el ácido láctico producto es una sustancia ácida, el pH de la solución de cultivo de fermentación se ajusta a un valor predeterminado en el intervalo anterior con una sustancia alcalina, urea, carbonato de calcio, gas amoníaco o similares.

5 Si la tasa de suministro de oxígeno se aumenta deseablemente en el cultivo de fermentación de levadura, puede ser posible aumentar la tasa de suministro de oxígeno, por ejemplo, manteniendo la concentración de oxígeno en 21% o más mediante adición de oxígeno en el aire, presurización de la solución de cultivo de fermentación, el aumento de la velocidad de agitación o el aumento de la tasa de ventilación. Alternativamente, si se necesita reducir la tasa de suministro de oxígeno, puede ser también posible mezclar aire con un gas libre de oxígeno, tal como dióxido de carbono, nitrógeno o argón y suministrar el gas mixto.

10 En la presente invención, se puede iniciar un cultivo continuo (retirada) después de que la concentración de levadura se incremente en el cultivo por lotes o el cultivo de alimentación en la fase temprana del cultivo, o alternativamente, se puede iniciar el cultivo continuo de forma simultánea con el cultivo mediante la siembra de levadura a una concentración más alta. Es posible suministrar la solución de materia prima de fermentación y retirar la solución cultivada simultáneamente desde un punto adecuado. El suministro de la materia prima de fermentación y la retirada de la disolución cultivada no se pueden llevar a cabo al mismo tiempo. Alternativamente, el suministro de la materia prima de fermentación y la retirada de la solución cultivada se pueden llevar a cabo de forma continua o intermitente. Los nutrientes descritos anteriormente necesarios para el crecimiento de los microbios se añaden preferiblemente a la solución de materia prima de fermentación para el crecimiento continuo de los microbios.

15 Para una producción más eficaz, la concentración de la levadura en la solución de cultivo de fermentación se mantiene preferiblemente elevada en el rango en el que el entorno de la solución de cultivo de fermentación no es inadecuado para el crecimiento de la levadura y la tasa de mortalidad no se incrementa. Es posible, por ejemplo, obtener una productividad más favorable, manteniendo la concentración de levadura, como peso en seco, en 5 g/L o más. La concentración máxima de la levadura no está particularmente limitada, si no causa problemas en el funcionamiento del aparato de fermentación continua o da lugar al deterioro de la productividad.

20 Cuando el cultivo continuo se lleva a cabo mediante el uso de microbios de nueva aportación capaces susceptibles de producir fermentación, se lleva a cabo preferiblemente, de una manera normal en un solo tanque de reacción de fermentación para el control del cultivo. Sin embargo, en el caso de un método de cultivo continuo de producción de ácido láctico con crecimiento simultáneo de microbios, el número de tanques de reacción de fermentación es arbitrario. Se pueden utilizar múltiples tanques de reacción de fermentación, por ejemplo, debido a que la capacidad de un tanque de reacción de fermentación es pequeña. Es posible, en tal caso, obtener el producto de fermentación a alta productividad, incluso si se lleva a cabo el cultivo continuo, ya que los múltiples tanques de reacción de fermentación están conectados en paralelo o en serie entre sí por tuberías.

25 El ácido láctico contenido en la solución de cultivo producido por el método de producción de ácido láctico de acuerdo con la presente invención se puede separar y purificar mediante una combinación de métodos conocidos tales como intercambio iónico, concentración, destilación y cristalización.

30 Por ejemplo, un aparato de fermentación utilizado en el método de producción de ácido láctico de acuerdo con la presente invención está configurado para que tenga principalmente un tanque de reacción de fermentación para la producción de ácido láctico, que contenga la cepa de levadura transformante de acuerdo con la presente invención en el mismo, y un elemento de membrana de separación que contenga una membrana porosa para la separación de la solución de cultivo de la cepa de levadura transformante por filtración. El elemento de membrana de separación puede ser instalado dentro o fuera del tanque de reacción de fermentación.

35 En el método de producción de ácido láctico por cultivo continuo por medio de la filtración de la solución de cultivo de acuerdo con la presente invención con una membrana de separación, la recuperación de ácido láctico a partir del producto filtrado, manteniendo o retroalimentando la solución no filtrada a la solución de cultivo y añadiendo el medio a la solución de cultivo, es preferible utilizar una membrana porosa que tenga un diámetro medio de microporo de 0,01 μm o más y menos de 1 μm como membrana de separación y filtrar la solución de cultivo a una presión de filtración, es decir, una diferencia de presión transmembrana, en el intervalo de 0,1 a 20 kPa. Debido a que no es particularmente necesario presurizar el tanque de reacción de fermentación, no es necesario un medio de accionamiento para la circulación de la solución de cultivo de fermentación entre el aparato de separación de la filtración y el tanque de reacción de fermentación, y por lo tanto, el elemento de membrana de separación se puede instalar en el tanque de reacción de fermentación para la reducción del tamaño del aparato de cultivo de fermentación.

40 La configuración de la membrana porosa utilizada favorablemente como membrana de separación en la presente invención se describirá a continuación. La membrana porosa de acuerdo con la presente invención es una membrana que tiene una separabilidad y una permeabilidad al agua adecuadas de acuerdo con la calidad y la aplicación del agua tratada, y es preferiblemente una membrana porosa que tiene una capa de resina porosa, desde los puntos de propiedades de separación, tales como el funcionamiento de bloqueo, la permeabilidad al agua y la resistencia a las manchas. Dicha membrana porosa tiene una capa de resina porosa que funciona como capa de separación funcional sobre la superficie del material de base poroso. El material de base poroso fortalece la membrana de separación soportando la capa de resina porosa.

45 El material para el material base poroso puede ser un material orgánico o inorgánico, pero se utiliza de manera favorable una fibra orgánica. Los ejemplos de materiales de base porosa favorables incluyen telas tejidas y telas no

tejidas producidas mediante el uso de una fibra orgánica tal como fibra de celulosa, fibra de triacetato de celulosa, fibra de poliéster, fibra de polipropileno o fibra de polietileno, y, entre los materiales anteriores, se utilizan de manera favorable las telas no tejidas, que son baratas, se producen fácilmente y permiten un control relativamente más sencillo de la densidad.

- 5 La capa de resina porosa funciona como una capa de separación funcional, como se ha descrito anteriormente, y se puede utilizar de manera favorable una membrana de polímero orgánico. Los ejemplos de los materiales para la membrana de polímero orgánico incluyen resinas de polietileno, resinas de polipropileno, resinas de poli(cloruro de vinilo), resinas de poli(fluoruro de vinilideno), resinas de polisulfona, resinas de poli(éter sulfona), resinas de poliacrilonitrilo, resinas celulósicas, resinas de triacetato de celulosa y similares. La membrana de polímero orgánico
10 puede ser una mezcla de resinas que contienen la resina como componente principal. El término "componente principal", según se utiliza en la presente memoria, significa que el componente está contenido en una cantidad de 50% en peso o más, preferiblemente 60% en peso o más. En particular, la materia prima que constituye la capa de resina porosa es preferiblemente una resina que permite la formación de membrana fácil ya que su solución es superior en durabilidad física y resistencia química, tal como resina de poli(cloruro de vinilo), resina de poli(fluoruro de vinilideno), resina de polisulfona, resina de poli(éter sulfona) o resina de poliacrilonitrilo, y se utiliza de manera
15 más favorable una resina de poli(fluoruro de vinilideno) o una resina que lo contiene como componente principal.

La resina de poli(fluoruro de vinilideno) utilizada de manera favorable es un homopolímero de fluoruro de vinilideno, pero también se utilizan de manera favorable copolímeros del mismo con un monómero copolimerizable de vinilo con fluoruro de vinilideno. Los ejemplos de los monómeros de vinilo copolimerizables con fluoruro de vinilideno incluyen tetrafluoroetileno, hexafluoropropileno, fluoruro de etileno tricloruro, y similares.
20

La membrana de separación para su uso en la presente invención puede ser una membrana plana o una membrana de fibra hueca. En el caso de una membrana plana, el espesor medio se determina de acuerdo con la selección de las aplicaciones, pero preferiblemente se selecciona en el intervalo de 20 μm o más y 5.000 μm o menos, más preferiblemente 50 μm o más y 2.000 μm o menos.

- 25 Como se describió anteriormente, la membrana de separación para su uso en la presente invención es preferentemente una membrana porosa hecha de un material de base porosa y una capa de resina porosa. A continuación la capa de resina porosa puede penetrar o no en el material base poroso, y el grado se selecciona según la aplicación. El espesor medio del material de base porosa se selecciona preferiblemente en el intervalo de 50 μm o más y 3.000 μm o menos. Cuando la membrana porosa es una membrana de fibra hueca, el diámetro interno de la fibra hueca se selecciona preferiblemente en el intervalo de 200 μm o más y 5.000 μm o menos, y el espesor de la película se selecciona preferiblemente en el intervalo de 20 μm o más y 2000 μm o menos. La fibra hueca puede contener un género tejido o de punto tubular de fibra orgánica o inorgánica.
30

En primer lugar, se describirá brevemente un método de producción de una membrana plana, entre las membranas porosas anteriores.

- 35 Se forma una película de una solución concentrada que contiene la resina y un disolvente sobre la superficie de un material base porosa, mientras que se permite la impregnación de la solución concentrada en el material base porosa. Posteriormente, sólo la superficie del lado de la película del material de base porosa que porta la película se pone en contacto con un baño de coagulación que contiene una sustancia no disolvente, para la solidificación de la resina y la formación de una capa de resina porosa sobre la superficie del material de base porosa. La solución concentrada se prepara disolviendo una resina en un disolvente. La solución concentrada puede contener
40 adicionalmente un no disolvente. La temperatura de la solución concentrada se selecciona preferiblemente de manera normal en el intervalo de 15 a 120°C, desde el punto de vista de la eficacia de formación de membrana.

La solución concentrada puede contener en ese caso un agente de formación de poros, además. El agente formador de poros tiene la actividad de hacer porosa la capa de resina, ya que se extrae de la película recubierta cuando se sumerge en el baño de coagulación. Se puede controlar el tamaño del diámetro medio del microporo, mediante la adición del agente formador de poros. El agente formador de poros es preferentemente muy soluble en el baño de coagulación. Los ejemplos de los agentes formadores de poros utilizados favorablemente incluyen sales inorgánicas tales como cloruro de calcio y carbonato de calcio. Alternativamente, se pueden utilizar un polioxialquileno tal como polietilenglicol y polipropilenglicol; un compuesto polimérico soluble en agua tal como poli(alcohol vinílico), polivinilbutiral y poli(ácido acrílico); y glicerol como el agente formador de poros.
45
50

El disolvente es un compuesto que disuelve las resinas. El disolvente acelera la formación de la capa de resina porosa en la interacción con la resina y el agente de formación de poros. Los ejemplos de los disolventes que se van a utilizar incluyen N-metilpirrolidinona (NMP), N,N-dimetilacetamida (DMAc), N,N-dimetilformamida (DMF), dimetilsulfóxido (DMSO), N-metil-2-pirrolidona, metiletilcetona, tetrahidrofurano, tetrametilurea, fosfato de trimetil, ciclohexanona, isoforona, γ -butilolactona, metilisoamilcetona, ftalato de dimetilo, metiléter de propilenglicol, carbonato de propileno, alcohol de diacetona, triacetato de glicerol, acetona, metiletilcetona y similares. Entre ellos, se utilizan favorablemente los disolventes en los que la resina es altamente soluble, tales como NMP, DMAc, DMF y DMSO. Estos disolventes se pueden usar solos o como una mezcla de dos o más. La solución concentrada se puede preparar disolviendo la resina anteriormente descrita en el disolvente descrito más arriba, preferiblemente a
55

una concentración de 5% en peso o más y de 60% en peso o menos.

5 Por ejemplo, se pueden añadir al disolvente componentes que no sean disolventes tales como polietilenglicol, poli(alcohol vinílico), polivinilpirrolidona y glicerol. El no disolvente es un líquido que no disuelve las resinas. El no disolvente controla la velocidad de solidificación de la resina y por lo tanto el tamaño del microporo. Se pueden utilizar como no disolvente agua o un alcohol tal como metanol o etanol. En particular, el agua y el metanol son preferibles desde el punto de vista del precio. El no disolvente puede ser una mezcla de estos disolventes.

En lo sucesivo, se describirá brevemente el método de producción de una membrana de fibra hueca, entre las membranas porosas.

10 La membrana de fibra hueca se puede preparar por extrusión de una solución concentrada que contiene una resina y un disolvente fuera de la tubería externa de un troquel de doble tubo y un fluido de formación de hueco fuera de la tubería interna del troquel de doble tubo y solidificación de la solución por refrigeración en un baño de refrigeración.

15 La solución concentrada se puede preparar disolviendo la resina descrita en el método de producción de una membrana plana en el disolvente descrito en el método de producción de una membrana plana preferiblemente a una concentración de 20% en peso o más a 60% en peso o menos. El fluido de formación de hueco que se va a utilizar es normalmente gas o líquido. Además, una capa de resina porosa adicional puede aplicarse como recubrimiento (laminada) sobre la superficie más externa de la membrana de fibra hueca obtenida. La laminación se puede llevar a cabo, por ejemplo, para la modificación de las propiedades de la membrana de fibra hueca, tales como el carácter hidrófobo-hidrófilo y el diámetro del microporo, a las propiedades deseadas. El laminado de la capa de resina porosa adicional se puede preparar poniendo en contacto la solución concentrada que contiene una resina disuelta en un disolvente con un baño de coagulación que contiene una sustancia no disolvente y solidificando de ese modo la resina. Por ejemplo, se pueden utilizar de manera favorable materiales similares a los de la membrana de polímero orgánico descrita anteriormente como los materiales de la resina. En cuanto al método de laminación, la membrana de fibra hueca se puede sumergir en la solución concentrada o se puede aplicar la solución concentrada sobre la superficie de la membrana de fibra hueca, y la cantidad de laminación se puede ajustar después de la laminación exprimiendo una parte de la solución concentrada adherida o purgando a fondo la solución concentrada con un cuchillo de aire.

20 La membrana de separación para su uso en la presente invención proporciona un elemento de membrana separación combinado con un miembro de soporte. Un elemento de membrana de separación que tiene una placa de soporte utilizada como miembro de soporte y una membrana de separación para su uso en la presente invención formada al menos sobre una cara de la placa de soporte es una realización favorable del elemento de membrana de separación que tiene la membrana de separación para su uso en la presente invención. Si es difícil aumentar el área de la membrana en su conformación, es preferible formar una membrana de separación sobre ambas caras de la placa de soporte para el aumento de la permeabilidad al agua.

35 Cuando la membrana porosa usada como membrana de separación tiene un diámetro de microporo medio en el intervalo de $0,01 \mu\text{m}$ o más y menos de $1 \mu\text{m}$, como se ha descrito anteriormente, la membrana muestra tanto una alta tasa de exclusión que impide las fugas de microbios y de lodo como una elevada permeabilidad al agua al mismo tiempo, y puede conservar una permeabilidad al agua favorable sin obstrucción durante un período prolongado de tiempo con una mayor precisión y reproducibilidad. Si se utilizan microbios, el diámetro medio de los microporos de la membrana porosa es preferiblemente de $0,4 \mu\text{m}$ o menos, y la membrana puede ser utilizada de manera más favorable, si su diámetro medio de microporo es de menos de $0,2 \mu\text{m}$. La permeabilidad al agua puede disminuir cuando el diámetro medio de microporo es excesivamente pequeño, y por lo tanto en la presente invención, el diámetro medio de microporo es de $0,01 \mu\text{m}$ o más, preferiblemente de $0,02 \mu\text{m}$ o más y aún más preferiblemente de $0,04 \mu\text{m}$ o más.

40 El diámetro medio de microporo se puede determinar mediante la medición de los diámetros de todos los microporos observables en el intervalo de $9,2 \mu\text{m} \times 10,4 \mu\text{m}$ por observación bajo microscopio electrónico de barrido con un aumento de 10.000 veces y promediando los diámetros obtenidos de este modo.

45 La desviación típica σ del diámetro medio de microporo es preferiblemente de $0,1 \mu\text{m}$ o menos. Además, se puede obtener una fracción que penetra homogénea, cuando la desviación típica del diámetro medio de microporo es pequeña, es decir, cuando el diámetro de los microporos es de un tamaño uniforme. La desviación típica del diámetro medio de microporo es deseablemente tan pequeña como sea posible, porque es más fácil para controlar la operación de fermentación.

50 Cuando el número de microporos observado en el intervalo de $9,2 \mu\text{m} \times 10,4 \mu\text{m}$ descrito anteriormente se designa como N, cada diámetro medido como Xk y el promedio del diámetro de microporo como X(promedio), la desviación típica σ del diámetro medio de microporo se calcula de acuerdo con la siguiente Fórmula 1:

55

[Formula 1]

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum_{k=1}^N (X_k - X(\text{promedio}))^2}{N}} \dots \dots \text{(Fórmula 1)}$$

La permeabilidad de la solución de cultivo de fermentación es una de las propiedades importantes de la membrana de separación para su uso en la presente invención, y se puede utilizar el coeficiente de permeabilidad del agua pura de la membrana de separación antes de su uso como indicador de permeabilidad. En la presente invención, el coeficiente de permeabilidad del agua pura de la membrana de separación, tal como se determina mediante el uso de agua purificada por medio de una membrana de ósmosis inversa a una temperatura de 25°C y una diferencia de altura de 1 m, es preferiblemente de $2 \times 10^{-9} \text{ m}^3/(\text{m}^2 \cdot \text{s} \cdot \text{Pa})$. Se puede obtener una permeabilidad en agua suficiente en la práctica, cuando el coeficiente de permeabilidad del agua pura es de $2 \times 10^{-9} \text{ m}^3/(\text{m}^2 \cdot \text{s} \cdot \text{Pa})$ o más y de $6 \times 10^{-7} \text{ m}^3/(\text{m}^2 \cdot \text{s} \cdot \text{Pa})$ o menos. Más preferible, el coeficiente de permeabilidad del agua pura es de $2 \times 10^{-9} \text{ m}^3/(\text{m}^2 \cdot \text{s} \cdot \text{Pa})$ o más y de $1 \times 10^{-7} \text{ m}^3/(\text{m}^2 \cdot \text{s} \cdot \text{Pa})$ o menos.

La rugosidad de la superficie de membrana de la membrana de separación para su uso en la presente invención es un factor que ejerce una influencia en la obstrucción de la membrana de separación. Se puede disminuir el coeficiente de exfoliación y la resistencia de la película de la membrana de separación favorablemente y llevar a cabo la fermentación continua a una menor diferencia de presión transmembra, cuando la rugosidad de la superficie de la membrana es preferentemente de $0,1 \mu\text{m}$ o menos. Esto, por lo tanto, conduce a la prevención de la obstrucción y a la fermentación continua estabilizada, y por esa razón, la rugosidad de la superficie es preferiblemente tan baja como sea posible.

Además, sería posible, mediante la reducción de la rugosidad de la superficie de membrana de la membrana de separación, reducir la fuerza de cizallamiento generada sobre la superficie de la membrana durante la filtración de los microbios, conduciendo de ese modo a la supresión de la descomposición de los microbios y la obstrucción de la membrana de separación, y a una filtración estabilizada continua durante un período prolongado de tiempo.

La rugosidad de la superficie de la membrana se puede determinar utilizando el siguiente aparato de microscopía de fuerza atómica (AFM) y el aparato siguiente en las condiciones de más abajo. El aparato de microscopía de fuerza atómica (AFM) utilizado es preferiblemente un aparato con una calidad equivalente a o mayor que el aparato siguiente.

- Aparato: aparato de microscopía de fuerza atómica (Nanoscope IIIa, fabricado por Digital Instruments Co., Ltd.)
- Condiciones: Sonda: Voladizo SiN (fabricado por Digital Instruments Co., Ltd.)
 - : Modo de exploración: modo de contacto (medición de fase gaseosa)
 - modo de descarga bajo el agua (medida bajo el agua)
 - : Intervalo de barrido: $10 \mu\text{m}$, $25 \mu\text{m}$ cuadrados (medición de fase gaseosa)
 - $5 \mu\text{m}$, $10 \mu\text{m}$ cuadrado (medición bajo el agua)
 - : Definición de barrido: 512×512
- Preparación de la muestra:
 - En la medición, la muestra de membrana se sumergió en etanol a temperatura ambiente durante 15 minutos y luego en agua RO durante 24 horas y después se secó al aire antes de su uso. El agua RO es el agua de la que se han eliminado las impurezas tales como iones y sales con una membrana de ósmosis inversa (membrana RO), una especie de membrana de filtración. El tamaño de los poros en la membrana RO es de aproximadamente 2 nm o menos.

La rugosidad de la superficie de la membrana (d_{rugosa}) se calcula a partir de la altura de cada punto en la dirección del eje Z observado bajo el AFM de acuerdo con la siguiente Fórmula 2:

[Fórmula 2]

$$d_{(rugosa)} = \sum_{n=1}^N \frac{|Z_n - \bar{Z}|}{N} \dots \dots \text{(Fórmula 2)}$$

D_{rugosa} : Rugosidad de la superficie (μm)

Z_n : Altura en el eje Z (μm)

Z : Altura media en el intervalo de barrido (μm)

5 N : Número de muestras medidas

En la presente invención, la diferencia de presión transmembrana cuando los microbios se filtran a través de la membrana de separación es preferiblemente una condición que evita la obstrucción fácil por los microbios y los componentes del medio, pero es importante para llevar a cabo el tratamiento de filtración a una diferencia de presión transmembrana en el intervalo de 0,1 kPa o más y 20 kPa o menos. La diferencia de presión transmembrana está preferiblemente en el intervalo de 0,1 kPa o más y 10 kPa o menos, más preferiblemente en el intervalo de 0,1 kPa o más y 5 kPa. La desviación del intervalo de la diferencia de presión transmembrana puede dar lugar a una rápida obstrucción por los microbios y los componentes del medio, que posiblemente conduzca a una disminución de la cantidad de agua que ha penetrado y a problemas en el funcionamiento de la fermentación continua.

En cuanto a la fuerza motriz para la filtración, la diferencia de presión transmembrana se puede generar en la membrana de separación por el principio del sifón de la utilización de la diferencia de nivel de líquido (diferencia de carga hidráulica) entre la solución de cultivo de fermentación y el agua tratada separada por la membrana. Para la fuerza motriz de filtración, se puede instalar una bomba de succión en el lado del agua tratada separada por la membrana o se puede instalar una bomba de presurización en el lado de la solución de cultivo de fermentación de la membrana de separación. La diferencia de presión transmembrana se puede controlar mediante la modificación de la diferencia de nivel de líquido entre la solución de cultivo de fermentación y el agua tratada separada por la membrana. Cuando se usa una bomba para la generación de diferencia de presión transmembrana, la diferencia de presión transmembrana se puede controlar por la fuerza de presión de succión y la diferencia de presión transmembrana se puede controlar por la presión de gas o líquido para la presurización del lado de la solución de cultivo de fermentación. Si se necesita tal control de la presión, es posible controlar la diferencia de presión transmembrana, mediante el uso de la diferencia de presión entre la presión del lado de la solución de cultivo de fermentación y la presión del lado del agua tratada separada por la membrana como la diferencia de presión transmembrana.

Además, la membrana de separación utilizada en la presente invención preferiblemente muestra un rendimiento que permite el tratamiento de filtración a una diferencia de presión transmembrana durante el tratamiento de filtración en el intervalo de 0,1 kPa o más y 20 kPa o menos. Como se describió anteriormente, la membrana de separación para su uso en la presente invención tiene preferiblemente un coeficiente de permeabilidad al agua pura antes de su uso, tal como se calcula a partir de la permeabilidad al agua que se determina mediante el uso de agua purificada con membrana de ósmosis inversa a una temperatura de 25°C y a una diferencia de altura de 1 m, preferiblemente en el intervalo de $2 \times 10^{-9} \text{ m}^3/(\text{m}^2 \cdot \text{s} \cdot \text{Pa})$ o más, más preferiblemente en el intervalo de $2 \times 10^{-7} \text{ m}^3/(\text{m}^2 \cdot \text{s} \cdot \text{Pa})$ o más y $6 \times 10^{-7} \text{ m}^3/(\text{m}^2 \cdot \text{s} \cdot \text{Pa})$ o menos.

Un ejemplo típico del aparato de fermentación continua utilizado en el método de producción de ácido láctico de acuerdo con la presente invención, en el que un elemento de membrana de separación se instala en el tanque de reacción de fermentación, se muestra en la Figura 1. La Figura 1 es una vista lateral esquemática que explica la realización del aparato de fermentación continua con membrana de separación para su uso en la presente invención. En la Figura 1, el aparato de fermentación continua con membrana de separación tiene esencialmente un tanque de reacción de fermentación 1 para el cultivo de fermentación de levadura y una unidad de control de la diferencia de altura 3 para el control de la cantidad de la solución de cultivo de fermentación en el tanque de reacción de fermentación 1. Un elemento de membrana de separación 2 está instalado en el tanque de reacción de fermentación 1 y el elemento de membrana de separación 2 tiene una membrana porosa incorporada en el mismo. Los ejemplos de las membranas porosas que se van a utilizar incluyen la membrana de separación y el elemento de membrana de separación se describe en el folleto del documento WO 2002/064240.

En lo sucesivo, se describirán las realizaciones favorables de la fermentación continua por medio del aparato de fermentación continua con membrana de separación mostradas en la Figura 1. El medio se introduce en el tanque de reacción de fermentación 1 de manera continua o intermitente mediante una bomba de suministro de medio 7. El medio puede ser desinfectado según sea necesario mediante esterilización por calentamiento, desinfección por calentamiento o tratamiento de esterilización del filtro antes del suministro al tanque de reacción de fermentación 1.

Durante la producción de la fermentación, la solución de fermentación del tanque de reacción de fermentación 1 se puede agitar según sea necesario por medio de un agitador 5 en el tanque de reacción de fermentación 1. Se puede suministrar un gas deseado, según sea necesario, al tanque de reacción de fermentación 1 mediante un aparato de suministro de gas 4. El gas suministrado a continuación, puede ser recuperado y reciclado de nuevo al aparato de suministro de gas 4. Además, el pH de la solución de fermentación en el tanque de reacción de fermentación 1 se puede ajustar, según sea necesario, por una unidad de control-sensora del pH 9 y una bomba de suministro de solución de pH ajustado 8. La producción de fermentación de alta productividad también se puede realizar mediante la regulación, según sea necesario, de la temperatura de la solución de cultivo de fermentación en el tanque de reacción de fermentación 1 por medio de un controlador de temperatura 10.

La regulación del pH y la temperatura se ilustró aquí para la regulación de las condiciones físicas y químicas de la solución de cultivo de fermentación mediante la unidad de control de instrumentación, pero la regulación también se puede realizar, según sea necesario, mediante una medición del oxígeno disuelto u ORP (potencial de oxidación-reducción), y las condiciones físicas y químicas se pueden regular mediante el uso de la concentración de ácido láctico en la solución de cultivo de fermentación, como se determina por medio de un analizador tal como un sensor químico en línea, como indicador. El método de suministro del medio de forma continua o intermitentemente se lleva a cabo de manera que la cantidad y velocidad de suministro del medio puede ser regulada adecuadamente mediante el uso de los valores de medida de los entornos físicos y químicos de la solución de cultivo de fermentación obtenidos por el aparato de la instrumentación.

La solución de cultivo de fermentación se filtra y se separa en la levadura y los productos de fermentación por medio del elemento de membrana de separación 2 instalado en el tanque de reacción de fermentación 1 y los productos de fermentación se descargan desde el sistema de aparatos. La levadura filtrada y separada permanece en el sistema de aparatos, ya que la concentración de la levadura en el sistema de aparatos se mantiene alta, permitiendo de este modo la producción de una fermentación de alta productividad. La filtración y la separación por el elemento de membrana de separación 2 se llevan a cabo, impulsadas por la diferencia de presión principal con la superficie del agua en el tanque de reacción de fermentación 1, y no exigen una fuerza motriz adicional especial. La velocidad de filtración-separación del elemento de membrana de separación 2 y la cantidad de la solución de fermentación en el tanque de reacción de fermentación 1 pueden ser reguladas, según sea necesario, correctamente con un sensor de nivel 6 y una unidad de control de la diferencia de presión principal 3. Aunque la filtración y la separación por el elemento de membrana de separación de 2 realizadas por diferencia de presión principal se muestran como la realización anterior, la filtración y la separación se pueden realizar, según sea necesario, mediante una bomba o mediante filtración por succión, por ejemplo, por presurización con gas o líquido del sistema de aparatos.

De aquí en adelante, se muestra en la vista esquemática de la Figura 2 un ejemplo típico de los aparatos de fermentación utilizados en el método de producción de ácido láctico de acuerdo con la presente invención, en el que está instalado el elemento de membrana de separación fuera del tanque de reacción de fermentación. La Figura 2 es una vista lateral esquemática que explica otra realización del aparato de fermentación continua de membrana de separación para su uso en la invención.

En la Figura 2, el aparato de fermentación continua con membrana de separación tiene esencialmente un tanque de reacción de fermentación 1 para el cultivo de fermentación de la levadura, un tanque de separación con membrana 12 que tiene un elemento de membrana de separación 2 en el mismo que está conectado al tanque de reacción de fermentación 1 a través de una bomba de circulación de solución del cultivo de fermentación 11 y una unidad de control de diferencia de altura 3 para la regulación de la cantidad de solución de cultivo de fermentación en el tanque de reacción de fermentación 1. El elemento de membrana de separación 2 tiene una membrana porosa incorporada en el mismo. Los ejemplos de las membranas porosas para su uso incluyen la membrana de separación y el elemento de membrana de separación descritos en el folleto del documento WO 2002/064240.

En la Figura 2, el medio puede ser introducido en el tanque de reacción de fermentación 1 mediante una bomba de suministro de medio 7 y la solución de cultivo de fermentación en el tanque de reacción de fermentación 1 se puede agitar, según sea necesario, con un agitador 5. También se puede introducir un gas deseado en el mismo, según sea necesario, mediante un aparato de suministro de gas 4. El gas suministrado puede recuperarse después y reciclarse de nuevo al aparato de suministro de gas 4. El pH de la solución de cultivo de fermentación se puede ajustar, según sea necesario, con una unidad de control-sensora de pH 9 y una bomba de suministro de solución de pH ajustado 8. Además, la temperatura de la solución de cultivo de fermentación se puede ajustar, según sea necesario, por medio de un controlador de temperatura 10 para la producción de fermentación de alta productividad. Además, la solución de cultivo de fermentación en el aparato se hace circular entre el tanque de reacción de fermentación 1 y el tanque de separación con membrana 12 por medio de una bomba de circulación de solución de cultivo de fermentación 11. La solución de cultivo de fermentación que contiene los productos de fermentación se filtra y se separa en levadura y productos de fermentación por medio del elemento de membrana de separación 2 y por lo tanto, el ácido láctico producto de fermentación se puede descargar fuera del sistema de aparatos.

La levadura filtrada y separada permanece en el sistema de aparatos, ya que la concentración de la levadura en el sistema de aparatos se mantiene alta, permitiendo de este modo la producción de la fermentación de alta productividad. La filtración y la separación por medio del elemento de membrana de separación de 2 podrán ser realizadas por la diferencia de presión principal de la superficie del agua del tanque de separación con membrana 12

y no exige una potencia especial adicional. La velocidad de filtración de la separación del elemento de membrana de separación 2 y la cantidad de la solución de cultivo de fermentación en el sistema de aparatos puede ser regulada, según sea necesario, adecuadamente por un sensor de nivel 6 y una unidad de control de la diferencia de presión principal 3. Se puede suministrar un gas deseado, según sea necesario, en el tanque de separación con membrana 12 por el aparato de suministro de gas 4.

Aunque la filtración y la separación por medio del elemento de membrana de separación de 2 realizado por diferencia de presión principal se mostraron como la realización anterior, la filtración y la separación se pueden realizar, según sea necesario, mediante una bomba o mediante filtración por succión, por ejemplo, por medio de presurización de gas o líquido del sistema de aparatos. La diferencia de presión transmembrana se puede ajustar y controlar por los medios anteriores.

En lo sucesivo, la membrana de separación y el elemento de membrana de separación descritos en el folleto del documento WO 2002/064240, una realización favorable del elemento de membrana de separación para su uso en la presente invención, se describirá brevemente con referencia a un dibujo. La Figura 3 es una vista en perspectiva esquemática que explica una realización del elemento de membrana de separación para su uso en el elemento de la presente invención.

El elemento de membrana de separación, como se muestra en la Figura 3, tiene una placa rígida de soporte 13 y un material de canal 14 y la membrana de separación 15 descrita anteriormente formado en ese orden sobre ambas caras del mismo. La placa de soporte 13 tiene muescas 16 en ambas caras. La membrana de separación 15 permite la filtración de la solución de cultivo de fermentación. El material de canal 14 es un material para el transporte del producto filtrado desde la membrana de separación 15 de manera eficiente a la placa de soporte 13. El producto filtrado introducido en la placa de soporte 13 avanza a través de la muesca 16 de la placa de soporte 13 al tubo de recogida de agua 17 y después se descarga fuera del aparato de fermentación continua. Se puede utilizar un método tal como una diferencia de presión principal, una bomba, una filtración por succión, por ejemplo, con líquido o gas, o una presurización del sistema de aparatos como energía para el producto del filtrado.

La Figura 4 es una vista en perspectiva esquemática que explica otra realización del elemento de membrana de separación para su uso en la presente invención. El elemento de membrana de separación, como se muestra en la Figura 4, tiene principalmente un haz de membranas de separación de fibra hueca 18 (membranas porosas), una capa superior de resina de sellado 19 y una capa inferior de resina de sellado 20. Las membranas de separación 18 se adhieren y se fijan entre sí en forma de haz por la capa superior de resina de sellado 19 y la capa inferior de resina de sellado 20. Las regiones huecas de las membranas de fibras huecas (membranas porosas) del haz de membranas de separación 18 se sellan con la capa inferior de resina de sellado 20 por adhesión y fijación en una estructura de prevención de fugas de la solución de cultivo. Por otro lado, la capa superior de resina de sellado 19 no sella los poros internos de las membranas de fibra hueca (membranas porosas) del haz de membranas de separación 18, ya que forma en una estructura que permite el flujo del producto filtrado al tubo colector de agua 22. El elemento de membrana de separación puede ser instalado en el aparato de fermentación continua a través del bastidor de soporte 21. El producto filtrado que contiene el producto de fermentación filtrado a través del haz de membranas de separación 18 avanza a través de la región hueca de las membranas de fibra hueca y el tubo colector de agua 22 y se descarga fuera del aparato de fermentación continua. Se puede utilizar un método tal como una diferencia de presión principal, una bomba, una filtración por succión, por ejemplo, con líquido o gas o la presurización del sistema de aparatos como energía para la descarga del producto filtrado.

El miembro para el elemento de membrana de separación del aparato de fermentación continua utilizado en el método de producción de ácido láctico de acuerdo con la presente invención es preferiblemente un miembro resistente a la operación de esterilización con vapor agua de alta presión. Si el aparato de fermentación continua es esterilizable internamente, se hace posible evitar el riesgo de contaminación microbiana no deseada durante la fermentación continua y llevar a cabo una fermentación continua más estabilizada. El miembro que constituye el elemento de membrana de separación es preferiblemente resistente a las condiciones de la operación de esterilización con vapor de agua a alta presión, específicamente a 121°C durante 15 minutos. Por ejemplo, se puede seleccionar un metal tal como acero inoxidable o aluminio o una resina tal como resina de poliamida, resina de flúor, resina de policarbonato, resina de poliacetato, resina de poli(tereftalato de butileno), PVDF, resina de polifeniléneter modificado o resina de polisulfona favorablemente para el miembro del elemento de membrana de separación.

En el aparato de fermentación continua utilizado en el método de producción de ácido láctico de acuerdo con la presente invención, el elemento de membrana de separación puede ser instalado en el tanque de reacción de fermentación, como se muestra en la Figura 1, o fuera del tanque de reacción de fermentación, como se muestra en la Figura 2. Si el elemento de membrana de separación está instalado fuera del tanque de reacción de fermentación, se puede instalar un tanque de separación con membrana por separado y el elemento de membrana de separación instalado en el mismo, y la solución de cultivo puede ser filtrada de manera continua a través del elemento de membrana de separación, ya que la solución de cultivo se hace circular entre el tanque de reacción de fermentación y el tanque de separación con membrana.

En el aparato de fermentación continua utilizado en el método de producción de ácido láctico de acuerdo con la presente invención, el tanque de separación con membrana es deseablemente esterilizable con vapor de agua a alta

presión. Si el tanque de separación con membrana es esterilizable con vapor de agua a alta presión, la contaminación por bacterias no deseadas puede ser evitada fácilmente.

5 La fermentación continua, si se lleva a cabo por el método de producción de ácido láctico por fermentación continua de acuerdo con la presente invención, proporciona una mayor tasa de producción volumétrica y permite una producción de fermentación extremadamente eficaz, en comparación con la fermentación por lotes. La tasa de producción de fermentación por cultivo continuo se puede calcular de acuerdo con la siguiente Fórmula 3:

Tasa de producción de fermentación (g/L/hr) = Concentración de producto en la solución descargada (g/L) x Cantidad de descarga de la solución de cultivo de fermentación (L/hr) / Cantidad de solución operacional en el aparato (L).....(Fórmula 3)

10 La tasa de producción de fermentación por cultivo por lotes se puede calcular dividiendo la cantidad de producto generado cuando la fuente de carbono en bruto es consumida totalmente (g) por el tiempo necesario para el consumo de la fuente de carbono (h) y el volumen de la solución de cultivo de fermentación en el momento (L).

15 La presente invención se caracteriza porque el cultivo continuo se lleva a cabo, a medida que se estabiliza, sin deterioro en el rendimiento y la tasa de producción de ácido láctico durante un período prolongado de tiempo, mediante el cultivo de una levadura que tiene un casete de expresión de lactato deshidrogenasa que contiene el promotor del gen SED1. El promotor del gen SED1 muestra una cantidad de expresión de genes 5 veces más grande o más, preferiblemente 7 veces o más y más preferiblemente 10 veces o más, que la cantidad promedio de expresión relativa de los genes después de 50 horas desde el inicio del cultivo, mientras se filtra la levadura a través de una membrana de separación, y por lo tanto, el cultivo continuo se continúa preferiblemente al menos durante 20 100 horas o más, preferiblemente durante 200 horas o más, y más preferiblemente durante 300 horas o más.

En la presente invención, se pueden proporcionar ácidos lácticos tanto D como L.

El ácido láctico obtenido por el método de producción de ácido láctico de acuerdo con la presente invención se puede proporcionar principalmente como materia prima para el poli(ácido láctico).

Ejemplos

25 (Ejemplo de Referencia 1) Preparación de cepa de levadura que tiene capacidad de producir ácido láctico

En la presente invención, se utilizó una levadura que contiene el gen *ldh* derivado de *Xenopus laevis* que tiene la secuencia de nucleótidos mostrada por el SEQ ID NO: 4 en un sitio aguas abajo del promotor PDC1 como la cepa de levadura que tiene la capacidad de producir ácido láctico. El gen *ldh* derivado de *Xenopus laevis* se clonó por el método de PCR. Se utilizó un ADN de fagémido preparado a partir de una biblioteca de ADNc derivada de riñón de 30 *Xenopus laevis* (fabricada por Stratagene) de acuerdo con el protocolo adjunto como molde en la PCR.

Se utilizó polimerasa KOD-Plus (fabricada por Toyobo) para la reacción de amplificación de PCR, y el tampón de reacción, la mezcla de dNTP y otros utilizados fueron los adjuntados con el kit. Se prepararon 50 µL de un sistema de reacción que contenía 50 ng/muestra del ADN de fagémido preparado de acuerdo con el protocolo adjunto como se ha descrito anteriormente, 50 pmol/muestra de cebadores y 1 unidad/muestra de polimerasa KOD-Plus. La solución de reacción se desnaturalizó a una temperatura de 94°C durante 5 minutos en un sistema de amplificación por PCR iCycler (fabricado por BIO-RAD), y después se sometió a 30 ciclos de desnaturalización por calor a 94°C durante 30 segundos, el cebador se sometió a reasociación a 55°C durante 30 segundos y a extensión de la cadena complementaria a 68°C durante 1 minuto, y después se enfrió a una temperatura de 4°C. Los cebadores de amplificación del gen (SEQ ID NO: 7 y 8) se prepararon de modo que se añadió una secuencia de reconocimiento para Sall en el lado 5' terminal y una secuencia de reconocimiento para NotI en el lado 3' terminal.

SEQ ID NO: 7:

gtcgacatgg caactgtgaa ggataa

SEQ ID NO: 8:

gcggccgcct agaactgcag ctcctt

45 Los fragmentos de amplificación de PCR se purificaron, y los terminales de los mismos fueron fosforilados por la polinucleótido quinasa de T4 (fabricada por Takara Bio Inc.) y a continuación se ligaron al vector pUC118 (que se había escindido anteriormente con una enzima de restricción HincII y tenía la superficie de corte desfosforilada). La ligación se llevó a cabo utilizando un kit de ligación de ADN Ver.2 (fabricado por Takara Bio Inc.). La solución de ligación se transformó en células competentes de *E. coli* DH5α (fabricado por Takara Bio Inc.) y la mezcla se sembró y se cultivó durante la noche en una placa de LB que contenía un antibiótico ampicilina a una concentración de 50 µg/mL. Los ADN plasmídicos de las colonias obtenidas se recogieron por medio de Miniprep y se escindieron con las enzimas de restricción Sall y NotI, y se seleccionaron los plásmidos que contenían el gen *ldh* derivado de *Xenopus laevis* insertado. Todas las series de operaciones se llevaron a cabo de acuerdo con el protocolo adjunto.

Los vectores pUC118 que contenían el gen *ldh* derivado de *Xenopus laevis* insertado se escindieron mediante las

enzimas de restricción Sall y NotI; los fragmentos de ADN se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 1%; y los fragmentos que contenían el gen *ldh* derivado de *Xenopus laevis* se purificaron por un método común. Los fragmentos que contenían el gen *ldh* se ligaron a los sitios de escisión XhoI/NotI del vector de expresión pTRS11 mostrado en la Figura 5; los ADN plasmídicos se recuperaron mediante un método similar al anterior; y un vector de expresión que contenía el gen *ldh* derivado de *Xenopus laevis* insertado se seleccionó mediante escisión de los vectores de expresión con las enzimas de restricción XhoI y NotI. En lo sucesivo, el vector de expresión que contiene el gen *ldh* derivado de *Xenopus laevis* insertado así preparado se designará pTRS102.

Un fragmento de PCR de 1,3 kb que contenía el gen *ldh* derivado de *Xenopus laevis* y una secuencia terminadora TDH3 se amplificaron mediante PCR utilizando pTRS102 como molde de amplificación y los oligonucleótidos (SEQ ID NO: 9 y 10) como conjunto de cebadores. El oligonucleótido del SEQ ID NO: 9 fue diseñado para que tuviera una secuencia correspondiente a la secuencia de 60 pb aguas arriba del codón de inicio del gen de PDC1.

SEQ ID NO: 9:

tctcaattat tattttctac tcataacctc acgcaaaata acacagtcaa atcaatcaaa
atggcaactg tgaaggataa actca

SEQ ID NO: 10:

aggcgtatca cgaggcctt

A continuación, un fragmento de PCR de 1,2 kb que contenía un gen TRP1 marcador seleccionable de levadura se amplificó mediante PCR utilizando el plásmido pRS424 como molde de amplificación y los oligonucleótidos (SEQ ID NO: 11 y 12) como conjunto de cebadores. El oligonucleótido del SEQ ID NO: 12 fue diseñado para que tuviera una secuencia añadida correspondiente a la secuencia de 60 pb aguas abajo del codón de terminación del gen de PDC1.

SEQ ID NO: 11:

gaattaattc ttgaagacga aagggcctcg tgatacgctc agattgtact gagagtgcac

SEQ ID NO: 12:

tatttttcgt tacataaaaa tgcttataaa actttaacta ataattagag attaaatcgc
ctgtgcggtta tttcacaccg

Cada fragmento de ADN se aisló por electroforesis en gel de agarosa al 1% y se purificó de acuerdo con un método común. Se amplificó por PCR utilizando una mezcla del fragmento de 1,3 kb y el fragmento de 1,2 kb obtenido de este modo como moldes de amplificación y los oligonucleótidos (SEQ ID NO: 9 y 12) como conjunto de cebadores, un fragmento de PCR de aproximadamente 2,5 kb que tenía secuencias equivalente a las secuencias de 60 pb aguas arriba y aguas abajo del gen PDC1, respectivamente, en los extremos 5 y 3 y que contenían el gen *ldh* derivado de *Xenopus laevis*, el terminador TDH3 y el gen TRP1 conectado a este.

Los fragmentos de PCR se aislaron por electroforesis en gel de agarosa al 1% y se purificaron de acuerdo con un método común; se transforman en una cepa de levadura *Saccharomyces cerevisiae* NBRC10505; y se seleccionó un transformante que tenía el gen *ldh* derivado de *Xenopus laevis* introducido en el cromosoma en un sitio aguas abajo del promotor del gen de PDC1 mediante cultivo en un medio libre de triptófano.

El hecho de que el transformante obtenido de este modo sea una levadura que tiene un gen *ldh* derivado de *Xenopus laevis* introducido en un sitio aguas abajo del promotor del gen de PDC1 en el cromosoma se confirmó de la siguiente manera: En primer lugar, el ADN del genoma del transformante se preparó con un kit de extracción de ADN del genoma Gentorukun (fabricado por Takara Bio Inc.) y la producción de fragmento de ADN amplificado de aproximadamente 2,8 kb se confirmó por PCR utilizando el ADN genómico preparado del transformante como un molde de amplificación y los oligonucleótidos (SEQ ID NO: 12 y 13) como conjunto de cebadores. Por otro lado, los no transformantes proporcionaron fragmentos de ADN amplificados de aproximadamente 2,1 kb mediante PCR. En lo sucesivo, el transformante que tiene el gen *ldh* derivado de *Xenopus laevis* introducido en un sitio aguas abajo del promotor del gen de PDC1 en el cromosoma se denominará cepa B2. Las secuencias aguas arriba y aguas abajo del gen de PDC1 se pueden obtener de la base de datos del genoma de *Saccharomyces* ([URL:http://www.yeastgenome.org/](http://www.yeastgenome.org/)).

SEQ ID NO: 13:

caaatatcgt ttgaatattt ttccg

Con posterioridad, la cepa de levadura SW015 descrita en el folleto del documento WO 2007/043253, en la que el gen *pdh1* está sustituido por el marcador TRP1 y el gen *pdh5* tiene una mutación sensible a la temperatura, y la cepa B2 obtenida anteriormente se conjugaron, para dar una célula diploide. Se hizo que la célula diploide formara un asca en un medio de formación de ascas. El asca se diseccionó con un micromanipulador; se recogieron las respectivas células haploides; y se estudiaron los requisitos nutricionales de las respectivas células haploides. Entre las células haploides obtenidas se seleccionó una cepa que tenía el gen *ldh* derivado de *Xenopus laevis* insertado en el locus del gen *pdh1* y que tenía una mutación sensible a la temperatura en el gen *pdh5* (no viable a 34°C). La cepa de levadura se designó cepa SU014.

El hecho de que la cepa SU014 tuviera capacidad de producir ácido láctico se confirmó mediante la medición del ácido láctico contenido en el sobrenadante del cultivo de las células transformantes en medio SC (Methods in Yeast Genetics, 2000 Ed., CSHL Press) por medio de HPLC en las siguientes condiciones.

Columna: Shim-Pack SPR-H (fabricada por Shimadzu Corp.)

5 Fase móvil: ácido p-toluenosulfónico 5 mM (velocidad de flujo: 0,8 mL/min)

Solución de reacción: ácido p-toluenosulfónico 5 mM, Bis-Tris 20 mM, EDTA-2Na 0,1 mM (velocidad de flujo: 0,8 mL/min)

Método de detección: conductividad eléctrica

Temperatura: 45°C

10 La pureza óptica del ácido L-láctico se determinó por medio de HPLC en las siguientes condiciones:

Columna: TSK-gel enantio LI (nombre comercial registrado: fabricado por Tosoh Corporation)

Fase móvil: solución acuosa de sulfato de cobre 1 mM

Velocidad de flujo: 1,0 ml/min

Método de detección: UV254 nm

15 Temperatura: 30°C

La pureza óptica del ácido L-láctico se calcula de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\text{Pureza óptica (\%)} = 100 \times (L - D) / (L + D)$$

En la presente memoria, L representa la concentración de ácido L-láctico, y D representa la concentración de ácido D-láctico.

20 Se detectó ácido L-láctico y se detectó ácido D-láctico sólo en una cantidad menor que el límite de detección por medio de análisis de HPLC. Los resultados anteriores demuestran que la cepa SU014 tiene capacidad para producir ácido L-láctico.

(Ejemplo de Referencia 2) Método de preparación de membrana de separación En la presente invención, se utilizó una membrana porosa preparada por el siguiente método como membrana de separación.

25 Se utilizó una resina de poli(fluoruro de vinilideno) (PVDF) como resina, un polietilenglicol (PEG) con un peso molecular de aproximadamente 20.000 como agente formador de poros, N,N-dimetilacetamida (DMAc) como disolvente y agua pura como no disolvente, y estos componentes se mezclaron con agitación cuidadosa a una temperatura de 90°C, para dar una solución concentrada en la siguiente composición:

- PVDF: 13,0% en peso

30 • PEG: 5,5% en peso

- DMAc: 78,0% en peso

- Agua pura: 3,5% en peso

La solución concentrada se enfrió a una temperatura de 25°C y a continuación se aplicó como recubrimiento sobre un tejido de fibra no tejida de poliéster (material base poroso) que tenía una densidad de 0,48 g/cm³ y un espesor de 220 µm, y el tejido no tejido resultante se sumergió, inmediatamente después de la aplicación, en agua pura a una temperatura de 25°C durante 5 minutos y tres veces en agua caliente a una temperatura de 80°C para el lavado de DMAc y PEG, para dar una membrana porosa (membrana de separación) que tenía una capa de resina porosa. Se observó un intervalo de 9,2 µm x 10,4 µm sobre la superficie de la capa de resina porosa en el lado en el que se aplicó como revestimiento la solución concentrada para la membrana de separación. En un microscopio electrónico de barrido con un aumento de 10.000 veces, para mostrar que el diámetro medio de todos los microporos observados era de 0,02 µm. La permeabilidad al agua pura de la membrana de separación evaluada fue 2 x 10⁻⁹ m³/(m²·s·Pa). La permeabilidad al agua se determinó a una diferencia de altura de 1 m, mediante el uso de agua purificada con membrana RO a una temperatura de 25°C. La desviación típica del diámetro medio de microporo fue de 0,0055 µm y la rugosidad de la superficie de la membrana fue de 0,1 µm.

45 (Ejemplo de Referencia 3) Cultivo continuo de filtración de la cepa de levadura que tiene una capacidad de producción de ácido láctico mediante la utilización de una membrana de separación

En la presente invención, se llevó a cabo un cultivo continuo de filtración mediante el uso de la cepa SU014 preparada en el Ejemplo de Referencia 1 y el aparato de cultivo continuo se muestra en la Figura 1. Se utilizó un medio de fermentación de ácido láctico en la composición mostrada en la Tabla 1 como medio. El medio se esterilizó con vapor de agua a alta presión (2 atm) a una temperatura de 121°C durante 15 minutos antes de su uso. Se utilizaron acero inoxidable y un molde de resina de polisulfona para los miembros del elemento de membrana de separación y se utilizó la membrana porosa preparada en el Ejemplo de Referencia 2 como membrana de

50

separación. Las condiciones operativas en el presente ejemplo son las siguientes, a menos que se especifique lo contrario:

Volumen del volumen del tanque de reacción: 2 (L)

Volumen del tanque de reacción de fermentación: 1.5 (L)

5 Membrana de separación utilizada: membrana de filtración de PVDF (preparada en el Ejemplo de Referencia 2)

Área de filtración efectiva del elemento de separación con membrana: 120 cm²

Temperatura ajustada a: 30 (°C)

Tasa de ventilación del tanque de reacción de fermentación: aire: 0,01 (L/min), gas nitrógeno: 0,19 (L/min)

Velocidad de agitación del tanque de reacción de fermentación: 800 (rpm)

10 Ajuste del pH: se ajustó a pH 5 con NaOH 1N

Antiespumante: un antiespumante esterilizado PE-L (fabricado por Wako Pure Chemical Industries) añadido en una cantidad de 200 µL cada 3 horas.

Esterilización: el tanque de cultivo que contiene un elemento de membrana de separación y el medio utilizado fueron esterilizados con vapor de agua a alta presión en un autoclave a 121°C durante 20 min.

15 [Tabla 1]

Glucosa	100 g/L
Sulfato de amonio	1,05 g/L
Base nitrogenada de levadura sin aminoácidos y sulfato de amonio (fabricada por Difco)	1,07 g/L
18 Aminoácidos convencionales con exclusión de leucina y triptófano	152 mg/L
Leucina	760 mg/L
Inositol	152 mg/L
Ácido p-aminobenzoico	16 mg/L
Adenina	40 mg/L
Uracilo	152 mg/L

En primer lugar, la cepa SU014 se cultivó con sacudimiento en un tubo de ensayo que contenía 10 ml de un medio de fermentación de ácido láctico durante la noche (preprecultivo). La solución de cultivo obtenida se transfirió a 100 ml de un medio de fermentación de ácido láctico de nueva aportación y la mezcla se cultivó con sacudimiento en un matraz de 500 ml Sakaguchi durante 24 horas a 30°C (preprecultivo). La solución de preprecultivo se sembró en 1,5 L de un medio de fermentación de ácido láctico (concentración de glucosa: 70 g/L) colocado en el aparato de cultivo continuo mostrado en la Figura 1, y la mezcla se cultivó durante 24 horas, mientras el tanque de reacción 1 se agitaba con un agitador adjunto de 5 a 400 rpm, como tasa de ventilación, la temperatura y el pH del tanque de reacción 1 se ajustaron (precultivo). Inmediatamente después del pre-cultivo, el medio de fermentación de ácido láctico se suministró a este de forma continua, y el ácido láctico se produjo por medio de cultivo continuo, mientras que la cantidad de fracción que penetraba a través de la membrana se controló para mantener la cantidad de solución de fermentación en el aparato de cultivo continuo constante a 1,5 L. Las concentraciones de ácido láctico producido y de glucosa residual en la solución de fermentación que han atravesado la membrana se determinaron cuando fue necesario. El rendimiento de ácido láctico/azúcar y la tasa de producción de ácido láctico se calcularon a partir de las cantidades de ácido láctico generado y de glucosa prima suministrada que se calculó a partir de la concentración de glucosa. La concentración de glucosa se determinó mediante el uso de la "Prueba de Glucosa Wako C" (nombre comercial registrado) (fabricada por Wako Pure Chemical Industries). Como resultado, se encontró que, aunque el cultivo continuo prosiguió constantemente durante un período de hasta 200 horas, el rendimiento de ácido láctico/azúcar y la tasa de producción de ácido láctico se redujeron después de aproximadamente 200 horas, debido a la disminución de la concentración de ácido láctico acumulado.

(Ejemplo 1) Fluctuación de la expresión génica durante el cultivo continuo

Para la evaluación de la fluctuación en la expresión génica durante el cultivo continuo en el Ejemplo de Referencia 3, las muestras de solución de cultivo se obtuvieron después de 70 y 210 horas desde el inicio del cultivo continuo del

Ejemplo de Referencia 3 y se extrajeron los ARN totales de la levadura. En la extracción del ARN total, la levadura obtenida se suspendió en 10 ml de una solución tampón para la homogeneización (tratado con acetato de sodio 50 mM (pH 5,3), EDTA DEPC 10 mM) a una DO₆₀₀ de 0,2 y la mezcla se transfirió a un tubo de 50 ml. Se añadieron adicionalmente a la misma 500 µL de SDS al 20%; 12 ml de fenol (saturado con solución de tampón de homogeneización) previamente calentado a 65°C; y la mezcla se agitó con un mezclador Voltex durante 5 segundos. La mezcla se mantuvo a 65°C durante 4 minutos y después se enfrió rápidamente a la temperatura ambiente en un baño de hielo seco/etanol. Se centrifugó a la temperatura ambiente (5 min. 12000 G); el sobrenadante acuoso se transfirió a un tubo separado de 50 ml; y a esto se le añadió PCI (pH 5,3) en la misma cantidad para la extracción. El sobrenadante acuoso se transfirió a un tubo de 50 ml separado; se añadió acetato de sodio 3 M (pH 5,3) en una cantidad 1/10; y la mezcla se sometió a precipitación con etanol. Las bolitas resultantes obtenidas se lavaron dos veces con etanol del 80%, se secaron hasta su solidificación y se disolvieron en agua libre de ARN, para dar una muestra de ARN total.

Se determinó la concentración de la muestra de ARN total obtenida con un absorciómetro y se utilizó 1 µg de la muestra para el análisis de micromatriz de ADN. La micromatriz de ADN se llevó a cabo utilizando "3D-Gen" fabricado por Toray Industries Inc. de acuerdo con el protocolo adjunto. El escáner utilizado fue ScanArray Express (PerkinElmer), y el escaneado se llevó a cabo bajo las condiciones de Cyanine 5 (valor de PMT: 55%) (para la medición de la intensidad de fluorescencia media después de 210 horas de cultivo) o Cyanine 3 (valor de PMT: 70%) (para la medición de la intensidad de fluorescencia media después de 70 horas de cultivo), para proporcionar una imagen. La intensidad de la fluorescencia de cada mancha en la imagen obtenida se digitalizó por medio del soporte lógico GenePix Pro 5.0 (Axon Instruments), y se calculó el valor de la mediana. A continuación, se calculó la intensidad de fluorescencia media de todos los puntos en cada muestra.

Como resultado, el gen CDC19, el gen IPP1, el gen ARF1, el gen CUP5, el gen RPL28, el gen TRX2, el gen HSP104, el gen AHP1, YMR122W-A, el gen CIT1, el gen RPS15, el gen ALD4, YPL225W, el gen HSP26, el gen PGK1, SED1 gen, el gen MFA1, HYP2 gen, el gen HSP12, el gen QCR6, el gen HXK1, el gen TDH3, el gen ENO1, el gen BGL2, YJL133C-A, el gen QCR8, el gen FBA1, el gen CWP2, el gen CCW12, el gen TMA10, el gen SIP18, el gen HOR7 , CCW14 gen y el gen PIR3 se confirman en la muestra después de 70 horas de cultivo como genes que tienen una mayor intensidad de fluorescencia de más de 10 veces o más que la intensidad media de fluorescencia, y el gen Cys3, el gen CDC48, LYS20 gen, el gen HSP31, ARG5,6 gen, el gen RPS24A, el gen RPL29, el gen RPL24A, el gen ADH4, el gen MUP1, el gen RPL11B, THI4 gen, el gen RPL24B, el gen RPS0A, el gen RPL27A, el gen RPL16A, el gen RPS21B, el gen RPS5, el gen HOM6, el gen PDC5, THI7 gen, el gen MET17, el gen ECM40, el gen ARG1, el gen ZPS1, el gen IDH2, el gen CDC19, el gen IPP1, el gen ARF1, el gen RPL28, el gen TRX2, el gen HSP104, el gen AHP1, el gen CIT1, el gen RPS15, el gen ALD4, YPL225X y el gen CCW12 se confirmaron en la muestra después de 210 horas de cultivo como genes que tiene una intensidad de fluorescencia de más de 10 veces o más que la intensidad de fluorescencia media por medio de lo cual el resultado referente al gen SED1 está de acuerdo con la invención reivindicada todos los demás resultados no están en el alcance de la invención reivindicada. Los resultados se resumen en la Tabla 2.

[Tabla 2]

Muestra 70 horas	Intensidad de fluorescencia media (Cyanine 3) = 2527	Muestra 210 horas	Intensidad de fluorescencia media (Cyanine 5) = 2560
Nombre del gen	Intensidad de fluorescencia	Nombre del gen	Intensidad de fluorescencia
CDC19	32744	CYS3	31699
IPP1	31010	CDC48	48387
ARF1	32791	LYS20	26967
CUP5	48692	HSP31	65535
RPL28	32227	ARG5.6	25938
TRX2	27127	RPS24A	25954
HSP104	37404	RPL29	31691
AHP1	36389	RPL24A	27070
YMR122W-A	26689	ADH4	29111
CIT1	38065	MUP1	36322
RPS15	33355	RPL11B	42975
ALD4	25334	THI4	65535
YPL225W	33524	RPL24B	60397

ES 2 616 428 T3

Muestra 70 horas	Intensidad de fluorescencia media (Cyanine 3) = 2527	Muestra 210 horas	Intensidad de fluorescencia media (Cyanine 5) = 2560
Nombre del gen	Intensidad de fluorescencia	Nombre del gen	Intensidad de fluorescencia
HSP26	65535	RPS0A	25985
PGK1	45002	RPL27A	26848
SED1	65535	RPL16A	30035
MFA1	52959	RPS21B	41105
HYP2	58791	RPS5	26324
HSP12	59804	HOM6	46392
QCR6	40818	PDC5	65535
HXK1	65535	THI7	37815
TDH3	44578	MET17	65535
ENO1	47131	ECM40	35308
BGL2	40588	ARG1	25772
YJL133C-A	53171	ZPS1	43968
QCR8	65535	IDH2	34806
FBA1	56999	CDC19	31238
CWP2	65535	IPP1	36610
CCW12	65535	ARF1	27340
TMA10(reservado)	52672	RPL28	26537
SIPI8	57587	TRX2	26762
HOR7	50590	HSP104	35829
CCW14	27043	AHP1	29875
PIR3	40635	CIT1	34931
		RPS15	38663
		ALD4	26524
		YPL225W	27404
		CCW12	32536

Los resultados identificaron los genes que se expresan en una cantidad mayor de 10 veces o más que la cantidad de expresión relativa media de todos los genes después de 50 horas desde el inicio del cultivo en cultivo continuo con la filtración simultánea de una cepa de levadura que tiene una capacidad para producir ácido láctico.

- 5 (Ejemplo 2) Introducción del gen *ldh* en el locus *SED1* de acuerdo con la presente invención, así como los loci de los genes, *CWP2* y *ENO1* que no están en el alcance de la invención.

Basándose en los resultados obtenidos en el Ejemplo 1, el gen *ldh* mostrado por el SEQ ID NO: 4 se introdujo en los loci del gen *SED1*, el gen *CWP2* y el gen *ENO1*.

- 10 En la introducción del mismo en el locus del gen *SED1*, se amplificó un fragmento de PCR de 1,3 kb que contenía el gen *ldh* derivado de *Xenopus laevis* y la secuencia de terminación *TDH3* mediante PCR utilizando pTRS 102 preparado en el Ejemplo de Referencia 1 como molde de amplificación y los oligonucleótidos (SEQ ID NO: 10 y 14) como conjunto de cebadores. El oligonucleótido del SEQ ID NO: 14 fue diseñado para añadir una secuencia correspondiente a la secuencia de 60 pb aguas arriba del codón de iniciación del gen *SED1*.

SEQ ID NO: 14:

tattgattta tagtcgtaac tacaagaca agcaaaataa aatacgttcg ctctattaag

- 15 atggcaactg tgaaggataa actca

A continuación, se amplificó un fragmento de PCR de aproximadamente 1,3 kb que contenía un gen HIS3 marcador seleccionable de levadura mediante PCR utilizando el plásmido pRS423 como molde de amplificación y los oligonucleótidos (SEQ ID NO: 11 y 15) como conjunto de cebadores. El oligonucleótido del SEQ ID NO: 15 fue diseñado para añadir una secuencia correspondiente a la secuencia de 60 pb aguas abajo del codón de terminación del gen SED1.

SEQ ID NO: 15:

aaaaaataac ataatactga aagaaagcat taagaaggcg gatgtgtcaa acaccaccgt

ctgtgcggtg tttcacaccg

Cada fragmento de ADN se separó por electroforesis en gel de agarosa al 1% y se purificó mediante un método común. Un fragmento de PCR de aproximadamente 2,6 kb que tenía conectado el gen *ldh* derivado de *Xenopus laevis*, el terminador TDH3 y el gen HIS3 que tenía añadidas las secuencias correspondientes a las secuencias de 60 pb aguas arriba y aguas abajo del gen SED1 respectivamente en los extremos 5 y 3 se amplificó mediante PCR utilizando una mezcla de dos clases de fragmentos de aproximadamente 1,3 kb obtenidos de este modo como molde de amplificación y los oligonucleótidos (SEQ ID NO: 14 y 15) como conjunto de cebadores.

El fragmento de PCR se separó por electroforesis en gel de agarosa al 1% y se purificó por un método común, y luego se transformó en la cepa SU014, y se seleccionó un transformante que tenía el gen *ldh* derivado de *Xenopus laevis* incorporado en un sitio aguas abajo del promotor del gen SED1 en el cromosoma por cultivo en un medio exento de histidina.

El hecho de que el transformante obtenido de este modo sea una levadura que tiene el gen *ldh* derivado de *Xenopus laevis* incorporado en un sitio aguas abajo del promotor del gen SED1 en el cromosoma se confirmó de la siguiente manera: En primer lugar, el ADN del genoma del transformante se preparó mediante el uso de un kit de extracción de ADN de genoma Genterukun (fabricado por Takara Bio Inc.) y la producción de un fragmento de ADN de amplificación de aproximadamente 2,9 kb se confirmó mediante PCR utilizándolo como molde de amplificación y los oligonucleótidos (SEQ ID NO: 16 y 17) como conjunto de cebadores. Los transformantes proporcionan un fragmento de ADN de amplificación de aproximadamente 1,4 kb por medio de PCR. En lo sucesivo, el transformante que tiene el gen *ldh* derivado de *Xenopus laevis* incorporado en un sitio aguas abajo del promotor del gen SED1 en el cromosoma será referido como cepa SU015.

SEQ ID NO: 16:

tagattggcc gtaggggctg

SEQ ID NO: 17:

cacgcaacgc gtaagaaaca

Posteriormente, en la introducción en el locus del gen CWP2 que no está en el alcance de la presente invención, se amplificó el fragmento de PCR de 1,3 kb que contenía el gen *ldh* derivado de *Xenopus laevis* y la secuencia de terminación TDH3, mediante PCR utilizando el pTRS102 preparado en el Ejemplo de Referencia 1 como molde de amplificación y los oligonucleótidos (SEQ ID NO: 10 y 18) como conjunto de cebadores. El oligonucleótido del SEQ ID NO: 21 fue diseñado para añadir una secuencia correspondiente a la secuencia de 60 pb aguas arriba del codón de iniciación del gen CWP2.

SEQ ID NO: 18:

cttctcataa tcaagaataa ataacttcat cacattcgct acacactaac aagaaaaaaa

atggcaactg tgaaggataa actca

Posteriormente, el fragmento de la PCR de 1,3 kb que contenía un gen HIS3 marcador seleccionable de levadura se amplificó mediante PCR utilizando el plásmido pRS423 como molde de amplificación y los oligonucleótidos (SEQ ID NO: 11 y 19) como conjunto de cebadores. El oligonucleótido del SEQ ID NO: 19 fue diseñado para añadir una secuencia correspondiente a la secuencia de 60 pb aguas abajo del codón de terminación del gen CWP2.

SEQ ID NO: 19:

ctagtaaac cgaaaatttt gaaaaagcc atatagatat tataaaaaat cagagatttc

ctgtgcggtg tttcacaccg

Cada fragmento de ADN se separó por electroforesis en gel de agarosa al 1% y se purificó por un método común. El fragmento de PCR de aproximadamente 2,6 kb que tenía el gen *ldh* derivado de *Xenopus laevis* conectado, el terminador TDH3 y el gen HIS3 que tenía secuencias añadidas correspondientes a las secuencias de 60 pb aguas arriba y aguas abajo del gen CWP2 respectivamente en los extremos 5 y 3 se amplificó por PCR utilizando una mezcla de los dos tipos de fragmentos de aproximadamente 1,3 kb como molde de amplificación y los oligonucleótidos (SEQ ID NO: 18 y 19) como conjunto de cebadores.

El fragmento de PCR se separó por electroforesis en gel de agarosa al 1% y se purificó por un método común; se

transformó en la cepa SU014; y una cepa transformante que tenía el gen *ldh* derivado de *Xenopus laevis* incorporado en un sitio aguas abajo del promotor del gen *CWP2* en el cromosoma fue seleccionado por cultivo en un medio exento de histidina.

5 El hecho de que el transformante obtenido de este modo sea una levadura que tiene el gen *ldh* derivado de *Xenopus laevis* incorporado en un sitio aguas abajo del promotor del gen *CWP2* en el cromosoma se confirmó de la siguiente manera: En primer lugar, se preparó el ADN del genoma del transformante mediante el uso de un kit de extracción de ADN del genoma Gentrakun (fabricado por Takara Bio Inc.), y se encontró por PCR, utilizándolo como un molde de amplificación y los oligonucleótidos (SEQ ID NO: 20 y 21) como conjunto de cebadores, que se había obtenido un fragmento de ADN de amplificación de aproximadamente 2,9 kb. Los no transformantes proporcionan un fragmento de ADN de amplificación de aproximadamente 0,7 kb por medio de PCR. En lo sucesivo, el transformante que tiene el gen *ldh* derivado de *Xenopus laevis* en un sitio aguas abajo del promotor del gen *CWP2* en el cromosoma será referido como cepa SU016 que no está en el alcance de la presente invención.

SEQ ID NO: 20:

aaacagagaa atgtaacggt

15 SEQ ID NO: 21:

cattcgaaga gaaatcacag

Posteriormente, en la introducción en el locus del gen de *ENO1* que no está en el alcance de la presente invención, un fragmento de PCR de 1,3 kb que contenía el gen *ldh* derivado de *Xenopus laevis* y la secuencia de terminación *TDH3* se amplificó mediante PCR utilizando el pTRS102 preparado en el Ejemplo de Referencia 1 como molde de amplificación y los oligonucleótidos (SEQ ID NO: 10 y 22) como cebador. El oligonucleótido del SEQ ID NO: 22 fue diseñado para añadir una secuencia correspondiente a la secuencia de 60 pb aguas arriba del codón de inicio del gen *ENO1*.

SEQ ID NO: 22:

ctagctatattt ttcataaaaa accaagcaac tgcttatcaa cacacaaaca ctaaatcaaa

atggcaactg tgaaggataa actca

25 Con posterioridad, se amplificó un fragmento de PCR de aproximadamente 1,3 kb que contenía un gen marcador seleccionable *URA3* de levadura mediante PCR utilizando el plásmido pRS426 como molde de amplificación y los oligonucleótidos (SEQ ID NO: 11 y 23) como conjunto de cebadores. El oligonucleótido del SEQ ID NO: 23 fue diseñado para añadir una secuencia correspondiente a la secuencia de 60 pb aguas abajo del codón de terminación del gen *ENO1*.

30 SEQ ID NO 23:

gaaaatgaaa taaatgacaa aaaaacgtgt tttttggact agaaggctta atcaaaagct

ctgtgcggtta tttcacaccg

Cada fragmento de ADN se separó por medio de electroforesis en gel de agarosa al 1% y se purificó por un método común. Un fragmento de PCR de aproximadamente 2,6 kb que tenía conectado el gen *ldh* derivado de *Xenopus laevis*, el terminador *TDH3* y el gen *URA3* que tenía secuencias añadidas correspondientes a las secuencias de 60 pb aguas arriba y aguas abajo del gen *ENO1* respectivamente en los extremos 5 y 3, se amplificó por PCR utilizando una mezcla de los dos tipos de fragmentos de 1,3 kb obtenidos como molde de amplificación y los oligonucleótidos (SEQ ID NO: 22 y 23) como conjunto de cebadores.

40 El fragmento de la PCR se separó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% y se purificó mediante un método común, y a continuación se transformó en la cepa SU014, y se seleccionó un transformante que tenía el gen *ldh* derivado de *Xenopus laevis* incorporado en un sitio aguas abajo del promotor del gen *ENO1* sobre el cromosoma mediante cultivo en un medio libre de uracilo.

45 El hecho de que el transformante así obtenido sea una levadura que tiene el gen *ldh* derivado de *Xenopus laevis* incorporado en un sitio aguas abajo del promotor del gen *ENO1* en el cromosoma se confirmó de la siguiente manera: En primer lugar, se preparó el ADN del genoma del transformante utilizando un kit de extracción de ADN del genoma Gentrakun (fabricado por Takara Bio Inc.), y se encontró que se había preparado un fragmento de ADN de amplificación de aproximadamente 2,9 kb mediante PCR utilizándolo como molde de amplificación y los oligonucleótidos (SEQ ID NO: 24 y 25) como conjunto de cebadores. Los no transformantes proporcionan un fragmento de ADN de amplificación de aproximadamente 1,7 kb mediante PCR. En lo sucesivo, el transformante que tenía el gen *ldh* derivado de *Xenopus laevis* incorporado en un sitio aguas abajo del gen *ENO1* en el cromosoma será referido como cepa SU017 que no está en el alcance de la presente invención.

50 SEQ ID NO: 24:

aaggtatgcc tctccccgga

SEQ ID NO: 25:

cggatacacg cgtcaccaca

Con posterioridad, el gen *ldh* derivado de *Xenopus laevis* se introdujo en el locus del gen *ENO1* de la cepa SU015. La introducción del gen *ldh* derivado de *Xenopus laevis* en el locus del gen *ENO1* de la cepa SU015 y la confirmación de la misma se llevaron a cabo de una manera similar al método descrito anteriormente, para la preparación de la cepa SU017, excepto que la cepa SU014 se reemplazó por la cepa SU015. El transformante obtenido será referido como cepa SU018.

(Ejemplo 3) Preparación de cepa 2 de levadura productora de ácido láctico.

3-1 Clonación de genes *ldh* derivados de ser humano y *Leuconostoc mesenteroides*. A continuación, los genes *ldh* derivados de ser humano y *Leuconostoc mesenteroides* mostrados en los SEQ ID NO: 5 y 6 fueron clonados. En primer lugar, se describirá a continuación el método de clonación del gen *ldh* derivado de ser humano:

Se cultivó una línea celular de cáncer de mama (MCF-7) y se recuperó; el ARN total de la misma se extrajo utilizando el reactivo TRIZOL (fabricado por Invitrogen); y los ADNc se prepararon en una reacción de transcripción inversa utilizando SuperScript Choice System (fabricado por Invitrogen) utilizando el ARN total como molde. Estas operaciones se llevaron a cabo de forma detallada respectivamente de acuerdo con los protocolos adjuntos. Los ADNc obtenidos se utilizaron como moldes de amplificación en la siguiente PCR.

El gen *ldh* fue clonado mediante PCR con polimerasa KOD-Plus utilizando los ADNc obtenidos por las operaciones como molde de amplificación y los oligonucleótidos de los SEQ ID NO: 26 y 27 como conjunto de cebadores. Cada fragmento de amplificación de PCR se purificó; el extremo del mismo se fosforiló por medio de polinucleótido quinasa de T4 (fabricada por Takara Shuzo Co., Ltd.) y se ligó a un vector pUC118 (previamente escindido con la enzima de restricción *HindIII* y desfosforilado en la superficie del corte). La ligación se llevó a cabo utilizando un kit de ligación de ADN Ver.2 (fabricado por Takara Shuzo Co., Ltd.). Se obtuvo un plásmido que contenía un gen *ldh* derivado de ser humano subclonado (número de acceso; AY009108, SEQ ID NO: 5) transformando *E. coli* DH5 α con el plásmido ligado producto y recuperando el ADN plasmídico. El plásmido pUC118 que tenía el gen *ldh* obtenido insertado en él fue digerido con las enzimas de restricción *XhoI* y *NotI*, y cada fragmento de ADN obtenido fue insertado en un vector de expresión de levadura pTRS11 en los sitios de escisión *XhoI/NotI*, para dar un plásmido que expresaba el gen *ldh* derivado de ser humano pTRS48.

En lo sucesivo, se describirá el método de clonación del gen *ldh* derivado de *Leuconostoc mesenteroides*.

El gen *ldh* derivado de *Leuconostoc mesenteroides* se clonó mediante la síntesis total del gen al cual se aplica el método de PCR, con referencia a la secuencia (SEQ ID NO: 6) descrita en Res. Microbiol, 146, 291-302 (1995). Se añadió la secuencia de reconocimiento de *XhoI* en el extremo terminal 5 y la secuencia de reconocimiento de *NotI* en el extremo terminal 3 durante la síntesis total, y el fragmento de PCR se sometió a clonación de TA en el vector pTA2. La ligación se llevó a cabo utilizando un kit de ligación de ADN Ver.2 (fabricado por Takara Shuzo Co., Ltd.). Se obtuvo un plásmido que tenía el gen *ldh* derivado de *Leuconostoc mesenteroides* subclonado (SEQ ID NO: 6) transformando *E. coli* DH5 α con el plásmido de ligación producto y recuperando el ADN plasmídico. El plásmido pTA2 que contenía el gen *ldh* insertado obtenido se digirió con las enzimas de restricción *XhoI* y *NotI*, y cada fragmento de ADN obtenido se insertó en el vector de expresión de levadura pTRS11 en el sitio de escisión *XhoI/NotI*, para dar un plásmido pTRS152 que expresa el gen *ldh* derivado de *Leuconostoc mesenteroides*.

3-2 Introducción de genes *ldh* derivados de ser humano y *Leuconostoc mesenteroides* en el cromosoma

Con posterioridad, se introdujeron los genes *ldh* de los SEQ ID NO: 5 y 6 en los loci del gen *PDC1*, el gen *SED1*, el gen *CWP2* y el gen *ENO1* por medio de lo cual el gen *SED1* está de acuerdo con la invención reivindicada.

Por medio de una PCR en la que se utilizaban los plásmidos pTRS48 y pTRS152 como moldes de amplificación y los oligonucleótidos de los SEQ ID NO: 28 y 10 (pTRS48) y de los SEQ ID NO: 29 y 10 (pTRS152) como conjuntos de cebadores, se amplificaron un fragmento de ADN que tenía las secuencias de terminación del gen *ldh* derivado de ser humano de 1,3 kb y el gen *TDH3* derivado de *Saccharomyces cerevisiae* y un fragmento de ADN que contenía las secuencias de terminación del gen *ldh* derivado de *Leuconostoc mesenteroides* y el gen *TDH3* derivado de *Saccharomyces cerevisiae*. También por medio de PCR, utilizando el plásmido pRS424 como molde de amplificación y los oligonucleótidos de los SEQ ID NO: 11 y 12 como conjunto de cebadores, se amplificó un fragmento de ADN que contenía un gen *TRP1* derivado de *Saccharomyces cerevisiae* de 1,2 kb. Cada fragmento de ADN se separó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5% y se purificó mediante un método común. Cada uno de los productos obtenidos mediante PCR utilizando una mezcla del fragmento de 1,3 kb y el fragmento de 1,2 kb así obtenido como molde de amplificación y los oligonucleótidos de los SEQ ID NO: 28 y 12 y los SEQ ID NO: 29 y 12 como conjuntos de cebadores se separó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5%, y se produjeron un fragmento de ADN de 2,5 kb que tenía un gen *TRP1* conectado a un gen de *LDH* derivado de ser humano y un fragmento de ADN de 2,5 kb que tenía el gen *TRP1* conectado al gen *ldh* derivado de *Leuconostoc mesenteroides* mediante un método común. Se transformó una cepa de levadura en gemación NBRC 10505 con el fragmento de ADN de 2,5 kb mediante un método común, para que no requiriera triptófano.

El hecho de que el transformante así obtenido sea una levadura que tiene el gen *ldh* derivado de ser humano o el gen *ldh* derivado de *Leuconostoc mesenteroides* introducido en un sitio aguas abajo del promotor del gen *PDC1* en el cromosoma que no está en el alcance de la invención reivindicada se confirmó mediante un método similar al método del Ejemplo de Referencia 1.

- 5 A continuación, mediante un método similar al del Ejemplo de Referencia 1, se preparó una cepa de levadura que tenía un gen *ldh* derivado de ser humano o de *Leuconostoc mesenteroides* introducido en un sitio aguas abajo del promotor del gen *PDC1* en el cromosoma y que tenía una mutación sensible a la temperatura en el gen *pdcs*. Serán referidos respectivamente como cepas SU019 y SU024 que no están en el alcance de la invención reivindicada.

- 10 La introducción en el locus SED 1 de acuerdo con la invención, así como los loci de los genes *CWP2* y *ENO1* que no están en el alcance de la mención reivindicada se realizó mediante un método similar al descrito en el Ejemplo 2, excepto que los cebadores se alteraron. Los cebadores alterados se describirán a continuación.

Cebador para la introducción en el locus del gen *SED1*

- 15 Se llevó a cabo la PCR, se utilizó el cebador mostrado por el SEQ ID NO: 30, reemplazando el cebador mostrado por el SEQ ID NO: 14 utilizado en el Ejemplo 2 en el caso del gen *ldh* derivado de ser humano, y se utilizó el cebador mostrado por el SEQ ID NO: 33 en el caso del gen *ldh* derivado de *Leuconostoc mesenteroides*, y las cepas SU019 y SU024 se transformaron, utilizando el fragmento de PCR obtenido, respectivamente para que no requiriera histidina. Los transformantes obtenidos serán referidos respectivamente como cepa SU020 (que contenía el gen *ldh* derivado de ser humano introducido) y la cepa SU025 (que contenía el gen *ldh* derivado de *Leuconostoc mesenteroides* introducido).

- 20 Cebador para la introducción en el locus del gen *CWP2* que no está en el alcance de la mención reivindicada

- 25 Se llevó a cabo la PCR, se utilizó el cebador mostrado por el SEQ ID NO: 31, reemplazando el cebador mostrado por el SEQ ID NO: 18 utilizado en el Ejemplo 2 en el caso del gen *ldh* derivado de ser humano y se utilizó el cebador mostrado por el SEQ ID NO: 34 en el caso del gen *ldh* derivado de *Leuconostoc mesenteroides*, y las cepas SU019 y SU024 se transformaron, utilizando el fragmento de PCR obtenido, respectivamente para que no requiriera histidina. Los transformantes obtenidos serán referidos respectivamente como cepa SU021 (que contenía el gen *ldh* derivado de ser humano introducido) y la cepa SU026 (que contenía el gen *ldh* derivado de *Leuconostoc mesenteroides* introducido).

Cebador para la introducción en el locus del gen *ENO1* que no está en el alcance de la invención reivindicada

- 30 Se llevó a cabo la PCR, se utilizó el cebador mostrado por el SEQ ID NO: 32, reemplazando el cebador mostrado por el SEQ ID NO: 22 utilizado en el Ejemplo 2 en el caso del gen *ldh* derivado de ser humano y se utilizó el cebador mostrado por el SEQ ID NO: 35 en el caso del gen *ldh* derivado de *Leuconostoc mesenteroides*, y las cepas SU019 y SU024 se transformaron, utilizando el fragmento de PCR obtenido, respectivamente para que no requiriera uracilo. Los transformantes obtenidos serán referidos respectivamente como cepa SU022 (que contenía el gen *ldh* derivado de ser humano introducido) y la cepa SU027 (que contenía el gen *ldh* derivado de *Leuconostoc mesenteroides* introducido). Además, las cepas SU020 y SU025 se transformaron de una manera similar para que no requiriera uracilo, para dar respectivamente la cepa SU023 (que contenía el gen *ldh* derivado de ser humano introducido) y la cepa SU028 (que contenía el gen *ldh* derivado de *Leuconostoc mesenteroides* introducido).

(Ejemplo 4) Ensayo de fermentación de ácido láctico mediante cultivo por lotes que no está en el alcance de la invención reivindicada

- 40 Los ensayos de fermentación de ácido láctico se llevaron a cabo por medio de cultivo por lotes, mediante el uso de la cepa obtenida en el Ejemplo de Referencia 1 (SU014) y las cepas SU015 a SU028 obtenidas en los Ejemplos 2 y 3. El medio de fermentación de ácido láctico mostrado en la Tabla 1 se colocó en un tubo de ensayo de 10 mL, y cada una de las cepas SU014 a SU028 en pequeña cantidad se inoculó allí, y la mezcla se cultivó durante la noche a 30°C (preprecultivo). A continuación, se colocaron 100 mL del medio de fermentación de ácido láctico de nueva aportación mostrado en la Tabla 1 en un matraz Erlenmeyer de 500 mL, y cada solución de preprecultivo se sembró allí en la cantidad total, y la mezcla se cultivó con agitación a 30°C durante 24 horas (precultivo). Posteriormente, cada una de las soluciones de precultivo después de precultivo durante 24 horas, se añadió en la cantidad completa en un fermentador de mini-jarra (fabricado por Marubishi Bioengineering, volumen: 5L) que contenía 1 L del medio de fermentación de ácido láctico mostrado en la Tabla 1, y la mezcla se cultivó a una velocidad de agitación constante (120 rpm), velocidad de ventilación (0,1 L/min), temperatura (30°C) y pH (pH 5) (cultivo principal). La solución se neutralizó con NaOH 1 N, y la velocidad de alimentación se controló midiendo el cambio de peso con una balanza. La solución de cultivo después del cultivo principal durante 40 horas se centrifugó, y el sobrenadante obtenido se filtró a través de la membrana, la concentración de ácido láctico acumulado se calculó por el método descrito en el Ejemplo de Referencia 1. La concentración de glucosa se determinó mediante el uso del "Ensayo de Glucosa Wako C" (nombre comercial registrado, fabricado por Wako Pure Chemical Industries).

Los rendimientos de ácido láctico/azúcar calculados a partir de los resultados de medición se muestran en la Tabla 3. La pureza óptica del ácido láctico se determinó por el método descrito en el Ejemplo de Referencia 1, que muestra

que solamente se detecta ácido L-láctico y el ácido D-láctico estaba contenido en una cantidad menor que el límite de detección en el caso de las cepas SU014 a SU023, mientras que solamente se detectó ácido D-láctico y el ácido L-láctico estaba contenido en una cantidad menor que el límite de detección en el caso de cepas SU024 a SU028; por medio de lo cual las cepas SU015, SU018, SU020 y SU025 están en de acuerdo con la invención reivindicada

5 [Tabla 3]

Rendimiento de ácido láctico (%)	Nombre de la cepa	SU014	SU015	SU016	SU017	SU018	SU019	SU020	SU021
		53	58	57	61	62	40	45	43
	Nombre de la cepa	SU022	SU023	SU024	SU025	SU026	SU027	SU028	
	-	47	49	38	42	40	44	45	

10 Los resultados confirmaron que, en cultivo continuo de acuerdo con la invención reivindicada, con filtración simultánea de una cepa de levadura que tiene una capacidad de producir ácido láctico, el ácido láctico se obtiene con un rendimiento superior en las cepas SU015 a SU018 que están de acuerdo con la invención reivindicada ,pero también por las cepas SU017 que no están en el alcance de la invención reivindicada (cepas con el gen *ldh* derivado de *Xenopus laevis* introducido), las cepas SU020 a 024 (cepas con el gen *ldh* derivado de ser humano introducido) y las cepas SU025 a 028 (cepas con el gen *ldh* derivado de *Leuconostoc mesenteroides* introducido), es decir, levaduras que tienen un casete que expresa lactato deshidrogenasa introducido que tiene un gen *ldh* en un sitio aguas abajo del promotor de un gen que tiene una cantidad expresión mayor en 10 veces o más que la cantidad de expresión relativa media de todos los genes después de 50 horas desde el inicio del cultivo, que las cepas SU014, SU019 y SU024, por medio del cual las cepas SU015, SU018, SU020 y SU025 están de acuerdo con la invención reivindicada.

(Ejemplo 5) Ensayo de fermentación de ácido láctico mediante cultivo continuo

20 El cultivo continuo de filtración se llevó a cabo en el aparato de cultivo continuo se muestra en la Figura 1, mediante el uso de cepas de levadura transformantes SU015 a SU028 obtenidas en los Ejemplos 2 y 3. El medio usado era un medio de fermentación de ácido láctico en la composición mostrada en la Tabla 1, cuya concentración de glucosa se cambió a 70 g/L. El medio se esterilizó por medio de vapor de agua a alta presión (2 atm.) a una temperatura de 121°C durante 15 minutos antes de su uso. Se utilizaron acero inoxidable y un molde de resina de polisulfona para los miembros de elemento de membrana de separación. La membrana de separación utilizada fue la membrana porosa preparada en el Ejemplo de Referencia 2. La condición operativa en el presente ejemplo es la siguiente, a menos que se especifique lo contrario:

Volumen del tanque de reacción: 2 (L)

Volumen del tanque de reacción de fermentación: 1,5 (L)

Membrana de separación utilizada: membrana de filtración PVDF (preparada en el Ejemplo de Referencia 2)

30 Área de filtración efectiva del elemento de separación con membrana: 120 cm²

Temperatura ajustada a: 30 (°C)

Velocidad de ventilación del tanque de reacción de fermentación: aire: 0,01 (L/min), gas nitrógeno: 0,19 (L/min)

Velocidad de agitación del tanque de reacción de fermentación: 800 (rpm)

35 Ajuste del pH: se ajustó a pH 5 con hidróxido de calcio 5N

Antiespumante: se añadió un antiespumante esterilizado PE-L (fabricado por Wako Pure Chemical Industries) en una cantidad de 200 µL cada 3 horas

Esterilización: el tanque de cultivo que incluía elementos de membrana de separación y el medio utilizado fueron todos esterilizados bajo vapor de agua a alta presión en un autoclave a 121°C durante 20 min.

40 En primer lugar, se cultivó cada una de las cepas SU015 a SU028 durante la noche en un tubo de ensayo que contenía 10 ml del medio de fermentación de ácido láctico mostrado en la Tabla 1 (preprecultivo). La solución de cultivo obtenida se sembró en la cantidad completa a 100 ml de medio de fermentación de ácido láctico de nueva aportación mostrado en la Tabla 1 y la mezcla se cultivó con agitación en un matraz de 500 ml Sakaguchi durante 24 horas a 30°C (preprecultivo). La solución de preprecultivo se añadió a 1,5 L del medio de fermentación de ácido láctico en el aparato de cultivo continuo mostrado en la Figura 1, y la mezcla se cultivó durante 24 horas, mientras que el tanque de reacción 1 se agitaba por un agitador adjunto de 5 a 400 rpm y la velocidad de ventilación, la

- 5 temperatura y el pH del tanque de reacción 1 se ajustaron (precultivo). Inmediatamente después del pre-cultivo, el medio de fermentación del ácido láctico se suministró continuamente al mismo, y el ácido láctico fue producido mediante cultivo continuo, mientras se controlaba la cantidad de penetración de membrana para hacer que el volumen de la solución de fermentación en el aparato de cultivo continuo se mantuviera constante a 1,5 L. Las concentraciones de ácido láctico producido y de glucosa residual en la solución de fermentación que penetra a través de la membrana se verificaron según fue necesario. La concentración de ácido láctico acumulado se determinó por el método descrito en el Ejemplo de Referencia 1 y la concentración de glucosa se determinó mediante el uso del "Ensayo de Glucosa Wako C" (nombre comercial registrado, fabricado por Wako Pure Chemical Industries).
- 10 El rendimiento de ácido láctico/azúcar y la tasa de producción de ácido láctico, tal como se calcula a partir del ácido láctico y de la glucosa suministrados, calculada a partir de la concentración de glucosa, se resumen en las Tablas 4 y 5, junto con los resultados obtenidos en el Ejemplo de Referencia 1, por medio de lo cual SU015, SU018, SU020 y SU025 están de acuerdo con la invención reivindicada. El cálculo se hizo de acuerdo con la Fórmula 3, y el tiempo en la Tabla es el tiempo transcurrido después del comienzo del cultivo.
- 15 [Tabla 4]

	Nombre de la cepa	Rendimiento de ácido láctico (%)				
		50-100 horas	100-150 horas	150-200 horas	200-250 horas	250-300 horas
Ejemplo de referencia 1	SU014	65	75	66	45	20
Ejemplo 4	SU015	68	73	72	70	67
	SU016	67	74	72	69	65
	SU017	70	73	75	73	70
	SU018	75	80	82	82	79
	SU019	51	63	57	38	18
	SU020	54	65	63	60	62
	SU021	53	62	62	58	56
	SU022	57	66	68	65	63
	SU023	60	70	68	68	70
	SU024	45	54	50	33	15
	SU025	48	58	55	54	56
	SU026	48	57	55	53	52
SU027	50	60	59	59	57	
SU028	52	63	64	61	62	

[Tabla 5]

	Nombre de la cepa	Velocidad de producción de ácido láctico (g/L/h)					
		50 horas	100 horas	150 horas	200 horas	250 horas	300 horas
Ejemplo de referencia 1	SU014	2,5	3,1	3,1	2,6	1,7	0,8
Ejemplo 4	SU015	2,9	3,1	3	3	2,8	2,5
	SU016	2,9	3	3	3	2,8	2,5
	SU017	2,9	3,1	3,1	3,1	3	2,9
	SU018	3,1	3,3	3,4	3,4	3,4	3,2
	SU019	1,8	2,0	2,3	2,1	1,4	0,5
	SU020	1,9	2,2	2,5	2,4	2,3	2,4
	SU021	2,0	2,2	2,3	2,2	2,0	1,9
	SU022	2,1	2,4	2,6	2,5	2,4	2,4

	Nombre de la cepa	Velocidad de producción de ácido láctico (g/L/h)					
		50 horas	100 horas	150 horas	200 horas	250 horas	300 horas
	SU023	2,2	2,6	2,7	2,7	2,6	2,7
	SU024	1,4	1,6	1,8	1,7	1,2	0,5
	SU025	1,6	2,0	2,1	1,9	1,8	1,9
	SU026	1,6	1,8	1,9	1,9	1,8	1,8
	SU027	1,7	2,1	2,2	2,0	2,0	1,9
	SU028	1,8	2,3	2,4	2,3	2,2	2,2

5 Los resultados mostraron que, en cultivo continuo con filtración simultánea de una cepa de levadura que tiene una capacidad de producir ácido láctico, el ácido láctico puede ser producido con un alto rendimiento y una alta velocidad de producción constante durante un máximo de 300 horas por las cepas SU015 a SU018, las cepas SU020 a SU023 y las cepas SU025 a SU028, es decir, levaduras que tiene un casete que expresa lactato deshidrogenasa introducido que tiene un gen *ldh* en un sitio aguas abajo del promotor de un gen que tiene una cantidad de expresión 10 veces mayor o más que la cantidad de expresión relativa media de todos los genes después de 50 horas desde el inicio del cultivo, por medio de lo cual SU015, SU018, SU020 y SU025 están de acuerdo con la invención reivindicada. Por otra parte, el rendimiento y la velocidad de producción de ácido láctico disminuyeron rápidamente después de 200 horas, cuando se utilizó la cepa del Ejemplo de Referencia 1 (SU014) o una cepa SU019 o SU024. Además, la medición de la pureza óptica de cada muestra por el método descrito en el Ejemplo de Referencia 1 mostró que solamente se detecta ácido L-láctico y el ácido D-láctico está presente en una cantidad menor que el límite de detección en el caso de cepas SU014 a SU023, mientras que solamente se detecta ácido D-láctico y el ácido L-láctico está presente en una cantidad menor que el límite de detección en el caso de cepas SU024 a SU028, por medio de lo cual SU025 está de acuerdo con la invención reivindicada.

10
 15

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Toray Industries, Inc.

<120> **Casete de expresion para Lactato Deshidrogenasa, Levadura Transformada
y Método para Producir Ácido Láctico**

<130> 08089

<160> 35

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 1000

<212> **ADN.**

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 1

aggattttaa tctgttggag ttaaggtgaa tacgtttttc catattgggg tatgcagctc 60
gaacctaaag tggatgtac acatccctc aagcacccc attaccctta taggattaat 120
gtaagcaaca gcttacacgg aattggaaat actattcaac gatccatgca tctgccagat 180
tcggacatgc atattcccca attggatata gaaaattaac gtaaggcagt atctttcac 240
aatgtacttg caacgcggcg acttaaagtt gaagtacaac ctgcagcagc ggctttttgt 300
acggtacgcc aaactgtcaa tggataatat tgcgtagacc gaaaaaggta atcctcaaca 360
ctaccgtgg tggatgacct aaagcagtaa tattggttgg aattatctcc cagacggcac 420
cgtctccccc agaaagctta gccccgaggt ctacctcca tacaacctg attgctccac 480

gtcattgccc cttcttctga ggacaaaaag gcatatctcg ctaaaattag ccatcagaac 540
 cgttattggt attatatttt cattacgaaa gaggagaggg cccagcgcgc cagagcaca 600
 acggtcattg attactttat ttggtctaaag atccatccct tctcgatgtc atctctttcc 660
 attcttgtgt atttttgatt gaaaatgatt ttttgtccac taatttctaa aataagaca 720
 aaaagccttt aagcagtttt tcatccattt tactacggta aatgaatta gtacgggatg 780
 gctcccagtc gcattatttt tagattggcc gtaggggctg gggtagaact agagtaagga 840
 acattgctct gcctcttttt gaactgcat ataaatacct gacctatttt attctccatt 900
 atcgtattat ctcacctctc tttttctatt ctcttgaat tattgattta tagtcgtaac 960
 tacaaagaca agcaaaaataa aatacgtctg ctctattaag 1000

<210> 2

<211> 1000

<212> **ADN**

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 2

ctaatagaca aggtgctatg agtgaattgc tagcctcccc tttttatttt gtgcggctac 60
 cgcaagggac aaagcttttc ttagaaaacc gtctgagaag cataacgtac gccatccct 120
 agacatatta ataatgctac agatactatg ctgctcgtct tttttgacg acctttttat 180
 tgcaatgtgc aactaatggc aaacaaccac atagtatcac agtattacat tgctccacc 240
 gatgcggatg ttagggcgcc aagtctgtca tgaagcatgt tctgtcata atcttgtatg 300
 caaaataccg cgttctgcgc cactgatatg ctaggcagca gcaacctatg cagaagattg 360
 cttttccac gcctgtttta cgtctccagg gcaattgaaa caatgcagcg atcgcgccca 420
 caacacgcca aagagaagcg aaagtgggccc tgggcggcct cagtttcggc agaggtaaac 480
 aacacgaact gaactgcctt agctccgaag ggcaattcca caggcactcc gcggggcccc 540
 gccaaagccc aaaaggcgtg gaatatgcgc gttttggggc cataacaccc agtaccacgg 600
 ccggaacggg ccatataata agtttttca cctcaagaat ggtaaacgta aataggaaca 660
 tcccactacc ctagaaattg cggaaatttc gcgcttatca ttagaaaatc tggaaccgtc 720
 cttttctctc tttcttgcct ttcctttcc gtattattgc cattctttaa ctgcatttgg 780
 ggaaccgtag accaaaagcc aaacagagaa atgtaacgtt ctaaaaaaaa aacaacgaaa 840
 aaattgaaaa ataagataca ataactgtat ataaatcagg cttcttgttc atcattttca 900
 attctctctc tgccatccct tttctatct ttgttctttt cttctcataa tcaagaataa 960
 ataacttcat cacattcgtc acacactaac aagaaaaaaaa 1000

<210> 3

<211> 1000

<212> **ADN**

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 3

tagaaagcat actatactat tcgacacttc ctttcaatcc tggaattaac agtcactttt 60
 aaaaaagaca tctaccgtga aggtgcccga gagtatcgcg ttaccatata gccaaaaact 120
 gatatacgcc gcggaaacca ggcaacaat tgaagagaaa aattttgagg aactctctgc 180
 atcgaagccg tctagagtta ccactagtca gatgccgcgg gcacttgagc acctcatgca 240
 cagcaataac acaacacaat ggtagtagc aacctgaatt cggtcattga tgcattgatg 300
 tgccgtgaag cgggacaacc agaaaagtcg tctataaatg ccggcacgtg cgatcatcgt 360
 ggccggggttt taagagtga taccacaaat tctgcatta ccgcggaacc gccagatatt 420
 cactacttga cgaaaagcg tttgaaataa tgacgaaaaa gaaggaagaa aaaaaaagaa 480
 aaataccgct tctaggcggg ttatctactg atccgagcct ccactaggat agcacccaaa 540
 cacctgcata tttggagcgc ctttacttac accacccaaa accactttcg cctctcccgc 600
 ccttgataac gtccactaat tgagcgatta cctgagcggc cctcttttgc ttgcagcatg 660
 agacttgcac actgcaaatc gtaagtagca acgtctcaag gtcaaaactg tatggaaacc 720
 ttgtcacctc acttaattct agctagccta cctgcaagt caagaggtct cctgattcc 780
 tagccacctc aaggtatgcc tctcccggga aactgtggcc tttctggca cacatgatct 840
 ccacgatttc aacatataaa tagcttttga taatggcaat attaatcaaa tttattttac 900
 ttctttcttg taacatctct cttgtaatcc cttattcctt ctactattt ttataaaaa 960
 accaagcaac tgcttatcaa cacacaaaca ctaaatcaaa 1000

<210> 4

<211> 999

<212> **ADN**

<213> *Xenopus laevis*

<400> 4

atggcaactg tgaaggataa actcatccac aatgtggtea aggaggagtc gctccccag 60
 aacaaggtea ccattgtggg tgtggggggc gtgggcatgg cctgtgcat cagtgtctg 120
 cagaaggatt tggcagatga gcttgcaact gttgatgta tagaagaca actgaagggg 180
 gaaatgatgg atctccagca tggcagctg ttctctgta ccccaagat tctctcaggg 240
 aaagattaca gctcactgc aaactcaag ctggtagttg tgacggccgg ggcccgtcag 300
 caggagggag agagtgcct gaactctggt cagcgcaatg tcaacatctt caaattcatc 360
 attccaaca ttgtcaagta cagcccaac tgcaacctgc tcatcgtctc caaccagtg 420
 gacattctga catatgtggc ctggaagatc agtggattcc ccaaaaaccg tgtcattggc 480

agcggctgca atttggactc tgcccgtttc cgttacctca tggggcagaa gtttgggac 540
 cacaccaga gctgccacgg ttgggtcatt ggggaacacg gagactcgag tgtgccagt 600
 tggagtgggg tgaatgtggc tggcgtgtcc ctgaaaacce tgcacccoga tattgggagt 660
 gacgcagaca aggagaactg gaaggagggtg cacaagcagg ttgtggacag cgcctatgaa 720
 gtgatcaage tgaagggcta cacctcctgg gctattggcc tgtccgtagc tgacctgtct 780
 gagagtatcc tgaagaacct ccgccgagtc catccattt ccacaatggt caagggcatg 840
 tacggcgtga ataatgatgt ttctctcagt gtcccctgtg tgttgggcaa cttgggcatc 900
 acagacgtgg ttaacatgac gctgaaggca gatgaagagg atcgettacg caagagcgca 960
 gacacacctg gggccatcca gaaggagctg cagttctag 999

<210> 5

<211> 999

<212> **ADN**

<213> Homo sapiens

<400> 5

atggcaactc taaaggatca gctgatttat aatcttctaa aggaagaaca gacccccag 60
 aataagatta cagttgttgg gtttgggtct gttggcatgg cctgtgccat cagtatctta 120
 atgaaggact tggcagatga acttgcctct gttgatgta tgaagacaa attgaaggga 180
 gagatgatgg atctccaaca tggcagcctt ttcttagaa caccaaagat tgtctctggc 240
 aaagactata atgtaactgc aaactccaag ctggtcatta tcacggctgg ggcacgtcag 300
 caagagggag aaagccgtct taatttggtc cagcgtaacg tgaacatatt taaattcacc 360
 attcctaattg ttgtaaaata cagcccgaac tgaagttgc ttattgttc aaatccagtg 420
 gatacttga cctacgtggc ttggaagata agtggtttc caaaaaccg tgttattgga 480
 agtggttgca atctggattc agcccattc cgttacctga tgggggaaag gctgggagt 540
 caccattaa gctgtcatgg gtgggtcctt ggggaacatg gagattccag tgtgcctgta 600
 tggagtggaa tgaatgttgc tgggtctct ctgaagactc tgcacccaga tttagggact 660
 gataaagata aggaacagtg gaaagaggtt cacaagcagg tggttgagag tgcttatgag 720
 gtgatcaaac tcaaaggcta cacatcctgg gctattggac tctctgtage agatttggca 780
 gagagtataa tgaagaatct taggcgggtg caccagttt ccaccatgat taagggtctt 840
 tacggaataa aggatgatgt ctctcttagt gttccttga ttttgggaca gaatggaatc 900
 tcagacctg tgaagggtgac tctgacttct gaggaagagg cccgtttgaa gaagagtgca 960
 gatacacttt ggggatcca aaaggagctg caattttaa 999

<210> 6

<211> 996

<212> **ADN**

<213> *Leuconostoc mesenteroides*

<400> 6

atgaagattt ttgcttacgg cattcgtgat gatgaaaage catcactga agaatggaaa 60
ggcgtaacc cagagattga agtggactac acacaagaat tattgacacc tgaacagct 120
aagttggctg agggatcaga ttcagctggt gtttatcaac aattggacta tacacgtgaa 180
acattgacag ctttagctaa cgttgggtgt actaacttgt cattgcgtaa cgttggta 240
gataacattg atttgatgc agcaegtga ttaacttta acattcaaa tgttctgtt 300
tattaccaaa atgctattgc agaacactca atgctcaat tatctcgtt gctacgtgc 360
acgaaagcat tggatgcaa aattgctaag cgagacttgc gttgggcacc acaactgga 420
cgtgaaatgc gtatgcaaac agttgggtgt attggtacag gtcatttgg ccgtgttgc 480
attaacattt tgaaggctt tggggccaag gttattgctt atgacaagta cccaaatgc 540
gaattacaag cagaagggtt gtacgttgc acattagacg aattatatgc acaagctgat 600
gcaatttcat tgtatgttc tgggtacct gaaaaccate atctaatcaa tgcagatgc 660
attgctaaga tgaaggatgg tgtggttate atgaacgtg cgcgtggtaa ttgatggac 720
attgacgcta ttattgatgg ttgaattct ggtaagatt cagactcgg tatggacgtt 780
tatgaaaatg aagttgcttg tcaatgaag attggtctgg taaagaattc cccagatgc 840
aagattgctg acttgattgc acgcgaaat gttatgatca cccacacac ggctttctat 900
acaactaaag ctgttctaga aatggtcac caatcattg atgcagcagt tctttcgc 960
aagggtgaga agccagctat tctgttgaa tatta 996

<210> 7

<211> 26

<212> **ADN**

<213> Artificial

<220>

<223> **cebador**

<400> 7

gtcgacatgg caactgtgaa ggataa 26

<210> 8

<211> 26

<212> **ADN**

<213> Artificial

<220>

<223> **cebador**

<400> 8

gcggcgcgct agaactgcag ctctct 26

<210> 9

<211> 85

<212> **ADN**

<213> Artificial

<220>

<223> **cebador**

<400> 9

tctcaattat tattttctac tcataacctc acgcaaaata acacagtcaa atcaatcaaa 60
atggcaactg tgaaggataa actca 85

<210> 10

<211> 20

<212> **ADN**

<213> Artificial

<220>

<223> **cebador**

<400> 10

aggcgtatca cgagccctt 20

<210> 11

<211> 60

<212> **ADN**

<213> Artificial

<220>

<223> cebador

<400> 11

gaattaattc ttgaagacga aagggcctcg tgatacgcct agattgtact gagagtgcac 60

<210> 12

<211> 80

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> cebador

<400> 12

tatttttcgt tacataaaaa tgcttataaa actttaacta ataattagag attaaatcgc 60
ctgtgcggta tttcacaccg 80

<210> 13

<211> 25

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> cebador

<400> 13

caaatacgt ttgaatattt ttccg 25

<210> 14

<211> 85

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> cebador

<400> 14

tattgattta tagtcgtaac tacaagaca agcaaaataa aatacgttcg ctctattaag 60
atggcaactg tgaaggataa actca 85

<210> 15

<211> 80

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> cebador

<400> 15

aaaaaataac ataatactga aagaaagcat taagsaggcg gatgtgtcaa acaccaccgt 60
ctgtggegta tttcacaccg 80

<210> 16

<211> 20

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> cebador

<400> 16

tagattggcc gtaggggctg 20

<210> 17

<211> 20

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> **cebador**

<400> 17

cacgcaacgc gtaagaaaca 20

<210> 18

<211> 85

<212> **ADN**

<213> Artificial

<220>

<223> **cebador**

<400> 18

cttctcataa tcaagaataa ataacttcat cacattcgct acacactaac aagaaaaaaaa 60

atggcaactg tgaaggataa actca 85

<210> 19

<211> 80

<212> **ADN**

<213> Artificial

<220>

<223> **cebador**

<400> 19

ctagtaaac cgaaaatfff gaaaaaagcc atatagatat tataaaaaat cagagatttc 60

ctgtgcggta tttcacaccg 80

<210> 20

<211> 20

<212> **ADN**

<213> Artificial

<220>

<223> **cebador**

<400> 20

aaacagagaa atgtaacgtt 20

<210> 21

<211> 20

<212> **ADN**

<213> Artificial

<220>

<223> **cebador**

<400> 21

cattcgaaga gaaatcacag 20

<210> 22

<211> 85

<212> **ADN**

<213> Artificial

<220>

<223> **cebador**

<400> 22

ctagctattt ttcataaaaa accaagcaac tgcttatcaa cacacaaaca ctaaatacaa 60

atggcaactg tgaaggataa actca 85

<210> 23

<211> 80

<212> **ADN**

<213> Artificial

<220>

<223> **cebador**

<400> 23

gaaaatgaaa taaatgacaa aaaaacgtgt ttttggact agaaggctta atcaaaagct 60

ctgtgcggtta tttcacaccg 80

<210> 24

<211> 20

<212> **ADN**

<213> Artificial

<220>

<223> **cebador**

<400> 24

aaggtatgcc tctccccgga 20

<210> 25

<211> 20

<212> **ADN**

<213> Artificial

<220>

<223> **cebador**

<400> 25

cggatacacg cgtcaccaca 20

<210> 26

<211> 26

<212> **ADN**

<213> Artificial

<220>

<223> **cebador**

<400> 26

ctcgagatgg caactctaaa ggatca 26

<210> 27

<211> 28

<212> **ADN**

<213> Artificial

<220>

<223> **cebador**

<400> 27

gcggccgcctt aaaattgcag ctctttt 28

<210> 28

<211> 85

<212> **ADN**

<213> Artificial

<220>

<223> **cebador**

<400> 28

tctcaattat tattttctac tcataacctc acgcaaaaata acacagtcaa atcaatcaaa 60
atggcaactc taaaggatca gctga 85

<210> 29

<211> 85

<212> **ADN**

<213> Artificial

<220>

<223> **cebador**

<400> 29

tctcaattat tattttctac tcataacctc acgcaaaaata acacagtcaa atcaatcaaa 60
atgaagattt ttgcttaegg cattc 85

<210> 30

<211> 85

<212> **ADN**

<213> Artificial

<220>

<223> **cebador**

<400> 30

tattgattta tagtcgtaac tacaaagaca agcaaaataa aataggtcg ctctattaag 60
atggcaactc taaaggatca gctga 85

<210> 31

<211> 85

<212> **ADN**

<213> Artificial

<220>

<223> **cebador**

<400> 31

cttctcataa tcaagaataa ataacttcat cacattcgt acacactaac aagaaaaaaa 60
atggcaactc taaaggatca gctga 85

<210> 32

<211> 85

<212> **ADN**

<213> Artificial

<220>

<223> **cebador**

<400> 32

ctagctattt ttcataaaaa accaagcaac tgcttatcaa cacacaaaca ctaaatacaa 60
atggcaactc taaaggatca gctga 85

<210> 33

<211> 85

<212> **ADN**

<213> Artificial

<220>

<223> **cebador**

<400> 33

atgaagattt ttgcttacgg cattctattg atttatagtc gtaactacaa agacaagcaa 60
aataaaatac gttcgtctca ttaag 85

<210> 34

<211> 85

<212> **ADN**

<213> Artificial

<220>

<223> **cebador**

<400> 34

atgaagattt ttgcttacgg cattccttct cataatcaag aataaataac tcatcacat 60
tcgtacaca ctaacaagaa aaaaa 85

<210> 35

<211> 85

<212> **ADN**

<213> Artificial

<220>

<223> **cebador**

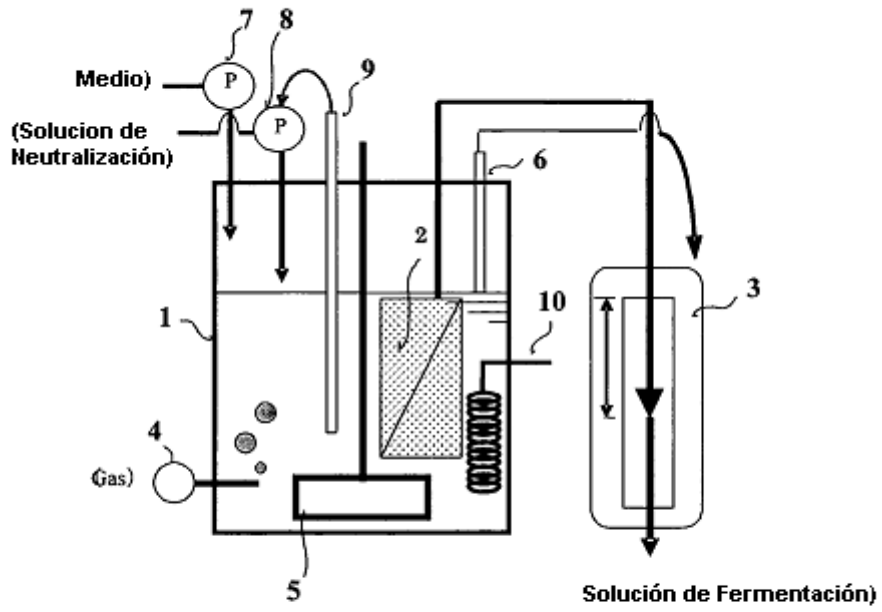
<400> 35

atgaagattt ttgcttacgg cattcctagc tatttttcat aaaaaaccaa gcaactgctt 60
atcaacacac aaacactaaa tcaaa 85

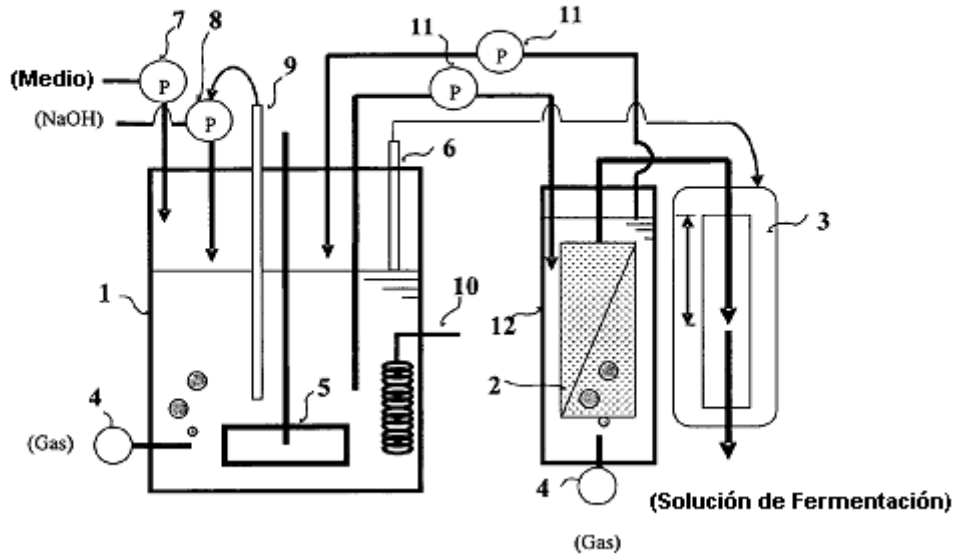
REIVINDICACIONES

1. Un método de producción de ácido láctico, que comprende una etapa de cultivo para cultivar la cepa de levadura transformante que comprende al menos un casete de expresión de lactato deshidrogenasa,
- 5 en donde dicho casete comprende un gen que codifica lactato deshidrogenasa conectado a un sitio aguas abajo de un promotor del gen supresor de defecto exponencial 1 (gen SED1);
- en donde la cepa de levadura transformante comprende al menos un casete de expresión de lactato deshidrogenasa en el cromosoma,
- y la etapa de cultivo es una fermentación continua.
2. El método de producción de ácido láctico de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el promotor es un promotor que tiene una secuencia de nucleótidos seleccionada entre las siguientes secuencias (a) a (b):
- 10 (a) un promotor que tiene la secuencia de nucleótidos mostrada por el SEQ ID NO: 1; y
- (b) un promotor que tiene una secuencia de nucleótidos que hibrida con la secuencia de nucleótidos mostrada por el SEQ ID NO: 1 o una secuencia de nucleótidos que tiene parte de ella bajo condiciones rigurosas;
- 15 en donde las condiciones rigurosas consisten en una temperatura de hibridación de 37°C en presencia de formamida al 50%.
3. El método de producción de ácido láctico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en donde al menos un gen de la cepa de levadura transformante es el gen supresor de defecto exponencial 1 (gen SED1) que está sustituido por el casete que expresa la lactato deshidrogenasa de acuerdo con la reivindicación 1.
4. El método de producción de ácido láctico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la cepa de levadura transformante pertenece al género *Saccharomyces*.
- 20 5. El método de producción de ácido láctico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la cepa de levadura transformante es *Saccharomyces cerevisiae*.
6. El método de producción de ácido láctico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la fermentación continua comprende la filtración de la solución de cultivo a través de una membrana de separación, la recuperación del ácido láctico a partir del producto filtrado, el mantenimiento o retro-alimentación de la solución no filtrada a la solución de cultivo, y la adición de medio a la solución de cultivo.
- 25

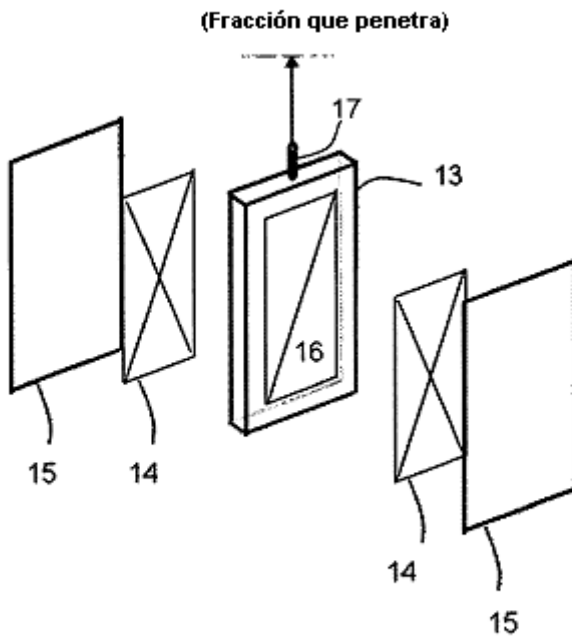
[Fig.1]



[Fig.2]

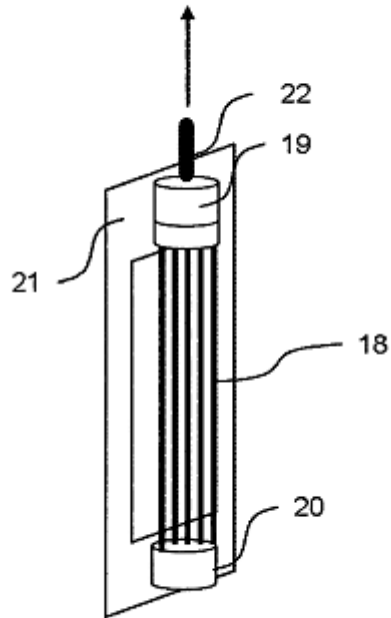


[Fig.3]



[Fig. 4]

(Fracción que penetra)



[Fig. 5]

