

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 619 176**

51 Int. Cl.:

C12P 7/56 (2006.01)

C12N 1/21 (2006.01)

C12N 15/09 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.09.2004 PCT/JP2004/014037**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.04.2005 WO05033324**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.09.2004 E 04773417 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.12.2016 EP 1669460**

54 Título: **Biocatalizador para producir ácido D-láctico**

30 Prioridad:

30.09.2003 JP 2003342222

30.09.2003 JP 2003342165

30.09.2003 JP 2003340062

20.05.2004 JP 2004150252

20.05.2004 JP 2004150253

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

23.06.2017

73 Titular/es:

**MITSUI CHEMICALS, INC. (100.0%)
5-2, HIGASHI-SHIMBASHI 1-CHOME
MINATO-KU, TOKYO 105-7117, JP**

72 Inventor/es:

**WADA, MITSUFUMI;
OIKAWA, TOSHIHIRO;
MOCHIZUKI, DAISUKE;
TOKUDA, JUNKO;
KAWASHIMA, MIYUKI;
ARAKI, TADASHI;
ABE, REIKO;
MIYAKE, HITOKI;
TAKAHASHI, HITOSHI;
SAWAI, HIDEKI;
MIMITSUKA, TAKASHI;
MORISHIGE, TAKASHI y
HIGASHI, YOSUKE**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 619 176 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

Biocatalizador para producir ácido D-láctico

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un microorganismo que produce ácido D-láctico con alto rendimiento y con alta selectividad, y un método para producir ácido D-láctico usándolo. Específicamente, se refiere a un método para producir ácido D-láctico con alta pureza y buena eficacia, especialmente un método para producir eficazmente ácido D-láctico en el que una cantidad de ácido pirúvico producida y acumulada es pequeña.

Además, la presente invención se refiere a un método para producir ácido D-láctico, en el que el método se caracteriza por utilizar un microorganismo en el que la D-lactato deshidrogenasa dependiente de FAD está inactivada o reducida.

Además, la presente invención se refiere a un microorganismo que produce ácido D-láctico sin producir ácido succínico y ácido fumárico que son impurezas, y un método para producir ácido D-láctico usándolo.

20 **Antecedentes de la técnica**

El ácido poliláctico, que es un polímero biodegradable, atrae mucha atención como producto que responde a la sostenibilidad y LCA (evaluación del ciclo vital) con actualización del problema de CO₂ y se requiere un método de producción eficaz y económico para ácido láctico, que es una materia prima del mismo. Por otro lado, el ácido poliláctico producido industrialmente en la actualidad es un polímero de ácido L-láctico. Sin embargo, el ácido láctico incluye ácido L-láctico y ácido D-láctico. El ácido D-láctico está atrayendo atención en años recientes como una materia prima para polímeros o intermedios de productos químicos agrícolas y medicinas. Sin embargo, se requiere ácido láctico como materia prima para tener una alta pureza óptica para cualquier uso.

En la naturaleza, existe un microorganismo que produce ácido láctico con buena eficacia tal como de lactobacillus y bacterias filamentosas, y algunos de los métodos para producir ácido láctico usándolos ya han entrado en uso práctico. Por ejemplo, *Lactobacillus delbrueckii* o similares se conoce como un microorganismo que produce ácido L-láctico con buena eficacia, y microorganismos que pertenecen al género *Sporolactobacillus* o similares como microorganismos que producen ácido D-láctico con buena eficacia. En todos los casos, la cantidad de ácido láctico acumulada alcanza alto nivel, pero productos secundarios contenidos en la solución de cultivo distintos de ácido láctico, por ejemplo, compuestos tales como ácido acético, etanol, acetoina y ácido pirúvico, que no se retiran en el proceso de purificación, pueden conducir a reducción de la calidad de ácido láctico, que se es el producto final. Además, también es un problema crítico que la contaminación debida a isómeros ópticos puede provocar reducción de la pureza óptica.

Para evitar dicha reducción de la pureza del ácido láctico, es un medio eficaz reducir la cantidad de productos secundarios producidos por un microorganismo. Se ha hecho posible inhibir específicamente la producción de los productos secundarios dirigidos por alteración de un cierto gen de un microorganismo usando una técnica de recombinación génica que se ha desarrollado en años recientes. Sin embargo, no significa que el método de alteración génica pueda aplicarse fácilmente a cualquier microorganismo en la realidad, y no es fácil aplicarlo a un microorganismo que pueda producir originalmente ácido láctico con alto rendimiento tal como de lactobacillus o bacterias filamentosas o similares. Esto se debe a que la información genómica de estos microorganismos no puede siempre conocerse lo suficiente, y además no se usan universalmente como un hospedador de recombinación génica.

Por el contrario, es posible realizar alteración génica de forma relativamente sencilla para *Escherichia coli*, levadura, cultivo de células humanas o similares, para los que hay abundante información genómica, y que tienen suficientes registros como un hospedador de recombinación génica. Especialmente, *Escherichia coli* se prefiere más a la vista de la baja tasa o facilidad de cultivo. Además, ya que *Escherichia coli* produce solamente isómeros D de ácido láctico, es un hospedador adecuado para el fin de obtener ácido D-láctico con alta pureza óptica. Sin embargo, el tipo silvestre de *Escherichia coli* tiene baja productividad para ácido D-láctico, y produce diversos ácidos orgánicos de productos secundarios además de ácido D-láctico. Para resolver este problema, se ha intentado en el pasado modificar la ruta metabólica de *Escherichia coli* por recombinación génica, para producir selectivamente ácido D-láctico con alto rendimiento.

Chang, *et al.* (Chang, D.-E., *et al.*, Appl. Environ. Microbiol., Vol. 65(4), pp 1384-1389 (1999)) fueron capaces de producir 62,2 g/l de ácido D-láctico en 60 horas, cultivando una doble variante de fosfo-transacetilasa (en lo sucesivo en el presente documento, se puede denominar simplemente pta) y fosfoenolpirúvico carboxilasa (en lo sucesivo en el presente documento, se puede denominar simplemente ppc) de *Escherichia coli* usando un método que contiene glucosa al 5 % y aminoácidos y aumentando después la cantidad de masa microbiana cultivando de forma preliminar con aireación, el cultivo se realizó en condiciones anaerobias y cultivando adicionalmente y añadiendo glucosa al medio para mantener la concentración de glucosa al 5 % o menos en el medio. En este caso, la tasa de conversión

de glucosa a ácido D-láctico fue del 76 %.

Zhou, *et al.* (Zhou, S., *et al.*, Appl. Environ. Microbiol., Vol. 69(1), pp 399-407 (2003)) indicaron que se preparó *Escherichia coli* con alteración cuádruple de piruvato formiato-liasa (en lo sucesivo en el presente documento se puede denominar simplemente pfl), fumarato reductasa (en lo sucesivo en el presente documento se puede denominar simplemente frd), alcohol/aldehído deshidrogenasa (en lo sucesivo en el presente documento se puede denominar simplemente adeE) y acetato quinasa (en lo sucesivo en el presente documento se puede denominar simplemente ackA) y se cultivó en un medio salino orgánico que contenía glucosa al 5 % en condiciones anaerobias durante 168 horas para producir 48,5 g/l de ácido D-láctico sin ningún producto secundario de ácido fórmico, ácido succínico, etanol y ácido acético. Sin embargo, no puede decirse que este intento satisfaga tanto la tasa de selección como la productividad debido a la baja productividad tal como 0,29 g/l/h aunque fue exitoso para producir ácido D-láctico con alta selectividad. Además, no hay ninguna mención acerca de productos secundarios de ácido pirúvico, y los efectos de su reducción no están claros. Ya que el ácido pirúvico es un sustrato de reacción metabólica de ácido D-láctico, es diferente de otros productos secundarios de ácidos orgánicos, y si su producción se suprime inconscientemente, la producción de ácido D-láctico en sí misma también se suprime. En ese momento, no es fácil suprimir la producción secundaria de ácido pirúvico a un mínimo. En general, es un hecho bien conocido para los expertos en la materia que cuando el ácido pirúvico está contenido como una impureza en una materia prima para monómero de ácido láctico, se producen problemas no deseados tales como reducción de la tasa de polimerización de polímeros o similares. Por esta razón también, el ácido pirúvico es uno de los productos secundarios que deberían reducirse por cualquier medio. Sin embargo, no ha habido ningún informe en el pasado de que la producción secundaria de ácido pirúvico se suprima manteniendo al mismo tiempo alta productividad de ácido D-láctico con éxito.

En resumen, la cantidad máxima de ácido D-láctico acumulado con *Escherichia coli* conocida hasta la fecha ha sido de 62,2 g/l con un tiempo de producción de 60 horas. Por otro lado, si se considera que la productividad de ácido L-láctico de lactobacillus o bacterias filamentosas, que se usa en la producción industrial de ácido L-láctico, no es menor de 100 g/l en la cantidad acumulada y además el tiempo de producción está dentro de 24 horas, se tendría que decir que la cantidad de ácido D-láctico acumulado y el tiempo de producción en el caso de *Escherichia coli* aún están a bajo nivel. No hubo ningún informe en el pasado acerca de que la *Escherichia coli* consiguiera productividad de ácido láctico tan alta como la de lactobacillus o bacterias filamentosas, y lejos de ello, no ha habido ningún dato en el pasado que sugiera si el ácido D-láctico puede acumularse y producirse o no en más de 100 g/l usando *Escherichia coli*.

Cuando se fermenta ácido D-láctico usando *Escherichia coli*, se considera en general que la presencia de oxígeno no es preferible. Esto se debe a que, si un aceptor de electrones tal como oxígeno está presente, *Escherichia coli* experimenta respiración y no fermentación. Solamente en ausencia de un aceptor de electrones tal como oxígeno, *Escherichia coli* obtiene energía (ATP) solamente por fosforilación en el nivel de sustrato, y produce ácidos orgánicos reductores tales como ácido láctico usando potencia de reducción (NADH) obtenida en la ruta glucolítica. Por razones tales como estas, se lleva a cabo fermentación de ácido D-láctico convencional usando *Escherichia coli* principalmente en cultivo anaeróbico. En pocos casos, se lleva a cabo cultivo bifásico en el que la primera mitad del cultivo es aireada y la segunda mitad del cultivo es anaerobia. Sin embargo, esto significa que la primera mitad se realiza para el fin de asegurar una cantidad suficiente de masa microbiana, y la fermentación de ácido láctico final se lleva a cabo en condiciones anaerobias como se esperaba. Sin embargo, cuando se presupone una producción industrial real, el agua de macerado de maíz (en lo sucesivo en el presente documento se puede denominar simplemente CSL) o similares, que es una fuente de aminoácidos barata añadida a un medio, contiene no solamente ácidos orgánicos que se convierten en impurezas, sino también isómero D e isómero L de ácido láctico. Sin embargo, si se lleva a cabo cultivo anaeróbico, el ácido L-láctico no se asimila y permanece en el medio. La ácido L-láctico deshidrogenasa (en lo sucesivo en el presente documento se puede denominar simplemente lld), que es una enzima catalítica de la reacción para producir ácido pirúvico a partir de isómero L, se sabe que se expresa en condiciones aerobias. Por lo tanto, si hay un método para fermentar ácido láctico con buena eficacia incluso en condiciones aerobias, se espera que el método permita asimilar isómero L contenido en el medio en masa microbiana, y producir isómero D con alta pureza óptica. Sin embargo, no ha habido ninguna técnica hasta la fecha para realizarlo.

Antes del informe de Zhou, *et al.* acerca de la producción de ácido láctico usando una cepa con pfl alterado, ha habido los siguientes informes. Específicamente, Contag, *et al.* (Contag, P. R., *et al.*, Appl. Environ. Microbiol., Vol. 56(12), pp 3760-3765 (1990)) han mostrado que, aunque la cepa de *Escherichia coli* no variante de pfl produce ácido láctico 35 mM; una cepa variante de pfl produce ácido láctico 45 mM debido a productividad mejorada del ácido láctico. Concretamente, ya se ha conocido por divulgación de datos de Contag, *et al.* que la productividad de ácido D-láctico se mejora por inactivación de actividad de pfl en *Escherichia coli*.

La D-lactato deshidrogenasa se clasifica en dependiente de NADH y dependiente de FAD de acuerdo con la diferencia en la dependencia de una coenzima. La D lactato deshidrogenasa dependiente de NADH cataliza una reacción de ácido pirúvico a ácido D-láctico en el cuerpo vivo. Especialmente, la D lactato deshidrogenasa dependiente de NADH derivada de *Escherichia coli* se denomina ldha.

Yang, *et al.* (Yang, Y. T., *et al.*, *Metab. Eng.*, Vol. 1(2), pp 141-152 (1999)) han indicado que, introduciendo un vector de expresión incorporado con el gen *ldhA* en *Escherichia coli*, la cantidad de ácido D-láctico acumulado mejora, aunque poco, hasta aproximadamente 8 g/l. Es decir, se sabe a partir de datos desvelados por Yang, *et al.* que la productividad de ácido D-láctico mejora por el refuerzo de la actividad de *LdhA* en *Escherichia coli*.

Por otro lado, de acuerdo con Bunch, *et al.* [Bunch, PK., *Microbiology*, Vol. 143(Pt 1), 187-195 (1997)], se ha indicado que *Escherichia coli*, en la que se introduce un vector de expresión de gen de *LdhA* derivado de *Escherichia coli* tiene crecimiento inhibido por el vector de expresión introducido.

Además, los ejemplos de sobreexpresión en *Escherichia coli* de D lactato deshidrogenasa (en lo sucesivo en el presente documento, se puede denominar *Ldh*) derivada de bacterias distintas de *Escherichia coli*, incluyen la expresión de *Ldh* derivada de *Lactobacillus helveticus* indicada por Kochhar, *et al.* [Kochhar, S., *Eur. J. Biochem.*, (1992) 208, 799-805], y la expresión de *Ldh* derivada de *Lactobacillus bulgaricus* presentada por Kochhar, *et al.* [Kochhar, S., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, (1992) 185, 705-712]. Sin embargo, en cualquiera de los informes, no hay ninguna mención acerca de la cantidad de isómero D o de ácido pirúvico acumulado, ya que estos informes se refieren a la investigación sobre propiedades fisicoquímicas de las enzimas expresadas.

Sin embargo, la productividad de ácido D-láctico de un microorganismo que se inactiva o cuya actividad de *pfl* se reduce, y con actividad *LdhA* reforzada adicionalmente aún no se conoce bien.

Con un método para reforzar un gen usando un vector de expresión, pueden aparecer problemas generales tales como pérdida del vector que provoca reducción en la cantidad de un gen deseado expresado, y reducción adicional de la productividad de una sustancia deseada. A partir de estos hallazgos, el método para reforzar un gen de *Ldh* usando un vector de expresión tiene varios problemas por resolver en la aplicación a la producción industrial de ácido D-láctico, y se desea un método para reforzar un gen que lo reemplace. Sin embargo, no se ha realizado ningún informe acerca de dicho enfoque.

Como un método para reforzar un gen en lugar de usar un vector de expresión, existe un método para reforzar el gen en el que la región promotora génica en el genoma se sustituye por un promotor arbitrario como se indica en Solem, *et al.* (Solem, C., *et al.*, *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 68(5), pp 2397-2403 (2002)). Sin embargo, si se considera un caso en el que esta técnica se aplica a la producción de ácido D-láctico en el que el gen de *LdhA* anteriormente mencionado se usa, el gen de *LdhA* reforzado con este método es solamente 1 copia del gen en el genoma. Por lo tanto, se predice que la mejora de actividad de *LdhA* es pequeña en comparación con un método de refuerzo por un vector de expresión que expresa muchas copias del gen, de modo que ha sido difícil incluso para un experto en la materia anticipar que la productividad de ácido D-láctico mejore en comparación con el caso del uso del vector de expresión.

Por otro lado, se han desvelado por análisis de enzima purificada a partir de *Escherichia coli* que la D-lactato deshidrogenasa dependiente de FAD (en lo sucesivo en el presente documento, se puede denominar simplemente *dld*) cataliza principalmente la reacción inversa de D-lactato deshidrogenasa dependiente de NADH, es decir, la reacción de ácido D-láctico a ácido pirúvico. Shaw, *et al.* adquirieron en el pasado cepas de *Escherichia coli* JS150 y JS151, en las que *dld* estaba alterada. Sin embargo, no hubo ninguna mención acerca de la productividad de ácido D-láctico o productividad de ácido pirúvico en esas cepas (Shaw, L., *et al.*, *J. Bacteriol.*, Vol. 121(3), pp 1047-1055 (1975)). Además, Barnes, *et al.* han indicado que *dld* está implicada en la incorporación de diversos aminoácidos o sacáridos (Barnes, E. M., *et al.*, *J. Biol. Chem.*, Vol. 246(17), pp 5518-5522 (1971)]. Sin embargo, no hubo ninguna mención acerca de la producción de ácido D-láctico o ácido pirúvico.

Además, si se realiza una búsqueda de la doble variante de *dld* y *pfl* con la base de datos del centro de reserva genética de *E. coli* (CGSC) afiliado con la universidad de Yale, que es una de las autoridades para suministro de una cepa de *Escherichia coli*, aparece un artículo de Mat-Jan, *et al.*, (Mat-Jan, F., *et al.*, *J. Bacteriol.*, Vol. 171(1), pp 342-348 (1989)) como el artículo correspondiente. Sin embargo, como resultado de un examen minucioso, no hubo ninguna descripción acerca de rotura de doble cadena de *dld* y *pfl* en este artículo.

Como se ha descrito anteriormente, no ha habido ningún informe de ácido D-láctico que indique la obtención de productividad y selectividad al mismo tiempo correspondiente a nivel industrial por producción de fermentación usando un microorganismo, y tampoco ningún ejemplo previo en el que, por ejemplo, se redujera ácido succínico o ácido fumárico, que es un ácido orgánico producto secundario principal, manteniendo al mismo tiempo alta productividad de ácido D-láctico.

Por lo tanto, se ha estudiado intensivamente para suprimir la producción de ácido succínico sin reducir la productividad de ácido D-láctico, y como resultado se ha descubierto que, por alteración del gen de la malato deshidrogenasa (en lo sucesivo en el presente documento, se puede denominar *mdh*), que es una enzima que cataliza una reacción de ácido oxaloacético a ácido málico en condiciones anaerobias, es posible suprimir completamente la producción de ácido succínico sin reducir la productividad de ácido D-láctico. Sin embargo, ya que aún se produjo ácido fumárico como producto secundario, también se ha descubierto que es posible reducir la cantidad de producto secundario de ácido fumárico por alteración del gen de la aspartato amoniaco-liasa (en lo

sucesivo en el presente documento, se puede denominar aspA).

Se ha desvelado un efecto de inactivación de la actividad de mdh en el artículo de Courtright, *et al.* en 1970 (Courtright, J. B. *et al.*, J. Bacteriol., Vol. 102(3), pp 722-728 (1970)). Los hallazgos desvelados indican que, con *Escherichia coli* en la que está inactivada la actividad de mdh, aunque no hay ninguna reactividad de ácido oxalacético a ácido málico en condiciones anaerobias, la reactividad de ácido aspártico a ácido fumárico, por el contrario, se mejora. Es decir, esto explica que hay dos rutas para producir ácido succínico en condiciones anaerobias, es decir, una ruta que conduce a ácido fumárico y ácido succínico a través de ácido málico de ácido oxalacético, y una ruta que conduce a ácido fumárico y ácido succínico mediante ácido aspártico a partir de ácido oxalacético, y que si la actividad de mdh está inactivada, la primera ruta se detiene, pero la segunda ruta por el contrario se activa. Por lo tanto, el artículo de Courtright, *et al.* no es una divulgación que muestre que el ácido succínico no se produzca por inactivación de la actividad de mdh.

Otra técnica anterior sobre los efectos de inactivación de la actividad de mdh se refiere a levadura en la que el gen de mdh está alterado (JP-A n.º 11-056361). Esta patente se refiere al cambio de la cantidad de ácido málico producido por alteración del gen de mdh de la levadura, pero no tiene ninguna mención sobre cómo dichos resultados afectan a la cantidad de ácido succínico producida.

En resumen, ha sido difícil incluso para un experto en la materia suponer a partir de los hallazgos pasados que la producción de ácido succínico puede suprimirse completamente por inactivación de mdh de un microorganismo.

Además, con respecto al efecto de inactivación de la actividad de aspA, solamente se han desvelado en el pasado hallazgos sobre *Yersinia pestis* (Dreyfus, L. A., *et al.*, J. Bacteriol., Vol. 136(2), pp 757-764 (1978)). Sin embargo, lo esencial del presente artículo es que el ácido aspártico o glutamina se hace menos susceptible a descomposición en la célula por inactivación de actividad de aspA, y no hay ningún análisis acerca de la cantidad de ácido fumárico producida.

Documento de patente 1: JP-A n.º 11-056361

Documento no de patente 1: Chang, D.-E., *et al.*, Appl. Environ. Microbiol., Vol. 65(4), pp 1384-1389 (1999)

Documento no de patente 2: Zhou, S., *et al.*, Appl. Environ. Microbiol., Vol. 69(1), pp 399-407 (2003)

Documento no de patente 3: Contag, P. R., *et al.*, Appl. Environ. Microbiol., Vol. 56(12), pp 3760-3765 (1990)

Documento no de patente 4: Yang, Y. T., *et al.*, Metab. Eng., Vol. 1(2), pp 141-152 (1999)

Documento no de patente 5: Bunch, P.K., *et al.*, Microbiology, Vol. 143(Pt 1), pp 187-195 (1997)

Documento no de patente 6: Kochhar, S., *et al.*, Eur. J. Biochem., Vol. 208(3), pp 799-805 (1992)

Documento no de patente 7: Kochhar, S., *et al.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., Vol. 185(2), pp 705-712 (1992)

Documento no de patente 8: Solem, C., *et al.*, Appl. Environ. Microbiol., Vol. 68(5), pp 2397-2403 (2002)

Documento no de patente 9: Shaw, L., *et al.*, J. Bacteriol., Vol. 121(3), pp 1047-1055 (1975)

Documento no de patente 10: Barnes, E. M., *et al.*, J. Biol. Chem., Vol. 246(17), pp 5518-5522 (1971)

Documento no de patente 11: Mat-Jan, F., *et al.*, J. Bacteriol., Vol. 171(1), pp 342-348 (1989)

Documento no de patente 12: Courtright, J. B. *et al.*, J. Bacteriol., Vol. 102(3), pp 722-728 (1970)

Documento no de patente 13: Dreyfus, L. A., *et al.*, J. Bacteriol., Vol. 136(2), pp 757-764 (1978)

Divulgación de la invención

Un objetivo de la presente invención es proporcionar un método para alta producción de ácido D-láctico, y otro objeto de la invención es proporcionar un método para producir ácido D-láctico con alta selectividad, en el que la pureza óptica es alta y un ácido orgánico producto secundario es pequeño.

Otro objetivo de la invención es proporcionar un método para producir ácido D-láctico con una cantidad reducida de ácido pirúvico acumulada, en el que el ácido pirúvico es una impureza de ácido orgánico y no se ha retirado simplemente de forma convencional del medio en el que se produce ácido láctico y se acumula por un microorganismo.

Otro objetivo de la invención es proporcionar un método para producir ácido láctico, que comprende producir ácido láctico eficazmente usando bacterias con heterofermentación de ácido láctico. Otro objetivo de la invención es proporcionar un método para producir ácido láctico, que comprende producir ácido láctico eficazmente con alta pureza óptica usando bacterias con heterofermentación de ácido láctico.

Otro objetivo de la invención es proporcionar un método para producir ácido D-láctico, en el que la producción de ácido succínico y/o ácido fumárico, que es un producto secundario, se suprime sin reducir la productividad de la sustancia deseada.

Otro objetivo de la invención es proporcionar un método para reforzar el gen de la D-lactato deshidrogenasa estable en lugar de un método para reforzar usando un vector de expresión, y un método para producir ácido D-láctico en alto rendimiento.

Los presentes inventores han estudiado intensivamente para resolver los objetivos anteriormente mencionados y, como resultado, han descubierto que una bacteria, en la que la actividad de piruvato formiato-liasa (pfl) está inactivada o reducida, y la actividad de D-lactato deshidrogenasa (ldhA) dependiente de NADH derivada de *Escherichia coli* está potenciada, produce ácido D-láctico en un tiempo más corto que una convencional, y consigue una alta capacidad de acumulación que no ha sido posible hasta la fecha. Especialmente, con respecto a un método para potenciar la actividad de ldhA, se ha descubierto que es posible introducir una cantidad notable de ácido D-láctico en un tiempo más corto usando un microorganismo que expresa un gen que codifica ldhA en el genoma uniendo con un promotor de un gen que controla la expresión de una proteína implicada en una ruta glucolítica, una ruta de biosíntesis de ácido nucleico o una ruta de biosíntesis de aminoácidos, en comparación con el método para potenciar la expresión génica usando el vector de expresión. En el método que usa el vector de expresión, el nivel de expresión de D-lactato deshidrogenasa en una célula es mayor que en el método de la presente invención, pero esta cantidad alta de la enzima no está directamente relacionada con alta producción de ácido D-láctico por alguna razón. Por el contrario, es muy sorprendente que la productividad de ácido D-láctico en la presente invención mejora con el tiempo drásticamente aunque el nivel de expresión de la enzima en una célula no sea tan alto.

A continuación, los inventores han descubierto que una parte de ácido pirúvico presente en una solución de cultivo de microorganismos se produce de hecho por dld de ácido D-láctico y además han descubierto que, criando y cultivando un microorganismo en el que el gen de dld está sustancialmente inactivado o reducido, el crecimiento del microorganismo no se suprime en comparación con el hospedador, y que se obtiene una solución de cultivo que contiene ácido D-láctico de alta calidad, en el que la concentración de ácido pirúvico contenido en el medio se reduce. Además, han descubierto que, criando y cultivando un microorganismo en el que la actividad de pfl está inactivada o reducida, y/o la actividad de ldhA está potenciada, y además el gen de dld está sustancialmente inactivado o reducido, se obtiene ácido D-láctico de alta calidad con ácido pirúvico reducido en el medio.

Además, los inventores han conseguido la presente invención descubriendo que el microorganismo anteriormente mencionado que tiene un ciclo de TCA, en el que la actividad de malato deshidrogenasa (mdh) está inactivada o reducida, y además la actividad aspartato amoniaco liasa (aspA) está inactivada o reducida, suprime la producción secundaria de ácido succínico y ácido fumárico manteniendo al mismo tiempo la alta productividad de ácido D-láctico.

Específicamente, la presente invención es la siguiente.

[1] Un método para producir ácido láctico, que comprende cultivar una bacteria de heterofermentación de ácido láctico, en el que la actividad de piruvato formiato-liasa (pfl) está inactivada o reducida, en un medio al que se añaden dos o más tipos de aminoácidos, y recuperar ácido láctico del cultivo obtenido.

[2] El método para producir ácido láctico como se describe en [1], en el que la bacteria de heterofermentación de ácido láctico es *Escherichia coli*.

[3] El método para producir ácido láctico como se describe en [2], en el que *Escherichia coli* es de la cepa MT-10934 (FERM BP-10057).

[4] Un método para producir ácido D-láctico, que comprende cultivar una bacteria, en la que la actividad de D-lactato deshidrogenasa (ldhA) dependiente de NADH derivada de *Escherichia coli* está potenciada y la actividad de piruvato formiato-liasa (pfl) está inactivada o reducida, y recuperar ácido D-láctico del cultivo obtenido.

[5] El método para producir ácido D-láctico como se ha descrito en [4], en el que la bacteria es *Escherichia coli*.

[6] El método para producir ácido D-láctico como se ha descrito en [4] o [5], en el que el cultivo se lleva a cabo en un medio al que se añaden dos o más tipos de aminoácidos.

[7] Un microorganismo en el que la actividad de D-lactato deshidrogenasa (dld) dependiente de FAD inherente en el microorganismo está inactivada o reducida, la actividad de piruvato formiato-liasa (pfl) está inactivada o reducida, y/o la actividad de D-lactato deshidrogenasa (ldhA) dependiente de NADH derivada de *Escherichia coli* está potenciada.

[8] El microorganismo como se describe en [7], en el que el microorganismo es una bacteria.

[9] El microorganismo como se describe en [8], en el que la bacteria es *Escherichia coli*.

[10] Un método para producir ácido D-láctico, que comprende cultivar el microorganismo como se ha descrito en uno cualquiera de [7] a [9] en un medio líquido, en el que se produce, se acumula y se aísla ácido D-láctico del medio líquido.

[11] El método para producir ácido D-láctico como se ha descrito en [10], en el que se lleva a cabo cultivo en un medio al que se añaden dos o más tipos de aminoácidos.

[12] Un método para producir ácido D-láctico, que comprende cultivar un microorganismo en el que la actividad de D-lactato deshidrogenasa (dld) dependiente de FAD está inactivada o reducida, en un medio líquido, en el que se produce, acumula y aísla ácido D-láctico del medio líquido.

[13] El método como se ha descrito en [12], en el que el microorganismo es una bacteria.

[14] El método como se ha descrito en [13], en el que la bacteria es *Escherichia coli*.

[15] Un microorganismo, en el que un gen que codifica D-lactato deshidrogenasa dependiente de NADH derivada de *Escherichia coli* (ldhA) expresa la D-lactato deshidrogenasa dependiente de NADH (ldhA) en el genoma del microorganismo usando un promotor de un gen que controla la expresión de una proteína implicada en una ruta glucolítica, una ruta de biosíntesis de ácido nucleico o una ruta de biosíntesis de aminoácidos.

[16] El microorganismo como se ha descrito en [15], en el que el microorganismo es *Escherichia coli*.

[17] El microorganismo como se ha descrito en [15] o [16], en el que la actividad de piruvato formiato-liasa (pfl) inherente en el microorganismo está inactivada o reducida, y/o la actividad de D-lactato deshidrogenasa dependiente de FAD (dld) está inactivada o reducida.

[18] *Escherichia coli*, que expresa D-lactato deshidrogenasa (ldhA) dependiente de NADH derivada de *Escherichia coli* en el genoma de *Escherichia coli* usando un promotor de un gen derivado de *Escherichia coli* que controla la expresión de una proteína implicada en una ruta glucolítica, una ruta de biosíntesis de ácido nucleico o una ruta de biosíntesis de aminoácidos, en lugar de usar un promotor de un gen que codifica la D-lactato deshidrogenasa dependiente de NADH (ldhA).

[19] *Escherichia coli* como se ha descrito en [18], en la que el promotor del gen de *Escherichia coli*, que controla la expresión de la proteína implicada en la ruta de glucólisis, la ruta de biosíntesis de ácido nucleico o la ruta de biosíntesis de aminoácidos es un promotor de un gen de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa derivado de *Escherichia coli*.

[20] *Escherichia coli* como se ha descrito en [18] o [19], en el que la actividad de piruvato formiato-liasa (pfl) inherente en la *Escherichia coli* está inactivada o reducida, y/o la actividad de D-lactato deshidrogenasa dependiente de FAD (dld) está inactivada o reducida.

[21] Un método para producir ácido D-láctico, que comprende cultivar el microorganismo como se ha descrito en una cualquiera de [15] a [20] usando un medio.

[22] Un microorganismo que tiene un ciclo de TCA, en el que la actividad de malato deshidrogenasa (mdh) está inactivada o reducida, la actividad de piruvato formiato-liasa (pfl) está inactivada o reducida, y/o la actividad de D-lactato deshidrogenasa dependiente de FAD (dld) está inactivada o reducida.

[23] El microorganismo como se ha descrito en [22], en el que la actividad de aspartato amoniaco-liasa (aspA) inherente en el microorganismo está inactivada o reducida.

[24] El microorganismo como se ha descrito en [22] o [23], en el que el microorganismo es una bacteria.

[25] El microorganismo como se ha descrito en [24], en el que la bacteria es *Escherichia coli*.

[26] El microorganismo como se ha descrito en [25], en el que la actividad de D-lactato deshidrogenasa dependiente de NADH derivada de *Escherichia coli* (ldhA) está potenciada.

[27] Un método para producir un compuesto distinto de ácido orgánico formado en un ciclo de TCA, que comprende cultivar el microorganismo como se ha descrito en una cualquiera de [22] a [26] usando un medio.

[28] El método como se ha descrito en [27], en el que el compuesto distinto del ácido orgánico es ácido D-láctico.

[29] El método para producir ácido láctico como se ha descrito en una cualquiera de [1] a [6], [10] a [14], [21] y [28], en el que se lleva a cabo un cultivo en condiciones aerobias.

[30] El método para producir ácido láctico como se ha descrito en [29], en el que las condiciones aerobias permiten un aporte de oxígeno que satisface un requisito de un coeficiente de transferencia de oxígeno no menor de $K_L a$ de 1 h^{-1} y no más de 400 h^{-1} a presión normal usando agua a una temperatura de $30 \text{ }^\circ\text{C}$.

[31] El método para producir ácido láctico como se ha descrito en una cualquiera de [1] a [6], [10] a [14], [21] y [28] a [30], en el que el pH del cultivo es de 6 a 8.

De acuerdo con la presente invención, se proporciona un microorganismo que tiene alta productividad de ácido D-láctico y selectividad de ácido D-láctico. Por lo tanto, cultivando el microorganismo preparado por la invención para producir ácido D-láctico, es posible producir ácido D-láctico con alta pureza más económicamente, en comparación con el método convencional.

Además, de acuerdo con la presente invención, se proporciona una bacteria que produce ácido D-láctico, en el que la cantidad de ácido pirúvico producida es pequeña. Por lo tanto, cultivando la cepa preparada por la invención para producir ácido D-láctico, es posible producir ácido D-láctico con alta pureza química y alta pureza óptica más económicamente, en comparación con el método convencional.

Además, produciendo ácido D-láctico mediante el uso de masa microbiana preparada de acuerdo con la presente invención, se hace posible producir solución de fermentación de ácido D-láctico con alta calidad y menos carga de purificación, en el que el contenido de ácido pirúvico, que es una impureza, se reduce en comparación con el método convencional.

Además, de acuerdo con la presente invención, se hace posible suprimir la producción secundaria de ácido succínico y/o ácido fumárico sin provocar reducción en la productividad de un compuesto distinto de ácidos orgánicos producidos en un ciclo de TCA. Especialmente, en el caso en el que el fin sea producir de forma industrial un compuesto distinto de los ácidos orgánicos producidos en el ciclo de TCA, es posible reducir el coste de purificación de la sustancia deseada reduciendo el tipo y la cantidad de productos secundarios.

Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 es una gráfica que muestra el ciclo temporal de una cantidad de ácido D-láctico acumulada en la solución de cultivo en el Ejemplo 20. En la figura, el triángulo muestra los resultados de la cepa MG1655 Δ pflAdld (Ejemplo 15), el cuadrado muestra los resultados de la cepa MG1655 Δ pflAdld/pGAPldhA (Ejemplo 18) y el círculo muestra los resultados de la cepa insertada en el genoma MG1655 Δ pfl Δ dld/GAPldh (Ejemplo 19).

La Fig. 2 es una gráfica que muestra el ciclo temporal de la concentración de ácido láctico acumulado en la solución de cultivo en el Ejemplo 24. En la figura, la cruz muestra los resultados de la cepa Δ pfl Δ dld, el círculo

muestra los resultados de la cepa $\Delta pfl\Delta dld\Delta mdh$, el triángulo muestra los resultados de la cepa $\Delta pfl\Delta dld\Delta ppc$ y el cuadrado muestra los resultados de la cepa $\Delta pfl\Delta dld\Delta frd$.

La Fig. 3 es una gráfica que muestra el ciclo temporal de la concentración de ácido succínico acumulado en la solución de cultivo en el Ejemplo 24. En la figura, la cruz muestra los resultados de la cepa $\Delta pfl\Delta dld$, el círculo muestra los resultados de la cepa $\Delta pfl\Delta dld\Delta mdh$, el triángulo muestra los resultados de la cepa $\Delta pfl\Delta dld\Delta ppc$ y el cuadrado muestra los resultados de la cepa $\Delta pfl\Delta dld\Delta frd$.

La Fig. 4 es una gráfica que muestra el ciclo temporal de la concentración de ácido láctico acumulado en la solución de cultivo en el Ejemplo 25. En la figura, el círculo muestra los resultados de la cepa $\Delta pfl\Delta dld\Delta rndh\Delta asp$, el triángulo muestra los resultados de la cepa con inserción en el genoma $\Delta pfl\Delta dld\Delta rndh\Delta asp/G\Delta PldhA$ y el cuadrado muestra los resultados de la cepa $\Delta pfl\Delta dld\Delta mdh$.

La Fig. 5 es una gráfica que muestra el ciclo temporal de la concentración de ácido fumárico acumulado en la solución de cultivo en el Ejemplo 25. En la figura, el círculo muestra los resultados de la cepa $\Delta pfl\Delta dld\Delta rndh\Delta asp$, el triángulo muestra los resultados de la cepa con inserción en el genoma $\Delta pfl\Delta dld\Delta rndh\Delta asp/G\Delta PldhA$ y el cuadrado muestra los resultados de la cepa $\Delta pfl\Delta dld\Delta mdh$.

Mejor modo para llevar a cabo la invención

En lo sucesivo en este documento, se explicará en detalle la presente invención.

La piruvato formiato-liasa (pfl) en la presente invención es una enzima clasificada en el número de enzima 2.3.1.54 basado en el informe del comité de enzimas de la Unión de bioquímica internacional (I.U.B.), que también se denomina formiato acetil transferasa. La presente enzima se refiere a un nombre genérico de una enzima que cataliza de forma reversible una reacción para producir ácido fórmico a partir de ácido pirúvico.

La inactivación en la presente invención se refiere a un estado en el que la actividad de la enzima anteriormente mencionada medida por el sistema de medición convencional está por debajo del límite de detección.

Reducción en la presente invención se refiere a un estado en el que la actividad de la enzima anteriormente mencionada se reduce significativamente debido a mutación de un gen que codifica la enzima y/o recombinación genética anteriormente mencionada, en comparación con el estado antes de realizar esos tratamientos.

La bacteria de heterofermentación en la presente invención se refiere a una bacteria capaz de producir al menos uno o más tipos de sustancias seleccionados de ácido fórmico, ácido acético, ácido succínico y etanol además de ácido láctico descomponiendo sacáridos en fermentación. Específicamente, como la bacteria de heterofermentación de la presente invención, es adecuada *Escherichia coli*. Como bacteria de heterofermentación en la que la actividad de piruvato formiato-liasa (pfl) está inactivada o reducida, puede ejemplificarse una cepa con gen de pfl alterado de cualquier cepa silvestre de *Escherichia coli* o *Escherichia coli* MT-10934, que puede prepararse en el método mostrado de acuerdo con los ejemplos de la presente invención o similares.

La MT-10934 anteriormente mencionada es una cepa en la que se confirma que la actividad de pfl ya está reducida, de modo que es posible realizar la presente invención fácilmente. La presente cepa se ha depositado el 8 de noviembre de 2002, como el número de depósito FERM BP-10057 en el Depositario de Organismos de Patente Internacional, Tsukuba Central 6, 1-1-1 Higashi, Tsukuba, Ibaraki, del Instituto Nacional de Ciencia y Tecnología Industrial Avanzada, basado en el tratado de Budapest sobre el reconocimiento internacional del depósito de microorganismos para fines de procedimientos de patente.

Además, con respecto a la cepa variante sencilla de pfl, ya que MT-10934 tiene propiedades de HfrC, se mezcla con una cepa silvestre que tiene propiedades F arbitrarias, por ejemplo, MG1655, W3110 o similares en un medio LB durante 2 horas, y después se diluye para adquirir colonias individuales, de las que puede seleccionarse una cepa variante individual de pfl para una cepa variante deseada. Ya que la cantidad de ácido fórmico producida está reducida en el cultivo anaeróbico en comparación con la cepa silvestre, la cepa variante de pfl también puede adquirirse por selección usando esto como un índice.

El cultivo de la presente invención se refiere a cultivar un microorganismo relacionado con la presente invención usando un medio. En este caso, el medio para usar no está particularmente limitado si es un medio que contiene trazas de componentes orgánicos, ácidos nucleicos, vitaminas o similares, que el microorganismo requiere para producir fuente de carbono, fuente de nitrógeno, ion inorgánico y ácido láctico.

El medio al que se añaden dos o más tipos de aminoácidos en la presente invención significa un medio que contiene al menos dos o más tipos entre diversos aminoácidos en la naturaleza, e incluye un medio que contiene un producto natural tal como extractos de levadura, casaminoácido, peptona, suero, melaza residual, agua de macerado de maíz y similares o hidrolizados de extractos de productos naturales. Para obtener resultados más preferibles, el medio comprende preferentemente de 0,5 % a 20 %, y más preferentemente de 2 % a 15 % de al menos un tipo seleccionado de extractos de levadura, peptona, suero, melaza residual y agua de macerado de maíz, o una mezcla de los mismos. Especialmente, la adición de agua de macerado de maíz proporciona un gran efecto, y en este caso,

pueden obtenerse mejores resultados sin añadir una sal tal como sulfato de amonio que de otro modo. El medio es habitualmente medio líquido.

La condición de cultivo varía dependiendo de la masa microbiana preparada y un aparato de cultivo. Por ejemplo, cuando se reduce MT-10934 con actividad de pfl reducida, el cultivo se realiza en las siguientes condiciones en las que la temperatura de cultivo es preferentemente de 20 °C a 40 °C, más preferentemente de 25 °C a 35 °C, y el pH se ajusta hasta preferentemente de 6,0 a 7,2, más preferentemente de 6,5 a 6,9 con NaOH, NH₃ o similares. El tiempo de cultivo no está particularmente limitado, pero es un tiempo necesario para cultivar la masa microbiana suficiente, y producir adicionalmente ácido láctico.

Además, en el caso de usar cepa con gen de pfl alterado de la cepa silvestre de *Escherichia coli* MG1655 en la que la actividad de pfl está inactivada, el pH neutro o de neutro a un poco alcalino proporciona productividad máxima, y el pH de cultivo es preferentemente de 6,9 a 7,4, y más preferentemente de 7,1 a 7,3. Se permite que la temperatura de cultivo sea mayor que la de MT-10934, y por lo tanto el cultivo a 33 °C hasta 42 °C puede proporcionar una productividad máxima.

En el cultivo, se usa en general en cultivo un fermentador, que puede habitualmente controlar la temperatura, el pH, las condiciones aerobias y la velocidad de agitación, pero el cultivo de la presente invención no está limitado al uso del fermentador. En el caso de cultivo usando el fermentador, si es necesario, se lleva a cabo cultivo de siembra previamente como precultivo, y este puede inocularse en una cantidad necesaria en un medio en un fermentador preparado previamente.

MT-10934 puede producir ácido fórmico en una región de pH 7 a 7,5, mientras que para la cepa con gen de pfl alterado de MG1655, no se encuentra producción de ácido fórmico en el método de cultivo de la presente invención. Por lo tanto, en el caso del uso de *Escherichia coli* como bacteria de heterofermentación, puede obtenerse una productividad máxima en las siguientes condiciones:

cuando se observa producción de ácido fórmico como en MT-10934 en caso de producción de ácido láctico con la masa microbiana adoptada usando un medio de pH aproximadamente neutro, el pH del medio está controlado de neutro a algo ácido en la producción de ácido láctico real y, cuando no se observa producción de ácido fórmico como en la cepa con el gen de pfl alterado de MG1655, el pH del medio está controlado hasta el lado neutro o algo alcalino en la producción real de ácido láctico.

El cultivo en la presente invención se refiere a masa microbiana, una solución de cultivo y un producto de tratamiento de la misma, que se produce por el método descrito anteriormente.

Un método para recuperar ácido láctico del cultivo tal como la solución de cultivo obtenida anteriormente, por ejemplo, incluye un método conocido convencionalmente si es de la solución de cultivo, por ejemplo, un método de destilación directa después de acidificación, un método de formación y destilación de lactida, un método de destilación después de la adición de alcohol y catalizador para esterificación, un método de extracción en un disolvente orgánico, un método de aislamiento con una columna de intercambio iónico, un método de concentración y aislamiento por electrodiálisis o similares o una combinación de los mismos. Además, ya que la masa microbiana producida por el método de la presente invención produce un grupo enzimático que es adecuado para producción de ácido láctico, la producción de ácido láctico además mediante el uso del grupo enzimático y recuperación del ácido láctico producido también se considera una parte del método de recuperación de ácido láctico del cultivo.

La D-lactato deshidrogenasa dependiente de NADH (LdhA) derivada de *Escherichia coli* en la presente invención es una enzima derivada de *Escherichia coli* que produce ácido D-láctico y NAD a partir de ácido pirúvico y NADH, y se ejemplifica específicamente por una enzima producida a partir de un gen adquirido por Bunch, *et al.* (Microbiology 143 (Pt 1), 187-195 (1997)), o un gen que tiene la secuencia contenida en los fragmentos de ADN amplificados por PCR a partir de la Secuencia n.º 3 y Secuencia n.º 4 con el ADN genómico de *Escherichia coli* como molde.

La potenciación de la actividad de LdhA en la presente invención se refiere a un estado en el que la actividad de la enzima producida a partir del gen que codifica LdhA aumenta más significativamente por mutación del gen que codifica LdhA y/o recombinación genética, que el estado antes de realizar esos tratamientos.

La bacteria en la presente invención es en general un microorganismo de una célula procariota.

Como ejemplo de la bacteria en la presente invención en la que la actividad de LdhA está potenciada y además la actividad de pfl está inactivada o reducida, puede ejemplificarse MT-10934/pGlyLdhA, que se describe en Ejemplos de la invención. La presente cepa puede usarse convenientemente en el método para producir ácido láctico como se ha descrito en el [1] anteriormente mencionado, que comprende cultivar una bacteria de heterofermentación de ácido láctico, en la que la actividad de piruvato formiato-liasa (pfl) está inactivada o reducida, en un medio al que se añaden dos o más tipos de aminoácidos, y recuperar ácido láctico del cultivo obtenido. Como una de las medidas para potenciar la actividad de LdhA en la presente invención, es eficaz un método en el que un gen que codifica LdhA está integrado en un plásmido de expresión unido a un promotor de un gen que controla la expresión de una proteína implicada en una ruta glucolítica, una ruta de biosíntesis de ácido nucleico o una ruta de biosíntesis de

aminoácidos, y se introduce en una bacteria deseada. En este caso, el promotor del gen que controla la expresión de la proteína implicada en la ruta glucolítica, la ruta de biosíntesis de ácido nucleico o la ruta de biosíntesis de aminoácidos se refiere a un fuerte promotor que actúa constantemente en una bacteria, preferentemente en *Escherichia coli*, y es menos susceptible a supresión de la expresión incluso en presencia de glucosa. Los ejemplos específicos del mismo incluyen un promotor de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa o un promotor de serina hidroximetiltransferasa (glyA). Las bacterias obtenidas de esta manera hacen posible mejorar la cantidad de ácido D-láctico acumulado, reducir la concentración de ácido pirúvico que es una impureza, y mejorar la pureza óptica de ácido D-láctico en la producción de ácido D-láctico en condiciones aerobias, en comparación con en las que no se potencia la expresión de ldhA.

La D-lactato deshidrogenasa dependiente de FAD (dld) en la presente invención se refiere a un nombre genérico de una enzima que cataliza una reacción para producir ácido pirúvico a partir de ácido D-láctico en presencia de dinucleótido de flavina adenina oxidado, que es una coenzima.

El microorganismo en la presente invención no está particularmente limitado si el microorganismo es capaz de producir ácido D-láctico, y también incluye un microorganismo que se hace capaz de producir ácido D-láctico por cualquier modificación aunque el microorganismo es inicialmente incapaz de producir ácido D-láctico.

El microorganismo en el que la actividad de dld está inactivada o reducida de acuerdo con la presente invención y/o la actividad de pfl está inactivada o reducida, y/o la actividad de ldhA está potenciada, puede ejemplificarse por una cepa de *Escherichia coli* MT- 10994 (FERM BP-10058).

El promotor del gen que controla la expresión de la proteína implicada en la ruta glucolítica, la ruta de biosíntesis de ácido nucleico o la ruta de biosíntesis de aminoácidos en la presente invención, es un promotor fuerte que actúa constantemente en un microorganismo, y es menos susceptible de supresión de la expresión incluso presencia de glucosa. Los ejemplos específicos incluyen un promotor de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (en lo sucesivo en el presente documento, puede denominarse GAPDH) o un promotor de serina hidroximetiltransferasa.

El promotor en la presente invención se refiere a un sitio al que se une una ARN polimerasa que tiene un factor sigma, e inicia la transcripción. Por ejemplo, un promotor de GAPDH derivado de *Escherichia coli* se describe en los números de base 397 a 440 en la información de secuencia de bases de número de referencia de GenBank X02662.

El microorganismo de acuerdo con la presente invención en el que el gen codifica ldhA expresa la ldhA en el genoma usando el promotor del gen que controla la expresión de la proteína implicada en la ruta glucolítica, la ruta de biosíntesis de ácido nucleico o la ruta de biosíntesis de aminoácidos, y en el que la actividad de pfl está inactivada o reducida, y/o la actividad de dld está inactivada o reducida, puede ejemplificarse por una cepa de *Escherichia coli* MT-10994 (FERM BP-10058).

Ya que la cepa de *Escherichia coli* MT-10994 se expresa uniendo funcionalmente el gen de ldhA con el promotor de GAPDH en el genoma, y pflB y dld se inactivan por alteración génica, la presente invención puede llevarse a cabo fácilmente usando esta cepa. La presente cepa se ha depositado el 1 de marzo de 2004 como el número de depósito FERM BP- 10058 en el Depositario de Organismos de Patente Internacional, Tsukuba Central 6, 1-1-1 Higashi, Tsukuba, Ibaraki, del Instituto Nacional de Ciencia y Tecnología Industrial Avanzada basado en el Tratado de Budapest sobre el reconocimiento internacional del Depósito de Microorganismos para los fines de Procedimiento de Patentes.

El ciclo de TCA en la presente invención significa una ruta metabólica para experimentar con el tiempo oxidación completa de esqueletos de carbono tales como glucosa, ácido graso y muchos aminoácidos, que también se denomina un ciclo de ácido cítrico, un ciclo de ácido tricarbóxico o un ciclo de Krebs.

La malato deshidrogenasa (mdh) en la presente invención se clasifica en el número de enzima 1.1.1.37, basándose en el informe del comité de enzimas de la Unión de Bioquímica Internacional (I.U.B.), y se refiere a un nombre genérico de una enzima, que cataliza de forma reversible una reacción para producir ácido oxalacético a partir de ácido málico en presencia de dinucleótido de nicotinamida adenina oxidada que es una coenzima.

El microorganismo en el que la actividad de mdh está inactivada o reducida en la presente invención, en el que la actividad de pfl está inactivada o reducida, y/o la actividad de dld está inactivada o reducida, puede ejemplificarse por la cepa de *Escherichia coli* MT-10994. La presente cepa puede usarse convenientemente en el método para producir ácido láctico como se ha descrito en el [1] mencionado anteriormente, que comprende cultivar una bacteria de heterofermentación de ácido láctico, en la que la actividad de piruvato formiato-liasa (pfl) está inactivada o reducida, en un medio al que se añaden dos o más tipos de aminoácidos y recuperar ácido láctico del cultivo obtenido.

La aspartato amoniaco liasa (aspA) de la presente invención se clasifica en el número de enzima 4.3.1.1 basándose en el informe del comité de enzimas de la Unión de Bioquímica Internacional (I.U.B.), que también se denomina

aspartasa. La presente enzima se refiere a un nombre genérico de una enzima que cataliza de forma reversible una reacción para producir ácido fumárico a partir de ácido L-aspartico.

5 Cuando se produce ácido láctico cultivando el microorganismo obtenido en la presente invención, puede llevarse a cabo aireación para obtener resultados más preferibles aunque puede que la aireación no sea necesaria en absoluto. Las condiciones de aireación del presente documento no siempre requieren que el aire pase a través de la solución de cultivo, sino que también incluyen aireación de superficie dependiendo de la forma del fermentador, en el que una capa de aire encima de la solución de cultivo se ventila mientras que la solución de cultivo se agita moderadamente, y se refieren a hacer fluir un gas que contiene oxígeno al fermentador. En el caso de aireación en la solución, ya que la concentración de oxígeno disuelto cambia de acuerdo con combinaciones de presión interna, localización de las aspas de agitación, forma de las aspas de agitación y velocidad de agitación, pueden encontrarse condiciones óptimas de la siguiente manera usando productividad de ácido láctico, cantidad de ácidos orgánicos distintos de ácido láctico o similares como un índice. Por ejemplo, en el caso de cultivo de cepa de *Escherichia coli* MT-10934 con un fermentador relativamente pequeño tal como BMJ-01, un aparato de cultivo fabricado por ABLE Corporation, pueden obtenerse resultados preferibles en condiciones de aireación que pueden conseguirse con la velocidad de aireación de 0,01 vvm a 1 vvm y la velocidad de agitación de 50 rpm a 500 rpm a presión normal, mas preferentemente, la velocidad de aireación de 0,1 vvm a 0,5 vvm y la velocidad de agitación de 100 rpm a 400 rpm a presión normal cuando se usan 500 g de la solución de cultivo. Esta condición aeróbica es una condición que permite un aporte de oxígeno que satisfaga un requisito de un coeficiente de transferencia de oxígeno K_{La} de no menos de 1 h^{-1} y no más de 400 h^{-1} a presión normal usando agua a una temperatura de $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

Además, otro índice de condición de aireación óptima es una condición de aireación obtenida por la velocidad de aireación y la velocidad de agitación en las que ácido fórmico, ácido acético, ácido succínico y etanol, que se producen por la cepa MT-10934 en cultivo anaeróbico, no es más de 5,0 g/l, y más preferentemente no más de 1,0 g/l, y se produce además ácido láctico.

Además, otro índice de condición de aireación optima es una condición conseguida por la velocidad de aireación y la velocidad de agitación en las que la concentración de ácido L-láctico se reduce hasta no más de 0,02 % en 10 a 100 horas cuando la cepa MT-10934 se cultiva en un medio que contiene ácido L-láctico 0,3 %, que es un isómero óptico.

No es necesario que la condición de aireación como se ha descrito anteriormente se lleve a cabo desde el inicio hasta el final del cultivo, y llevar a cabo una parte del proceso de cultivo también puede proporcionar resultados preferibles.

Además, realizando aireación como se ha descrito anteriormente, puede mejorarse la productividad de ácido láctico y puede conseguirse reducción del isómero óptico.

En lo sucesivo en el presente documento, un ejemplo de la presente invención se muestra por Ejemplos, que no limitan la presente invención de ninguna manera.

[Ejemplo 1] Producción de ácido láctico por cepa MT-10934

La composición de medio usado en cultivo se describe en la Tabla 1 a continuación.

Tabla 1

Composición de medio	
Glucosa	10 %
Agua de macerado de maíz (fabricado por NIHON SHOKUHIN KAKO CO. LTD.)	5 %
Sulfato de amonio	0,5 %
Hidrogeno fosfato disódico 12-hidrato	0,3 %
Dihidrógeno fosfato potásico	0,15 %
Cloruro sódico	0,15 %
Sulfato de magnesio 7-hidrato	0,1 %
Adecanol LG126	0,1 %

El presente medio contiene 0,34 % de azúcar reductor estimado como producto hidrolizado, 0,31 % de ácido D-láctico, 0,31 % de ácido L-láctico, 0,33 % de aminoácidos libres y cantidades traza de diversos ácidos orgánicos, todos los cuales derivan de agua de macerado de maíz.

Se inoculó cepa de *Escherichia coli* MT-10934 en 25 ml de un caldo de cultivo LB, solución de cultivo de Miller (Difco244620) contenida en un matraz cónico, y se llevó a cabo cultivo con agitación durante una noche a 120 rpm como precultivo. Después, la cantidad completa se inoculó en 475 g del medio de la composición anteriormente

mencionada contenida en un fermentador de 1 l (BMJ-01, aparato de cultivo fabricado por ABLE Corporation). Se llevó a cabo cultivo en condiciones que incluían presión atmosférica, una velocidad de aireación de 0,5 vvm, una velocidad de agitación de 150 rpm, una temperatura de cultivo de 31 °C y pH de 6,7 (ajustado con NaOH), hasta que la glucosa se consumió completamente.

Después de completar el cultivo, el ensayo de los ácidos orgánicos y la medición de la pureza óptica de ácido D-láctico en la solución de cultivo obtenida se realizaron con HPLC de acuerdo con un método establecido. Los resultados se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2
MG1655 (silvestre) MT-10934

	MG1655 (silvestre)	MT-10934
Cantidad de ácido D-láctico acumulada	54,9 g/kg de solución de cultivo	90,5 g/kg de cultivo
Cantidad recuperada de solución de cultivo	540 g	570 g
Peso de masa microbiana seca	3,5 g/l	2,2 g/l
Pureza óptica de ácido D-láctico	99,9 %ee o más	99,9 %ee o más
Ácido succínico	6,2 g/l	N.D <0,2 g/l
Ácido fórmico	1,8 g/l	N.D <0,1 g/l
Ácido acético	2,4 g/l	N.D <0,1 g/l
Etanol	0,8 g/l	N.D <0,1 g/l
Cantidad de ácido D-láctico acumulada después de 50 h de inicio de cultivo	46,5 g/kg	58,2 g/kg
N.D: No detectado		

En los resultados, se considera que la razón por la que la cantidad total de ácido láctico es mayor que la cantidad de glucosa añadida al inicio del cultivo es que la fuente de carbono en el agua de macerado de maíz se ha usado. Sin embargo, usando todo el azúcar reductor, los ácidos orgánicos y aminoácidos en agua de macerado de maíz, se alcanzó la tasa de conversión del 90 % o más. Además, aunque se usó una solución de cultivo que contenía ácidos orgánicos o isómeros ópticos de ácido láctico presentes como impurezas en el medio, los ácidos orgánicos como impurezas se redujeron y se produjo ácido láctico con alta pureza óptica.

Además, se obtuvo MG1655 como ATCC47076 de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC).

[Ejemplo 2] Construcción del vector de expresión de *ldhA* y bacterias productoras de ácido láctico

Para adquirir un promotor de la serina hidroximetiltransferasa (*glyA*), se llevó a cabo amplificación con un método de PCR usando ADN genómico de *Escherichia coli* como un molde y la Secuencia N.º 1 y la Secuencia N.º 2 como sondas, y la digestión del fragmento obtenido con una enzima de restricción *EcoRI* produjo un fragmento que codificaba un promotor de *glyA* de aproximadamente 850 pb. Además, para adquirir un gen estructural de *ldhA*, se llevó a cabo amplificación con un método de PCR usando ADN del genoma de *Escherichia coli* como molde y la Secuencia N.º 3 y la Secuencia N.º 4 como sondas, y la digestión del fragmento obtenido con enzimas de restricción *EcoRI* y *HindIII* proporcionó un fragmento de gen estructural de *ldhA* de aproximadamente 1,0 kpb. Los dos fragmentos anteriormente mencionados se mezclaron con el fragmento obtenido por digestión del plásmido pUC18 usando enzimas de restricción *EcoRI* y *HindIII*, se ligaron usando una ADN ligasa y después se transformaron en una *Escherichia coli* para proporcionar el plásmido pGlydhA.

El plásmido obtenido pGlydhA se transformó en una cepa de *Escherichia coli* MT-10934 para proporcionar una cepa MT-10934/pGlydhA, que es una bacteria productora de ácido láctico.

Además, se obtuvo pUC18 mediante extracción de acuerdo con un método establecido de ATCC37253, que está disponible de la Colección Americana de Cultivos Tipo. Además, la cepa MT-10934 se ha depositado el 8 de noviembre de 2002 con el número de depósito anteriormente mencionado en el Depositario de Organismos de Patente Internacional, Tsukuba Central 6, 1-1-1 Higashi, Tsukuba, Ibaraki, del Instituto Nacional de Ciencia y Tecnología Industrial Avanzada

[Ejemplo 3] Producción de ácido láctico por bacterias productoras de ácido láctico de cepa MT-10934/pGlydhA

La cepa MT-10934/pGlydhA, que es la bacteria productora de ácido láctico obtenida en el Ejemplo 2, se inoculó en 25 ml de caldo de cultivo LB, solución de cultivo de Miller (Difco244620) contenida en un matraz cónico, y se llevó a cabo cultivo como precultivo de la misma manera que se ha descrito en el Ejemplo 1. Después de completar el cultivo, se realizaron ensayo de los ácidos lácticos y medición de la pureza óptica de los mismos con HPLC de acuerdo con un método establecido. Los resultados se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3

Cantidad de ácido D-láctico acumulada	94 g/kg de solución de cultivo
Cantidad recuperada de solución de cultivo	570 g
Peso de masa microbiana seca	2,0 g
Pureza óptica del ácido D-láctico	99,9 %ee o más
Cantidad de ácido D-láctico acumulada después de 50 h del inicio del cultivo	65,2 g/kg

En los resultados, se considera que la razón por la que la cantidad total de ácido láctico es mayor que la cantidad de glucosa añadida al inicio del cultivo es que la fuente de carbono en el agua de macerado de maíz se ha usado. Sin embargo, usando todo el azúcar reductor, ácidos orgánicos y aminoácidos en agua de macerado de maíz, se consiguió la tasa de conversión del 90 % o más.

[Ejemplo 4] Clonación de una región adyacente al gen de pfl de *Escherichia coli*

La secuencia de bases completa del ADN genómico de *Escherichia coli* se conoce (número de referencia de GenBank: U00096), y la secuencia de bases de un gen que codifica piruvato formiato-liasa de *Escherichia coli* (en lo sucesivo en el presente documento, puede denominarse pfl) también se ha indicado (número de referencia de GenBank: AE000192). Para clonar la región adyacente a la secuencia de bases de un gen que codifica pfl (2.283 pb), se sintetizaron cuatro tipos de cebadores oligonucleotídicos mostrados en las Secuencias N.º 5, 6, 7 y 8. Los cebadores de las Secuencias N.º 6 y 7 tienen sitio de reconocimiento SphI en el extremo 5' terminal.

El ADN del genoma de la cepa de *Escherichia coli* MG1655 se preparó por el método descrito en Current Protocols in Molecular Biology (JohnWiley & Sons). Usando combinaciones de 1 µg del ADN del genoma obtenido con el cebador que tiene la secuencia de bases de Secuencia N.º 5 y el cebador que tiene la secuencia de bases de Secuencia N.º 6, y con el cebador que tiene la secuencia de bases de Secuencia N.º 7 y el cebador que tiene la secuencia de bases de Secuencia N.º 8, se realizó PCR en condiciones habituales usando 100 pmol de cada uno de los ADN de cebadores anteriormente mencionados para amplificar fragmentos de ADN de aproximadamente 1,8 kpb (en lo sucesivo en el presente documento, puede denominarse un fragmento pflB-L) y aproximadamente 1,3 kpb (en lo sucesivo en el presente documento, puede denominarse un fragmento pflB-R). Estos fragmentos de ADN se aislaron por electroforesis en agarosa, se recuperaron y el fragmento de pflB-L se digirió con HindIII y SphI, y el fragmento de pflB-R se digirió con SphI y PstI, respectivamente. Estos dos tipos de fragmentos digeridos y un producto de digestión de plásmido sensible a temperatura pTH18cs1 (N.º de referencia de GenBank: AB019610) (Hashimoto-Gotoh, T., *et al.*, Gene, Vol. 241 (1), pp185-191 (2000)) con HindIII y PstI se hicieron reaccionar con ADN ligasa T4, y después el producto se transformó en una célula competente de *Escherichia coli* DH5α (TAKARA BIO INC.), para proporcionar un plásmido que contiene dos fragmentos, es decir, un fragmento adyacente cadena arriba 5' y un fragmento adyacente cadena abajo 3' de un gen que codifica pflB, que se designó pTHΔpfl.

[Ejemplo 5] Preparación de cepa con gen de pfl alterado de la cepa de *Escherichia coli* MG1655

El plásmido pTHΔpfl obtenido en el Ejemplo 4 se transformó en la cepa de *Escherichia coli* MG1655, se cultivó durante la noche en placa de agar LB que contenía 10 µg/ml de cloranfenicol a 30 °C, a la que la célula puede mantener un plásmido sensible a temperatura, para proporcionar un transformante. El transformante obtenido se cultivó en un medio LB a 30 °C durante 3 horas hasta una noche, y después se diluyó convenientemente con un medio líquido LB o solución salina, y se aplicó a una placa de agar LB que contenía 10 µg/ml de cloranfenicol. Esta placa de agar LB se cultivó a 42 °C, a la que el plásmido sensible a la temperatura no puede mantenerse, y el transformante cultivado se obtuvo como una cepa en la que la longitud completa del plásmido está integrada en el genoma de *Escherichia coli* por recombinación homóloga entre exogenoma y genoma.

A partir de esta cepa, se adquirió un ADN genómico, y se realizó PCR usando este como molde. Se confirmó que ya que el gen resistente al cloranfenicol contenido en pTH18cs1 está presente en el genoma y que están presentes

regiones homólogas de cada región adyacente 5' y región adyacente 3' de un gen que codifica pflB en el genoma, la longitud completa del plásmido fue una cepa integrada en el genoma de *Escherichia coli*.

5 La cepa en la que la longitud completa del plásmido se integró en el genoma de *Escherichia coli* se inoculó en un matraz con tabiques deflectores de 100 ml que contenía 20 ml de un medio líquido LB que no contenía cloranfenicol, y este se cultivó con agitación a 30 °C durante 4 horas. Esta solución de cultivo se diluyó convenientemente en un medio líquido LB que no contenía cloranfenicol, y se aplicó a un medio de agar LB que no contenía cloranfenicol. Después de cultivar a 42 °C, se seleccionaron aleatoriamente 96 colonias del cultivo crecido, y se dejó crecer en un medio de agar LB que no contenía cloranfenicol, y un medio de agar LB que contenía cloranfenicol, respectivamente, y después se seleccionaron cepas sensibles al cloranfenicol.

Además, se adquirió un ADN genómico de las cepas seleccionadas y se realizó PCR usando este como un molde para seleccionar una cepa en la que un gen que codifica pfl es deficiente, que se designó cepa MG1655ΔpflB.

15 [Ejemplo 6] Producción de ácido láctico por cepa MG1655Δpfl usando casaminoácido

Se preparó una pluralidad de matraces cónicos, que contenían cada uno 25 g de caldo de cultivo LB, solución de cultivo de Miller (Difco244620), como un precultivo. En ellos, se inocularon por separado tres tipos de cepas, es decir, bacterias productoras de ácido láctico, MG1655, cepa MG1655Δpfl y MG1655Δpfl/pGlydhA en las que el plásmido pGlydhA como se ha descrito en el Ejemplo 2 se recombinó con la cepa MG1655Δpfl de acuerdo con un método establecido. Se llevó a cabo cultivo con agitación durante una noche a 30 °C con 120 rpm, y después la cantidad completa se inoculó por separado en un fermentador de 1 l (BMJ-01, aparato de cultivo fabricado por ABLE) que contenía 475 g del medio mostrado en la Tabla 4. El cultivo se llevó a cabo en condiciones que incluían presión atmosférica, una velocidad de aireación de 0,5 vvm, una velocidad de agitación de 200 rpm, una temperatura de cultivo de 31 °C y pH de 6,7 (ajustado con NaOH) durante 50 horas. Después de completar el cultivo, se realizó el ensayo de ácido láctico y medición de pureza óptica del mismo en la solución de cultivo obtenida con HPLC de acuerdo con un método establecido. Los resultados se muestran en la Tabla 5.

30 Tabla 4
Composición de medio

Glucosa	100 g/l
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	6,0 g/l
(NH ₄) ₂ SO ₄	6,0 g/l
KH ₂ PO ₄	3,0 g/l
NaCl	3,0 g/l
MgSO ₄ ·7aq	0,1 g/l
Extracto de levadura	0,5 g/l
Casaminoácido	5,0 g/l

Tabla 5
MG1655 MG1655ΔpflMG1655Δpfl/pGlydhA

Cantidad de ácido D-láctico acumulado	28 g/l	58 g/l	63,7 g/l
---------------------------------------	--------	--------	----------

35 [Ejemplo 7] Producción de ácido láctico por MG1655Δpfl usando agua de macerado de maíz

MG1655, MG1655Δpfl y MG1655Δpfl/pGlydhA se inocularon por separado en 25 g de la solución de cultivo contenida en un matraz cónico, y se llevó a cabo cultivo con agitación durante una noche a 30 °C con 120 rpm como precultivo. Después, la cantidad completa se inoculó por separado cada uno en un fermentador de 1 l (BMJ-01, aparato de cultivo fabricado por ABLE Corporation) que contenía 475 g del medio mostrado en la Tabla 6. Se llevó a cabo cultivo en condiciones que incluían presión atmosférica, una velocidad de aireación de 0,5 vvm, una velocidad de agitación de 300 rpm, una temperatura de cultivo de 35 °C, y un pH de 7,2 (ajustado con NaOH) durante 24 horas. Después de completar el cultivo, se realizaron mediciones de ácido láctico y el ácido pirúvico en la solución de cultivo obtenida con HPLC de acuerdo con un método establecido. Los resultados se muestran en la Tabla 7.

45 Tabla 6

Composición de medio	
Glucosa	10 %
Agua de macerado de maíz (fabricado por NIHON SHOKUHIN KAKO CO. LTD.)	5 %
Adecanol LG126	0,1 %

Tabla 7

	MG1655	MG1655Δ pfl	MG1655Δpfl/pGly IdhA
Cantidad de ácido D-láctico acumulada	52 g/l	95 g/kg de solución de cultivo	95 g/kg de solución de cultivo
Cantidad recuperada de solución de cultivo	520 g	560 g	560 g
Peso de masa microbiana seca	2,5 g/l	2,5 g/l	2,5 g/l
Ácido pirúvico	1,1 g/l	1,1 g/l	0,3 g/l
Tiempo de cultivo	24 horas	24 horas	24 horas

5 En los resultados, se considera que la razón por la que la cantidad total de ácido láctico es mayor que la cantidad de glucosa añadida al inicio del cultivo es que la fuente de carbono en agua de macerado de maíz se ha usado. Sin embargo, usando todo el azúcar reductor, ácidos orgánicos y aminoácidos en el agua de macerado de maíz, se consiguió una tasa de conversión del 90 % o más.

[Ejemplo 8] Alta acumulación y producción de ácido láctico por cepa MG1655Δpfl con alta concentración de glucosa

10 Se inoculó MG1655Δpfl en 25 g de la solución de cultivo contenida en un matraz cónico, y se llevó a cabo cultivo con agitación durante una noche con 120 rpm como precultivo. Después, la cantidad completa se inoculó en un fermentador de BMJ-01, un aparato de cultivo fabricado por ABLE Corporation, que contenía 475 g del medio, que tenía la concentración de glucosa de 10 % a 15 % como se muestra en la Tabla 8. Se llevó a cabo cultivo en condiciones que incluían presión atmosférica, una velocidad de aireación de 0,5 vvm, una velocidad de agitación de 15 300 rpm, una temperatura de cultivo de 35 °C, y un pH de 7,2 (ajustado con NaOH) hasta que se agotó la glucosa completa. Después de completar el cultivo, se realizó medición de ácido láctico con HPLC de acuerdo con un método establecido. Los resultados se muestran en la Tabla 9.

Tabla 8

Composición de medio	
Glucosa	10 %, 12 %, 15 %
Agua de macerado de maíz (fabricado por NIHON SHOKUHIN KAKO CO, LTD.)	5 %
Adecanol LG126	0,1 %

Tabla 9

Concentración de glucosa	10 %	12 %	15 %
Cantidad de ácido D-láctico acumulada	95 g/kg de solución de cultivo	112 g/kg de cultivo	130 g/kg de solución de cultivo
Cantidad recuperada de solución del cultivo	560 g	567 g	580 g
Peso de masa microbiana seca	2,5 g/l	2,5 g/l	2,5 g/l

25 Se considera que la razón por la que la cantidad total de ácido láctico es mayor que la cantidad de glucosa añadida al inicio del cultivo es que la fuente de carbono de agua de macerado de maíz se ha usado. Sin embargo, usando todo el azúcar reductor, ácidos orgánicos y aminoácidos en el agua de macerado de maíz, se alcanzó la tasa de conversión del 90 % o más. Además, se consiguió alta cantidad de acumulación de 130 g/l, lo que no había sido posible hasta la fecha.

30 [Ejemplo 9] Investigación de la cantidad añadida del agua de macerado de maíz usando cepa MG1655Δpfl.

35 Se inoculó MG1655Δpfl en 25 g de la solución de cultivo contenida en un matraz cónico, y se llevó a cabo el cultivo con agitación durante una noche con 120 rpm como precultivo. Después, la cantidad total se inoculó en un fermentador de BMJ-01, un aparato de cultivo fabricado por ABLE Corporation, que contenía 475 g del medio, variando la concentración de agua de macerado de maíz de 1 a 10 % como se muestra en la Tabla 10. Se llevó a cabo cultivo en condiciones que incluían presión atmosférica, una velocidad de aireación de 0,5 vvm, una velocidad de agitación de 300 rpm, una temperatura de cultivo de 35 °C, y pH de 7,2 (ajustado con NaOH) durante 24 horas. Después de completar el cultivo, se realizó medición de ácido láctico con HPLC de acuerdo con un método establecido. Los resultados se muestran en la Tabla 11.

40

Tabla 10

Composición de medio	
Glucosa	10 %
CSL (fabricado por NIHON SHOKUJIN KAKO CO, LTD.)	1 %, 2,5 %, 5 %, 10 %
Adecanol LG126	0,1 %

Tabla 11

	1 %	2,5 %	5 %	10 %
Cantidad de ácido D-láctico acumulada	55 g/l	90 g/l	94 g/l	96 g/l

5 En el grupo en el que se añadió agua de macerado de maíz 1 %, aunque se observó reducción en la tasa de producción, la tasa de producción a las 24 horas alcanzó la cantidad de 55 g/l, lo que no había sido posible hasta la fecha. Además, la tasa de conversión de glucosa usada a ácido láctico se mantuvo a 90 % o más.

10 [Ejemplo 10] Efecto de las condiciones de aireación en la tasa de glucólisis usando cepa MG1655Δpfl

15 La cepa MG1655Δpfl se inoculó en 25 g de la solución de cultivo contenida en un matraz cónico, y se llevó a cabo cultivo con agitación durante la noche con 120 rpm como precultivo. Después, la cantidad completa se inoculó en un fermentador de BMJ-01, un aparato de cultivo fabricado por ABLE Corporation, que contenía 475 g del medio como se muestra en la Tabla 12. Se llevó a cabo cultivo en condiciones que incluían presión atmosférica y con las condiciones de aireación mostradas en la Tabla 13 con una temperatura de cultivo de 35 °C y pH de 7,2 (ajustado con NaOH) durante 24 horas. La cantidad de glucosa residual se midió por el ensayo de glucosa CII Wako (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.).

20 Tabla 12

Composición de medio	
Glucosa	12 %
CSL (fabricado por NIHON SHOKUJIN KAKO CO, LTD.)	5 %
Adecanol LG126	0,1 %

Tabla 13

Grupo experimental	1	2	3	4
Velocidad de aireación (vvm)	0	0,5	0,5	0,5
Velocidad de agitación (rpm)	200	200	400	600

25 Tabla 14

Grupo experimental	1	2	3	4
Cantidad de glucosa residual (g/l)	59,4	39,4	21,7	67,9

Se descubrió por este experimento que la tasa de glucólisis se mejoró de acuerdo con la mejora de las condiciones de aireación, pero la tasa de glucólisis se redujo si las condiciones de aireación mejoraron en exceso.

30 [Ejemplo 11] Investigación de la cantidad añadida de agua de macerado de maíz usando cepa MG1655Δpfl/pGlyldhA

35 Se inoculó MG1655ΔpflB/pGlyldhA en 25 g de la solución de cultivo contenida en un matraz cónico, y se llevó a cabo cultivo con agitación durante una noche con 120 rpm como precultivo. Después, la cantidad completa se inoculó en un fermentador de BMJ-01, un aparato de cultivo fabricado por ABLE Corporation, que contenía 475 g del medio, variando la concentración del agua de macerado de maíz del 1 al 10 % como se muestra en la Tabla 15. Se llevó a cabo cultivo en condiciones que incluían presión atmosférica, una velocidad de aireación de 0,5 vvm, una velocidad de agitación de 300 rpm, una temperatura de cultivo de 35 °C y pH de 7,2 (ajustado con NaOH) durante 24 horas. Después de completar el cultivo, se realizó medición del ácido D-láctico con HPLC de acuerdo con un método establecido. Los resultados se muestran en la Tabla 16.

40

Tabla 15

Composición de medio	
Glucosa	10 %
CSL (fabricado por NIHON SHOKUHIN KAKO CO, LTD.)	1 %, 2,5 %, 5 %, 10 %
Adecanol LG126	0,1 %

Tabla 16

CSL	1 %	2,5 %	5 %	10 %
Cantidad de ácido D-láctico acumulada	58 g/l	92 g/l	96 g/l	97 g/l

5 El grupo en el que se añadió agua de macerado de maíz al 1 % tiene la menor productividad entre los grupos ensayados, pero una tasa de producción a las 24 horas con la cantidad de 58 g/l es una tasa de producción que no fue posible de forma convencional. Además, la tasa de conversión de la glucosa usada al ácido D-láctico se mantuvo a 90 % o más.

10 [Ejemplo 12] Efecto de las condiciones de aireación en la tasa de glucólisis usando cepa MG1655Δpfl/pGlydhA

15 Se inoculó MG1655ΔpflB/pGlydhA en 25 g de la solución de cultivo contenida en un matraz cónico, y se llevó a cabo cultivo con agitación durante una noche con 120 rpm como precultivo. Después, la cantidad completa se inoculó en un fermentador de BMJ-01, un aparato de cultivo fabricado por ABLE Corporation, que contenía 475 g del medio mostrado en la Tabla 17. Se llevó a cabo cultivo con presión atmosférica y en las condiciones de aireación mostradas en la Tabla 18 con una temperatura de cultivo de 35 °C y pH de 7,2 (ajustado con NaOH) durante 24 horas. La cantidad de glucosa residual se midió por el ensayo de glucosa CII Wako Pure Chemical Industries, Ltd.).

Tabla 17

Composición de medio	
Glucosa	12 %
CSL (fabricado por NIHON SHOKUHIN KAKO CO, LTD.)	5 %
Adecanol LG126	0,1 %

Tabla 18

Grupo experimental	1	2	3	4
Velocidad de aireación (vvm)	0	0,5	0,5	0,5
Velocidad de agitación (rpm)	200	200	400	600

Tabla 19

Grupo experimental	1	2	3	4
Cantidad de glucosa residual (g/l)	59,4	36,6	20,1	54,5

25 Se descubrió por este experimento que la tasa de glucólisis se mejoró de acuerdo con la mejora de las condiciones de aireación, pero la tasa de glucólisis se redujo si la condición de aireación se mejoró en exceso.

30 [Ejemplo 13] Preparación de cepa de *Escherichia coli* MG1655 con el gen de dld suprimido

35 Se llevó a cabo PCR usando CAACACCAAGCTTTCGCG (Secuencia N.º 9), TTCCACTCCTTGTGGTGGC (Secuencia N.º 10), AACTGCAGAAATTACGGATGGCAGAG (Secuencia N.º 11) y TGTTCTAGAAAGTTCCTTTGAC (Secuencia N.º 12), que se prepararon basándose en la información génica de la región adyacente al gen de dld del ADN genómico derivado de la cepa MG1655. El fragmento obtenido se digirió respectivamente con enzimas de restricción HindIII y PstI, y PstI y XbaI, para proporcionar fragmentos de aproximadamente 1.140 pb, respectivamente. Estos fragmentos se mezclaron con el fragmento que se obtuvo por digestión del plásmido sensible a temperatura pTH18cs1 (Hashimoto-Gotoh, T., *et al.*, Gene, Vol. 241 (1), pp185-191 (2000)) con HindIII y XbaI, se ligaron usando una ligasa, y después se transformaron en una cepa DH5α a 30 °C, y se cultivaron en una placa de agar LB que contenía 10 µg/ml de cloranfenicol para proporcionar un transformante. La colonia obtenida se cultivó en un medio líquido LB que contenía 10 µg/ml de cloranfenicol a 30 °C durante una noche, y se recuperó un plásmido de la masa microbiana obtenida. Este plásmido se transformó en la cepa MG1655 a 30 °C, y se cultivó en una placa de agar LB que contenía 10 µg/ml de cloranfenicol para proporcionar un transformante. El transformante obtenido se aplicó a una placa de agar, y se cultivó durante una noche a 30 °C. A continuación, para obtener masa

microbiana cultivada, la masa microbiana cultivada se aplicó a una placa de agar LB que contenía 10 µg/ml de cloranfenicol para proporcionar colonias que crecían a 42 °C.

5 Además, la operación se repitió de nuevo para obtener colonias individuales que crecían a 42 °C, y se seleccionó un clon, en el que el plásmido completo se integró en el cromosoma por recombinación homóloga. Se confirmó que el presente clon no tenía el plásmido en el citoplasma.

10 A continuación, el clon anteriormente mencionado se aplicó a una placa de agar LB, y se cultivó durante una noche a 30 °C, y después se inoculó en un medio líquido LB (3 ml/tubo de ensayo) y se cultivó con agitación a 42 °C durante 3 a 4 horas. Este se diluyó convenientemente (aproximadamente 10⁻² a 10⁻⁶) para obtener colonias individuales, y la solución diluida se aplicó a una placa de agar LB y se cultivó durante una noche a 42 °C para proporcionar colonias. A partir de las colonias cultivadas, se seleccionaron aleatoriamente 100 colonias, y cada una de ellas se cultivó en una placa de agar LB y una placa de agar LB que contenía 10 µg/ml de cloranfenicol. Se seleccionaron de ellas clones sensibles a cloranfenicol que crecían solamente en una placa de agar LB. Además, se amplió un fragmento de aproximadamente 2,0 kpb que contenía dld mediante PCR usando el ADN cromosómico de estos clones deseados, y se seleccionó una cepa en la que una región génica de dld estaba suprimida. El clon que satisfizo la descripción anterior se eligió como la cepa con dld suprimido, y la cepa obtenida se designó cepa MG1655Δdld.

20 [Ejemplo 14] Producción de ácido D-láctico por la cepa MG1655Δdld

25 La cepa MG1655 o cepa MG1655Δdld se inoculó en 25 ml de caldo de cultivo LB, solución de cultivo de Miller (Difco244620) contenida en un matraz cónico, y se llevó a cabo cultivo con agitación durante una noche con 120 rpm como precultivo. La cantidad completa de cada solución de precultivo se movió por separado a un fermentador de BMJ-01, un aparato de cultivo fabricado por ABLE Corporation, que contenía 475 g del medio de la composición como se muestra en la Tabla 20, y se llevó a cabo cultivo. Se llevó a cabo cultivo en condiciones que incluían presión atmosférica, una tasa de aireación de 0,5 vvm, una velocidad de agitación de 200 rpm, una temperatura de cultivo de 31 °C, y pH de 6,7 (ajustado con NaOH) durante 96 horas. Después de 48 horas y después de completar el cultivo, se realizó el ensayo de ácido láctico, ácido pirúvico, ácido fórmico y ácido acético con HPLC de acuerdo con un método establecido. Los resultados después de 48 horas se muestran en la Tabla 21, y los resultados después de completar el cultivo se muestran en la Tabla 22, en la que la cepa MG1655 y la cepa MG1655Δdld están representadas por Silvestre y Δdld, respectivamente.

35

Tabla 20

Composición de medio	
Glucosa	100 g/l
Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	6,0 g/l
(NH ₄) ₂ SO ₄	6,0 g/l
KH ₂ PO ₄	3,0 g/l
NaCl	3,0 g/l
MgSO ₄ ·7aq	0,1 g/l
Extracto de levadura	0,5 g/l
Casaminoácido	5,0 g/l

Tabla 21

Resultados después de 48 horas

	Silvestre	Δdld
Cantidad de ácido D-láctico acumulada	26 g/l	22 g/l
Cantidad de ácido pirúvico acumulada	4,5 g/l	1,1 g/l
Cantidad de ácido fórmico acumulada	5,0 g/l	1,55 g/l
Cantidad de ácido acético acumulada	14 g/l	9,5 g/l

40

Tabla 22

Resultados después de 96 horas

	Silvestre	Δdld
Cantidad de ácido D-láctico acumulada	36 g/l	41 g/l
Cantidad de ácido pirúvico acumulada	5,84 g/l	1,26 g/l
Cantidad de ácido fórmico acumulada	3,4 g/l	0 g/l

Cantidad de ácido acético acumulada 12 g/l 11 g/l

[Ejemplo 15] Preparación de cepa de *Escherichia coli* MG1655 con los genes de pfl y dld suprimidos

5 El plásmido pTHΔpfl obtenido en el Ejemplo 4 se transformó en la cepa MG1655Δdld y se cultivó en una placa de agar LB que contenía 10 µg/ml de cloranfenicol para proporcionar un transformante. El transformante obtenido se aplicó a una placa de agar, y se cultivó durante una noche a 30 °C. A continuación, para obtener masa microbiana cultivada, el transformante cultivado se aplicó a una placa de agar LB que contenía 10 µg/ml de cloranfenicol para proporcionar colonias que crecieran a 42 °C.

10 Tratando el clon obtenido de la misma manera que en el Ejemplo 5, se adquirió cepa MG1655 con los genes de dld y pfl suprimidos, y se designó cepa MG1655ΔpflΔdld.

[Ejemplo 16] Introducción del vector de expresión de ldhA en la cepa MG1655Δdld y cepa MG1655ΔpflΔdld

15 El plásmido pGlyldhA obtenido en el Ejemplo 2 se transformó en la cepa MG1655Δdld y la cepa MG1655ΔpflΔdld, respectivamente, para proporcionar cepa MG1655Δdld/pGlyldhA y cepa MG1655ΔpflΔdld/pGlyldhA.

[Ejemplo 17] Producción de ácido D-láctico por cepa MG1655, cepa MG1655Δdld, cepa MG1655Δpfl, cepa MG1655ΔpflΔdld, cepa MG1655Δdld/pGlyldhA y cepa MG1655ΔpflΔdld/pGlyldhA

20 La cepa MG1655, cepa MG1655Δdld, cepa MG1655Δpfl, cepa MG1655ΔpflΔdld, cepa MG1655Δdld/pGlyldhA y cepa MG1655ΔpflΔdld/pGlyldhA se inocularon por separado cada una en 25 ml de caldo de cultivo LB, solución de cultivo de Miller contenida en un matraz cónico, y se llevó a cabo cultivo con agitación durante una noche con 120 rpm como precultivo. La cantidad completa de cada solución de precultivo se movió por separado a un fermentador de BMJ-01, un aparato de cultivo fabricado por ABLE Corporation, que contenía 475 g del medio de la composición como se muestra en la Tabla 20, y se llevó a cabo cultivo. Se llevó a cabo cultivo en condiciones que incluían presión atmosférica, una velocidad de aireación de 0,5 vvm, una velocidad de agitación de 200 rpm, una temperatura de cultivo de 31 °C, y pH de 6,7 (ajustado con NaOH) durante 96 horas. Después de completar el cultivo, se realizó ensayo de ácido láctico, ácido pirúvico, ácido fórmico y ácido acético con HPLC de acuerdo con el método establecido. Los resultados después de 96 horas se muestran en la Tabla 23. Los nombres de las cepas se representan por A, B, C, D, E y F, respectivamente.

Tabla 23

35 Concentraciones de diversos ácidos orgánicos en la solución de cultivo (las unidades del valor numérico en la tabla están todas en g/l)

	A	B	C	D	E	F
Cantidad de ácido D-láctico acumulada	40	41,5	60	61	43	65
Cantidad de ácido pirúvico acumulada	2,7	1,0	2,3	1,1	0,9	0,7
Cantidad de ácido fórmico acumulada	4,0	3,5	ND	ND	3,5	ND
Cantidad de ácido acético acumulada	11	7,3	4,4	4,3	7,0	4,2

[Ejemplo 18] Construcción del vector de expresión de ldhA y un transformante del vector de expresión de ldhA bajo el control de promotor de GAPDH

40 La secuencia de bases del gen de ldhA de *Escherichia coli* ya se ha presentado (número de referencia de GenBank: U36928). Para adquirir un promotor de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), AACGAATTCTCGCAATGATTGACACGATTC (secuencia N.º 13) y ACAGAATTCGCTATTTGTTAGTGAATAAAAGG (secuencia N.º 14) se amplificaron con un método de PCR usando el ADN genómico de la cepa de *Escherichia coli* MG1655 como un molde. El fragmento de ADN obtenido se digirió con una enzima de restricción EcoRI para proporcionar un fragmento de aproximadamente 100 pb, que codifica un promotor de GAPDH. Además, para adquirir un gen estructural de D-lactato deshidrogenasa (ldhA), GGAATTCGGAGAAAGTCTTATGAAACT (secuencia N.º 15) y CCCAAGCTTTAAACCAGTTCGTTCGGGC (secuencia N.º 16) se amplificaron con un método de PCR usando el ADN genómico de la cepa de *Escherichia coli* MG1655 como un molde. El fragmento de ADN obtenido se digirió con enzimas de restricción EcoRI y HindIII para proporcionar un fragmento de D-lactato deshidrogenasa (ldh) de aproximadamente 1,0 kpb. Se mezclaron dos fragmentos de ADN mencionados anteriormente con el fragmento obtenido con digestión del plásmido pUC18 usando enzimas de restricción EcoRI y HindIII, se ligaron usando una ligasa y después se transformaron en una célula competente de *Escherichia coli* DH5α (fabricada por TAKARA BIO INC.), para proporcionar un transformante que crece en una placa de agar LB que contiene 50 µg/ml de ampicilina. La colonia obtenida se cultivó en un medio líquido LB que contenía 50 µg/ml de ampicilina y en el medio LB a 30 °C durante una noche, y el plásmido pGAPldhA se recuperó de la masa microbiana obtenida. Este plásmido pGAPldhA se transformó en la cepa MG1655ΔpflΔdld, y se cultivó en una placa de agar LB que contenía 1 µg/ml de ampicilina a 37 °C durante una noche para proporcionar la cepa MG1655ΔpflΔdld/pGAPldhA.

[Ejemplo 19] Sustitución del promotor de *ldhA* en el genoma de la cepa de *Escherichia coli* MG1655ΔpflΔdld con promotor de GAPDH

Se conoce la secuencia de bases completa del ADN genómico de *Escherichia coli* (número de referencia de GenBank: U00096), y también se ha indicado la secuencia de bases del gen de *ldhA* de *Escherichia coli* (número de referencia de GenBank: U36928). Se realizó PCR usando AAGGTACCACCAGAGCGTTCTCAAGC (secuencia N.º 17) y GCTCTAGATTCTCCAGTGATGTTGAATCAC (secuencia N.º 18), que se prepararon basándose en la información génica de la región adyacente 5' del gen de *ldhA* derivado de la cepa de *Escherichia coli* MG1655, usando ADN genómico de *Escherichia coli* como un molde, para amplificar un fragmento de ADN de aproximadamente 1000 pb.

Además, se realizó PCR usando GGTCTAGAGCAATGATTCACACGATTCG (secuencia N.º 19), que se preparó basándose en la información de secuencia del promotor de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) de la cepa de *Escherichia coli* MG1655, y AACTGCAGGTTCTTCATACACGTCC (secuencia N.º 20), que se preparó basándose en la información de secuencia del gen de *ldhA* de la cepa de *Escherichia coli* MG1655, usando el vector de expresión pGAPldhA preparado en el Ejemplo 18 como un molde, para proporcionar un fragmento de ADN de aproximadamente 850 pb que contiene un promotor de GAPDH y una región adyacente al codón de inicio del gen de *ldhA*.

El fragmento obtenido anteriormente se digirió con enzimas de restricción KpnI y XbaI, y XbaI y PstI, respectivamente, y este fragmento se mezcló con el fragmento obtenido por digestión del plásmido sensible a temperatura pTH18cs1 con KpnI y PstI, se ligó usando una ligasa y después se transformó en una célula competente DH5α (fabricada por TAKARA BIO INC.) a 30 °C, para proporcionar un transformante que crece en una placa de agar LB que contiene 10 µg/ml de cloranfenicol. La colonia obtenida se cultivó en un medio líquido LB que contenía 10 µg/ml de cloranfenicol a 30 °C durante una noche, el plásmido se recuperó de la masa microbiana obtenida, que se designó pTH-GAPldhA. pTH-GAPldhA se transformó en la cepa MG1655ΔpflΔdld a 30 °C, se cultivó en una placa de agar LB que contenía 10 µg/ml de cloranfenicol a 30 °C durante una noche, para proporcionar un transformante. El transformante obtenido se inoculó en un medio líquido LB que contenía 10 µg/ml de cloranfenicol, y se cultivó durante una noche a 30 °C. A continuación, para obtener masa microbiana cultivada, el transformante cultivado se aplicó a una placa de agar LB que contenía 10 µg/ml de cloranfenicol para proporcionar colonias que crecían a 42 °C. Las colonias obtenidas se cultivaron en un medio líquido LB que no contenía un fármaco a 30 °C durante una noche, y después se aplicaron a una placa de agar LB que no contenía un fármaco para proporcionar colonias que crecían a 42 °C.

A partir de las colonias cultivadas, se seleccionaron aleatoriamente 100 colonias, y cada una de ellas se cultivó en una placa de agar LB que no contenía un fármaco y una placa de agar LB que contenía 10 µg/ml de cloranfenicol, para seleccionar clones sensibles a cloranfenicol. Además, se amplificó un fragmento de aproximadamente 800 pb que contenía un promotor de GAPDH y un gen de *ldhA* por PCR usando el ADN cromosómico de estos clones deseados, para seleccionar una cepa en la que la región promotora de *ldhA* se sustituye con el promotor de GAPDH, y el clon que satisface la descripción anterior se designó como cepa con inserción en el genoma MG1655ΔpflΔdld/GAPldhA.

[Ejemplo 20] Producción de ácido D-láctico mediante cepa MG1655ΔpflΔdld, cepa MG1655ΔpflΔdld/pGAPldhA y cepa con inserción en el genoma MG1655ΔpflΔdld/GAPldhA

La cepa MG1655ΔpflΔdld, cepa MG1655ΔpflΔdld/pGAPldhA y cepa con inserción en el genoma MG1655ΔpflΔdld&pflB/GAPldhA se inocularon por separado cada una en 25 ml de caldo de cultivo LB, solución de cultivo de Miller (Difco244620) contenida en un matraz cónico, y se llevó a cabo cultivo con agitación durante una noche a 120 rpm como precultivo. La cantidad completa de cada solución precultivada se movió a un fermentador de 1 l (BMJ-01, aparato de cultivo fabricado por ABLE Corporation), que contenía 475 g de un medio que contenía 120 g/l de glucosa y agua de macerado de maíz 5 % (fabricado por NIHON SHOKUHIN KAKO CO. LTD.) y se llevó a cabo cultivo. Se llevó a cabo cultivo en condiciones que incluían presión atmosférica, una velocidad de aireación de 0,5 vvm, una velocidad de agitación de 200 rpm, una temperatura de cultivo de 35 °C y pH de 7,2 (ajustado con NaOH) hasta que se agotó la glucosa. Después de completar el cultivo, se midió la cantidad de ácido D-láctico acumulado en la solución de cultivo obtenida con HPLC de acuerdo con un método establecido. Los resultados se muestran en la Fig. 1. La acumulación y producción de ácido D-láctico fue de 109,0 g/l para la cepa MG1655ΔpflΔdld 48 horas, 115,6 g/l para la cepa MG1655ΔpflΔdld/pGAPldhA 48 horas y 113,5 g/l para la cepa con inserción en el genoma MG1655ΔpflΔdld/GAPldhA 30 horas, respectivamente.

[Ejemplo 21] Preparación de cepa de *Escherichia coli* MG1655ΔpflΔdldΔmdh

Se conoce la secuencia de bases completa del ADN genómico de *Escherichia coli* (número de referencia de GenBank: U00096), y también se ha indicado la secuencia de bases del gen de *mdh* de *Escherichia coli* (número de referencia de GenBank: AE000403). Para clonar la región adyacente a la secuencia de bases de un gen que codifica *mdh* (939 pb), se sintetizaron cuatro tipos de cebadores oligonucleotídicos mostrados en los n.º de secuencia 21, 22, 23 y 24. El cebador que tiene la secuencia de bases de la secuencia N.º 21 tiene un sitio de reconocimiento de KpnI

en el extremo 5' terminal, los cebadores que tienen la secuencia de bases de las secuencias N.º 22 y 23 tienen un sitio de reconocimiento de BamHI en el extremo 5' terminal, el cebador que tiene la secuencia de bases de la secuencia N.º 24 tiene un sitio de reconocimiento de XbaI en el extremo 5' terminal, respectivamente.

5 El ADN genómico de la cepa de *Escherichia coli* MG 1655 se preparó de acuerdo con el método descrito en Current Protocols in Molecular Biology (JohnWiley & Sons). Usando combinaciones de 1 µg del ADN genómico obtenido con la secuencia N.º 21 y la secuencia N.º 22, y con la secuencia N.º 23 y secuencia N.º 24, se realizó PCR usando 100 pmol de cada uno de los ADN de cebadores anteriormente mencionados en condiciones habituales para amplificar fragmentos de ADN de aproximadamente 800 pb (en lo sucesivo en el presente documento, pueden denominarse un fragmento de mdh-L) y aproximadamente 1000 pb (en lo sucesivo en el presente documento, pueden denominarse un fragmento de mdh-R). Estos fragmentos de ADN se aislaron por electroforesis de agarosa, se recuperaron y el fragmento de mdh-L se digirió con KpnI y BamHI y el fragmento de mdh-R se digirió con BamHI y XbaI, respectivamente. Estos dos tipos de fragmentos digeridos y un producto de digestión del plásmido sensible a temperatura pTH18cs1 (número de referencia de GenBank: AB019610) (Hashimoto-Gotoh, T., *et al.*, Gene, Vol. 241(1), pp 185-191 (2000)) con KpnI y XbaI se hicieron reaccionar con ADN ligasa T4, y después se transformaron en una célula competente *Escherichia coli* DH5α (TAKARA BIO INC.), para proporcionar un plásmido que contenía dos fragmentos, es decir, un fragmento adyacente cadena arriba 5' y un fragmento adyacente cadena abajo 3' de un gen que codifica mdh, y el presente plásmido se designó pTHΔmdh.

20 El plásmido pTHΔmdh se transformó en una cepa de *Escherichia coli* MG1655ΔpflΔdld, y se adquirió cepa MG1655ΔpflΔdld con el gen de mdh alterado de la misma manera que en el Ejemplo 5. La presente cepa se designó cepa MG1655ΔpflΔdldAmdh.

[Ejemplo Comparativo 1] Preparación de cepa de *Escherichia coli* MG1655ΔpflBΔdldΔppc

25 Se conoce la secuencia de bases completa del ADN genómico de *Escherichia coli* (número de referencia de GenBank: U00096), y también se ha indicado la secuencia de bases del gen de ppc de *Escherichia coli* (número de referencia de GenBank: AE000469). Para clonar la región adyacente a la secuencia de bases de un gen que codifica ppc (2.652 pb), se sintetizaron cuatro tipos de cebadores oligonucleotídicos que tienen secuencias de bases mostradas en las secuencias N.º 25, 26, 27 y 28. Los cebadores de las secuencias N.º 26 y 27 tienen un sitio de reconocimiento de XbaI en el extremo 5', y el cebador de la secuencia N.º 28 tiene un sitio de reconocimiento de SacI en el extremo 5' terminal.

35 Usando combinaciones de 1 µg del ADN genómico de la cepa de *Escherichia coli* MG1655 con la secuencia N.º 25 y secuencia N.º 26, y con la secuencia N.º 27 y secuencia N.º 28, se realizó PCR usando 100 pmol de cada uno de los ADN de cebadores anteriormente mencionados en condiciones habituales para amplificar fragmentos de ADN de aproximadamente 1.450 pb (en lo sucesivo en el presente documento, puede denominarse un fragmento ppc-L) y aproximadamente 750 pb (en lo sucesivo en el presente documento, puede denominarse un fragmento ppc-R). Estos fragmentos de ADN se aislaron por electroforesis en agarosa, se recuperaron y se digirió el fragmento ppc-L con HindIII y XbaI y el fragmento ppc-R se digirió con XbaI y SacI, respectivamente. Estos dos tipos de fragmentos digeridos y un producto de digestión del plásmido sensible a temperatura pTH18cs1 con HindIII y SacI se hicieron reaccionar con ADN ligasa T4, y después se transformaron en una célula competente de *Escherichia coli* DH5α (TAKARA BIO INC.), para proporcionar un plásmido que contiene dos fragmentos, es decir, un fragmento adyacente cadena arriba 5' y un fragmento adyacente cadena abajo 3' de un gen que codifica ppc, y este plásmido se designó pTHΔppc.

50 El plásmido pTHΔppc se transformó en una cepa de *Escherichia coli* MG1655ΔpflΔdld, y finalmente se adquirió la cepa MG1655ΔpflΔdld con el gen de ppc alterado. La presente cepa se designó cepa MG1655ΔpflBΔdldΔppc. Además, los detalles del método para obtener la presente cepa estuvieron de acuerdo con el método descrito en el Ejemplo 5.

[Ejemplo Comparativo 2] Preparación de cepa de *Escherichia coli* MG1655ΔpflΔdldΔfrd

55 Se conoce la secuencia de bases completa del ADN genómico de *Escherichia coli* (número de referencia de GenBank: U00096), y también se ha indicado la secuencia de bases del gen de frd de *Escherichia coli* (número de referencia de GenBank: AE000487). El gen de frd, que se intenta suprimir en el presente ejemplo, es un gen que contiene cuatro tipos de genes, es decir, un gen que codifica frdA (1.809 pb), un gen que codifica frdB (735 pb), un gen que codifica frdC (396 pb) y un gen que codifica frdD (360 pb). Para clonar la región adyacente a la secuencia de bases del gen de frd, se sintetizaron cuatro tipos de cebadores oligonucleotídicos que tienen las secuencias de bases mostradas en las secuencias N.º 29, 30, 31 y 32. El cebador de la secuencia N.º 29 tiene un sitio de reconocimiento de EcoRI en el extremo 5' terminal, los cebadores de las secuencias N.º 30 y 31 tienen un sitio de reconocimiento BamHI en el extremo 5' terminal y el cebador de la secuencia N.º 32 tiene un sitio de reconocimiento de HindIII dentro del mismo, respectivamente.

65 Usando combinaciones de 1 µg del ADN genómico de la cepa de *Escherichia coli* MG1655 con la secuencia N.º 29 y secuencia N.º 30, y con la secuencia N.º 31 y secuencia N.º 32, se realizó PCR usando 100 pmol de cada uno de los

ADN de cebadores mencionados anteriormente en condiciones habituales para amplificar fragmentos de ADN de aproximadamente 600 pb (en lo sucesivo en el presente documento, puede denominarse un fragmento frd-L) y aproximadamente 800 pb (en lo sucesivo en el presente documento, puede denominarse un fragmento frd-R). Estos fragmentos de ADN se aislaron por electroforesis en agarosa y se recuperaron. Posteriormente, el fragmento frd-L se digirió con EcoRI y BamHI y el fragmento frd-R se digirió con BamHI y HindIII, respectivamente. Estos dos tipos de fragmentos digeridos y un producto de digestión del plásmido sensible a temperatura pTH18cs1 con EcoRI y HindIII se hicieron reaccionar con ADN ligasa T4, y después se transformaron en una célula competente de *Escherichia coli* DH5α (TAKARA BIO INC.), para proporcionar un plásmido que contiene dos fragmentos, es decir, un fragmento adyacente cadena arriba 5' y un fragmento adyacente cadena abajo 3' de un gen que codifica frd, y este plásmido se designó pTHΔfrd.

El plásmido pTHΔfrd se transformó en una cepa de *Escherichia coli* MG1655ΔpflΔdld, y finalmente se obtuvo una cepa MG1655ΔpflΔdld con el gen de frd alterado, que se designó cepa MG1655ΔpflBΔdldΔfrd. Los detalles del método para obtener la presente cepa estuvieron de acuerdo con el método descrito en el Ejemplo 5.

[Ejemplo 22] Preparación de cepa de *Escherichia coli* MG1655ΔpflΔdldAmdhAasp

Se conoce la secuencia de bases completa del ADN genómico de *Escherichia coli* (número de referencia de GenBank: U00096), y también se ha indicado la secuencia de bases del gen de aspA de *Escherichia coli* (número de referencia de GenBank: AE000486). Para clonar la región adyacente a la secuencia de bases de un gen que codifica aspA (1.482 pb), se sintetizaron cuatro tipos de cebadores oligonucleotídicos mostrados en las secuencias N.º 33, 34, 35 y 36.

Usando combinaciones de 1 µg del ADN genómico de la cepa de *Escherichia coli* MG1655 con la secuencia N.º 33 y secuencia N.º 34, y con la secuencia N.º 35 y secuencia N.º 36, se realizó PCR usando 100 pmol de cada uno de los ADN de cebadores anteriormente mencionados en condiciones habituales para amplificar fragmentos de ADN de aproximadamente 910 pb (en lo sucesivo en el presente documento, pueden denominarse un fragmento aspA-L) y aproximadamente 1.100 pb (en lo sucesivo en el presente documento, puede denominarse un fragmento aspA-R). Estos fragmentos de ADN se aislaron por electroforesis en agarosa y se recuperaron. Ambos del fragmento AspA-L y el fragmento AspA-R se alisaron en la parte final con un kit de formación de extremos romos de ADN (TAKARA BIO INC.), y después el extremo 5' terminal se fosforiló usando polinucleótido quinasa T4 de acuerdo con un método establecido. Por otro lado, se digirió el plásmido sensible a temperatura pTH18cs1 con SmaI, y después se llevó a cabo desfosforilación mediante fosfatasa alcalina. Se hicieron reaccionar dos tipos de los fragmentos fosforilados y el plásmido desfosforilado con ADN ligasa T4, y después se transformaron en una célula competente de *Escherichia coli* DH5α (TAKARA BIO INC.), para proporcionar un plásmido que contiene dos fragmentos, es decir, un fragmento adyacente cadena arriba 5' y un fragmento adyacente cadena abajo 3' de un gen que codificaba aspA, y este plásmido se designó pTHΔasp.

El plásmido pTHΔasp se transformó en una cepa de *Escherichia coli* MG1655ΔpflΔdldAmdh, y finalmente se obtuvo la cepa MG1655ΔpflΔdldAmdh con el gen de aspA alterado, que se designó cepa MG1655ΔpflBΔdldAmdhΔasp. Los detalles del método para obtener la presente cepa estuvieron de acuerdo con el método descrito en el Ejemplo 5.

[Ejemplo 23] Preparación de *Escherichia coli* cepa MG1655ΔpflΔdldAmdhΔasp/cepa con inserción en el genoma GAPIdhA

El plásmido pTH-GAPIdhA obtenido en el Ejemplo 19 se transformó en una cepa de *Escherichia coli* MG1655ΔpflΔdldAmdhΔasp a 30 °C, se cultivó en una placa de agar LB que contenía 10 µg/ml de cloranfenicol a 30 °C durante una noche, para proporcionar un transformante. El transformante obtenido se inoculó en un medio líquido LB que contenía 10 µg/ml de cloranfenicol, y se cultivó durante una noche a 30 °C. A continuación, para obtener masa microbiana cultivada, el transformante cultivado se aplicó a una placa de agar LB que contenía 10 µg/ml de cloranfenicol para proporcionar colonias que crecían a 42 °C. Las colonias obtenidas se cultivaron en un medio líquido LB que no contenía un fármaco a 30 °C durante una noche, y se aplicó adicionalmente a una placa de agar LB que no contenía un fármaco para proporcionar colonias que crecían a 42 °C.

De las colonias cultivadas, se seleccionaron aleatoriamente 100 colonias, y cada una de ellas se cultivó en una placa de agar LB que no contenía un fármaco y una placa de agar LB que contenía 10 µg/ml de cloranfenicol, para seleccionar clones sensibles a cloranfenicol. Además, se amplificó un fragmento de aproximadamente 800 pb que contenía promotor de GAPDH y gen de IdhA mediante PCR usando el ADN cromosómico de estos clones deseados, para seleccionar una cepa en la que la región promotora de IdhA está sustituida con el promotor de GAPDH, y el clon que satisface la descripción anterior se designó cepa con inserción de genoma MG1655ΔpflΔdldAmdhΔasp/GAPIdhA.

[Ejemplo 24] Producción de ácido D-láctico y ácido succínico usando cepa de *Escherichia coli* MG1655ΔpflΔdldAmdh

- La cepa de *Escherichia coli* MG1655 Δ pfl Δ dld obtenida en el Ejemplo 15, la cepa de *Escherichia coli* MG1655 Δ pfl Δ dld Δ mdh obtenida en el Ejemplo 21, la cepa de *Escherichia coli* MG1655 Δ pfl Δ dld Δ ppc obtenida en el Ejemplo Comparativo 1 y la cepa de *Escherichia coli* MG1655 Δ pfl Δ dld Δ frd obtenida en el Ejemplo Comparativo 2 se inocularon por separado en cuatro matraces cónicos que contenían cada uno 25 ml de caldo de cultivo LB, solución de cultivo de Miller (Difco244620) y se llevó a cabo cultivo con agitación durante una noche a 30 °C con 120 rpm como precultivo. Después, la cantidad completa del contenido de matraz anteriormente mencionado se inoculó por separado en cuatro fermentadores de 1 l de volumen (BMJ-01, aparato de cultivo fabricado por ABLE Corporation), que contenía cada uno 475 g del medio mostrado en la Tabla 24. El cultivo se llevó a cabo en condiciones que incluían presión atmosférica, una velocidad de aireación de 0,5 vvm, una velocidad de agitación de 200 rpm, una temperatura de cultivo de 35 °C, y pH de 7,2 (ajustado con NaOH) durante 32 horas. Después de completar el cultivo, se midieron las concentraciones de ácido láctico y ácido succínico en la solución de cultivo obtenida con HPLC de acuerdo con un método establecido. Los resultados de la acumulación de ácido láctico se muestran en la Fig. 2, y los resultados de la acumulación de ácido succínico se muestran en la Fig. 3.
- Para ácido láctico, la acumulación usando la cepa Δ pfl Δ dld Δ mdh mostró 89 g/l a las 32 horas, y mostró la misma acumulación que la cepa Δ pfl Δ dld, mientras que la acumulación usando la cepa Δ pfl Δ dld Δ ppc y la cepa Δ pfl Δ dld Δ frd mostraron 56 g/l y 71 g/l, respectivamente.
- Para ácido succínico, la acumulación usando la cepa Δ pfl Δ dld mostró 3,8 g/l a las 32 horas, mientras que las otras tres cepas restantes no mostraron ninguna acumulación.

Tabla 24

Composición de medio	
Glucosa	12 %
Agua de macerado de maíz (fabricado por SHOKUHIN KAKO CO. LTD.)	5 %
(Residuo: agua)	

- [Ejemplo 25] Producción de ácido D-láctico y ácido fumárico por la cepa de *Escherichia coli* MG1655 Δ pfl Δ dld Δ mdh Δ asp y la cepa con inserción en el genoma MG1655 Δ pfl Δ dld Δ mdh Δ asp/GAPIdhA
- La cepa de *Escherichia coli* MG1655 Δ pfl Δ dld Δ mdh Δ asp obtenida en el Ejemplo 22, la cepa de *Escherichia coli* con inserción en el genoma MG1655 Δ pfl Δ dld Δ mdh Δ asp/GAPIdhA obtenida en el Ejemplo 23 y la cepa Δ pfl Δ dld Δ mdh obtenida en el Ejemplo 21 se inocularon por separado en tres matraces cónicos que contenía cada uno 25 ml de caldo de cultivo LB, solución de cultivo de Miller (Difco244620), y se llevó a cabo cultivo con agitación durante una noche a 30 °C con 120 rpm como precultivo. Después, la cantidad completa del contenido de matraz anteriormente mencionado se inoculó por separado en tres fermentadores de 1 l de volumen (BMJ-01, aparato de cultivo fabricado por ABLE Corporation), que contenían cada uno 475 g del medio mostrado en la Tabla 24. Se llevó a cabo cultivo en condiciones que incluían presión atmosférica, una velocidad de aireación de 0,5 vvm, una velocidad de agitación de 200 rpm, una temperatura de cultivo de 35 °C, y pH de 7,2 (ajustado con NaOH) durante 48 horas. Después de completar el cultivo, se midieron las concentraciones de ácido láctico y ácido fumárico en la solución de cultivo obtenida con HPLC de acuerdo con un método establecido. Los resultados de la acumulación de ácido láctico se muestran en la Fig. 4, y los resultados de la acumulación de ácido fumárico se muestran en la Fig. 5.
- Para ácido láctico, la acumulación usando la cepa Δ pfl Δ dld Δ mdh Δ asp mostró 91 g/l a las 48 horas y la cepa Δ pfl Δ dld Δ mdh mostró una acumulación similar de 90 g/l a las 48 horas, mientras que la cepa con inserción en el genoma Δ pfl Δ dld Δ mdh Δ asp/GAPIdhA mostró una acumulación de 98 g/l a las 24 horas.
- Para ácido fumárico, la acumulación usando la cepa Δ pfl Δ dld Δ mdh mostró 0,037 g/l a las 48 horas, mientras que la acumulación usando cepa Δ pfl Δ dld Δ mdh Δ asp y la cepa con inserción en el genoma Δ pfl Δ dld Δ mdh Δ asp/GAPIdhA mostraron 0,01 g/l a las 48 horas.

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Mitsui Chemicals, Inc.
- <120> Un biocatalizador para producir ácido D-láctico
- <130> F000364
- <160> 36
- <210> 1
- <211>34
- <212> ADN

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador para PCR
 5
 <400> 1
 ggaattcgtc gacggctcc agtcgaagc tggc 34
 <210> 2
 <211>32
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 10
 <220>
 <223> Cebador para PCR
 15
 <400>2
 ggaattctga ctcagctaac aataaaatt tt 32
 20
 <210> 3
 <211>28
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25
 <220>
 <223> Cebador para PCR
 <400> 3
 ggaattccgg agaaagtctt atgaaact 28
 30
 <210>4
 <211>29
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35
 <220>
 <223> Cebador para PCR
 <400> 4
 cccaagcttt taaaccagtt cgttcgggc 29
 40
 <210> 5
 <211>20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45
 <220>
 <223> Cebador para PCR
 50
 <400> 5
 gcacgaaagc ttgattacg 20
 <210> 6
 <211>30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 55
 <220>
 <223> Cebador para PCR
 60
 <400>6
 ttattgcatg cttagattg actgaaatcg 30
 <210> 7
 <211>30
 <212> ADN
 65

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador para PCR
 5
 <400> 7
 ttattgcatg cttatttact gcgtacttcg 30
 <210> 8
 <211>21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 10
 <220>
 <223> Cebador para PCR
 15
 <400> 8
 aaggcctacg aaaagctgca g 21
 20
 <210> 9
 <211>18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25
 <220>
 <223> Cebador para PCR
 <400> 9
 caacaccaag ctttcgcg 18
 30
 <210> 10
 <211>19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35
 <220>
 <223> Cebador para PCR
 <400> 10
 ttccactcct tgggtggc 19
 40
 <210>11
 <211>26
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45
 <220>
 <223> Cebador para PCR
 <400> 11
 aactgcagaa attacggatg gcagag 26
 50
 <210> 12
 <211>21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 55
 <220>
 <223> Cebador para PCR
 60
 <400> 21
 tgttctagaa agttctttga c 21
 <210>13
 <211>30
 <212> ADN
 65

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador para PCR
 5
 <400> 13
 aacgaattct cgcaatgatt gacacgattc 30
 <210> 14
 <211>32
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 10
 <220>
 <223> Cebador para PCR
 15
 <400> 14
 acagaattcg ctatttgta gtgaataaaa gg 32
 <210>15
 <211>28
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 20
 <220>
 <223> Cebador para PCR
 25
 <400> 15
 ggaattccgg agaaagtctt atgaaact 28
 30
 <210>16
 <211>30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35
 <220>
 <223> Cebador para PCR
 <400> 16
 40
 cccaagcttt taaaccagtt cgttcggggc 30
 <210> 17
 <211>26
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45
 <220>
 <223> Cebador para PCR
 <400> 17
 50
 aaggtaccac cagagcgttc tcaagc 26
 <210>18
 <211>30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 55
 <220>
 <223> Cebador para PCR
 60
 <400> 18
 gctctagatt ctccagtgat gttgaatcac 30
 <210>19

<211>28
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> Cebador para PCR
 <400> 19
 ggtctagagc aatgattcac acgattcg 28
 10 <210>20
 <211>28
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> Cebador para PCR
 <400> 20
 aactgcaggt tcgttctcat acaogtcc 28
 20 <210>21
 <211>30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <223> Cebador para PCR
 30 <400> 21
 aaaggtacca gaataccttc tgcttgccc 30
 <210> 22
 <211>30
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador para PCR
 40 <400> 22
 aaaggtacc ctaaactcct tattatattg 30
 <210>23
 <211>30
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador para PCR
 50 <400> 23
 aaaggtacca aacggagca cagactccgg 30
 <210>24
 <211>
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 60 <220>
 <223> Cebador para PCR
 <400> 24
 aaatctagaa tcagatcatc gtcgccttac 30
 65

<210>25
 <211>
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> Cebador para PCR
 <400> 25
 acggagcatg acggcaagc 19
 10
 <210> 26
 <211>
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> Cebador para PCR
 20
 <400> 26
 aatctagaca ccccatctta tcggttg 27
 <210>27
 <211>
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25
 <220>
 <223> Cebador para PCR
 30
 <400> 27
 ttctagatc ttctcttct gcaaacc 28
 <210> 28
 <211>
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35
 <220>
 <223> Cebador para PCR
 40
 <400> 28
 cttgagctc acgcgaggcc aggtatc 28
 <210>29
 <211>
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45
 <220>
 <223> Cebador para PCR
 50
 <400> 29
 agtgaattct cacagccagt gcgcca 27
 55
 <210>30
 <211>
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 60
 <220>
 <223> Cebador para PCR
 <400> 30
 agtggatccc gcatcgccaa tgtaaatcc 29
 65

ES 2 619 176 T3

5
<210>31
<211>
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador para PCR

<400>31
10 agtggatcgg acattcctcc agattgttt t 31

<210> 32
<211>
<212> ADN
15 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador para PCR

20 <400> 32
ataacgcaag aaagctgtt ga 22

<210>33
<211>
25 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador para PCR

30 <400>33
tttgagctc gatcaggatt gcgttggtgg 30

<210> 34
<211>
35 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador para PCR

40 <400> 34
cgaacagtaa tcgtacaggg 20

45 <210> 35
<211>
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

50 <220>
<223> Cebador para PCR

<400> 35
55 tacgattact gttggcatc gaccgaatac cggag 35

<210>36
<211>
<212> ADN
60 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador para PCR

<400> 36

ttttctaga cctggcagc ctctcttc 30

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un microorganismo recombinante en el que la actividad de D-lactato deshidrogenasa dependiente de FAD (did) inherente en el microorganismo recombinante está inactivada o reducida, la actividad de piruvato formiato-liasa (pfl) está inactivada o reducida y la actividad de D-lactato deshidrogenasa dependiente de NADH derivada de *Escherichia coli* (ldhA) está potenciada.
- 10 2. El microorganismo recombinante de acuerdo con la reivindicación 1, en el que al menos una de la actividad de malato deshidrogenasa (mdh) inherente en el microorganismo recombinante y la actividad de aspartato amoniaco liasa (aspA) inherente en el microorganismo recombinante está inactivada o reducida.
- 15 3. El microorganismo recombinante de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en donde el microorganismo es una bacteria.
4. El microorganismo recombinante de acuerdo con la reivindicación 3, en donde la bacteria es *Escherichia coli*.
- 20 5. Un método para producir ácido D-láctico, que comprende cultivar el microorganismo recombinante de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 en un medio líquido, en donde se produce, acumula y aísla del medio líquido ácido D-láctico.
6. El método para producir ácido D-láctico de acuerdo con la reivindicación 5, en el que el cultivo se lleva a cabo en un medio al que se añaden dos o más tipos de aminoácidos.
- 25 7. Un microorganismo recombinante, en el que la actividad de piruvato formiato liasa (pfl) inherente en el microorganismo recombinante está inactivada o reducida y la actividad de D-lactato deshidrogenasa dependiente de FAD (did) está inactivada o reducida y en el que un gen que codifica la D-lactato deshidrogenasa dependiente de NADH derivada de *Escherichia coli* (ldhA) expresa la D-lactato deshidrogenasa dependiente de NADH (ldhA) en el genoma del microorganismo usando un promotor de un gen que controla la expresión de una proteína implicada en una ruta glucolítica, una ruta de biosíntesis de ácidos nucleicos o una ruta de biosíntesis de aminoácidos.
- 30 8. El microorganismo recombinante de acuerdo con la reivindicación 7, en donde el microorganismo recombinante es *Escherichia coli*.
- 35 9. *Escherichia coli*, en la que la actividad de piruvato formiato liasa (pfl) inherente en la *Escherichia coli* está inactivada o reducida y/o la actividad de D-lactato deshidrogenasa dependiente de FAD (did) está inactivada o reducida y en la que la *Escherichia coli* expresa D-lactato deshidrogenasa dependiente de NADH derivada de *Escherichia coli* (ldhA) en el genoma de *Escherichia coli* usando un promotor de un gen derivado de *Escherichia coli* que controla la expresión de una proteína implicada en una ruta glucolítica, una ruta de biosíntesis de ácidos nucleicos o una ruta de biosíntesis de aminoácidos, en lugar de usar un promotor de un gen que codifica la D-lactato deshidrogenasa dependiente de NADH derivada de *Escherichia coli* (ldhA).
- 40 10. *Escherichia coli* de acuerdo con la reivindicación 9, en la que el promotor del gen de *Escherichia coli* que controla la expresión de la proteína implicada en la ruta glucolítica, la ruta de biosíntesis de ácidos nucleicos o la ruta de biosíntesis de aminoácidos, es un promotor de un gen de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa derivado de *Escherichia coli*.
- 45 11. Un método para producir ácido D-láctico, que comprende cultivar el microorganismo recombinante de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10 usando un medio.
- 50 12. La *Escherichia coli* de acuerdo con la reivindicación 4, que tiene un ciclo de TCA y en la que la actividad de la malato deshidrogenasa (mdh) está inactivada o reducida, en la que, además, la actividad de piruvato formiato liasa (pfl) está inactivada o reducida y/o la actividad de D-lactato deshidrogenasa dependiente de FAD (did) está inactivada o reducida, en la que la actividad de D-lactato deshidrogenasa dependiente de NADH derivada de *Escherichia coli* (ldhA) está potenciada y en la que la actividad de aspartato amoniaco liasa (aspA) inherente en la *Escherichia coli* está inactivada o reducida.
- 55 13. Un método para producir ácido D-láctico cultivando la *Escherichia coli* de acuerdo con la reivindicación 12 usando un medio.
- 60 14. El método para producir ácido láctico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5, 6, 11 y 13, en el que el cultivo se lleva a cabo en condiciones aerobias.
- 65 15. El método para producir ácido láctico de acuerdo con la reivindicación 14, en el que las condiciones aerobias permiten aporte de oxígeno que satisface un requisito de un coeficiente de transferencia de oxígeno $K_L a$ de no menos de 1 h^{-1} y no más de 400 h^{-1} a presión normal usando agua a una temperatura de $30 \text{ }^\circ\text{C}$.

16. El método para producir ácido láctico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5, 6, 11 y 13 a 15, en el que el pH del cultivo es de 6 a 8.

Fig.1

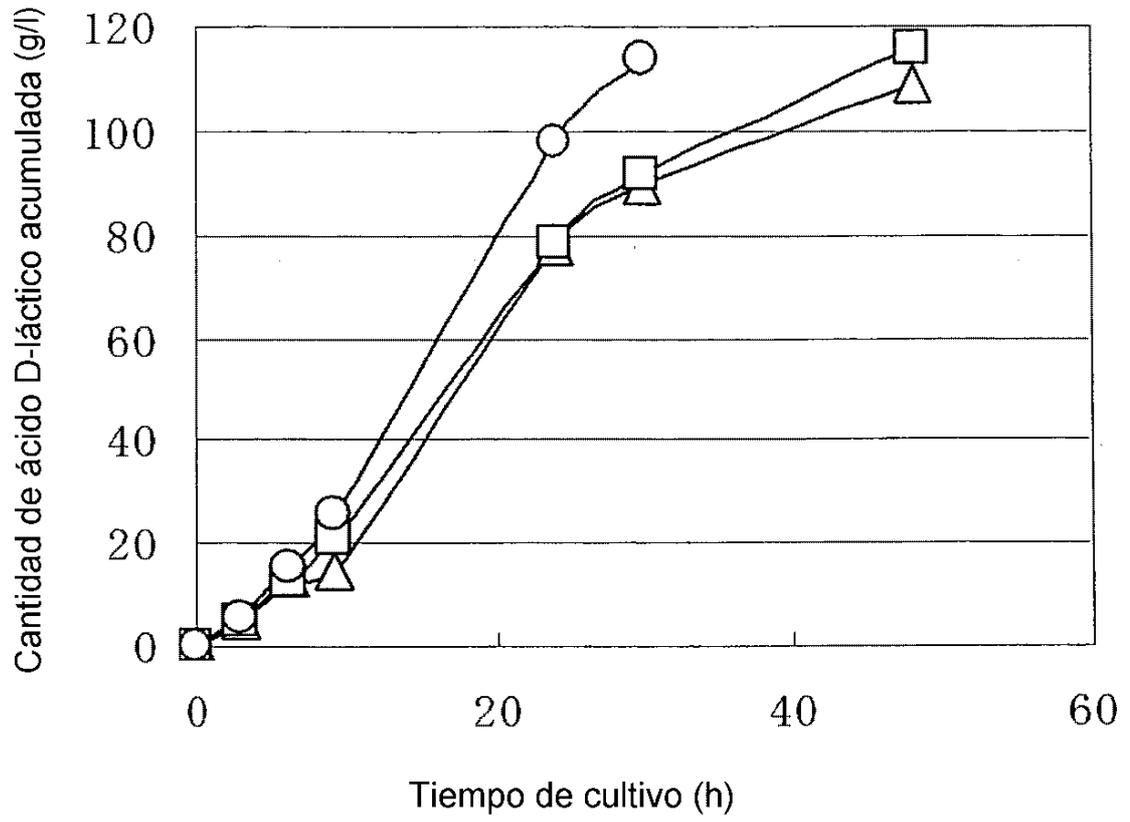


Fig.2

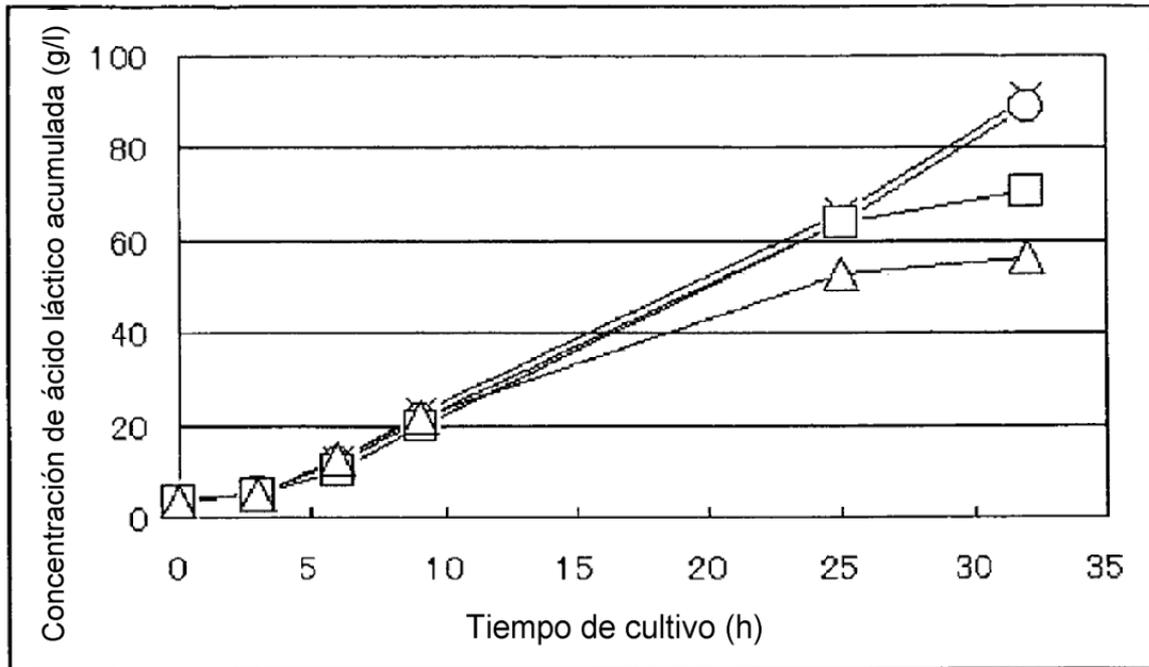


Fig.3

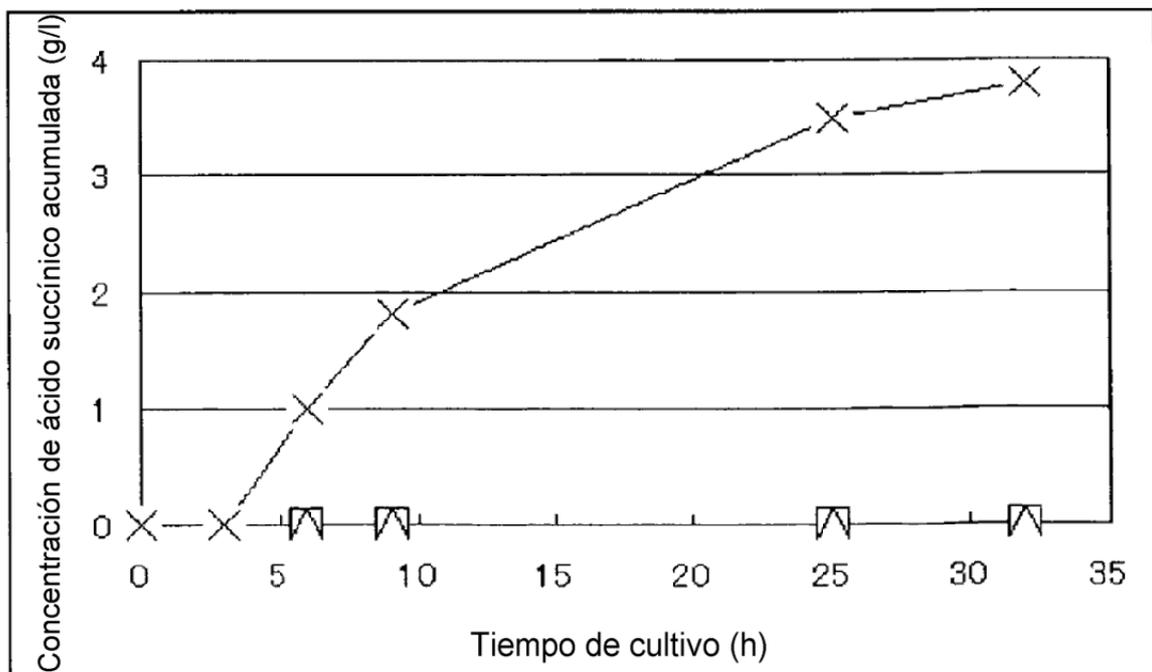


Fig.4

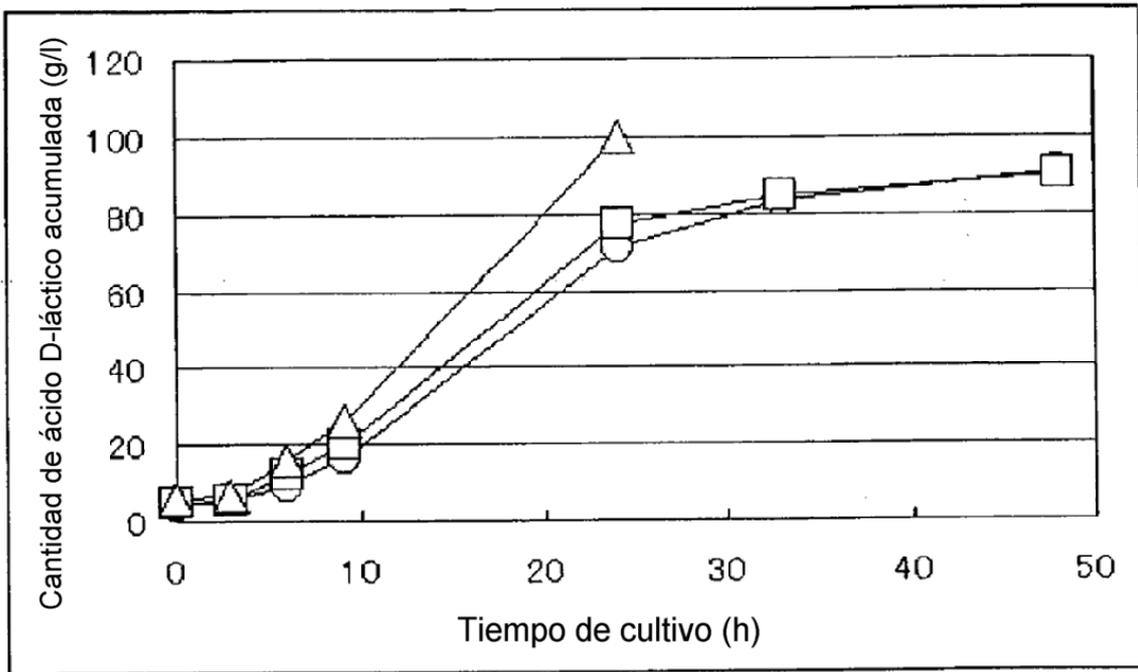


Fig.5

