

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 719 828**

51 Int. Cl.:

**C12N 1/19** (2006.01)

**C12P 7/56** (2006.01)

**C12N 15/09** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.11.2014 PCT/JP2014/080982**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.05.2015 WO15076393**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.11.2014 E 14864444 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.01.2019 EP 3072955**

54 Título: **Transformante y procedimiento para la producción del mismo, y procedimiento para la producción de ácido láctico**

30 Prioridad:

**22.11.2013 JP 2013242236**

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

**16.07.2019**

73 Titular/es:

**JMTC ENZYME CORPORATION (100.0%)  
8-17-5, Ginza Chuo-ku  
Tokyo 104-0061, JP**

72 Inventor/es:

**HARA FUTOSHI;  
KIMURA SHUICHIRO;  
HAGIYA YUICHIRO y  
TANAKA TAKAYUKI**

74 Agente/Representante:

**SALVÀ FERRER, Joan**

ES 2 719 828 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

Transformante y procedimiento para la producción del mismo, y procedimiento para la producción de ácido láctico

## 5 Campo técnico

La presente invención se refiere a un transformante, a un proceso para la producción del mismo y a un proceso para la producción de ácido láctico. Más específicamente, la solicitud describe un transformante que se obtiene mediante la incorporación de un gen de D-lactato deshidrogenasa derivado de las bacterias del género *Pediococcus* y un gen de D-lactato deshidrogenasa derivado de bacterias del género *Lactobacillus* en *Schizosaccharomyces pombe* y en el que algunos de los genes en un grupo de genes que codifican piruvato descarboxilasa se han suprimido o inactivado, un proceso para la producción del transformante y un proceso para la producción de ácido láctico en el que el transformante se cultiva o fermenta en una solución de cultivo o una solución de fermentación y el ácido láctico se obtiene a partir de la solución de cultivo o la solución de fermentación.

## 15 Técnica anterior

El ácido láctico es ampliamente utilizado para alimentos, con fines médicos y materias primas químicas de cosméticos y similares. Además, el ácido poliláctico obtenido utilizando ácido láctico está llamando la atención como plástico biodegradable que finalmente se descompone en dióxido de carbono y agua por microorganismos y similares. Por lo tanto, existe una necesidad de producir ácido láctico con alta productividad a bajo coste.

Como proceso para la producción de ácido láctico, se conoce un proceso biológico para la producción de ácido láctico mediante la fermentación de azúcar con bacterias de ácido láctico. Sin embargo, dado que las bacterias de ácido láctico tienen mala resistencia a los ácidos, a fin de obtener una alta productividad en el proceso mencionado anteriormente, el ácido láctico producido a través de la fermentación necesita cambiar a lactato al ser neutralizado por un álcali. En el proceso de producción en el que la neutralización se realiza mediante un álcali, es necesaria una etapa de revertir el lactato a ácido láctico. En consecuencia, el proceso de producción se complica y aumentan los costos de producción.

Como proceso para la obtención de ácido láctico sin realizar la neutralización por un álcali, existe un procedimiento que utiliza un transformante obtenido mediante la introducción de un gen que codifica lactato deshidrogenasa en levadura. Por ejemplo, PTL 1 da a conocer un caso en el que el ácido láctico se puede producir con alta productividad sin realizar una etapa de neutralización con un álcali mediante la realización de la fermentación del ácido láctico mediante el uso de un transformante que se obtiene mediante la incorporación de un gen de lactato deshidrogenasa de mamíferos, tales como seres humanos, en *Schizosaccharomyces pombe* y en el que algunos de los genes en un grupo de genes que codifican piruvato descarboxilasa del huésped de *Schizosaccharomyces pombe* se han eliminado o inactivado. Además, PTL 2 da a conocer un caso en el que el ácido L-láctico se obtiene mediante el cultivo de un transformante que se obtiene mediante la introducción de un gen de L-lactato deshidrogenasa de *Lactobacillus plantarum* en *Saccharomyces cerevisiae* que sustancialmente no produce etanol cuando se cultiva en un medio de cultivo. WO 2007/032792 describe la producción de ácido láctico por *Issatchenkia orientalis* modificado en el que se ha introducido un gen de lactato deshidrogenasa exógeno. WO 03/049525 da a conocer células de *Candida* modificadas genéticamente que comprenden una construcción de ácido nucleico recombinante que codifica lactato deshidrogenasa. US2014322773 describe un procedimiento para producir ácido láctico utilizando una célula huésped de *Schizosaccharomyces pombe* transformada para tener un gen de LDH derivado de mamífero en un caldo de cultivo de fermentación que comprende iones potasio.

## Lista de referencias

## 50 Bibliografía de Patentes

[PTL 1] Publicación Internacional PCT N° WO2011/021629

[PTL 2] Traducción Japonesa Publicada No. 2.007-512018 de la Publicación Internacional PCT para solicitudes de patentes

## 55 Características de la invención

## Problema técnico

60 La presente invención tiene como objetivo proporcionar un transformante de *Schizosaccharomyces pombe* que puede producir ácido D-láctico con alta productividad sin requerir neutralización por un álcali, y proporcionar un proceso para la producción del transformante.

65 La presente invención también tiene como objetivo proporcionar un proceso para producir ácido láctico con alta productividad usando el transformante sin realizar una etapa de neutralización con un álcali.

## Solución al problema

Un transformante como se describe en el presente documento utiliza *Schizosaccharomyces pombe* como huésped en el que se incorporan un gen de D-lactato deshidrogenasa derivado de las bacterias del género *Pediococcus* y un gen de D-lactato deshidrogenasa derivado de las bacterias del género *Lactobacillus*, en el que algunos de los genes en un grupo de genes que codifican piruvato descarboxilasa del huésped *Schizosaccharomyces pombe* se han eliminado o inactivado.

En el transformante descrito en este documento, las bacterias del género *Pediococcus* son preferiblemente *Pediococcus acidilactici* o *Pediococcus pentosaceus*, y las bacterias del género *Lactobacillus* son preferiblemente *Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus bulgaricus* o *Lactobacillus brevis*. Además, en el transformante descrito en este documento, los genes eliminados o inactivados en el grupo de genes que codifican piruvato descarboxilasa son preferiblemente genes de PDC2. Además, el gen de D-lactato deshidrogenasa se incorpora preferiblemente en un cromosoma de *Schizosaccharomyces pombe*.

Un proceso para la producción de un transformante tal como se describe aquí es un procedimiento para producir un transformante usando *Schizosaccharomyces pombe* como huésped en el que se incorporan un gen de D-lactato deshidrogenasa derivado de bacterias del género *Pediococcus* y un gen de D-lactato deshidrogenasa derivado de bacterias del género *Lactobacillus*, en el que algunos de los genes en un grupo de genes que codifican piruvato descarboxilasa del huésped *Schizosaccharomyces pombe* se han eliminado o inactivado. El proceso incluye una etapa de obtención de un transformante mediante la introducción de un casete de expresión en el huésped, en el que el casete de expresión consiste en un casete de expresión que incluye un promotor y un terminador que actúan en *Schizosaccharomyces pombe* y un gen de D-lactato deshidrogenasa derivado de bacterias del género *Pediococcus* y un casete de expresión que incluye un promotor y un terminador que actúan en *Schizosaccharomyces pombe* y un gen de D-lactato deshidrogenasa derivado de las bacterias del género *Lactobacillus*, o consiste en un casete de expresión que incluye un promotor o un terminador que actúan en *Schizosaccharomyces pombe*, un gen de D-lactato deshidrogenasa derivado de bacterias del género *Pediococcus*, y un gen de D-lactato deshidrogenasa derivado de las bacterias del género *Lactobacillus*, y un huésped, en el que algunos de los genes en un grupo de genes que codifican piruvato descarboxilasa se han eliminado o inactivado, se usa como el huésped anteriormente mencionado, o algunos de los genes en un grupo de genes que codifican piruvato descarboxilasa del transformante obtenido como se ha anteriormente están eliminados o inactivados.

En el proceso para la producción de un transformante descrito en este documento, los genes eliminados o inactivados en un grupo de genes que codifican a piruvato descarboxilasa son preferiblemente genes PDC2. Además, el gen de la D-lactato deshidrogenasa derivado de las bacterias del género *Pediococcus* y el gen de la D-lactato deshidrogenasa derivado de las bacterias del género *Lactobacillus* se introducen preferiblemente en un cromosoma del huésped.

En un proceso para la producción de ácido láctico descrito en el presente documento, el transformante se cultiva o fermenta en una solución de cultivo o una solución de fermentación, y el ácido D-láctico se obtiene a partir de la solución de cultivo o de la solución de fermentación.

En el proceso para la producción de ácido láctico descrito en el presente documento, el cultivo o la fermentación se realizan preferiblemente utilizando una solución de cultivo o una solución de fermentación que contiene glucosa o sacarosa a una concentración del 1% en masa al 50% en masa. Además, es preferible que el cultivo o la fermentación continúen adicionalmente después de que el pH de la solución de cultivo o la solución de fermentación sea igual a o menor que 3,5 debido al ácido D-láctico producido por el transformante. También es preferible que el cultivo o la fermentación continúen sin neutralizar el ácido D-láctico en la solución de cultivo o la solución de fermentación que se produce por el transformante. Además, es preferible que el ácido láctico se separe de la solución de cultivo o la solución de fermentación sin neutralizar el ácido D-láctico en la solución de cultivo o la solución de fermentación que se produce por el transformante. Además, es preferible que una concentración celular bacteriana inicial del transformante en la solución de cultivo o la solución de fermentación se ajuste para que sea de 0,1 g/l a 50 g/l (expresada en términos de células bacterianas secas).

La invención se define adicionalmente por las reivindicaciones.

## Efectos ventajosos de la invención

El transformante de *Schizosaccharomyces pombe* descrito en este documento puede producir ácido D-láctico con alta productividad sin requerir la neutralización por un álcali. Además, el transformante es adecuado para la producción de ácido D-láctico en presencia de altas concentraciones de azúcares, particularmente, glucosa, fructosa, sacarosa o maltosa, y para una fermentación de ácido láctico alta densidad.

El transformante se puede obtener simplemente mediante el proceso para la producción de un transformante tal como se describe en el presente documento.

Además, el proceso para la producción de ácido láctico tal como se describe en el presente documento puede producir ácido D-láctico con alta productividad, sin realizar una etapa de neutralización con un álcali.

Breve descripción de los dibujos

- 5 La figura 1 es una vista esquemática de la estructura de un vector recombinante pSE.
- La figura 2 es una vista esquemática de la estructura de un vector recombinante pSLh.
- 10 La figura 3 es una vista que muestra la variación temporal de la concentración (g/l) de glucosa, etanol y ácido D-láctico en una solución de fermentación durante la fermentación continua en el Ejemplo 4.
- La figura 4 es una vista que muestra la variación temporal de la velocidad de producción de ácido D-láctico (g/l · h) y el rendimiento a base de azúcar (%) de ácido D-láctico en la solución de fermentación durante la fermentación continua en el Ejemplo 4.
- 15 La figura 5 es una vista que muestra la variación temporal en el pH de la solución de fermentación durante la fermentación continua en el Ejemplo 4.
- 20 La figura 6 es una vista que muestra la variación temporal en la concentración de glucosa (g/l) en una solución de fermentación durante la fermentación continua en los Ejemplos 5 y 6.
- La figura 7 es una vista que muestra la variación temporal en la concentración de etanol (g/l) en la solución de fermentación durante la fermentación continua en los Ejemplos 5 y 6.
- 25 La figura 8 es una vista que muestra la variación temporal en la concentración de ácido D-láctico (g/l) en la solución de fermentación durante la fermentación continua en los Ejemplos 5 y 6.
- La figura 9 es una vista que muestra la variación temporal de la velocidad de producción de ácido D-láctico (g/l · h) en la solución de fermentación durante la fermentación continua en los Ejemplos 5 y 6.
- 30 La figura 10 es una vista que muestra la variación temporal en el rendimiento a base de azúcar (%) del ácido D-láctico en la solución de fermentación durante la fermentación continua en los Ejemplos 5 y 6.
- 35 La figura 11 es una vista que muestra la variación temporal en el pH de la solución de fermentación durante la fermentación continua en los Ejemplos 5 y 6.
- La figura 12 es una vista que muestra la variación temporal de la proporción de células bacterianas viables en la solución de fermentación durante la fermentación continua en los Ejemplos 5 y 6.

40 Descripción de las realizaciones

[Transformante]

- 45 El transformante descrito en este documento es un transformante que utiliza *Schizosaccharomyces pombe* (en o sucesivo referido como "S. pombe" también) como un huésped en el que se incorporan un gen de D-lactato deshidrogenasa derivado de las bacterias del género *Pediococcus* y un gen de D-lactato deshidrogenasa derivado de las bacterias del género *Lactobacillus*, en el que algunos de los genes en un grupo de genes que codifican la piruvato descarboxilasa del huésped *S. pombe* se han eliminado o inactivado.

50 <*S. pombe*>

- La *S. pombe* como huésped es una levadura (levadura de fisión) que pertenece al género *Schizosaccharomyces*, y es un microorganismo que tiene particularmente una excelente resistencia a los ácidos en comparación con otras levaduras. Se sabe que la *S. pombe* es excelente en la producción de ácido D-láctico en presencia de una alta concentración de glucosa en comparación con otras levaduras, tales como *Saccharomyces cerevisiae*, y es adecuada también para la fermentación de alta densidad (fermentación utilizando una gran cantidad de levadura). Por lo tanto, utilizando el transformante de la *S. pombe*, el ácido D-láctico puede producirse con una productividad extremadamente elevada.

- 60 Toda la secuencia de bases de cromosomas de la *S. pombe* se ha publicado "*Schizosaccharomyces pombe* gene DB (<http://www.genedb.org/genedb/pombe>)" en la base de datos "Gene DB" del Instituto Sanger. Los datos de la secuencia génica de la *S. pombe* que se describe en la presente memoria descriptiva se pueden obtener mediante la búsqueda del nombre del gen o el nombre de la cepa mencionada anteriormente en la base de datos descrita anteriormente.

65

Además, la *S. pombe* está disponible en institutos de depósito públicos o privados, tales como la American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, EE.UU.), National Collection of Yeast Cultures (NCYC, Norwich, Reino Unido), Centro de Recursos Biológicos Nite (NBRC, Kisarazu-shi, Chiba) y el Centro de Recursos Genéticos de levadura (YGRC, Facultad de Ciencias, Universidad de Osaka).

5

<Gen que codifica la piruvato descarboxilasa>

El grupo de genes que codifica la piruvato descarboxilasa (genes de piruvato descarboxilasa, en lo sucesivo, referidos como "genes PDC") en la *S. pombe* consiste en 4 tipos de genes, a saber, un gen que codifica la piruvato descarboxilasa 1 (en lo sucesivo, denominado como un "gen PDC1"), un gen que codifica la piruvato descarboxilasa 2 (en lo sucesivo, referido como un "gen PDC2"), un gen que codifica la piruvato descarboxilasa 3 (en lo sucesivo, referido como un "gen PDC3"), y un gen que codifica la piruvato descarboxilasa 4 (en lo sucesivo, referido como un "gen PDC4"). Entre éstos, el gen PDC2 y el gen PDC4 son genes PDC que juegan un papel funcional clave en la *S. pombe*. El nombre de la cepa de cada uno de los genes PDC es el siguiente.

15

gen PDC1 (Pdc1); SPAC13A11. 06

gen PDC2 (Pdc2); SPAC1F8. 07c

gen PDC3 (Pdc3); SPAC186. 09

gen PDC4 (Pdc4); SPAC3G9. 11c

20

Los datos de las secuencias de genes PDC pueden obtenerse mediante la búsqueda del nombre del gen o el nombre de la cepa en las base de datos de genes de *S. pombe* antes mencionada.

25

En la *S. pombe* de tipo salvaje, la glucosa se metaboliza en ácido pirúvico por un sistema glucolítico, y por la piruvato descarboxilasa expresada a partir de los genes PDC descritos anteriormente, el ácido pirúvico se convierte en acetaldehído. A continuación, el acetaldehído se convierte en etanol por la alcohol deshidrogenasa, y de esta manera, se realiza la fermentación del etanol. Debido a que la *S. pombe* de tipo salvaje no tiene un gen de lactato deshidrogenasa en funcionamiento (un gen que codifica la lactato deshidrogenasa (LDH), en lo sucesivo, referido como un "gen de LDH" también), una ruta a través del cual se genera ácido láctico a partir de pirúvico ácido no está presente en la *S. pombe*.

30

En cambio, la LDH expresada a partir del gen de LDH incorporado genera ácido láctico mediante la reducción de ácido pirúvico en ácido láctico. Por consiguiente, simplemente mediante la incorporación del gen de LDH en la *S. pombe* de tipo salvaje a fin de permitir la producción de ácido láctico, se realizan la fermentación del etanol y la fermentación del ácido láctico, y por tanto la productividad de ácido láctico no aumenta suficientemente.

35

El transformante descrito en este documento tiene un cromosoma en el que algunos de los genes en un grupo de genes que codifican piruvato descarboxilasa se han eliminado o inactivado. Debido a la eliminación o inactivación de algunos de los genes en el grupo de genes PDC del transformante, la eficiencia de la fermentación de etanol del transformante se reduce, y la cantidad de ácido pirúvico a convertir en etanol disminuye. Por lo tanto, se mejora la productividad de ácido láctico. Aquí, si el grupo de genes PDC es totalmente eliminado o inactivado, la fermentación del etanol no se realiza en absoluto, y se inhibe el crecimiento del transformante. En consecuencia, sólo algunos de los genes en el grupo de genes de PDC deben ser eliminados o inactivados.

40

Los genes PDC para ser eliminados o inactivados son particularmente preferiblemente los genes PDC2. Los genes PDC1 son genes PDC que particularmente juegan un papel funcional clave.

45

Tal como se describió anteriormente, si todos los genes PDC son eliminados o inactivados, el transformante no realiza la fermentación del etanol, y por lo tanto se dificulta el crecimiento del transformante. Por lo tanto, la eliminación o inactivación de los genes PDC debe ser realizada manteniendo la capacidad de fermentación del etanol necesaria para el crecimiento a fin de obtener una cantidad suficiente de transformante y, simultáneamente, mediante la reducción de la capacidad de fermentación del etanol con el fin de mejorar la eficiencia de la fermentación de ácido láctico. Para llevar a cabo tal tarea, los inventores de la presente invención llevaron a cabo una investigación. Como resultado, encontraron que si los genes PDC2 se eliminan o inactivan, los genes PDC4 se activan en cierta medida, y la capacidad suficiente de fermentación de etanol para la obtención de una cantidad suficiente de transformante y la producción de ácido láctico con una alta eficiencia de fermentación se pueden lograr simultáneamente.

50

55

La eliminación o inactivación de los genes PDC puede realizarse mediante un proceso conocido. Por ejemplo, mediante el uso de un procedimiento Latour (descrito en el Journal of Nucleic Acids Res., 2006, Vol. 34, p. E11, Publicación Internacional PCT N° WO2007/063919, y similares), pueden eliminarse los genes PDC.

60

Además, mediante la introducción de una mutación en una porción de la secuencia de bases de los genes PDC mediante delección, inserción, sustitución, o adición, los genes PDC se pueden eliminar. La mutación a introducir puede ser sólo una de delección, inserción, sustitución y adición, o dos o más mutaciones de estas.

65

Como proceso para la introducción de la mutación en una porción de los genes PDC, se puede utilizar un proceso conocido.

Por ejemplo, se puede utilizar un procedimiento de separación por mutación usando un mutágeno ("Experimental Method of Yeast Molecular Genetics", 1996, Gakkai Shuppan Center) y un procedimiento de mutación al azar utilizando una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (la revista de PCR Methods Appl., 1992, Vol. 2, pp 28-33).

Los genes PDC que llevan la mutación introducida en una parte de los mismos pueden ser genes que expresan piruvato descarboxilasa de tipo mutante sensible a la temperatura. La piruvato descarboxilasa de tipo mutante sensible a la temperatura es una enzima que muestra actividad equivalente a la actividad piruvato descarboxilasa de tipo salvaje a una cierta temperatura de cultivo, pero experimenta la pérdida o deterioro de la actividad a una temperatura igual o superior a una temperatura específica del cultivo.

Una cepa mutante que expresa la piruvato descarboxilasa de tipo mutante se puede obtener al ser seleccionada de genes cuya velocidad de crecimiento es equivalente a la velocidad de crecimiento de la levadura de tipo salvaje en las condiciones en que la actividad no está limitada por la temperatura, pero se reduce considerablemente bajo condiciones específicas de temperatura en las que la actividad es limitada.

<Gen de LDH>

El transformante tal como se describe en el presente documento tiene un gen de LDH. Tal como se describió anteriormente, la *S. pombe* originalmente no tiene el gen de LDH. Por lo tanto, mediante la introducción del gen de LDH de un organismo vivo que no sea la *S. pombe* en la *S. pombe* a través de un proceso de ingeniería genética, se obtiene el transformante.

El transformante descrito en este documento tiene un gen de D-lactato deshidrogenasa (D-LDH) derivado de bacterias del género *Pediococcus* y un gen de D-LDH derivado de bacterias del género *Lactobacillus*. El transformante descrito en este documento no tiene sólo un gen de D-LDH, pero tiene al menos dos o más genes de D-LDH. Por lo tanto, la eficacia de la expresión del gen de D-LDH puede mejorarse, y a su vez se mejora la eficiencia de producción de ácido D-láctico. Además, debido a que se tienen los genes de D-LDH derivados de microorganismos específicos, en combinación, el transformante puede producir una mayor cantidad de ácido D-láctico.

El gen de D-LDH derivado de bacterias del género *Pediococcus* incluye un gen de D-LDH (de tipo salvaje) que las bacterias del género *Pediococcus* originalmente tienen, un gen mutante que se obtiene por la sustitución, inserción o delección de una o varias bases en el gen de D-LDH y codifica una proteína que tiene la actividad de D-LDH, un gen mutante que se obtiene por la sustitución, inserción o delección de una o varias bases de aminoácidos en D-LDH codificada por el gen de D-LDH y codifica una proteína que tiene la actividad de D-LDH, y un gen obtenido mediante la adición de una secuencia de bases que codifica otros péptidos y similares a la cara en dirección 5' o la dirección 3' del gen mencionado anteriormente. Lo mismo se aplica para el gen de D-LDH derivado de bacterias del género *Lactobacillus*.

Específicamente, los ejemplos de bacterias del género *Pediococcus* o D-LDH derivada de las bacterias incluyen D-LDH de *Pediococcus acidilactici* (PaDLDH) (número de acceso GenBank: CAA50275 1) y D-LDH de *Pediococcus pentosaceus* (PpDLDH) (número de acceso GenBank: ABJ67935 1). Ejemplos de D-LDH derivada de bacterias del género *Lactobacillus* incluyen D-LDH de *Lactobacillus pentosus* (LpDLDH) (número de acceso GenBank: BAA14352 1), el gen de D-LDH de *Lactobacillus bulgaricus* (LbDLDH) (número de acceso GenBank: CAA42781 1), y D-LDH de *Lactobacillus brevis* (LbrDLDH) (número de acceso GenBank: AFR11459 1). En este documento, GenBank es la base de datos del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI).

El transformante descrito en este documento tiene por lo menos un gen de D-LDH derivado de bacterias del género *Pediococcus* o al menos un gen de D-LDH derivado de bacterias del género *Lactobacillus*. Alternativamente, el transformante descrito en este documento tiene al menos un gen de D-LDH derivado de bacterias del género *Pediococcus* y al menos un gen de D-LDH derivado de bacterias del género *Lactobacillus*. El transformante descrito en este documento puede tener sólo un gen de D-LDH derivado de bacterias del género *Pediococcus* o dos o más de tales genes de D-LDH. En un caso en el que el transformante tiene dos o más de tales genes de D-LDH, los genes pueden ser cualquiera de los genes D-LDH derivados de los homólogos de bacterias del género *Pediococcus* o genes de D-LDH derivados de heterólogos de bacterias del género *Pediococcus*. Lo mismo se aplica para el gen de D-LDH derivado de las bacterias del género *Lactobacillus*.

[Producción de transformante]

El transformante tal como se describe en este documento se obtiene mediante un procedimiento en el que se utiliza *S. pombe*, en la que algunos de los genes en un grupo de genes PDC se han eliminado o inactivado, como huésped y se introducen un gen de D-LDH derivado de bacterias del género *Pediococcus* y un gen de D-LDH derivado de bacterias del género *Lactobacillus* en la *S. pombe* mediante un proceso de ingeniería genética. Además, es posible

obtener el transformante descrito en el presente documento mediante un procedimiento en el que se utiliza *S. pombe*, en la que un grupo de genes PDC no se han eliminado o inactivado, como huésped; se introducen un gen de D-LDH derivado de bacterias del género *Pediococcus* y un gen de D-LDH derivado de bacterias del género *Lactobacillus* en la *S. pombe* mediante un proceso de ingeniería genética a fin de obtener un transformante; y a continuación, algunos de los genes en un grupo de genes PDC del transformante obtenido se eliminan o inactivan. En los ejemplos que se describirán posteriormente, un transformante objetivo es producido mediante el proceso anterior. Sin embargo, mediante el último proceso, también se puede obtener un transformante casi equivalente al transformante anterior. En cualquiera de los procesos, el gen de D-LDH derivado de bacterias del género *Pediococcus* y el gen de D-LDH derivado de bacterias del género *Lactobacillus* pueden ser introducidos de forma secuencial (en órdenes diferentes) o se pueden introducir de forma simultánea.

De aquí en adelante, el proceso para la producción de un transformante se describirá ilustrando el proceso en el que se utiliza la *S. pombe*, en la que algunos de los genes en un grupo de genes PDC se han eliminado o inactivado, como huésped y se introducen un gen de D-LDH derivado de bacterias del género *Pediococcus* y un gen de D-LDH derivado de bacterias del género *Lactobacillus* en el huésped mediante un proceso de ingeniería genética.

<Huésped>

La *S. pombe* usada como huésped puede ser una de tipo salvaje o un tipo mutante en la que genes específicos se han eliminado o inactivado de acuerdo con el propósito. Como proceso para eliminar o inactivar los genes específicos, se puede utilizar un proceso conocido. Específicamente, mediante el uso de un procedimiento Latour (descrito en el *Journal of Nucleic Acids Res.*, 2006, Vol. 34, pág. E11, Publicación Internacional PCT N° WO2007/063919, y similares), se suprimen los genes. Además, mediante un procedimiento de separación por mutaciones usando un mutágeno ("*Experimental Method of Yeast Molecular Genetics*", 1996, Gakkai Shuppan Center), un procedimiento de mutación al azar utilizando una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (la revista de *PCR Methods Appl.*, 1992, Vol. 2, pág 28-33), y similares, se introduce una mutación en algunos de los genes, inactivando de este modo los genes. El huésped de levadura del género *Schizosaccharomyces* en el que se han eliminado o inactivado genes específicos se describe en, por ejemplo, la Publicación Internacional PCT N° WO2002/101038 y la Publicación Internacional PCT N° WO2007/015470.

La porción en la que se eliminan o se inactivan los genes específicos puede ser una porción del marco de lectura abierto (ORF) o una porción de la secuencia de control de expresión. Es particularmente preferible utilizar un proceso de delección o inactivación mediante un procedimiento de recombinación homóloga mediada por PCR (la revista de *Yeast*, 1998, Vol. 14, pág. 943-951) en el que la porción de ORF de un gen estructural es sustituido por un gen marcador.

Un transformante en el que genes PDC se han eliminado o inactivado se puede utilizar preferiblemente como un huésped para producir el transformante como se ha descrito en este documento. Además, la *S. pombe* en la que los genes PDC y genes específicos distintos de los genes PDC se han eliminado o inactivado también se puede utilizar como huésped. Mediante la eliminación o inactivación de un gen de proteasa y similares, la eficacia de la expresión de proteínas heterólogas puede mejorarse, y si se utiliza un huésped obtenido de esta manera como huésped, puede esperarse la mejora de la eficiencia de la producción de ácido D-láctico.

Como *S. pombe* usada como huésped, es preferible utilizar aquellas que tienen un marcador para la selección del transformante. Por ejemplo, es preferible utilizar un huésped que esencialmente requiere un componente nutricional específico para el crecimiento debido a la falta de ciertos genes. En un caso en el que se prepara un transformante por transformación usando un vector que incluye una secuencia de genes diana, si el gen carente (marcador auxotrófico complementario) se introduce de antemano en el vector, la auxotrofia del huésped desaparece en el transformante. Mediante la diferencia de auxotrofia entre el huésped y el transformante, es posible hacer una diferenciación entre un huésped y un transformante y obtener un transformante.

Por ejemplo, mediante el uso de *S. pombe* que convierte el uracilo auxotrófico debido a la eliminación o inactivación de un gen de la fosfato descarboxilasa de orotidina (gen *ura4*) como huésped, la realización de la transformación usando un vector que tiene un gen *ura4* (marcador auxotrófico complementario) y a continuación la selección de un transformante en el que la auxotrofia de uracilo ha desaparecido, se puede obtener un transformante en el que está incorporado el vector. El gen carente que hace que el huésped sea auxotrófico no se limita al gen *ura4* con tal de que se puede utilizar para la selección del transformante, y puede ser un gen de isopropilmalato deshidrogenasa (gen *leu1*) o similar.

Además, la *S. pombe*, en la que un grupo de genes PDC no se han eliminado o inactivado, se puede utilizar como huésped para producir un transformante. En este caso, como huésped, es posible utilizar un huésped en el que se ha eliminado o inactivado el gen mencionado anteriormente (un marcador auxotrófico, un gen de proteasa, o similares) que no sean los genes PDC. Mediante la producción de un transformante utilizando el huésped y a continuación, la eliminación o inactivación de algunos de los genes en un grupo de genes PDC del transformante obtenido, se puede obtener el transformante descrito en el presente documento.

## &lt;Proceso para la introducción del gen de D-LDH&gt;

Como proceso para introducir un gen de D-LDH en un huésped mediante un procedimiento de ingeniería genética, se puede utilizar un proceso conocido. Como proceso en el que se utiliza la *S. pombe* como huésped y se introducen genes estructurales de proteínas heterólogas en el huésped, por ejemplo, es posible utilizar los procesos descritos en la solicitud de patente japonesa no examinada, primera publicación N° H05-15380, la publicación Internacional PCT No. WO95/09914, la solicitud de patente japonesa no examinada, primera publicación n° H10-234375, la solicitud de patente japonesa no examinada, primera publicación n° 2000-262284, la solicitud de patente japonesa no examinada, primera publicación n° 2005-198612, la publicación internacional PCT N° WO2011/021629 y similares.

## &lt;Casete de expresión&gt;

Un casete de expresión es una combinación de ADN necesario para la expresión de una proteína deseada, e incluye un gen estructural que codifica la proteína deseada y un promotor y un terminador que funcionan en un huésped. Un casete de expresión usado para la producción del transformante, tal como se describe en este documento, incluye al menos un gen de D-LDH derivado de bacterias del género *Pediococcus* o un gen de D-LDH derivado de bacterias del género *Lactobacillus* y un promotor y un terminador que funcionan en la *S. pombe*. El casete de expresión puede incluir alguno o más dominios entre un dominio 5' no traducido y un dominio 3' no traducido. Además, el casete puede incluir el marcador auxotrófico complementaria mencionado anteriormente. En un solo casete puede estar presente una pluralidad de genes de D-LDH. El número de genes de D-LDH en un solo casete es preferiblemente de 1 a 8, y más preferiblemente de 1 a 5. En un caso en que se incluye una pluralidad de genes de D-LDH en un solo casete, el casete puede incluir dos o más tipos de genes de D-LDH. Como casete de expresión, es preferible un casete de expresión que incluya uno o más genes de D-LDH, un promotor, un terminador, un dominio 5' no traducido, un dominio 3' no traducido y un marcador auxotrófico complementario.

En la producción del transformante, tal como se describe en el presente documento, el gen de D-LDH derivado de bacterias del género *Pediococcus* y el gen de D-LDH derivado de las bacterias del género *Lactobacillus* se pueden introducir en el huésped mediante diferentes casetes de expresión o mediante un solo casete de expresión. Como casete de expresión que incluye el gen de D-LDH derivado de bacterias del género *Pediococcus* y el gen de D-LDH derivado de bacterias del género *Lactobacillus*, por ejemplo, es preferible un casete de expresión que incluye un promotor, el gen de D-LDH derivado de bacterias del género *Pediococcus*, una secuencia de escisión, un marcador auxotrófico complementario (por ejemplo, un gen *ura4*), el gen de D-LDH derivado de bacterias del género *Lactobacillus*, y un terminador en este orden desde el lado 5' terminal.

Como gen de D-LDH derivado de bacterias del género *Pediococcus* o el gen de D-LDH derivado de bacterias del género *Lactobacillus* que se incluyen en el casete de expresión, se puede usar un gen codificado por el tipo salvaje tal como es. Sin embargo, con el fin de aumentar la cantidad de expresión del gen en la *S. pombe* usada como huésped, la secuencia del gen del tipo salvaje puede modificarse en un codón utilizado a una frecuencia elevada en la *S. pombe*.

El promotor y el terminador que funcionan en la *S. pombe* deben ser capaces de mantener la expresión de LDH al actuar en el transformante incluso si el ácido D-láctico se acumula por el transformante, tal como se describe aquí, y por lo tanto el medio intracelular del transformante se vuelve ácido (pH igual o inferior a 6). Como promotor que funciona en la *S. pombe*, es posible utilizar un promotor (preferiblemente un promotor que tiene una alta actividad de iniciación de la transcripción) que la *S. pombe* tiene originalmente o un promotor (tal como un promotor derivado de un virus) que la *S. pombe* no tiene originalmente. En este documento, pueden estar presentes en un vector dos o más tipos de promotores.

Los ejemplos del promotor que la *S. pombe* tiene originalmente incluyen un promotor del gen de la alcohol deshidrogenasa, un promotor del gen *nmt1* implicado en el metabolismo de tiamina, promotor del gen de la fructosa-1,6-bisfosfatasa involucrado en el metabolismo de la glucosa, un promotor de gen de la invertasa involucrado en la represión de catabolito (véase la publicación Internacional PCT No. WO99/23223), un promotor del gen de proteína de choque térmico (véase la publicación Internacional PCT No. WO2007/26617) y similares.

Los ejemplos del promotor que la *S. pombe* no tiene originalmente incluyen promotores derivados de virus de células de animales, descritos en la solicitud de patente japonesa no examinada, primera publicación N° H05-15380, solicitud de patente japonesa no examinada, primera publicación n° H07-163373, y solicitud de patente japonesa no examinada, primera publicación No. H10-234375. Como tales promotores, son preferibles un promotor hCMV y un promotor SV40.

Como terminador que funciona en la *S. pombe*, es posible utilizar un terminador que la *S. pombe* originalmente tiene o un terminador que la *S. pombe* no tiene originalmente. En este documento, pueden estar presentes en un vector dos o más tipos de terminadores.

Los ejemplos del terminador incluyen terminadores derivados de seres humanos, que se describen en la solicitud de patente japonesa no examinada, primera publicación N° H05-15380, solicitud de patente japonesa no examinada, primera publicación n° H07-163373, y la solicitud de patente japonesa no examinada, primera publicación n° H10 - 234.375. Como tales terminadores, son preferibles los terminadores de la lipocortina I humana.

5

<Vector>

El transformante descrito en este documento tiene, en un cromosoma, un casete de expresión que incluye un gen de D-LDH derivado de bacterias del género *Pediococcus* y un gen de D-LDH derivado de bacterias del género *Lactobacillus*, o ambos de un casete de expresión que incluye un gen de D-LDH derivado de bacterias del género *Pediococcus* y un casete de expresión que incluye un gen de D-LDH derivado de bacterias del género *Lactobacillus*. Alternativamente, el transformante descrito en este documento tiene el casete antes mencionado como gen extracromosómico. Tener el casete de expresión en un cromosoma significa un estado en el que el casete de expresión se incorpora en uno o más sitios en un cromosoma de la célula huésped. Tener el casete como un gen extracromosómico significa un estado en el que el transformante tiene un plásmido que incluye el casete de expresión en una célula. El transformante que tiene cada casete de expresión se obtiene causando la transformación de la *S. pombe* como un huésped mediante el uso de un vector que incluye cada casete de expresión.

10

15

20

25

30

El vector que incluye cada casete de expresión se puede producir mediante la incorporación del casete de expresión en un vector que tiene una estructura de ADN cíclico o una estructura de ADN lineal. En un caso en el que se prepara un transformante en el que el casete de expresión se introduce como un gen extracromosómico en la célula huésped, el vector es preferiblemente un plásmido que incluye una secuencia que se replica en la célula huésped, es decir, una secuencia de replicación autónoma (ARS). En cambio, en un caso en el que se prepara un transformante en el que el casete de expresión se incorpora en un cromosoma de la célula huésped, el vector es preferiblemente un vector que tiene una estructura de ADN lineal, no tiene ARS, y se introduce en la célula huésped. Por ejemplo, el vector puede ser un vector que consiste en ADN lineal o un vector que tiene una estructura de ADN cíclico que tiene una secuencia de reconocimiento por enzimas de restricción para cortar y abrir el vector en el ADN lineal cuando es introducido en el huésped. En un caso en el que el vector es un plásmido que tiene ARS, se puede establecer una estructura de ADN lineal mediante la eliminación de la porción ARS o mediante la inactivación de la función de ARS escindiendo la porción ARS, y entonces el plásmido puede ser introducido en el huésped.

35

El vector que tiene cada casete de expresión tiene preferiblemente un marcador para la selección del transformante. Ejemplos del marcador incluyen un gen de fosfato descarboxilasa de orotidina (gen *ura4*) y un gen de deshidrogenasa isopropilmalato (gen *leu1*) que son marcadores auxotróficos complementarios.

40

Cada gen de D-LDH se introduce preferiblemente en un cromosoma de la *S. pombe*. Mediante la introducción del gen de D-LDH en el cromosoma, se obtiene un transformante excelente en la estabilidad del mantenimiento del paso. Además, se puede introducir una pluralidad de genes de D-LDH en el cromosoma. En el transformante descrito en este documento, el número de genes de D-LDH derivados de bacterias del género *Pediococcus* que se incorporan en el cromosoma es preferiblemente de 1 a 20 y particularmente preferiblemente de 1 a 8. Además, el número de genes D-LDH derivados de bacterias del género *Lactobacillus* que se incorporan en el cromosoma del transformante es preferiblemente de 1 a 20 y particularmente preferiblemente de 1 a 8.

45

Como proceso para introducir un gen de D-LDH en un cromosoma, se puede utilizar un proceso conocido. Por ejemplo, mediante el proceso descrito en la solicitud de patente japonesa no examinada, primera publicación n° 2000-262284, se puede introducir una pluralidad de genes de D-LDH en el cromosoma. Mediante el mismo proceso, se puede introducir un único gen de D-LDH en el cromosoma. Además, como se describirá más adelante, se pueden introducir un único gen de D-LDH o una pluralidad de genes de D-LDH en una pluralidad de sitios del cromosoma.

50

Como proceso para introducir el gen de D-LDH derivado de bacterias del género *Pediococcus* o el gen de D-LDH derivado de bacterias del género *Lactobacillus* en el cromosoma de la *S. pombe*, es preferible un proceso en el que el gen de D-LDH se introduce en el cromosoma mediante un procedimiento de recombinación homóloga mediante el uso de un vector que tiene un casete de expresión que tiene cada gen de D-LDH y un sitio de recombinación.

55

El sitio de recombinación del vector es un sitio que tiene una secuencia de bases que puede causar la recombinación homóloga con un sitio diana de la recombinación homóloga en un cromosoma de la *S. pombe*. El sitio diana es un sitio en el que el casete de expresión se incorpora en el cromosoma de la *S. pombe*. El sitio diana se puede ajustar libremente mediante el diseño de la secuencia de bases del sitio de recombinación del vector de modo que el sitio de recombinación puede causar la recombinación homóloga con el sitio diana.

60

La secuencia de bases del sitio de recombinación y la secuencia de bases del sitio diana necesitan compartir una identidad igual o mayor que 70%. Además, en vista de facilitar la aparición de recombinación homóloga, la identidad compartida entre la secuencia de bases del sitio de recombinación y la secuencia de bases del sitio diana es preferiblemente igual o mayor que 90%, y más preferiblemente igual o mayor que 95 %. Al utilizar el vector que tiene el sitio de recombinación descrito anteriormente, el casete de expresión se puede incorporar en el sitio diana a través de recombinación homóloga.

65

5 La longitud (número de bases) del sitio de recombinación es preferiblemente de 20 pb a 2000 pb. Si la longitud del sitio de recombinación es igual o mayor que 20 pb, se produce fácilmente la recombinación homóloga. Si la longitud del sitio de recombinación es igual o inferior a 2.000 pb, es fácil de prevenir un caso en el que el vector es demasiado largo y por lo tanto la recombinación homóloga no se produce fácilmente. La longitud del sitio de recombinación es más preferiblemente igual o mayor que 100 pb, e incluso más preferiblemente, igual o mayor que 200 pb. Además, la longitud del sitio de recombinación es más preferiblemente igual o inferior a 800 pb, y aún más preferiblemente, igual o inferior a 400 pb.

10 El vector puede tener otros dominios de ADN, además del casete de expresión y el sitio de recombinación sitio mencionados anteriormente. Los ejemplos de los dominios de ADN incluyen un dominio de iniciación de la replicación llamado "ori" que es necesario para la replicación en E. coli y un gen de resistencia a los antibióticos (un gen de resistencia a neomicina o similares). Estos son los genes necesarios generalmente en un caso en el que un vector se construye utilizando E. coli. Aquí, es preferible eliminar el dominio de iniciación de la replicación cuando el vector se incorpora en el cromosoma del huésped, tal como se describirá más tarde.

15 En un caso en el que se incorpora el gen de D-LDH en el cromosoma, el vector tiene preferiblemente una estructura de ADN lineal cuando se introduce en la célula de S. pombe. Es decir, en un caso en el que el vector es un vector que tiene una estructura de ADN cíclico, tal como ADN de plásmido que se utiliza generalmente, es preferible que el vector se introduzca en la célula de S. pombe después de ser cortado y abierto para convertirse en ADN lineal por una enzima de restricción.

20 En este caso, la posición en la que se corta y se abre el vector que tiene una estructura de ADN cíclico está en el sitio de recombinación. Como resultado, en cada uno de ambos extremos del vector cortado y abierto, el sitio de recombinación está parcialmente presente, y a través de la recombinación homóloga, la totalidad del vector se incorpora en el sitio diana del cromosoma.

25 Mientras se pueda establecer una estructura de ADN lineal para el vector de tal manera que una porción del sitio de recombinación está presente en cada uno de ambos extremos del mismo, se puede construir el vector mediante un procedimiento distinto del proceso de corte-abertura del vector que tiene una la estructura de ADN cíclico.

30 Como vector, por ejemplo, se pueden utilizar adecuadamente plásmidos derivados de E. coli, tales como pBR 322, pBR 325, pUC 118, pUC 119, pUC 18 y pUC 19.

35 En este caso, es preferible eliminar un dominio de iniciación de la replicación llamado "ori" necesario para la replicación en E. coli del vector plásmido utilizado para la recombinación homóloga del cromosoma de la S. pombe. De esta manera, cuando el vector se incorpora en el cromosoma, puede mejorarse la eficacia de incorporación.

40 El proceso para la construcción del vector del que se ha eliminado el dominio iniciación de la replicación no está particularmente limitado, pero es preferible utilizar el procedimiento descrito en la solicitud de patente japonesa no examinada, primera publicación nº 2000-262284. Es decir, es preferible utilizar un proceso de construcción por avanzado de un vector precursor en el que se inserta un dominio de iniciación de la replicación en un sitio de escisión en el sitio de recombinación, de manera que el vector tiene la estructura de ADN lineal descrita anteriormente y el dominio de iniciación de la replicación está cortado. Mediante el proceso, se puede obtener fácilmente un vector del que se ha eliminado un dominio de iniciación de la replicación.

45 Además, es también preferible utilizar un proceso en el que se construye un vector precursor que tiene un casete de expresión y un sitio de recombinación utilizando el vector de expresión descrito en la solicitud de patente japonesa no examinada, primera publicación Nº H05-15380, solicitud de patente japonesa no examinada, primera publicación No. H07-163373, la publicación Internacional PCT No. WO96/23890, la solicitud de patente japonesa no examinada, primera publicación nº H10-234375, y similares, o mediante el proceso de construcción del mismo, y se elimina un dominio de iniciación de la replicación del vector precursor mediante una técnica general de ingeniería genética a fin de obtener un vector utilizado para la recombinación homóloga.

50 <Sitio diana>

55 El sitio diana en el que se incorpora el vector puede estar presente en un solo sitio o dos o más sitios en el cromosoma de la S. pombe. En un caso en el que dos o más sitios diana están presentes, el vector se incorpora en los dos o más sitios del cromosoma de la S. pombe. En un caso en el que una pluralidad de genes de D-LDH están incluidos en un solo casete de expresión, se puede incorporar una pluralidad de genes de LDH en un sitio diana. Además, mediante el uso de dos o más tipos de vectores que tienen sitios de recombinación correspondientes a cada uno de los sitios diana, el casete de expresión puede incorporarse en dos o más sitios diana. Mediante este proceso, se puede incorporar una pluralidad de genes de LDH en el cromosoma de la S. pombe. Como resultado, se puede aumentar la cantidad de expresión de D-LDH y puede mejorarse la productividad del ácido D-láctico. Por ejemplo, mediante la incorporación de un casete de expresión que incluye un gen de D-LDH

derivado de bacterias del género *Pediococcus* en un vector que tiene un primer sitio diana, la incorporación de un casete de expresión que incluye un gen de D-LDH derivado de las bacterias del género *Lactobacillus* en un vector que tiene un segundo sitio diana, y la realización de la transformación mediante el uso de los vectores y *S. pombe* en que algunos de los genes en un grupo de genes PDC se han eliminado o inactivado como huésped, el tal como se describe en el presente documento se obtiene.

En un caso en el que se incorpora un casete de expresión en un sitio diana, por ejemplo, es posible utilizar el sitio diana que se muestra en el proceso descrito en la solicitud de patente japonesa no examinada, primera publicación nº 2000-262284. Si se utiliza el procedimiento anterior, también es posible incorporar vectores en diferentes sitios diana mediante el uso de dos o más tipos de vectores que tienen diferentes sitios de recombinación. Sin embargo, el proceso es complicado para la incorporación de vectores en dos o más sitios del cromosoma.

Siempre que una pluralidad de porciones presentes en un cromosoma y que tienen secuencias de bases sustancialmente iguales entre sí, puedan ser utilizadas como sitios diana, y un vector puede incorporarse en cada uno de la pluralidad de sitios diana, el vector se puede incorporar en dos o más sitios en el cromosoma mediante el uso de un tipo de vector. Las secuencias de bases sustancialmente iguales entre sí significan que las secuencias comparten una identidad igual o mayor que 90%. La identidad compartida entre los sitios diana es preferiblemente igual o mayor que 95%. La longitud de cada una de las secuencias de bases sustancialmente iguales entre sí es una longitud que incluye el sitio de recombinación del vector antes mencionado, que es preferiblemente igual o mayor que 1.000 pb. En un caso en el que los genes de LDH se incorporan en una pluralidad de sitios diana en un estado dispersado, incluso si el mismo número de genes de D-LDH se incorporan en los sitios diana, un fenómeno en el que los genes de D-LDH se separan todos en una vez del cromosoma cuando el transformante crece, se produce menos que en un caso en el que una pluralidad de genes de D-LDH se incorpora en un solo sitio diana. Por lo tanto, se mejora la estabilidad del mantenimiento del paso del transformante.

Como pluralidad de sitios diana presentes en el cromosoma, los genes transposón Tf2 son preferibles. Tf2 es un gen transposón presente en un total de 13 sitios en cada cromosoma de triple hebra (monoploide) de *S. pombe*. La longitud (número de bases) del mismo se sabe que es aproximadamente de 4.900 pb y la identidad de secuencia de bases compartida entre los genes de los mismos se sabe que es del 99,7% (ver los siguientes documentos).

Nathan J. Bowen et al, "Retrotransposons and Their Recognition of pol II Promoters: A Comprehensive Survey of the Transposable Elements from the Complete Genome Sequence of *Schizosaccharomyces pombe*", *Genome Res.* 2003 13: 1984-1997

Es posible incorporar un vector en sólo uno de los Tf2 presentes en 13 sitios en el cromosoma. En este caso, mediante la incorporación de un vector que tiene dos o más genes de D-LDH, puede obtenerse un transformante que tiene dos o más genes de D-LDH. Además, mediante la incorporación de un vector en Tf2 en dos o más sitios, puede obtenerse un transformante que tiene dos o más genes de D-LDH. En este caso, mediante la incorporación del vector que tiene dos o más genes de D-LDH, puede obtenerse un transformante que tiene más genes de D-LDH. Si un vector se incorpora en todos los 13 Tf2, puede imponerse demasiada carga sobre la supervivencia o el crecimiento del transformante. Por lo tanto, el vector se incorpora preferiblemente en 8 o menos de los 13 Tf2, y más preferiblemente se incorpora en 5 o menos Tf2.

<Proceso de transformación>

Como proceso de transformación, puede usarse cualquiera de los procesos de transformación conocidos. Ejemplos de los procesos de transformación incluyen los procedimientos conocidos en la técnica relacionada, tales como un procedimiento con acetato de litio, un procedimiento de electroporación, un procedimiento con esferoplastos y un procedimiento con perlas de vidrio, y el proceso descrito en la solicitud de patente japonesa no examinada, primera publicación nº 2005-198612. Además, pueden utilizarse kits de transformación de levaduras disponibles comercialmente.

Como proceso para transformar el huésped de *S. pombe* mediante un procedimiento de recombinación homóloga, se puede utilizar un procedimiento de recombinación homóloga conocido. Como proceso de transformación en el momento de producir el transformante tal como se describe en el presente documento, es preferible un proceso en el que se utiliza como huésped una *S. pombe* en la que algunos de los genes en un grupo de genes PDC descritos anteriormente se han eliminado o inactivado y se incorpora un casete de expresión en el cromosoma de la *S. pombe* a través de la recombinación homóloga utilizando el vector descrito anteriormente. Según este procedimiento, el transformante tal como se describe en el presente documento se puede producir de forma simple.

En el momento de producir el transformante, en general, después de llevar a cabo la recombinación homóloga, se selecciona el transformante obtenido. Como proceso de selección, por ejemplo, se puede utilizar el siguiente proceso. Mediante el uso de un medio que puede seleccionar el transformante por el marcador auxotrófico antes mencionado, se lleva a cabo un cribado, seleccionando de este modo una pluralidad de transformantes de la colonia obtenida. A continuación, cada uno de los transformantes se somete individualmente a un cultivo líquido. Después de esto, se investiga la cantidad de expresión de una proteína heteróloga (tal como se describe en este documento,

D-LDH derivada de las bacterias del género *Pediococcus* o D-LDH derivada de las bacterias del género *Lactobacillus*) en cada solución de cultivo y los transformantes que muestran una cantidad de expresión mayor de la proteína heteróloga son seleccionados. A través de un procedimiento de electroforesis en gel en campo de pulsos, se lleva a cabo el análisis genómico en los transformantes seleccionados, y de esta manera, se investiga el número de vectores o casetes de expresión incorporados en el cromosoma.

El número de vectores incorporados en el cromosoma se puede ajustar en cierta medida mediante el ajuste de las condiciones de incorporación o similares. Se considera que la eficacia de incorporación o el número de vectores incorporados puede variar con el tamaño (número de bases) o la estructura del vector.

Generalmente, cuanto mayor es el número de casetes de expresión, mayor es la eficacia de la expresión de D-LDH, y presumiblemente, esto puede conducir al aumento de la eficiencia de producción del ácido D-láctico. Por lo tanto, se considera que mediante la incorporación de una pluralidad de genes de D-LDH en el cromosoma de la *S. pombe*, se puede aumentar la cantidad de expresión de D-LDH y puede mejorar la productividad de ácido D-láctico. Sin embargo, se considera también que si el número de casetes de expresión es demasiado grande, la carga impuesta sobre la supervivencia o crecimiento de las células puede aumentar, y a su vez, la eficiencia de producción de ácido D-láctico puede reducirse. Por el contrario, mediante la inclusión de una pluralidad de genes en un solo casete de expresión, es posible reducir el número de casetes de expresión para incorporarse en el cromosoma e incorporar un gran número de genes de D-LDH en el cromosoma. Sin embargo, se considera que si se aumenta el tamaño del vector, se puede reducir la probabilidad de que el vector se incorpore en el cromosoma, el número de vectores a incorporar no se puede aumentar fácilmente y, por lo tanto, el transformante no se puede obtener fácilmente.

Por lo tanto, los inventores de la presente invención pensaron que incluso en el caso en el que un número relativamente pequeño de casetes de expresión que tienen un tamaño adecuado se incorporen en el cromosoma, con el fin de obtener un transformante de *S. pombe* que tiene una alta eficiencia de producción de ácido D-láctico, un gen de D-LDH exógeno, que está altamente expresado de forma eficaz en la *S. pombe* y da lugar a una alta actividad de la D-LDH expresado, necesita ser seleccionado e introducido en el cromosoma. Como resultado de la investigación de genes de D-LDH derivados de diversos microorganismos, los inventores encontraron que mediante la incorporación de un gen de D-LDH derivado de las bacterias del género *Pediococcus* o un gen de D-LDH derivado de bacterias del género *Lactobacillus* en un transformante de *S. pombe* en el que algunos de los genes en un grupo de genes PDC se han eliminado o inactivado, puede obtenerse un transformante que tiene una eficiencia de producción de ácido D-láctico extremadamente alta. Además, sorprendentemente, se encontró que en el caso donde ambos genes de D-LDH derivados de las bacterias del género *Pediococcus* y derivados de las bacterias del género *Lactobacillus* se incorporan en el transformante de *S. pombe*, se obtiene un transformante que tiene una eficiencia de producción de ácido D-láctico marcadamente mayor, que en un caso donde los genes de D-LDH derivados de otras especies de organismos vivos se incorporan en el transformante de *S. pombe* en combinación.

[Proceso para la producción de ácido láctico]

Un procedimiento para la producción de ácido láctico, tal como se describe en el presente documento, es un proceso de producción de ácido láctico, en el que el transformante, tal como se describe en el presente documento, se fermenta en una solución de fermentación, y se obtiene ácido D-láctico a partir de la solución de fermentación.

Mediante la fermentación del transformante, tal como se describe en el presente documento, en una solución de fermentación que contiene azúcar, el ácido pirúvico obtenido a partir del azúcar a través de un sistema glucolítico se reduce por la D-lactato deshidrogenasa, y se produce ácido D-láctico. Mediante la obtención del ácido D-láctico producido en la solución de fermentación a partir de la solución de fermentación, se puede producir ácido láctico.

Como medio de cultivo o medio de fermentación usado para la producción de ácido D-láctico, se puede utilizar un medio de cultivo conocido que contiene azúcar o medio de fermentación para la levadura. Además, el medio de cultivo o el medio de fermentación deben contener una fuente de nitrógeno, sales inorgánicas, y similares que la *S. pombe* puede utilizar y deben permitir que la *S. pombe* se cultive o fermente de forma adecuada. Como medio de cultivo o medio de fermentación, se puede utilizar un medio natural o un medio sintético.

Ejemplos del azúcar como fuente de carbono incluyen azúcares, tales como glucosa, fructosa, sacarosa y maltosa. Los ejemplos de la fuente de nitrógeno incluyen amoníaco, una sal de amonio de un ácido inorgánico u orgánico, tal como cloruro de amonio o acetato de amonio, peptona, ácido casamino, extracto de levadura, y similares. Ejemplos de las sales inorgánicas incluyen fosfato de magnesio, sulfato de magnesio, cloruro de sodio, y similares. También es posible añadir, además, un factor acelerador de la fermentación, tal como proteolípido.

En el proceso para la producción de ácido láctico, tal como se describe en el presente documento, es preferible utilizar un medio de fermentación particularmente que contiene glucosa o sacarosa como azúcar. La concentración de glucosa o de sacarosa en la solución de fermentación (100% en masa) en la etapa inicial de la fermentación es preferiblemente igual o mayor que 1% en masa, más preferiblemente de 1% en masa al 50% en masa, e incluso más preferiblemente, de 2% en masa al 16% en masa. Después de reducir la concentración de glucosa o la concentración de sacarosa debido a la fermentación, es preferible continuar la fermentación mediante la adición de

- glucosa o un medio de fermentación según sea necesario. En la etapa final de la fermentación, la concentración de glucosa o similares pueden llegar a ser igual a o menor que 1% en masa. En un caso en el que se realiza la fermentación continua en la que se fermenta el sobrenadante que contiene ácido D-láctico, se recoge continuamente desde el tanque de fermentación, y al mismo tiempo, se suministra el medio de fermentación, es preferible mantener la concentración de glucosa o similares. Si la concentración de glucosa se ajusta para ser igual o mayor que 2% en masa, la productividad de ácido D-láctico se mejora aún más. Por otra parte, si la concentración de glucosa o de sacarosa en la solución de fermentación se ajusta para que sea igual o menor que 16% en masa, la eficiencia de la producción de ácido D-láctico se mejora aún más.
- Con el fin de mejorar la productividad de la producción de ácido D-láctico, es preferible llevar a cabo la fermentación de alta densidad. Durante la fermentación de alta densidad, la concentración celular bacteriana inicial del transformante en la solución de fermentación, expresada en términos del peso de células bacterianas en seco, se establece preferiblemente para que sea de 0,1 g/l a 50 g/l. La concentración celular bacteriana inicial del transformante en la solución de fermentación, expresada en términos del peso de células bacterianas en seco, se establece más preferiblemente para que sea de 10 g/l a 40 g/l. Si la concentración celular bacteriana inicial se establece para que sea alta, se puede lograr una alta productividad en un período corto de tiempo. Además, si la concentración inicial de la célula bacteriana es demasiado alta, puede aparecer un problema, tal como la agregación de las células bacterianas o de la reducción de la eficiencia de purificación.
- La concentración de células bacterianas que se describe en los Ejemplos y similares, que se describirá más adelante, es un valor convertido de una absorbancia ( $DO_{660}$ ) de luz que tiene una longitud de onda de 660 nm medido por un espectrómetro visible-ultravioleta V550 fabricado por JASCO Corporation. El valor de 1 que es igual a  $DO_{660}$  a 660 nm corresponde a un peso seco de 0,2 g y un peso húmedo de 0,8 g de levadura de fisión en 1000 ml de una solución de cultivo.
- Para el cultivo o fermentación de la levadura, se puede utilizar un proceso conocido. Por ejemplo, se pueden utilizar un cultivo de agitación o fermentación de agitación o cultivo de mezcla o fermentación de mezcla.
- La temperatura de cultivo de la temperatura de fermentación es preferiblemente de 23°C a 37°C, y el tiempo de cultivo o el tiempo de fermentación se pueden determinar apropiadamente.
- El cultivo o la fermentación pueden ser un cultivo por lotes o fermentación por lotes o pueden ser un cultivo continuo o fermentación continua. Por ejemplo, después de llevar a cabo la fermentación mediante fermentación por lotes, mediante la separación de las células bacterianas de la solución de fermentación, se puede obtener un sobrenadante fermentado que contiene ácido D-láctico. Además, para el procedimiento de fermentación continua, por ejemplo, se puede usar un proceso en el que una porción de la solución de fermentación se saca del tanque de fermentación, el sobrenadante fermentado que contiene ácido D-láctico se separa y se recoge de la solución de fermentación tomada, mientras que la solución que contiene células bacterianas no separada se devuelve al tanque de fermentación, y se añade de nuevo glucosa o un medio de fermentación al tanque de fermentación. Mediante la realización de la fermentación continua, la productividad de ácido D-láctico se mejora aún más.
- En el proceso para la producción de ácido láctico utilizando el transformante descrito en este documento, se utiliza la *S. pombe* particularmente excelente en resistencia a ácido. Por lo tanto, incluso si se reduce el pH (a un pH de aproximadamente 2 a 4) debido a la acumulación de ácido láctico, el ácido D-láctico puede producirse sin realizar la neutralización. Por consiguiente, incluso después de que el pH de la solución de fermentación resulta igual a o menor que 3,5, es posible producir ácido D-láctico continuando adicionalmente la fermentación mediante fermentación continua o similar. El pH en la etapa final de la fermentación o el pH durante la fermentación continua es preferiblemente de 1,5 a 3,5, y particularmente preferiblemente de 2,3 a 3,5. Con el fin de mejorar la productividad de ácido D-láctico, es preferible continuar adicionalmente la fermentación después de que el pH de la solución de fermentación llega a ser igual a o menor que 3,5. El transformante, tal como se describe aquí, es excelente en resistencia a los ácidos. En consecuencia, es posible continuar la fermentación sin neutralizar el ácido D-láctico en la solución de fermentación que se produce por el transformante.
- El ácido D-láctico se puede obtener de la solución de fermentación mediante un proceso conocido. Particularmente, es preferible obtener el ácido D-láctico mediante su separación de la solución de fermentación sin neutralizar el ácido D-láctico en la solución de fermentación. Por ejemplo, es posible utilizar un proceso en el que las células bacterianas se separan mediante centrifugación de la solución de fermentación después del final de la fermentación, y el ácido D-láctico se extrae usando éter dietílico o acetato de etilo después de que el pH llegue a ser igual o menor que 1; un proceso en el que la solución de fermentación se absorbe sobre una resina de intercambio iónico y se lava, y a continuación se eluye el ácido D-láctico; un proceso en el que las impurezas se eliminan utilizando carbón activado; un proceso en el que se hace reaccionar la solución de fermentación con alcohol en presencia de un catalizador ácido y después se somete a destilación; y un procedimiento en el que el ácido D-láctico se separa usando una membrana de separación. Además, en algunos casos, mediante la neutralización de ácido D-láctico en la solución de fermentación y a continuación separando el lactato de la solución de fermentación, se puede obtener el ácido D-láctico. Por ejemplo, mediante un proceso de conversión de ácido D-láctico en la solución de fermentación

en una sal de calcio o una sal de litio y la cristalización de la sal neutralizada, también se puede obtener el ácido D-láctico.

El proceso para la producción de ácido láctico descrito anteriormente utiliza el transformante usando *S. pombe* particularmente excelente en resistencia a los ácidos como huésped. Por lo tanto, incluso si no se realiza la neutralización por un álcali, el ácido D-láctico puede producirse de manera simple con una alta productividad. Además, debido a que algunos de los genes en un grupo de genes PDC son eliminados o inactivados, la eficiencia de fermentación del etanol se reduce. En consecuencia, se mejora el rendimiento basado en azúcar (una proporción de la cantidad de ácido láctico producido con respecto a la cantidad de azúcar que se consume) del ácido D-láctico. Por ejemplo, el rendimiento basado en azúcar del ácido D-láctico fácilmente puede llegar a ser igual o mayor que 50%. En algunos casos, el rendimiento basado en azúcar del ácido D-láctico llega a ser igual o mayor que 70%. Además, el proceso para la producción de ácido láctico descrito en este documento también es adecuado para la fermentación de alta densidad que se realiza en presencia de glucosa de alta concentración mediante el uso de un transformante de alta concentración.

Ejemplos

En lo sucesivo, la presente invención se describirá específicamente ilustrando ejemplos y ejemplos comparativos, pero la presente invención no está limitada a la siguiente descripción. En los presentes ejemplos, a menos que se especifique lo contrario, "%" significa "% en masa". Además, en los siguientes ejemplos, a menos que se especifique lo contrario, el ácido D-láctico se hará referencia simplemente como "ácido láctico" también.

[Ejemplo 1]

<Preparación de la cepa de *S. pombe* con delección del gen PDC2>

Se transformó una cepa ARC010 auxotrófica de uracilo de *S. pombe* (genotipo: h-, leu1-32, y ura4-D18) (véase la Publicación Internacional PCT No. WO2007/015470) de acuerdo con un procedimiento Latour (descrito en el Journal of Nucleic Acids Res., 2006, Vol 34, p. e11, publicación Internacional PCT N° WO2007/063919, y similares), preparando de este modo una cepa de delección (cepa IGF543) de la que se eliminaron los genes PDC2 (nombre de la cepa: SPAC1F8.07c).

Para la preparación de un fragmento de delección, el ADN genómico total preparado a partir de una cepa ARC032 de *S. pombe* (genotipo: h-) (véase la Publicación Internacional PCT No. WO2007/015470) utilizando DNeasy (fabricado por QUIAGEN) se utilizó como una plantilla, y se han usado 8 tipos de oligo ADN sintéticos (fabricados por Operon Biotechnologies) que tiene las secuencias de bases mostradas.

[Tabla 1]

Oligo ADN para preparar el fragmento de delección pdc2		
Oligo ADN	Secuencia de bases	SEQ ID NO.
UF	5'-CTCTCCAGCTCCATCCATAAG-3'	1
UR	5'-GACACAACCTTCTACCAAAAAGCCTTTCTGCCCATGTTTTCTGT C-3'	2
OF	5'-GCTTTTTGGTAGGAAGTTGTGTC-3'	3
OR	5'-AGTGGCATTGTAGCTAAGCTGTATCCATTCAGCCGTTTGTG- 3'	4
Df	5'-AAGTTTCGTCAATATCACAAGCTGACAGAAAACATGGGCAGAAA G-3'	5
Dr	5'-GTTCCCTTAGAAAAAGCAACTTTGG-3'	6
FF	5'-CATAAGCTTGCCACCACTTC-3'	7
FR	5'-GAAAAGCAACTTTGGTATTCTGC-3'	8

Específicamente, mediante un procedimiento PCR utilizando KOD-Dash (fabricado por TOYOBO CO., LTD.), se preparó un dominio UP usando UF y UR, y un dominio OL se preparó usando OF y OR, y un dominio DN se preparó usando DF y DR. A continuación, mediante el uso de estos como plantillas, se preparó un fragmento de delección de longitud completa mediante el mismo procedimiento de PCR usando FF y FR, respectivamente. En el momento de la preparación del fragmento de delección de longitud completa, se utilizaron 2 tipos de oligo ADN sintéticos (fabricados por Operon Biotechnologie) que tiene las secuencias de bases mostradas en la Tabla 2, y el ADN genómico total preparado a partir de la cepa ARC032 de la misma manera fue usado como una plantilla. Además, el fragmento de un dominio de un marcador auxotrófico uracilo ura4 de *S. pombe* (nombre de cepa indicada en GeneDB: SPCC330.05c, gen de orotidina-5'-fosfato descarboxilasa), preparado mediante el mismo procedimiento de PCR, también se usó en combinación como plantilla.

[Tabla 2]

Oligo ADN para preparar un fragmento de ura4		
Oligo ADN	Secuencia de bases	SEQ ID NO.
F	5'-AGCTTAGCTACAAATCCCCT-3'	9
R	5'-AGCTTGTGATATTGACGAAACTT-3'	10

La cepa de delección del gen PDC2 de *S. pombe* (una cepa IGF543, h-, leu1-32, ura4-D18, y pdc2-D23) tenía una velocidad de crecimiento lento. Por lo tanto, a fin de restablecer la velocidad de crecimiento, la cepa IGF543 se sembró en una placa YES (0,5% de extracto de levadura, 3% de glucosa y los suplementos SP) y se cultivó a 25°C, y la colonia obtenida se sembró en un medio YPD (1% de extracto de levadura, 2% de peptona y 2% de glucosa) y después se cultivó a 25°C. A continuación, mediante el uso de la solución de cultivo que contenía células completamente desarrolladas, se preparó una solución madre de glicerol y se almacenó a -80°C. Repitiendo la operación anterior hasta obtener una velocidad de crecimiento adecuada, se preparó una cepa cuya velocidad de crecimiento se restauró (nombrada IGF543).

[Ejemplo 2]

<Preparación de la cepa introducción de copia única del gen de LDH de *S. pombe*>

Se prepararon transformantes de *S. pombe* (Tabla 13) en los que se introdujeron un gen de PaDLDH, un gen de PpDLDH, un gen de LbDLDH, un gen de LbrDLDH, un gen de LpDLDH, un gen de D-LDH de *Lactobacillus fermentum* (gen de LfDLDH) (número de acceso GenBank: BAG28106. 1.), un gen de D-LDH de *Lactobacillus casei* (gen de LcDLDH) (número de acceso Gen Bank: CAQ67405.1), un gen de D-LDH de *Lactobacillus plantarum* (gen de LpDLDH) (número de acceso GenBank: CCC79301 1.), un gen de D-LDH de *Staphylococcus aureus* (gen de SaDLDH) (número de acceso GenBank. BAB96309 1.), o un gen de D-LDH de *Leuconostoc mesenteroides* (gen de LmDLDH) (número de acceso GenBank ABJ62843 1).

Específicamente, de acuerdo con el proceso de Bahler et al (la revista de *Yeast*, 1998, Vol. 14, pág. 943-951), la cepa IGF543 (cepa de eliminación de gen de *S. pombe*) preparada en el Ejemplo 1, se transformó utilizando un digesto de una enzima de restricción BsiWI de un vector recombinante integrador monodentado pSLh-PaDLDH que retenía un casete de expresión del gen de PaDLDH, un vector recombinante integrador monodentado pSLh-PpDLDH que retenía un casete de expresión del gen de PpDLDH, un vector recombinante integrador monodentado pSLh-LbDLDH que retenía un casete de expresión del gen de LbDLDH, un vector recombinante integrador monodentado pSLh-LbrDLDH que retenía un casete de expresión del gen de LbrDLDH, un vector recombinante integrador monodentado pSLh-LpDLDH que retenía un casete de expresión del gen de LpDLDH, un vector recombinante integrador monodentado pSLh-LfDLDH que retenía un casete de expresión del gen de LfDLDH, un vector recombinante integrador monodentado pSLh-LcDLDH que retenía un casete de expresión del gen de LcDLDH, un vector recombinante integrador monodentado pSLh-LpDLDH que retenía un casete de expresión del gen de LpDLDH, un vector recombinante integrador monodentado pSE-SaDLDH que retenía un casete de expresión del gen de SaDLDH o un vector recombinante integrador monodentado pSE-LmDLDH que retenía un casete de expresión del gen de LmDLDH.

El vector recombinante integrador monodentado pSE se preparó mediante el siguiente proceso. Es decir, primero, a través de la ligación, un fragmento de ADN obtenido por doble digestión de un vector integrador pTL2M5 (ver PTL 1) para la levadura de fisión por enzimas de restricción AflIII y XbaI se conectó a un fragmento ura4-ORF amplificado por PCR utilizando genoma de *S. pombe* como plantilla y un conjunto de cebadores representados por la SEQ ID NOS: 11 y 12, obteniendo de este modo un vector pTL2M5-ura4. A continuación, a través de la ligación, un fragmento de ADN que se obtuvo mediante la digestión de pTL2M5-ura con una enzima de restricción Bst1107I se conectó a un fragmento de ADN de SEQ ID NO: 13, que incluye secuencias de reconocimiento de enzimas de restricción totalmente sintéticas PmeI y PMAcI, obteniendo de este modo un vector pRU. A partir de entonces, a través de la ligación, un fragmento que se obtuvo mediante la digestión del vector pRU obtenido con una enzima de restricción PmeI se conectó a un fragmento obtenido por la digestión de un fragmento de ef1-DW que se amplificó por medio de PCR utilizando el genoma de *S. pombe* como plantilla y un conjunto de cebadores representados por las SEQ ID NOS: 14 y 15 con una enzima de restricción PmeI, obteniendo de este modo un vector pRU-efd. Posteriormente, a través de la ligación, un fragmento que se obtuvo mediante la digestión del vector pRU-efd obtenido con una enzima de restricción SpeI se conectó a un fragmento obtenido por la digestión de un fragmento de ef1-UP que se amplificó por medio de PCR utilizando el genoma de *S. pombe* como una plantilla y un conjunto de cebadores representados por la SEQ ID NOS: 6 y 17 con una enzima de restricción NheI, preparando de este modo un vector pSE (7.180 pb, figura 1) que tiene una secuencia (5' → 3', cíclico) representada por SEQ ID NO: 18.

Un vector recombinante integrador monodentado pSLh se preparó mediante el siguiente proceso. Es decir, primero, mediante el uso de un vector que se preparó mediante síntesis total de ADN e incluye una secuencia Y1 representada por SEQ ID NO: 19 como plantilla y un conjunto de cebadores representados por la SEQ ID NOS: 20 y 21, se llevó a cabo una reacción de PCR y el producto de PCR amplificado se sometió a doble digestión utilizando las enzimas de restricción KpnI y SnaBI, obteniendo de este modo un fragmento de ADN. A través de la ligación, el fragmento de ADN se conectó a un fragmento que se obtuvo mediante la digestión de un vector pSL1 con una

enzima de restricción BsiWI y un fragmento de ADN obtenido mediante la digestión de un producto de PCR que se obtuvo mediante una reacción de PCR mediante el uso de un vector pSL6 como plantilla y un conjunto de cebadores representados por la SEQ ID NOS: 22 y 23 con una enzima de restricción BsiWI y a continuación mediante la doble digestión del digesto obtenido con enzimas de restricción KpnI y SnaBI. De esta manera, se preparó pSLh (5936 pb, Figura 2) que tiene una secuencia (5' → 3', cíclica) representada por la SEQ ID NO: 24.

pSLh-PaDLDH se preparó mediante el siguiente proceso. Es decir, primero, mediante el uso de ADN genómico total preparado por DNeasy (fabricado por QUIAGEN) a partir del cultivo de una cepa NBRC 3076 de *Pediococcus acidilactici* (obtenida de NBRC (Biological Resource Center, NITE)) como plantilla y usando dos tipos de oligo ADN sintéticos (PaDLDH-F y PaDLDH-R, fabricados por Operon Biotechnologies) descritos en la Tabla 3, se obtuvo un fragmento ORF de un gen de PaDLDH mediante un procedimiento PCR utilizando KOD-Dash (fabricado por TOYOBO CO., LTD.). El fragmento de ORF codificó PaDLDH (SEQ ID NO: 27).

[Tabla 3]

	Secuencia	SEQ ID NO.
PaDLDH-F	gacacttttttcaaaCATGAAGATTATTGCTTATGGAATTCGTGAC	25
PaDLDH-R	atcatcatcatccttgtaateCTCAAACCTTAACCTCATTCTTTGAAGAATTCTTTTC	26
PaDLDH	MKIIAYGIRDDEKPYLDEWVTKNHIEVKAVPDLLDSSNIDLAKDYDGVVAYQQKPYTADLFDKMHEFGIHAFLSRNVGLDNVPADALKKNDIKISNVPAYS PRAIAELSVTQLLALLRKIPEFEYKMAHGDIRWEPDIGLELNQMTVGVI GTGRIGRAAIDIFKPF GAKVIAYDVF RNPALKEGMYVD TLEELYQOANVITLHVPALKDNYHMLDEKAF GQM QDGTFILNFARGTLVDTPALLKALDSGKVAGAALD TYENEV GIVD VDHGDQPIDDPVFN DLMSRRNVMITPHAAFYTRPAVKNMV QIALDNNRDLIEKNSSKNEVKFE	27

Mediante el uso de un kit de clonación HD Inn-Fusion (marca registrada) (fabricado por Clontech Laboratories, Inc.), el fragmento amplificado obtenido se incorporó en pSLh, preparando de este modo pSLh-PaDLDH. El procedimiento de In-Fusion se realizó de acuerdo al manual incluido en el kit. Es decir, el producto de PCR obtenido se purificó usando una columna de centrifugación, se añadió a una solución de reacción In-Fusion junto con pSLh, y se hizo reaccionar durante 15 minutos a 50°C.

pSLh-PpDLDH se preparó mediante el siguiente proceso. Es decir, primero, mediante el uso de ADN genómico total preparado por DNeasy (fabricado por QUIAGEN) a partir del cultivo de una cepa NBRC 107768 de *Pediococcus pentosaceus* (obtenida de NBRC) como plantilla y usando dos tipos de oligo ADN sintético (PpDLDH-F y PpDLDH-R, fabricados por Operon Biotechnologies) descritos en la Tabla 4, se obtuvo un fragmento ORF de un gen de PpDLDH mediante un procedimiento PCR utilizando KOD-Dash (fabricado por TOYOBO CO., LTD.). El fragmento de ORF codificó PaDLDH (SEQ ID NO: 30).

[Tabla 4]

	Secuencia	SEQ ID NO.
PpDLDH-F	CACTTTTTCAAACATGAAAATTATTGCTTATGGCATTTCGAGATG	28
PpDLDH-R	atcatcatcatccttgtaateGTCAAACCTTAACCTCATTCTTTTCAGCAC	29
PpDLDH	MKIIAYGIRDDEKTYLEEWVKDNKIEVKAVSEL LDSNTIEQAKGYDGVVAYQQKPYTD DDLFDKMNEFGIHAFLSRNVGVDNVPVEALKRNNIKITNVPAYS PMAIAELSVTQLLALIRRIPEF DAKMARGDFRWE PDIALELNQMTVGVI GTGRIGRAAINIFKGF GAKVIAYDVF RNSELEKEGIYVDSLEELYRQVDVITLHVPALKDNYHMLNDEAF AQMH DGVFVLNFARGSLIDTKALLKALDSGKVAGAALD TYEDEVGVFDVDHQNDPINDPVFN DLYSRRNVKITPHAAFYTKPAVKNMV QIALENNKALIEKGAAKNEVKFD	30

El fragmento amplificado obtenido se incorporó en pSLh mediante un procedimiento In-Fusion, obteniendo de este modo pSLh-PpDLDH. El procedimiento In-Fusion se realizó de la misma manera que se utiliza para la preparación de pSLh-PaDLDH.

- 5 pSLh-LbDLDH se preparó mediante el siguiente proceso. Es decir, primero, mediante el uso de ADN genómico total preparado por DNeasy (fabricado por QUIAGEN) a partir del cultivo de una cepa NBRC 13953 de *Lactobacillus bulgaricus* (obtenida de NBRC) como plantilla y usando dos tipos de oligo ADN sintético (LbDLDH-F y LbDLDH-R, fabricados por Operon Biotechnologies) descritos en la Tabla 5, se obtuvo un fragmento ORF de un gen de LbDLDH mediante un procedimiento PCR utilizando KOD-Dash (fabricado por TOYOBO CO., LTD.). El fragmento de ORF  
 10 codificó LbDLDH (SEQ ID NO: 33).

[Tabla 5]

	Secuencia	SEQ ID NO.
LbDLDH-F	gacactttttcaaacATGACTAAAATTTTGCTTACGCAATTCG	31
LbDLDH-R	gaaatcaacttttgGCCAACCTTAACTGGAGTTTCAGC	32
LbDLDH	MTKIFAYAIREDEKPFLEKWEDEAHKDVEVEYTDKLLTPETAALA KGADGVVVYQQLDYTAETLQALADNGITKMSLRNVGVDNIDMAK AKELGFQITNVPVYSPNAIAEHAAIQAARILRQAKAMDEKVARH DLRWAPTIGREVRDQVVGVTGHIGQVFMQIMEGFGAKVIAYD IFRNPELEKKGYYVDSLDDLYKQADVLSLHVDPVPANVHMINDK SIAKMKQDVVIVNVSRRGPLVDTDAVIRGLDSGKVFYGYAMDVYEG EVGVFNEDREGKEFPDARLADLIARPNVLVTPHTAFYTTHAVRN MVVKAFDNNLELVEGKEAETPVKVG	33

- 15 El fragmento amplificado obtenido se incorporó en pSLh mediante un procedimiento In-Fusion, obteniendo de este modo pSLh-LbDLDH. El procedimiento In-Fusion se realizó de la misma manera que se utiliza para la preparación de pSLh-PaDLDH.

- 20 pSLh-LbrDLDH se preparó mediante el siguiente proceso. Es decir, primero, mediante el uso de ADN genómico total preparado por DNeasy (fabricado por QUIAGEN) a partir del cultivo de una cepa NBRC 107147 de *Lactobacillus brevis* (obtenida de NBRC) como plantilla y usando dos tipos de oligo ADN sintético (LbrDLDH-F y LbrDLDH-R, fabricados por Operon Biotechnologies) descritos en la Tabla 6, se obtuvo un fragmento ORF de un gen de LbrDLDH mediante un procedimiento PCR utilizando KOD-Dash (fabricado por TOYOBO CO., LTD.). El fragmento de ORF  
 25 codificó LbrDLDH (SEQ ID NO: 36).

[Tabla 6]

	Secuencia	SEQ ID NO.
LbrDLDH-F	GACACTTTTTCAAAcATGAAAATTATTGCTTATGGCATTTCGTG AC	34
LbrDLDH-R	atcatcatcatccttgtaatcGTCGAACGAGACTTCGTTTTCA GC	35
LbrDLDH	MKI IAYGIRDDEQPYLEQWSKQOGIEVKAVAELLDEQTVDLAK GYDGAVVYQKPYTAAVLDQLAANGVTNLSLRNVGVDNVNADA VKRNGFKVTNVPAYSPAIAELTQVMRLRRPTPTFDRKQAO GDLTWAPDIADELNQMTVGIVATGRIGRAAMRIYQGFAGKVI YDVFHNPELEKQGIYVDTLDEL YAQADVLSLHAPATKDNHML DDAAFKMKDGVWILNPARGALIDTALILALDSGKVAGAAALD VYEDEVGIFNADEFKNFDAIPDERLKNLMKRENVLVTPHIAFYT KTAVKNMVQFALNNNKQLIETGRAENEVSFD	36

- 30 El fragmento amplificado obtenido se incorporó en pSLh mediante un procedimiento In-Fusion, obteniendo de este modo pSLh-LbDLDH. El procedimiento In-Fusion se realizó de la misma manera que se utiliza para la preparación de pSLh-PaDLDH.

- 35 pSLh-LpDLDH se preparó mediante el siguiente proceso. Es decir, primero, mediante el uso de ADN genómico total preparado por DNeasy (fabricado por QUIAGEN) a partir del cultivo de una cepa NBRC 106467 de *Lactobacillus pentosus* (obtenida de NBRC) como plantilla y usando dos tipos de oligo ADN sintético (LpDLDH-F y LpDLDH-R,

fabricados por Operon Biotechnologies) descritos en la Tabla 7, se obtuvo un fragmento ORF de un gen de LpDLDH mediante un procedimiento PCR utilizando KOD-Dash (fabricado por TOYOBO CO., LTD.). El fragmento de ORF codificó LpDLDH (SEQ ID NO: 39).

5

[Tabla 7]

	Secuencia	SEQ ID NO.
LpDLDH-F	gacactttttcaaacATGAAAATTATTGCATATGCTGTACGTG ATG	37
LpDLDH-R	atcatcatcatccttgtaateGTCAAACCTTAAGTTGCGTGTCA GC	38
LpDLDH	MKI IAYAVRDDRPF FDTWMKENPDVEVKLVPELLTEDNVDLA KGF DGADV YQQKDYTA EVLNKLAD EGVKNISLRNVGVDNLDVP TVKARGLNISNVPAYS PNAIAELSVTQLMQLLRQTPMFNKKLA KQDFRWAPDIAKELNTMTVGVIGTGRIGRAAIDIFKGF GAKVI GYDVYRNAELEKEGMYVDTLDELYAQADVITLHVPALKDNYHM LNADAFSKMKDGAYILNFARGTLIDSEDLIKALDSGKVAGAAL VTY EYETKIFNKDLEGQTI DDKVFMNLFNRDNVLI TPHTAFYT ETAVHNMVH VSMNSNKQFIETGKADTQVKFD	39

El fragmento amplificado obtenido se incorporó en pSLh mediante un procedimiento In-Fusion, obteniendo de este modo pSLh-LpDLDH. El procedimiento In-Fusion se realizó de la misma manera que se utiliza para la preparación de pSLh-PaDLDH.

10

pSLh-LfDLDH se preparó mediante el siguiente proceso. Es decir, primero, mediante el uso de ADN genómico total preparado por DNeasy (fabricado por QUIAGEN) a partir del cultivo de una cepa NBRC 3956 de Lactobacillus fermentum (obtenida de NBRC) como plantilla y usando dos tipos de oligo ADN sintético (LfDLDH-F y LfDLDH-R, fabricados por Operon Biotechnologies) descritos en la Tabla 8, se obtuvo un fragmento ORF de un gen de LfDLDH mediante un procedimiento PCR utilizando KOD-Dash (fabricado por TOYOBO CO., LTD.). El fragmento de ORF codificó LfDLDH (SEQ ID NO: 42).

15

[Tabla 8]

20

	Secuencia	SEQ ID NO.
LfDLDH-F	GACACTTTTTCAAACATGGCAAAAATTTACGCATACGGAATC	40
LfDLDH-R	atcatcatcatccttgtaateACCAACCTTAAGTTGGGGTTTCA G	41
LfDLDH	MAKIYAYGIRKDEEPYLN EWAKNHADVTVDYTAELLTPETAAQ AAGADGVVVYQQLDYTAETLQALADQGVTKMSLRNVGIDNIDM AKAKELGFEITNVPVYSPNAIAEHAAIQTARILRQSKKLDKKI ENGLRWAPTIGREVRDQVVGVTGHIQVFMQIMEGFGAKV IAYDVFKDPELEKKGYYVSLDEIYAQADVISLHVPAL ESTIHM INDETI AKMKDDAVLVNVS RGPLVD TDAVIRALDSGKLF GPFVM DTYEDEVGIFNEDWQKKEFPDARLNDLIHRDNVLT PHTAFYT THAVRNMVLKAFDNNLALVKGEETPVPKVG	42

El fragmento amplificado obtenido se incorporó en pSLh mediante un procedimiento In-Fusion, obteniendo de este modo pSLh-LfDLDH. El procedimiento In-Fusion se realizó de la misma manera que se utiliza para la preparación de pSLh-PaDLDH.

25

pSLh-LpIDLHDH se preparó mediante el siguiente proceso. Es decir, primero, mediante el uso de ADN genómico total preparado por DNeasy (fabricado por QUIAGEN) a partir del cultivo de una cepa NBRC 15891 de Lactobacillus plantarum (obtenida de NBRC) como plantilla y usando dos tipos de oligo ADN sintético (LpIDLHDH-F y LpIDLHDH-R, fabricados por Operon Biotechnologies) descritos en la Tabla 9, se obtuvo un fragmento ORF de un gen de LpIDLHDH

mediante un procedimiento PCR utilizando KOD-Dash (fabricado por TOYOBO CO., LTD.). El fragmento de ORF codificó LpIDLHDH (SEQ ID NO: 45).

[Tabla 9]

	Secuencia	SEQ ID NO.
LpIDLHDH-F	gacacttttttcaaacATGAAAATTATTGCATATGCTGTACGTG ATG	43
LpIDLHDH-R	atcatcatcatccttgtaatcGTCAAACCTAACTTGCCTATCA GCTTTAC	44
LpIDLHDH	MKIIAYAVRDERPFFDTWMKENPDVEVKLVPELLTEDNVDLA KGFDFGADVQQKDYTAEVLNKLADGKVNISLRNVGVDNLDVP TVKARGLNISNVPAYSPNAIAELSVTQLMQLLRQTPLFNKKLA KQDFRWAPDIAKELNMTVGVIGTGRIGRAADIFKGFAGAKVI GYDVYRNAELEKEGMYVDTLDELVAQADVITLHVPALKDNYHM LNADAFSKMKDGAYILNFARGTLIDSEDLIKALDSGKVAGAAL DTYEYETKIFNKDLEGQTIIDKVFMNLFNRDNVLI TPHTAFYT ETAVHNMVHVSMNSNKQFIETGKADTQVKFD	45

El fragmento amplificado obtenido se incorporó en pSLh mediante un procedimiento In-Fusion, obteniendo de este modo pSLh-LpIDLHDH. El procedimiento In-Fusion se realizó de la misma manera que se utiliza para la preparación de pSLh-PaDLHDH.

pSLh-LcDLHDH se preparó mediante el siguiente proceso. Es decir, primero, mediante el uso de ADN genómico total preparado por DNeasy (fabricado por QUIAGEN) a partir del cultivo de una cepa NBRC 15883 de Lactobacillus casei (obtenida de NBRC) como plantilla y usando dos tipos de oligo ADN sintético (LcDLHDH-F y LcDLHDH-R, fabricados por Operon Biotechnologies) descritos en la Tabla 10, se obtuvo un fragmento ORF de un gen de LcDLHDH mediante un procedimiento PCR utilizando KOD-Dash (fabricado por TOYOBO CO., LTD.). El fragmento de ORF codificó LcDLHDH (SEQ ID NO: 48).

[Tabla 10]

	Secuencia	SEQ ID NO.
LcDLHDH-F	GACACTTTTTCAAACATGAAGATCATTGCCTACGGTGC	46
LcDLHDH-R	atcatcatcatccttgtaatcCTTGGCGGGACCGGTGA	47
LcDLHDH	MKIIAYGARVDEIQYFKQWAKDTGNTLEYHTEFLDENTVEWAK GFDGINSLOTTTPYAAGVFEKMHAYGIKFLTIRNVGTDNIDMTA MKQYGIKRLSNVPAYSPAAIAEFALTDTLYLRLNMGKVQAQLQA GDYEKAGTFIKGKELGQQTGVGMGTGHIGQVAIKLFGFGAKVI AYDPYPMKGDHPDFDYVSLEDLFDKQSDIIDLHVPGIEQNTHTII NEAAFNLMPKGAIVINTARPNLIDTQAMLSNLKSGKLAGVGD TYEYETEDLLNLAKHGSFKDPLWDELLGMPNVVLSPHIAYYTE TAVHNMVYFSLQHLVDFLTKGETSTEVTGPA	48

El fragmento amplificado obtenido se incorporó en pSLh mediante un procedimiento In-Fusion, obteniendo de este modo pSLh-LcDLHDH. El procedimiento In-Fusion se realizó de la misma manera que se utiliza para la preparación de pSLh-PaDLHDH.

pSE-SaDLHDH se preparó mediante el siguiente proceso. Es decir, primero, mediante el uso de ADN genómico total preparado por DNeasy (fabricado por QUIAGEN) a partir del cultivo de una cepa NBRC 102135 de Staphylococcus aureus (obtenida de NBRC) como plantilla y usando dos tipos de oligo ADN sintético (SaDLHDH-F y SaDLHDH-R, fabricados por Operon Biotechnologies) descritos en la Tabla 11, se obtuvo un fragmento ORF de un gen de SaDLHDH mediante un procedimiento PCR utilizando KOD-Dash (fabricado por TOYOBO CO., LTD.). El fragmento de ORF codificó SaDLHDH (SEQ ID NO: 51).

[Tabla 11]

	Secuencia	SEQ ID NO.

SaDLDH-F	gacactttttcaaaCATGTACATAATCTTTAATTTCACTCATT TACTTTTCAATC	49
SaDLDH-R	gagctcgaattcacatgTTAATTTAAACGTGTTTCACATGTAC CAGTG	50
SaDLDH	MYIIFNFTHLLEFNLLKARFLIMTKIMFFGTRDYEKEMALNWGK KNNVEVTTSKELLSSATVDQLKDYDGVTTMQFGKLENDVYPKL ESYGIKQIAQRTAGFDMYDLDLAKKHNIVISNVPSYSPETIAE YSVSIALQLVRRFPDIERRVQTHDFTWQAEIMSKPVKNMTVAI IGTGRIGAATAKIYAGFGATITAYDAYPNKDLDFLTYSVKE AIKDADIISLHVPANKESYHLFDKAMFDHVKKGAILVNAARGA VINTPDLIAAVNDGTELLGAAIDTYENEAAYFTNDWTNKDIDDK TLELIEHERILVTPHIAFFSDEAVQNLVEGGLNAALSVINTG TCETRLN	51

El fragmento amplificado obtenido se incorporó en pSE mediante un procedimiento In-Fusion, obteniendo de este modo pSE-SaDLDH. El procedimiento In-Fusion se realizó de la misma manera que se utiliza para la preparación de pSLh-PaDLDH.

5 pSE-LmDLDH se preparó mediante el siguiente proceso. Es decir, primero, mediante el uso de ADN genómico total preparado por DNeasy (fabricado por QUIAGEN) a partir del cultivo de una cepa NBRC 100496 de Lueconostoc mesenteroides (obtenida de NBRC) como plantilla y usando dos tipos de oligo ADN sintético (LmDLDH-F y LmDLDH-R, fabricados por Operon Biotechnologies) descritos en la Tabla 12, se obtuvo un fragmento ORF de un gen de LmDLDH mediante un procedimiento PCR utilizando KOD-Dash (fabricado por TOYOBO CO., LTD.). El fragmento de ORF codificó LmDLDH (SEQ ID NO: 54).

[Tabla 12]

	Secuencia	SEQ ID NO.
LmDLDH-F	gacactttttcaaaCATGAAGATTTTTGCTTACGGCATTCCG	52
LmDLDH-R	gagctcgaattcacatgTTAATATTCAACAGCAATAGCTGGCT TC	53
LmDLDH	MKIFAYGIRDDEKPSLEEWKAANPEIEVDYDTELLTPETAKLA EGSDSAVVYQQLDYTRETLTALANVGVTNLSLRNVGTDNIDFD AAREFNFNISNVPVYSPNAIAEHSMLQLSRLLRRTKALDAKIA KRDLRWAPTGTGREMRMOTVGVIGTGHIGRVAINILKGFSAKVI AYDKYPNAELQAEGLYVDTLDELYAQADAIISLYVPGVPENHHL INADAIKMKDGVVIMNAARGNLMDIDAIIDGLNSGKISDFGM DVYENEVACSMKIGLVKNSPDAKIADLIARENVMITPHTAFYT TKAVLEMVHQSFDAAVAFKGEKPAIAVEY	54

15 El fragmento amplificado obtenido se incorporó en pSE mediante un procedimiento In-Fusion, obteniendo de este modo pSE-LmDLDH. El procedimiento In-Fusion se realizó de la misma manera que se utiliza para la preparación de pSLh-PaDLDH.

[Tabla 13]

Nombre de la cepa del transformante	Nombre de la cepa del huésped	Nombre del gen de LDH introducido
ASP4550	IGF543	PaDLDH
ASP4552	IGF543	PpDLDH
ASP4533	IGF543	LbDLDH
ASP4535	IGF543	LbrDLDH
ASP4540	IGF543	LfDLDH
ASP4541	IGF543	LpDLDH
ASP4537	IGF543	LcDLDH
ASP4545	IGF543	LpiDLDH

ASP3462	IGF543	LmDLDH
ASP3466	IGF543	SaDLDH

<Prueba de fermentación>

5 Se inoculó un medio líquido YPD6 (1% de extracto de levadura, 2% de peptona y 6% de glucosa) con cada uno de los transformantes obtenidos, y las células se cultivaron durante 24 horas en las condiciones de una temperatura de 32°C y una velocidad de agitación de 110 rpm. Después del final del cultivo, se recogieron las células bacterianas, se inocularon 4,5 ml de una solución acuosa de glucosa al 11,1% con las células bacterianas de tal manera que la concentración celular bacteriana inicial resultó ser de 36 g (expresados en términos de células bacterianas en seco)/litro, seguido por fermentación durante 3 o 7 horas bajo las condiciones de una temperatura de 32°C y una

10 velocidad de agitación de 110 rpm. Después del final de la fermentación, se midió la concentración (g/l) de cada uno de glucosa, etanol, y ácido láctico en la solución de fermentación. La Tabla 14 muestra los resultados de medición, una velocidad de producción de ácido láctico (g/(l · h)), un rendimiento basado en azúcar (%) de ácido láctico, una concentración de células bacterianas en seco (g/l) después del final de la fermentación, y la velocidad de producción de ácido láctico (g/(g · h)) por células bacterianas en seco que se calcularon a partir de los resultados de medición, y

15 el tiempo de fermentación.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

[Tabla 14]

Gen de DLDH introducido en el transformante	Tiempo de fermentación [h]	Concentración de glucosa [g/l]	Concentración de etanol [g/l]	Concentración de ácido láctico [g/l]	Velocidad de producción de ácido láctico [(g/(l · h))]	Rendimiento basado en azúcar del ácido láctico [%]	Concentración de células bacterianas secas [g/l]	Velocidad de producción de ácido láctico por células bacterianas en seco [(g/(g · h))]
PaDLDH	3,0	19,1	4,6	57,3	19,1	62,3	36,0	0,53
PpDLDH	3,0	38,7	6,9	32,1	10,7	44,4	36,0	0,30
LbDLDH	3,0	52,3	0,0	33,5	11,2	57,0	36,0	0,31
LbrDLDH	3,0	45,0	3,1	31,0	10,3	47,0	36,0	0,29
LfdLDH	3,0	27,1	3,5	48,9	16,3	58,4	36,0	0,45
LpDLDH	3,0	48,6	0,0	33,0	11,0	52,9	36,0	0,31
LcDLDH	3,0	31,0	3,6	50,1	16,7	62,7	36,0	0,46
LpiDLDH	3,0	35,4	1,1	40,9	13,6	54,1	36,0	0,38
LmDLDH	7,0	0,0	43,3	0,5	0,07	0,45	33,4	0,0021
SaDLDH	7,0	0,0	42,4	0,5	0,07	0,45	32,7	0,0022

Como resultado, se confirmó que la cepa ASP4550 en la que se introdujo el gen de PaDLDH como gen de D-LDH derivado de bacterias del género *Pediococcus*, la cepa ASP4552 en la que se introdujo el gen de PpDLDH, la cepa ASP4533 en la que se introdujo el gen de LbDLDH como un gen de D-LDH derivado de bacterias del género *Lactobacillus*, la cepa ASP4535 en la que se introdujo el gen de LbrDLDH, la cepa ASP4540 en la que se introdujo el gen de LfDLDH, la cepa ASP4541 en la que se introdujo el gen de LpDLDH, la cepa ASP4537 en la que se introdujo el gen de LcDLDH, y la cepa ASP4545 en la que se introdujo el gen de LpDLDH producen ácido láctico. En particular, la cepa ASP4550, la cepa ASP4537, la cepa ASP4540, y la cepa ASP4533 tenían un rendimiento basado en azúcar igual o mayor que 55%, mostrando una productividad extremadamente alta de ácido láctico. En cambio, la cepa ASP3462 en la que se introdujo el gen de LmDLDH y la cepa ASP3466 en la que se introdujo el gen de SaDLDH no confirmaron que produjeran ácido láctico.

[Ejemplo 3]

<Preparación de la cepa de introducción de doble copia del gen de D-LDH>

Se introdujeron genes de D-LDH derivados de organismos vivos homólogos o heterólogos en dos sitios en el cromosoma de la cepa IGF543 preparada en el Ejemplo 1, preparando de este modo transformantes. Se investigó la capacidad de producción de ácido láctico de cada uno de los transformantes. Una cepa en la que se restauraron la auxotrofia de uracilo y la auxotrofia de leucina y en la que se introdujeron dos copias del gen de PaDLDH fue nombrada cepa ASP4707; una cepa en la que se introdujeron una copia del gen de PaDLDH y una copia del gen de LpDLDH fue nombrada cepa ASP4156; una cepa en la que se introdujeron una copia del gen de PaDLDH y una copia del gen de LbDLDH fue nombrada cepa ASP4703; una cepa en la que se introdujeron una copia del gen de PaDLDH y una copia del gen de LbrDLDH fue nombrada cepa ASP4704; una cepa en la que se introdujeron una copia del gen de PaDLDH y una copia del gen de PpDLDH fue nombrada cepa ASP4708; y una cepa en la que se introdujeron una copia del gen de LfDLDH y una copia del gen de LpDLDH fue nombrada cepa ASP4752 (Tabla 15).

Específicamente, primero, de acuerdo con el proceso de Bahler et al (la revista de *Yeast*, 1998, Vol. 14, pág. 943-951), la cepa IGF543 (cepa de *S. pombe* con delección del gen PDC2) preparada en el Ejemplo 1 se transformó utilizando un digesto de una enzima de restricción BsiWI de un vector recombinante integrador monodentado pSE-PaDLDH que retenía un casete de expresión del gen de PaDLDH o un vector recombinante integrador monodentado pSE-LpDLDH que retenía un casete de expresión del gen de LpDLDH. De esta manera, se prepararon una cepa de introducción de una sola copia del gen de LDH de *S. pombe* (cepa ASP3472) en la que se introdujo una copia del gen de PaDLDH o una cepa de introducción de una sola copia del gen de LDH de *S. pombe* (cepa ASP3468) en el que se introdujo una copia de gen de LpDLDH se introdujo.

Se preparó PSE-PaDLDH mediante el siguiente proceso. Es decir, mediante el uso de pSLh-PaDLDH preparado en el Ejemplo 2, se cortó un casete de expresión (promotor hCMV/PaDLDH-ORF/terminador LPI) mediante digestión doble usando las enzimas de restricción *SpeI* y *Bst1107I*, y se introdujo pSE en el mismo, preparando de este modo pSE-PaDLDH.

Del mismo modo, mediante el uso de pSLh-LpDLDH preparado en el Ejemplo 2, se cortó un casete de expresión (promotor hCMV/LpDLDH-ORF/terminador LPI) mediante digestión doble usando las enzimas de restricción *SpeI* y *Bst1107I*, y se introdujo pSE en el mismo, preparando de este modo pSE-LpDLDH.

Cada una de las cepas de introducción de una sola copia del gen de LDH obtenida de *S. pombe* se trató con ácido 5-fluoroorótico (FOA) con el fin de eliminar el gen *ura4*. A continuación, de acuerdo con el proceso de Okazaki et al (la revista de *Nucleic Acids Res.*, 1990, Vol. 18, pág. 6485-6489), las cepas se transformaron usando el vector recombinante integrador monodentado pSLh-PaDLDH que retenía el casete de expresión del gen de PaDLDH, el vector recombinante integrador monodentado pSLh-PpDLDH que retenía el casete de expresión del gen de PpDLDH, el vector recombinante integrador monodentado pSLh-LpDLDH que retenía el casete de expresión del gen de LpDLDH, el vector recombinante integrador monodentado pSLh-LbDLDH que retenía el casete de expresión del gen de LbDLDH, el vector recombinante integrador monodentado pSLh-LbrDLDH que retenía el casete de expresión del gen de LbrDLDH, o el vector recombinante integrador monodentado pSLh-LfDLDH que retenía el casete de expresión del gen de LfDLDH que se prepararon en el Ejemplo 2. De esta manera, las cepas de introducción de doble copia del gen de D-LDH de *S. pombe* se prepararon en las que una o más copias del gen de PaDLDH, el gen de PpDLDH, el gen de LpDLDH, el gen de LbDLDH, el gen de LbrDLDH, o el gen de LfDLDH controlados por el promotor de hCMV se introdujeron en la proximidad de la posición de *Leu1*.

Cada una de las cepas de introducción de doble copia del gen de LDH obtenidas de *S. pombe* se trató con FOA con el fin de eliminar el gen *ura4*, y a continuación se transformó utilizando un fragmento de gen *leu1* (SEQ ID NO: 55) y un fragmento de gen *ura4* (SEQ ID NO: 56), preparando de este modo las cepas en las que fueron restauradas la auxotrofia de uracilo y la auxotrofia de leucina.

<Prueba de fermentación>

5 Se inoculó un medio líquido YPD6 se inoculó con cada una de las cepas de introducción de doble copia del gen de LDH obtenida de *S. pombe* de la misma manera que en el Ejemplo 2, se cultivaron las células, y las células bacterianas recogidas se fermentaron en una solución acuosa de glucosa al 11,1%. Después del final de la fermentación, se midió la concentración (g/l) de cada uno de glucosa, etanol y ácido láctico en la solución de fermentación. Además, se midió la pureza óptica del ácido láctico mediante la separación de isómeros ópticos usando una columna de tipo de intercambio de ligandos. A partir del área de pico de cada uno de los isómeros ópticos, se determinó la pureza óptica calculada mediante la siguiente ecuación.

10 Ecuación: Pureza óptica (% ee) =  $\frac{[\text{isómero D}] - [\text{isómero L}]}{([\text{isómero D}] + [\text{isómero L}])} \times 100$   
 ([Isómero D]: área del pico de ácido D-láctico, [isómero L]: área del pico de ácido L-láctico)

15 La Tabla 15 muestra el tiempo de fermentación, los resultados de medición, y un rendimiento basado en azúcar (%) de ácido D-láctico y una pureza óptica (% ee) de ácido D-láctico que se calcularon a partir de los resultados de medición. Como control, la cepa introducción de copia única de genes de PaDLDH (cepa ASP3472) tratada con FOA se sometió a la prueba de fermentación de la misma manera.

[Tabla 15]

Nombre de la cepa del transformante	Gen de DLDH introducido en el transformante	Tiempo de fermentación [h]	Concentración de glucosa [g/l]	Concentración de etanol [g/l]	Concentración de ácido láctico [g/l]	Rendimiento basado en azúcar del ácido láctico [%]	Pureza óptica [% ee]
ASP3472	PaDLDH	3,0	19,1	4,6	57,3	62,3	99,2
ASP4707	PaDLDH/PaDLDH/	23,0	0,0	7,4	75,7	68,2	99,7
ASP4156	LpDLDH/PaDLDH	8,0	3,6	7,6	84,1	80,5	99,5
ASP4703	LbDLDH/PaDLDH	24,0	0,0	0,5	81,7	75,0	99,6
ASP4704	LbrDLDH/PaDLDH	24,0	0,0	0,0	84,1	77,2	99,4
ASP4708	PpDLDH/PaDLDH	8,0	0,0	12,4	71,2	64,1	99,8
ASP4752	LfDLDH/LpDLDH	5,0	0,0	13,1	64,0	59,2	99,5

El rendimiento basado en azúcar de la cepa ASP4707 y la cepa ASP4708 en la que se introdujeron 2 copias de gen de D-LDH derivado de las bacterias del género *Pediococcus* no alcanzaron el 70%, y la capacidad de producción de ácido láctico de estas cepas no mejoró mucho en comparación con la capacidad de producción de ácido láctico de la cepa ASP3472 en la que se introdujo solo 1 copia del gen de D-LDH. Además, aunque se introdujeron en la cepa ASP4752 2 copias de gen de D-LDH derivado de bacterias del género *Lactobacillus*, el rendimiento basado en azúcar fue menor en esta cepa que en la cepa ASP3472 que era una cepa de introducción de una sola copia. En cambio, en todas de la cepa ASP4156, la cepa ASP4703, y la cepa ASP4704 en las que se introdujeron el gen de D-LDH derivado de las bacterias del género *Pediococcus* y el gen de D-LDH derivado de las bacterias del género *Lactobacillus* en combinación, el rendimiento basado en azúcar fue igual o mayor que 75%, que fue notablemente superior al rendimiento basado en azúcar de la cepa ASP3472. A partir de estos resultados, se entiende que en un caso en el que el gen de D-LDH derivado de las bacterias del género *Pediococcus* y el gen de D-LDH derivado de las bacterias del género *Lactobacillus* se introducen en *S. pombe* en combinación, se puede obtener un transformante que tiene una notablemente mayor capacidad de producción de ácido láctico, en comparación con los casos en los que los genes de D-LDH se combinan de otras maneras.

[Ejemplo 4]

<Cultivo de alimentación por lotes de la cepa de introducción del gen de LpDLDH/gen de PaDLDH>

Se inocularon 5 ml de un medio YES (pH 4,5) con la cepa ASP4156 (una cepa de introducción de gen de LpDLDH/gen de PaDLDH), y las células se cultivaron durante 24 horas a 32°C en un tubo de ensayo (precultivo 1). Por otra parte, se inocularon 200 ml de un medio YES (pH 4,5) con 4 ml de la solución de cultivo obtenida mediante el precultivo 1, y las células se cultivaron durante 30 horas a 32°C en un matraz de agitación con un volumen de 1 litro (precultivo 2).

A continuación, mediante el uso de un fermentador de jarra que tenía un volumen de 5 litros, se añadieron 200 ml de la solución de cultivo obtenida mediante el precultivo 2 a 1.800 ml de un medio inicial (ajustado para tener un pH de 4,5 mediante el uso de una solución acuosa de ácido sulfúrico 1 N), a la se añadió una cantidad apropiada de elementos traza y vitaminas de acuerdo con la composición mostrada en la Tabla 16, y el cultivo se inició a 30°C. Aquí, la concentración de cada componente en la Tabla 16 significa la concentración en volumen después de la inoculación del precultivo 2. 39 horas después del inicio del cultivo, mediante el uso de un medio de alimentación (ajustado para tener un pH de 4,5 mediante el uso de una solución acuosa de ácido sulfúrico 1 N) a la que se añadió una cantidad apropiada de elementos traza y vitaminas de acuerdo con la composición mostrada en la Tabla 17, se inició la alimentación. 117 horas después del inicio del cultivo, se puso fin al cultivo. Durante el cultivo, se controló el límite inferior del pH y se mantuvo a 4,5 mediante la adición de amoníaco acuoso al 12,5%.

[Tabla 16]

Componente	Concentración
Extracto de levadura	20 g/l
Glucosa acuosa (contenido de humedad: 8% a 9%)	33 g/l
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	15 g/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	8 g/l
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	5,34 g/l
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,04 g/l

[Tabla 17]

Componente	Concentración
Extracto de levadura	50 g/l
Glucosa acuosa (contenido de humedad: 8% a 9%)	550 g/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	9,00 g/l
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	4,45 g/l
K <sub>3</sub> SO <sub>4</sub>	3,50 g/l
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,14 g/l
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,04 g/l

<Fermentación continua de de la cepa de introducción del gen de LpDLDH/gen de PaDLDH>

A partir de la solución de cultivo obtenida después del final del cultivo alimentado por lotes, las células bacterianas se separaron mediante tratamiento de centrifugación. A continuación, se inoculó un medio inicial, al que se añadió una cantidad apropiada de elementos traza y vitaminas de acuerdo con la composición mostrada en la Tabla 18, con las células bacterianas de manera que la concentración celular bacteriana inicial resultó ser de 36 g (expresada en términos de células bacterianas en seco)/litro (DO<sub>660</sub> = 180), obteniéndose de este modo una solución de

5 fermentación. Se trasladaron 500 ml de la solución de fermentación a un fermentador de jarra que tenía un volumen de 1 litro conectado a una membrana de filtración de precisión de tipo flujo transversal. A partir de entonces, la solución de fermentación se hizo circular a través de una vía a lo largo de la cual pasa a través de la membrana de filtración de precisión desde el fermentador de jarra y se devuelve al fermentador de jarra. Posteriormente, se realizó una fermentación continua, en la que un medio de fermentación se suministró a un caudal constante y se extrajo el filtrado de membrana durante 163 horas a 28°C. En este momento, se estableció una velocidad de dilución de 0,066 (1/h). Durante la fermentación continua, se utilizó una membrana de filtración de precisión con microporos que tenían un diámetro más pequeño que el tamaño de las células bacterianas. En consecuencia, se hace circular las células bacterianas de nuevo al tanque de tal manera que se reciclaron durante las 163 horas de la fermentación continua. Durante la fermentación continua, el pH de la solución de fermentación se redujo a 2,3 sin realizar la neutralización del pH utilizando un álcali.

[Tabla 18]

Componente	Concentración
Extracto de levadura	5 g/l
Glucosa acuosa (contenido de humedad: 8% a 9%)	136,4 g/l
C <sub>8</sub> H <sub>5</sub> KO <sub>4</sub> (hidrogeno ftalato de potasio)	3 g/l
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,2 g/l
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	1,05 g/l
KCl	1 g/l
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,04 g/l

15 La figura 3 muestra la variación temporal de la concentración (g/l) de cada uno de glucosa, etanol y ácido láctico en la solución de fermentación durante la fermentación continua de la cepa ASP4156. La figura 4 muestra la variación temporal de la velocidad de producción de ácido láctico (g/(L · h)) y el rendimiento basado en azúcar (%) de ácido láctico. La figura 5 muestra la variación temporal en el pH de la solución de fermentación. El pH de la solución de fermentación se midió para la solución de fermentación muestreada utilizando un medidor de pH portátil. Como resultado de la realización de fermentación continua durante 163 horas mediante el uso de células bacterianas obtenidas por cultivo alimentado por lotes, se confirmó que, en un punto en el tiempo cuando la fermentación terminó, la velocidad de producción de ácido láctico fue de 5,1 g/(L · h) , y el rendimiento basado en azúcar de ácido láctico fue de 71%. 18 horas después del comienzo de la fermentación, la concentración de ácido láctico se incrementó y llegó a ser igual o mayor que 70 g/l y se mantuvo hasta un punto en el tiempo cuando pasaron aproximadamente 163 horas desde el inicio de la fermentación. Durante la fermentación continua, el pH se redujo a 2,3 sin realizar la neutralización del pH utilizando un álcali, pero la velocidad de producción de ácido láctico se mantuvo a aproximadamente 5 g/(L · h).

30 En un punto en el tiempo cuando se terminó la fermentación continua, se midió la pureza óptica del ácido láctico en la solución de fermentación de la misma manera que en el Ejemplo 3 mediante la separación de isómeros ópticos mediante el uso de una columna de tipo de intercambio de ligandos. Como resultado, se confirmó que la pureza óptica del ácido D-láctico era del 99,28% ee.

### 35 [Ejemplo 5]

<Preparación de la cepa introducción de genes de PaDLDH (ASP4878) en la que se induce la reversión de ura4>

40 Mediante el uso de un fragmento de ADN obtenido por la digestión de pSE con una enzima de restricción BsiWI, se transformó la cepa ASP4550 en la que se introdujo PaDLDH y el transformante obtenido se denominó ASP4878.

<Cultivo de alimentación por lotes de la cepa de introducción de genes de PaDLDH>

45 Se inocularon 5 ml de un medio YES (pH 4,5) con la cepa ASP4878 (una cepa de introducción de genes de PaDLDH para la reversión de ura4), y las células se cultivaron durante 24 horas a 32°C en un tubo de ensayo (precultivo 1). Por otra parte, se inocularon 200 ml de un medio YES (pH 4,5) con 4 ml de la solución de cultivo obtenida mediante el precultivo 1, y las células se cultivaron durante 24 horas a 32°C en un matraz de agitación con un volumen de 1 litro (precultivo 2).

50 A continuación, mediante el uso del mismo medio inicial y el medio de cultivo que en el ejemplo 4 y utilizando un álcali para el control del pH, se realizó el cultivo de alimentación por lotes. Mediante el uso de un fermentador de jarra que tenía un volumen de 5 litros, se añadieron 200 ml de la solución de cultivo obtenida mediante el precultivo 2 a 1.800 ml del medio inicial y el cultivo se inició a 30°C. 24 horas después del inicio del cultivo, se inició la alimentación utilizando el medio de cultivo. 71 horas después del inicio del cultivo, se puso fin al cultivo. Durante el cultivo, se controló el límite inferior del pH a 4,5. La concentración de células bacterianas en un punto en el tiempo cuando se terminó el cultivo de alimentación por lotes fue de 38,7 g (expresada en términos de células bacterianas en seco)/litro (DO<sub>660</sub> = 196).

<Fermentación continua de la cepa de la introducción del gen de PaDLDH>

5 Se trasladaron 500 ml de la solución de cultivo después del final del cultivo de alimentación por lotes a un fermentador de jarra que tenía un volumen de 1 litro y se hizo circular al hacerla pasar a través de una membrana de filtración de precisión de tipo de flujo transversal de la misma manera que en el Ejemplo 4. A continuación, mediante la realización del suministro de un medio de fermentación con un caudal constante y la extracción del filtrado de la membrana en las mismas condiciones que en el Ejemplo 4, la fermentación continua se realizó durante 166 horas. De manera similar a la del Ejemplo 4, durante la fermentación continua, el pH de la solución de fermentación se redujo a 2,5 sin realizar la neutralización del pH utilizando un álcali.

[Ejemplo 6]

15 <Cultivo de alimentación por lotes de la cepa de introducción de gen de LpDLDH/gen de PaDLDH (2)>

Se inocularon 5 ml de un medio YES (pH 4,5) con la cepa ASP4156 (una cepa de introducción de gen de LpDLDH/gen de PaD-LDH), y las células se cultivaron durante 24 horas a 32°C en un tubo de ensayo (precultivo 1). Por otra parte, se inocularon 120 ml de un medio YES (pH 4,5) con 2,4 ml de la solución de cultivo obtenida mediante el precultivo 1, y las células se cultivaron durante 30 horas a 32°C mediante el uso de un matraz de agitación con un volumen de 500 ml (precultivo 2).

25 A continuación, mediante el uso del mismo medio inicial y el medio de cultivo que en el ejemplo 4 y utilizando un álcali para el control del pH, se realizó el cultivo de alimentación por lotes. Mediante el uso de un fermentador de jarra que tenía un volumen de 3 litros, se añadieron 120 ml de la solución de cultivo obtenida mediante el precultivo 2 a 1.080 ml del medio inicial y el cultivo se inició a 30°C. 39 horas después del inicio del cultivo, se inició la alimentación utilizando el medio de cultivo. 134 horas después del inicio del cultivo, se puso fin al cultivo. Durante el cultivo, se controló el límite inferior del pH a 4,5. La concentración de células bacterianas en un punto en el tiempo cuando se terminó el cultivo de alimentación por lotes fue de 28,7 g (expresada en términos de células bacterianas en seco)/litro ( $DO_{660} = 145$ ).

30 <Fermentación continua de cepa de introducción de gen de LpDLDH/gen de PaDLDH (2)>

35 Se trasladaron 625 ml de la solución de cultivo después del final del cultivo de alimentación por lotes a un fermentador de jarra que tenía un volumen de 1 litro y se hizo circular al hacerla pasar a través de una membrana de filtración de precisión de tipo de flujo transversal de la misma manera que en el Ejemplo 4. Con el fin de aumentar la concentración de células bacterianas, se extrajeron 125 ml de filtrado de la membrana. A continuación, mediante la realización del suministro de un medio de fermentación con un caudal constante y la extracción del filtrado de la membrana en las mismas condiciones que en el Ejemplo 4, la fermentación continua se realizó durante 168 horas. De manera similar a la del Ejemplo 4, durante la fermentación continua, el pH de la solución de fermentación se redujo a 2,3 sin realizar la neutralización del pH utilizando un álcali.

45 Los resultados de la fermentación continua (2) de la cepa ASP4156 del Ejemplo 6 se compararon con los resultados de la fermentación continua de la cepa ASP4878 del Ejemplo 5 con el fin de investigar la variación temporal de la concentración (g/l) de cada uno de glucosa, etanol y ácido láctico en la solución de fermentación. Los resultados son visibles en las figuras 6, 7 y 8. En este documento, el ácido láctico contenido en la solución de fermentación desde el principio de la fermentación es una fracción de ácido láctico producida como un subproducto en la etapa de cultivo alimentado por lotes realizada para la obtención de células bacterianas para la fermentación de ácido láctico. Las figuras 9 y 10 muestran la variación temporal de la velocidad de producción de ácido láctico ( $g/(L \cdot h)$ ) y el rendimiento basado en azúcar (%) de ácido láctico, y las figuras 11 y 12 muestran la variación temporal en el pH de la solución de fermentación y la proporción de células bacterianas viables. La proporción de células bacterianas viables se calculó mediante la mezcla de la solución de fermentación con una solución de tinción con azul de tripano en una cantidad igual y contando el número de células muertas teñidas y el número de células vivas no teñidas a través de la observación microscópica.

55 En la cepa ASP4156 en la que se introdujeron dos copias del gen de D-LDH, la velocidad de producción de ácido láctico en un punto de tiempo cuando se terminó la fermentación (168 horas de fermentación continua) fue de 5,5  $g/(L \cdot h)$ , el rendimiento basado en azúcar de ácido láctico fue de 69%, y la proporción de células bacterianas viables fue de 58%. Por el contrario, en la cepa ASP4878 en la que se introdujo una copia del gen de D-LDH, la velocidad de producción de ácido láctico en un punto en el tiempo cuando la fermentación se terminó (166 horas de fermentación continua) fue de 2,4  $g/(L \cdot h)$ , el rendimiento basado en azúcar de ácido láctico fue de 54%, y la proporción de células bacterianas viables fue de 25%. En la cepa ASP4156, la concentración de ácido D-láctico no se redujo durante la fermentación continua. Sin embargo, en la cepa ASP4878, la concentración de ácido D-láctico tendió a comenzar a reducirse 47 horas después del comienzo de la fermentación. Además, el rendimiento basado en azúcar de ácido láctico en la cepa ASP4878 fue inferior en no menos del 10% que en la cepa ASP4156, y la proporción de células bacterianas viables tendió a reducirse notablemente en la cepa ASP4878.

65

La presente solicitud se basa en la Solicitud de Patente Japonesa N° 2013-242236, presentada el 22 de noviembre de 2013.

LISTADO DE SECUENCIAS

5  
 <110> ASAHIGLASS COMPANY, LIMITED  
 <120> TRANSFORMANTE Y PROCESO PARA LA PRODUCCIÓN DEL MISMO, Y PROCESO PARA LA  
 PRODUCCIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO  
 <130> F20140354  
 10 <150> JP 2013-242236  
 <151> 2013-11-22  
 <160> 56

<210> 1  
 15 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: UF  
 20 <400> 1  
 ctctccagct ccatccataa g 21

<210> 2  
 <211> 45  
 25 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: UR  
 30 <400> 2  
 gacacaactt cctacaaaa agcctttctg cccatgtttt ctgtc 45

<210> 3  
 <211> 23  
 35 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: OF  
 <400> 3  
 gcttttttgtt aggaagttgt gtc 23

<210> 4  
 <211> 43  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 45 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: OR  
 <400> 4  
 agtgggattt gtagctaagc tgtatccatt tcagccgttt gtg 43

<210> 5  
 <211> 45  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 55 <223> Descripción de la secuencia artificial: DF  
 <400> 5  
 aagtttcgtc aatatcacia gctgacagaa aacatgggca gaaag 45

<210> 6  
 60 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: DR  
 65 <400> 6  
 gttccttaga aaaagcaact ttgg 24

<210> 7

	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> Descripción de la secuencia artificial: FF	
	<400> 7	
	cataagcttg ccaccacttc	20
	<210> 8	
10	<211> 24	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: FR	
15	<400> 8	
	gaaaaagcaa ctttggatt ctgc	24
	<210> 9	
20	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: F for ura4 fragment	
	<400> 9	
25	agcttagcta caaatccac t	21
	<210> 10	
	<211> 23	
	<212> ADN	
30	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: R for ura4 fragment	
	<400> 10	
35	agcttgtgat attgacgaaa ctt	23
	<210> 11	
	<211> 33	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
40	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
	<400> 11	
	tctcaacata tggatgctag agtatttcaa agc	33
45	<210> 12	
	<211> 32	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
50	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
	<400> 12	
	agcagctcta gaggtaatgt tgtaggagca tg	32
	<210> 13	
55	<211> 34	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: fragmento de ADN	
60	<400> 13	
	agcagatatc gtttaaacca cgtggatatc agca	34
	<210> 14	
	<211> 27	
65	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	

	<400> 14						
	tagatatcag gataggctag tgaatgt						27
5	<210> 15						
	<211> 30						
	<212> ADN						
	<213> Secuencia artificial						
	<220>						
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador						
10	<400> 15						
	tagtttaaac ggcttcggat taccaacaaa						30
15	<210> 16						
	<211> 41						
	<212> ADN						
	<213> Secuencia artificial						
	<220>						
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador						
20	<400> 16						
	tagctagcgt ttaaacacgt gcaaactctt gctggttact c						41
25	<210> 17						
	<211> 28						
	<212> ADN						
	<213> Secuencia artificial						
	<220>						
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador						
30	<400> 17						
	tagctagcac attcactagc ctatcctg						28
35	<210> 18						
	<211> 7180						
	<212> ADN						
	<213> Secuencia artificial						
	<220>						
	<223> Descripción de la secuencia artificial: pSE						
	<400> 18						
	gaattgttgt tgtaaacttg tttattgcag cttataatgg ttacaaataa agcaatagca						60
	tcacaaatth cacaaataaa gcattttttt cactgcatc tagttgtggt ttgtccaaac						120
40	tcataatgt atcttatcat gtctggatcg atcccggcag gttgggcgtc gcttggctcg						180
	tcatttcgaa ccccagagtc ccgctcagaa gaactcgtca agaaggcgtc agaaggcgtc						240
	gcgctgcgaa tcgggagcgg cgataccgta aagcacgagg aagcggtcag cccattcggc						300
	gccaagctct tcagcaatat cacgggtagc caacgctatg tcctgatagc ggtccgccac						360
	acccagccgg ccacagtcga tgaatccaga aaagcggcca tttccacca tgatattcgg						420
45	caagcaggca tcgccatggg tcacgacgag atcctcgccg tcgggcatgc ggccttgag						480
	cctggcgaac agttcggctg gcgagagccc ctgatgctct tcgtccagat catcctgatc						540
	gacaagacc gcttccatcc gactcagtc tcgctcagtc cgatgtttcg cttggtggtc						600
	gaatgggacg gtagccggat caagcgtatg cagccgcccg attgcatcag ccatgatgga						660
	tactttctcg gcaggagcaa ggtgagatga caggagatcc tgccccggca cttcgcccaa						720
50	tagcagccag tcccttcccg cttcagtgac aacgtcgagc acagctgctc aaggaacgcc						780
	cgctcgtggc agccacgata gccgcgctgc ctcgctcctg agttcattca gggcaccgga						840
	acggtcggtc ttgacaaaaa gaaccgggcg cccctgctgc gacagccgga acacggcggc						900
	atcacagagc ccgattgtct gttgtgccc gtcatagcg aatagcctct ccaccaagc						960
	ggccggagaa cctgcgtgca atccatcttg ttcaatcatg cgaaaacgat ctcacctgt						1020
55	ctcttgatca gatccgggac ctgaaataaa agacaaaaag actaaactta ccagttaact						1080
	ttctggtttt tcagttcctc gaggagcttt ttgcaaaagc ctaggcctcc aaaaaagcct						1140
	cctcactact tctggaatag ctcagaggcc gaggcggcct cggcctctgc ataaataaaa						1200
	aaaattagtc agccatgggg cggagaattgg gcggaactgg gcggagttag gggcgggatg						1260
	ggcggagtta ggggcgggac tatggttgct gactaattga gatgcatgct ttgatactt						1320
60	ctgcctgctg gggagcctgg ggactttcca cactggttg ctgactaatt gagatgcatg						1380
	ctttgcatac ttctgcctgc tggggagcct ggggactttc cacaccctaa ctgacacaca						1440
	ttccacagga cattgattat tgactagcgt ttaaacacgt gcaaactctt gctggttact						1500
	ctcctgtttt ggattgccac actgctcaca ttgcttgcaa gttcgtgag ctcattgaga						1560
	agattgaccg tcggttccgg aagaagattg aggagtccc caagtttgc aagtctggtg						1620
65	atgcttgcat tgctaagatg gttcctatga agcctatgtg tgttgaagct ttcactgact						1680
	acgctctctt tggctgtttc gctgtccgtg acatgctgca aaccgtcgtc gtcggtgtca						1740
	tcaaggccgt tgagaagggt gccctggtg ccgctaaggt cactaaggcc gctgttaagg						1800
	ctggcgccaa gaagtaaaca ttttttactt cggatttaag tagatcttga gttgttghtaa						1860

	tcaggatagg	ctagtgaatg	tgctagttat	taatagtaat	caattacggg	gtcattagtt	1920
	catagcccat	atatggagtt	ccgcgttaca	taacttacgg	taaatggccc	gcctggctga	1980
	ccgcccacg	acccccgccc	attgacgtca	ataatgacgt	atgttcccat	agtaacgcca	2040
5	atagggactt	tccattgacg	tcaatgggtg	gagtatttac	ggtaaaactgc	ccacttggca	2100
	gtacatcaag	tgtatcata	gccaagtacg	ccccctattg	acgtcaatga	cggtaaaatgg	2160
	cccgcctggc	atTTTTGCCA	gtacatgacc	ttatgggact	ttcctacttg	gcagtacatc	2220
	tacgtattag	tcatacgtat	taccatgggtg	atgCGGTTTT	ggcagtacat	caatgggCGT	2280
	ggatagcggT	ttgactcacg	gggatttcca	agtctccacc	ccattgacgt	caatgggagt	2340
10	ttgTTTTggc	accaaaatca	acgggacttt	ccaaaatgtc	gtaacaactc	cgccccattg	2400
	acgcaaatgg	gCGGTAGGCG	tgtacgggtg	gaggTctata	taagcagatt	tctcttttagt	2460
	tctttgcaag	aaggtagaga	taaagacact	ttttcaaata	tggatgctag	agtatttcaa	2520
	agtatatcaag	ctagatctga	ggggatgaaa	aatccccattg	ccaaggaatt	ttggcctttg	2580
	atggaagaaa	agcaaagcaa	cttgtcagtc	gcggtcgatt	tgacgaagaa	atccgaaatc	2640
	ttagaattgg	tagataaaat	tggaccctat	gtctgtgtta	tcaagacaca	tattgacgtt	2700
15	gtcGaggatt	tcgaccagga	tatggtagaa	aaactgggtg	ccttaggtaa	aaagcatcgt	2760
	tttcttatct	ttgaggatcg	caaattcgca	gacattggaa	ataccgtcaa	gctacaatat	2820
	gcatctggTg	tgtacaaaat	tgcttcttgg	gctcataatca	caaattgccca	tacagtGCCA	2880
	ggcGagggta	ttatacaagg	cctcaaagaa	gttggtttac	ctttgggacg	tggTctcttg	2940
20	cttttggctg	aaatgtcttc	caaaggctct	ttggctactg	gttcttacac	agagaaaacc	3000
	ttagaatggT	ttgagaagca	taccgatttt	tgctttggct	ttatagctgg	tcgtcgattt	3060
	cctaaccctc	aaagcgacta	cataactatg	tcccctggta	tcggcttggga	tgTtaaagga	3120
	gacgggctgg	gacagcaata	tcgtactcct	gaagaagtga	ttgTaaactg	cggtagcgat	3180
	atcatcattg	ttggctgtgg	agtctatgga	gctggTcgta	atcctgtttg	cgaagccaag	3240
	agatatagag	aagctggttg	gaaggcatat	cagcaaagac	tttctcagca	ttaaaaaaag	3300
25	actaatgtaa	aatTTTTTTg	gttggttatt	gaaaaagtcg	atgccttgtt	tgcgtttgtt	3360
	ttcctaggcg	ttttatgtca	gaaggcattt	agaattagta	tacaagtact	ctttggtaaa	3420
	atTTTatgta	gcgactaaaa	tattaactat	tatagataaa	caccttggga	ataaaaagta	3480
	atTTTctata	gtaatTTTat	aaacatgctc	ctacaacatt	acctctagtt	attaatagta	3540
	atcaattacg	gggtatttag	ttcatagccc	atataTggag	ttccgcgTta	cataacttac	3600
30	ggtaaatggc	ccgcctgggt	gaccgcccga	cgacccccgc	ccattgacgt	caataatgac	3660
	gtatgttccc	atagtaacgc	caatagggac	tttccattga	cgTcaatggg	tggagtattt	3720
	acggTaaact	gcccacttgg	cagtacatca	agtgtatcat	atgccaaagta	cgccccctat	3780
	tgacgtcaat	gacggTaaat	ggccccgctg	gcattttgcc	cagtacatga	ccttatggga	3840
	ctttctact	tggcagtaca	tctacgtatt	agtcatcgct	attaccatgg	tgatgcgggt	3900
35	ttggcagtcg	atcaattggg	gtggatgatt	gTTTgactca	cggggatttc	caagttccca	3960
	cccattggac	gtcaatggga	gtttgttttg	gcacaaaat	caacgggact	ttccaaaatg	4020
	tcgtaacaac	tccgccccat	tgacgcaaat	gggCGGTAGG	cgTgtacggT	gggaggTcta	4080
	tataagcaga	tttctcttta	gttctttgca	agaaggtaga	gataaaagaca	ctttttcaaa	4140
	catgtgaatt	cgagctcggt	acccggggat	cctctagagt	cgacctgcag	gcatgcaagc	4200
40	tTaaatagga	aagTttcttc	aacaggatta	cagtgtagct	acctacatgc	Tgaaaaatat	4260
	agcTtttaaa	attattttat	attataactc	Tgtataatag	agataagTcc	atTTTtaaa	4320
	aatgttttcc	ccaaccata	aaaccctata	caagTtgTtc	tagtaacaat	acatgagaaa	4380
	gatgtctatg	tagctgaaaa	taaaatgacg	tcacaagacg	atctgcctcg	cgcgTttcgg	4440
	TgatgacggT	gaaaacctct	gacacatgca	gctcccggag	acggTcacag	ctTgtctgta	4500
45	agcggatgcc	gggagcagac	aagcccgtca	gggCGCGTca	gcgggtgttg	gcgggtgtcg	4560
	gggCGcagcc	atgaccagT	cacgtagcga	tagcggagTg	taatcgTtta	tcaggatagT	4620
	ctagTgagTg	ttatatgttt	gattaatata	attTggTata	ctactcagTa	atTaaatTta	4680
	cttataactt	aggaattgaa	attTaaattg	catggTtaaa	tatagattTg	taacgataat	4740
	tctTTTTttc	atTTTTTaaG	Tgcaaaatat	gtatatgtag	aactaagTgc	gtacatatgg	4800
50	aggactTtga	ataggtgtcg	gagacatagc	acgattaaga	ttcaacatat	caagcagagg	4860
	tacacggTtg	ctcgtttgtc	ttgTaaagatt	tatttccgac	ggagaacgTa	cgacagTact	4920
	agcagTgtgt	ggcctTgata	gagcctgttt	caatgtgcta	accatttctc	cagTttgtga	4980
	ttgtTgtgta	atagaaaacga	gcgactTgtg	agcatgaagT	aaaggatttt	gtTggTaatc	5040
	cgaagccgTt	taaaccacgT	ggattactgg	ctTaaactatg	cggcatcaga	gcagattgTa	5100
55	ctgagagTgc	accatatgCG	gtgtgaaata	ccgcacagat	gcgTaaaggag	aaaataccgc	5160
	atcagggcgt	cttccgcttc	ctcgtctact	gactcgctgc	gctcggTcgt	tcggctgcgg	5220
	cgagcggTat	cagctcactc	aaaggcggTa	atacggTtat	ccacagaatc	aggggataac	5280
	gcaggaaaga	acatgcatgt	gagcaaaaag	ccagcaaaaag	gccaggaacc	gTaaaaaggc	5340
	cgctTgtctg	gcgTttttcc	atagcgctccg	ccccctgac	gagcatcaca	aaaactcgac	5400
60	ctcaagTcag	aggtggcgaa	acccgacagg	actataaaga	taccagcgT	ttccccctgg	5460
	aagctccctc	gtgcgctctc	ctgttccgac	cctgccgctt	accggatacc	tgtccgcctt	5520
	tctcccttcg	ggaagcgtgg	cgctttctca	tagctcacgc	Tgtaggtatc	tcagTtcggT	5580
	gtaggtcgtt	cgctccaagc	Tgggctgtgt	gcacgaacc	cccgttcagc	ccgaccgctg	5640
	cgcttatccc	ggTaaactatc	gtctTtagTc	caaccCGgTa	agacacgact	tatcggcact	5700
65	ggcagTacc	actgTtaaca	ggattagcag	acgaggtat	gtaggcggTg	ctacagagTt	5760
	ctTgaagTgg	Tggcctaact	acggctacac	tagaaggaca	gtattTggTa	tctgcgctct	5820
	gctgaagcca	gtTaccTtctg	gaaaaagagT	Tggtagctct	Tgatccggca	aaCaaccac	5880
	cgctggtagc	ggTggTtttt	TgtttTgcaa	gcagcagatt	acgcgcagaa	aaaaaggatc	5940

	tcaagaagat	cctttgatct	tttctacggg	gtctgacgct	cagtggaacg	aaaactcacg	6000
	ttaagggatt	ttggatcatga	gattatcaaa	aaggatcttc	acctagatcc	ttttaaatta	6060
	aaaatgaagt	tttaaataca	tctaaagtat	atatgagtaa	acttggtctg	acagttacca	6120
	atgcttaatc	agtgaggcac	ctatctcagc	gatctgtcta	tttcgttcat	ccatagttgc	6180
5	ctgactcccc	gtcgtgtaga	taactacgat	acgggagggc	ttaccatctg	gccccagtgc	6240
	tgcaatgata	ccgcgagacc	cacgctcacc	ggctccagat	ttatcagcaa	taaaccagcc	6300
	agccggaagg	gccgagcgca	gaagtgggtcc	tgcaacttta	tccgcctcca	tccagtctat	6360
	taattgttgc	cggaagcta	gagtaagtag	ttcgcagtt	aatagtttg	gcaacgttgt	6420
	tgccattgct	gcaggcatcg	tgggtgacag	ctcgtcgttt	ggtagggctt	cattcagctc	6480
10	cggttcccaa	cgatcaaggc	gagttacatg	atcccccatg	ttgtgcaaaa	aagcggttag	6540
	ctccttcggt	cctccgatcg	ttgtcagaag	taagttggcc	gcagtgttat	cactcatggt	6600
	tatggcagca	ctcataaatt	ctcttactgt	catgccatcc	gtaagatgct	tttctgtgac	6660
	tggtgagtag	tcaaccaagt	cattctgaga	atagtgtag	cgccgaccga	gttgctcttg	6720
	cccggcgtca	acacgggata	ataccgcgcc	acatagcaga	actttaaaag	tgctcatcat	6780
15	tggaaaacgt	tcttcggggc	gaaaactctc	aaggatctta	ccgctgttga	gatccagttc	6840
	gatgtaacc	actcgtgcac	ccaactgatc	ttcagcatct	tttactttca	ccagcgtttc	6900
	tgggtgagca	aaaacaggaa	ggcaaaaatgc	cgcaaaaaag	ggaataagg	cgacacggaa	6960
	atggtgaata	ctcatactct	tcctttttca	atattattga	agcatttata	agggttattg	7020
	tctcatgagc	ggatacatat	ttgaatgtat	ttagaaaaat	aaacaaatag	gggttccgcg	7080
20	cacatttccc	cgaaaagtgc	cacctgacgt	ctaagaaacc	attattatca	tgacattaac	7140
	ctataaaaaat	aggcgtatca	cgaggccctt	tcgtcttcaa			7180

<210> 19  
 <211> 1101  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Secuencia Y1  
 <400> 19

30	tggcagtaca	tctacgtatt	agtcacgct	attaccatgg	tgatgcgggt	ttggcagtac	60
	atcaatgggc	gtggatagcg	gtttgactca	cggggatttc	caagctctca	ccccattgac	120
	gtcaatggga	gtttgttttg	gcaccaaaat	caacgggact	ttccaaaatg	tcgtaacaac	180
	tccgccccat	tgacgcaaat	gggcggtagg	cggtgtacgg	gggaggtcta	tataagcaga	240
	tttctcttta	gttcttttga	agaaggtaga	gataaagaca	ctttttcaaa	catgtaaagc	300
35	aggtgtcagg	gcgatggccc	actacgtgaa	ccatcacctt	aatcaagttt	tttgggtcgg	360
	aggtgccgta	aagcactaaa	tcggaaccct	aaagggagcc	cccgatctag	agcttgacgg	420
	ggaaagccgg	cgaacgtggc	gagaaaggaa	gggaagaaag	cgaagggagc	gggcgctagg	480
	gcgctggcaa	gtgtagcggg	cacgctgcgc	gtaaccacca	cacccgccgc	gcttaatgcg	540
	ccgctacagg	gcgcgctcca	ttcgccattc	aggctgcgca	actgttggga	agggcgatcg	600
40	gtgccccctt	cttcgctatt	acgccagctg	gcgaaagggg	gatgtgctgc	aagggcatta	660
	agttgggtaa	cgccaggggt	ttcccagtca	cgacgttgta	aaacgacggc	cagtgagcgc	720
	gcgtaatacg	actcactata	gggcgaattg	gagctccacc	gcggtggcgg	ccgctctaga	780
	actagtggat	ccccgggct	gcaggaattc	gatatacaagc	ttatcgatac	cgctgacctc	840
	gagggggggc	ccggtaccca	gcttttgctt	cctttagtga	gggttaattg	cgcgcttggc	900
45	gtaatcatgg	tcatagctgt	ttcctgtgtg	aaattgttat	ccgctacaaa	ttccacacaa	960
	catacgagcc	gggagcataa	agtgtaaagc	ctgggggtgcc	taatgagtga	gctaactcac	1020
	attaattgcg	ttgcgccatg	tgaagcaggt	gtcggtaaccg	attacaagga	tgatgatgat	1080
	aagtaacggg	gatcctctag	a				1101

<210> 20  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador  
 <400> 20

50	tggcagtaca	tctacgtatt	agtcac				27
----	------------	------------	--------	--	--	--	----

<210> 21  
 <211> 62  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador  
 <400> 21

60	tctagaggat	ccccgttact	tatcatcatc	atccttgtaa	tcgggtaccga	cacctgcttc	60
	ac						62

<210> 22  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 5 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador  
 <400> 22  
 aaatcgtacg cctagcagcg aatccaaacc 30

10 <210> 23  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 15 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador  
 <400> 23  
 atatacgtac gggatggctg cggag 25

20 <210> 24  
 <211> 5936  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 25 <223> Descripción de la secuencia artificial: pSLh  
 <400> 24  
 aaccacaga ggtagaatgt atatataaaa ttaataagct aagtgtaata cttaaaaaat 60  
 acattaattg gaactcgtat cctaccattt acaatgttca tccaattttt tcagattgta 120  
 ctgtaaatag cgtttgaaaa caccaaattt tagaagctaa tcaactctcat cataatcgtc 180  
 tacatcctca tcgttatcga cgataaaaga atcatcttgc atgctgggtt catccatgct 240  
 30 atcaaacgag ggatcaacgt aaatagggtg tttcactgta gccgctgctc ttctgggttg 300  
 cctcttttcta atcggagaat ctgaatcttc tgggtggctct gcgttagtgc aactagcttt 360  
 tggagttgaa ctactacctg gaataataaa atcatcatcg tcatcttcag gtgattgttt 420  
 ctttaccgag cttgcttttt tcccttttatt cttcgcagaa gccttcgtgg atgttatggg 480  
 ggaaggtttc aaactgctag gcaacaaatc atcttcatcg tctgaagaaa atatggtagt 540  
 35 agcaactggt ttattagtct ttcttctctt tccagacgcc gaggctgcta ttttttgac 600  
 gggtttttta ctacctgctt cttcagatgc aacagattga cttctttttc ttgattttcc 660  
 actatcactg ctatccaatc ccgggctctt agatatgcga ttttcttcaa ctgataagcc 720  
 atgagagtta tcctctgtct tgacaatggt tatgtcagat gatttctcag gttctttcga 780  
 cgctgcgaac tcaagtaaag tttgttgctt tcgatttggt gtagatgggt tggattcgtc 840  
 40 gctaggcgta cgatttaaat gcggccgcaa caacaattct tgaagacgaa agggcctcgt 900  
 gatacgccta tttttatagg ttaatgtcat gataataatg gtttctttaga cgtcaggtag 960  
 cacttttcgg ggaatgtgc gcggaacccc tatttgttta tttttctaaa tacattcaaa 1020  
 tatgtatccg ctcatgagac aataaccctg ataaatgctt caataatatt gaaaaaggaa 1080  
 gagtatgagt attcaacatt tccgtgtcgc ctttattccc ttttttgagg cattttgcct 1140  
 45 tcctgttttt gtcacccag aaacgctggg gaaagtaaaa gatgctgaag atcagttggg 1200  
 tgcacgagtg ggttacatcg aactggatct caacagcggg aagatccttg agagttttcg 1260  
 ccccgaagaa cgttttccaa tgatgagcac ttttaaagt ctgctatgtg gcgcggtatt 1320  
 atcccgtggt gacgccccgc aagagcaact cggctcggcg atacactatt ctcagaatga 1380  
 cttgggttgag tactcaccag tcacagaaaa gcatcttacg gatggcatga cagtaagaga 1440  
 50 attatgcagt gctgccataa ccatgagtga taactctgag gccaacttac ttctgacaac 1500  
 gatcggagga ccgaaggagc taaccgcttt tttgcacaac atgggggatc atgtaactcg 1560  
 ctttgatcgt tgggaaccgg agctgaatga agccatacca aacgacgagc gtgacaccac 1620  
 gatgcctgca gcaatggcaa caacgttgcg caaactatta actggcgaac tacttactct 1680  
 agcttcccgg caacaattaa tagactggat ggaggcggat aaagtgcag gaccacttct 1740  
 55 gcgctcggcc cttccggctg gctggtttat tgctgataaa tctggagccg gtgagcgtgg 1800  
 gtctcgcggt atcattgcag cactggggcc agatggtaag ccctcccgta tcgtagttat 1860  
 ctacacgacg gggagtcagg caactatgga tgaacgaaat agacagatcg ctgagatagg 1920  
 tgcctcactg attaagcatt ggtaactgtc agaccaagtt tactcatata tactttagat 1980  
 tgatttaaaa cttcattttt aatttaaaag gatctagggt aagatccttt ttgataatct 2040  
 60 catgacaaaa atcccttaac gtgagttttc gttccactga gcgtcagacc ccgtagaaaa 2100  
 gatcaaagga tcttcttgag atcctttttt tctgcgcgta atctgctgct tgcaaaaaa 2160  
 aaaaccaccg ctaccagcgg tggtttggtt gccggatcaa gagctacaa ctctttttcc 2220  
 gaaggtaact ggcttcagca gagcgcagat accaaatact gtccttctag tgtagccgta 2280  
 gttaggccac cacttcaaga actctgtagc accgcctaca tacctcgtc tgctaactct 2340  
 65 gttaccagtg gctgctgcca gtggcgataa gtcgtgtcct accgggttg actcaagacg 2400  
 atagttaccg gataaggcgc agcggctcggg ctgaacgggg ggttcgtgca cacagcccag 2460  
 cttggagcga acgacctaca ccgaactgag atacctacag cgtgagctat gagaaagcgc 2520  
 cacgcttccc gaaggagaaa aggcggacag gtatccggta agcggcaggg tcggaacagg 2580

```

agagcgcacg aggggagcttc caggggggaaa cgcctggtat ctttatagtc ctgtcggggt 2640
tcgccacctc tgacttgagc gtcgattttt gtgatgctcg tcaggggggc ggagcctatg 2700
gaaaaacgcc agcaacgcgg ccttttttacg gttcctggcc ttttgctggc cttttgctca 2760
catgcatggt ctttcctgcg ttatcccctg attctgtgga taaccgtatt accgcctttg 2820
5 agtgagctga taccgctcgc cgcagccgaa cgaccgagc cagcagatca gtgagcgagg 2880
aagcggaaaga gcgctgatg cggatatttc tccttacgca tctgtgcggt atttcacacc 2940
gcatatggtg cactctcagt acaatctgct ctgatgccgc atagttaagc catttaaatg 3000
cggccgcccgt acgggatggc tgcggagtca atgagctggt tttttaaggt aaggtgagga 3060
tattcctcct taaaaatcct agctacagtc ttgcgccaaa gacgagaagt tgccaaaaca 3120
10 ttagcttttg cgagtaatgt gacggggagc ggaggggttg aagtttcagc taaccaagca 3180
gccaacgcag caatacgaga aacttcttcc aaactgtaag gccaagtgtc catagcataa 3240
ccccagccgt tgtcctcagt caacgacttt caaaccttcc aagtaacaac ctccagtaag ttctcgtaaca 3300
acacaaaaat cgacaccttc aacgatttca ggcttcaaaag ggctgtactt gactaaagac 3360
ttgctggcaa agttgcaagg tcgaagggtg gcccaaacac ccatactctt acgaagcttc 3420
15 aataaacctt gctcaggacg acaattgggg ttggtccatt caggaccacc aacggcacc 3480
aaaagaacac cgtcagcttc caacaagcc ttcacagtct cgtcagtcaa aggggttcca 3540
taggcatcaa tagaggcacc tccaatcttg tgttcttcaa actcgagttt taactcaggt 3600
cgcttcttct caacgacttt caaaccttcc aaggcagaag caacaatttc agggccaata 3660
tggctctcctg gtaagacgac gattttcttt gcacacatgt tgttgaagaa gttttgttgt 3720
20 gaaatggttt cgtgaaagtt tcagacccta ccgcaaaaat gcctggtttc gggaaactca 3780
acactgttgc actttttata ctacagattg ggatatcgat aataatgctt aaaaaatcct 3840
tttttaaaaa agcttgttta cagtaacgta aatgaccaga aatcagatga aatcacaag 3900
aaagcaataa attcagctta aatcctgata tgtttgattt tgtgatgaaa tcatggatgt 3960
tcataggaat gcgctttttt aacgaaatat acaagtatcc tggagctta 4020
25 ttaattaatt aatgaatctt tgttcctagg cccgggctag taatcaatta cggggctatt 4080
agttcatagc ccatatatgg agttcccgct tacataactt acggtaaatg gcccgcttg 4140
ctgaccgccc aacgaccccc gccattgac gtcaataatg acgtatgttc ccatagtaac 4200
gccaataggg actttccatt gacgtcaatg ggtggagtat ttacggtaaa ctgcccactt 4260
ggcagtagat caagtgtatc atatgccaaag tacgccccct attgacgtca atgacggtaa 4320
30 atggcccggc tggcattttg cccagttacat gaccttatgg gactttccta ctggcagta 4380
catctacgta ttagtcatcg ctattaccat ggtgatgcgg ttttggcagt acatcaatgg 4440
gcgtggatag cggtttgact cacggggatt tccaagtctc caccctattg acgtcaatgg 4500
gagtttgttt tggcaccaaa atcaacggga ctttccaaaa tgtcgtaaaca actccgcccc 4560
attgacgcaa atgggcggtg ggcgtgtacg gtgggaggtc tatataagca gatttctctt 4620
35 tagttctttg caagaaggta gagataaaga cacttttca aacatgtaa gcagggtca 4680
ggcagatggc ccaactacgtg aaccatcacc ctaactaagt tttttggggt cgaggtgccg 4740
taaagcacta aatcggaacc ctaaaggag cccccgattt agagcttgac ggggaaagcc 4800
ggcgaacgtg gcgagaaagg aaggaagaa agcgaagga gcggcgcta gggcgctggc 4860
aagtgtagcg gtcacgctgc gcgtaaccac cacaccgccc gcgctaatg cgccgctaca 4920
40 gggcgcgctc cattcgccat tcaggctgcg caactgttgg gaagggcgat cgggtcgggc 4980
ctcttcgcta ttacgccagc tggcgaaagg gggatgtgct gcaaggcgat taagtgggt 5040
aacgccaggg ttttcccagt cacgacgttg taaaacgacg gccagtgagc gcgctgtaata 5100
cgactcacta tagggcgaat tggagctcca ccgcggtggc ggccgctcta gaactagtgg 5160
atcccccggg ctgcaggaat tcgatataca gcttatcgat accgtcgacc tcgagggggg 5220
45 gccgggtacc cagcttttgt tccctttagt gagggtaaat tgcgcgcttg gcgtaatcat 5280
ggtcatagct gtttcctgtg tgaattgtt atccgctcac aattccacac aacatacgag 5340
cgggagatct aaagtgtaaa gcctgggggt cctaattgag gagctaactc acattaattg 5400
cgttgcgcca tgtgaagcag gtgtcggtag cgattacaag gatgatgatg ataagtaacg 5460
gggatcctct agagtcgacc tgcaggcatg caagcttaaa taggaaagt tcttcaacag 5520
50 gattacagt tagctaccta catgctgaaa aatatagcct ttaaattcatt tttatattat 5580
aactctgtat aatagagata agtccatttt ttaaaaatgt tttcccaaaa ccataaaacc 5640
ctatacaagt tgttctagta acaatacatg agaaagatgt ctatgtagct gaaaataaaa 5700
tgacgtcaca agacgatctg cctcgcgctg ttcggtagtg acggtgaaaa cctctgacac 5760
atgcagctcc cggagacggt cacagcttgt ctgtaagcgg atgccgggag cagacaagcc 5820
55 cgtcagggcg cgtcagcggg tgttggcggg tgtcggggcg cagccatgac ccagtcacgt 5880
agcगतatagc gagcccgggc actagtgaat tcgagtatgt gtacgagttg tcttta 5936

```

```

<210> 25
<211> 45
60 <212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: PaDLDH-F
<400> 25
65 gacacttttt caaacatgaa gattattgct tatggaattc gtgac

```

45

```

<210> 26
<211> 57

```





<211> 41  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 5 <223> Descripción de la secuencia artificial: LbDLDH-R  
 <400> 32  
 gaaatcaact tttgttcgcc aaccttaact ggagtttcag c 41

<210> 33  
 <211> 333  
 <212> PRT  
 <213> Lactobacillus bulgaricus  
 <220>  
 <223> LbDLDH  
 <400> 33

15 Met Thr Lys Ile Phe Ala Tyr Ala Ile Arg Glu Asp Glu Lys Pro Phe  
                   5                                  10                                  15  
 Leu Lys Glu Trp Glu Asp Ala His Lys Asp Val Glu Val Glu Tyr Thr  
                   20                                  25                                  30  
 20 Asp Lys Leu Leu Thr Pro Glu Thr Ala Ala Leu Ala Lys Gly Ala Asp  
                   35                                  40                                  45  
 Gly Val Val Val Tyr Gln Gln Leu Asp Tyr Thr Ala Glu Thr Leu Gln  
                   50                                  55                                  60  
 25 Ala Leu Ala Asp Asn Gly Ile Thr Lys Met Ser Leu Arg Asn Val Gly  
                   65                                  70                                  75                                  80  
 Val Asp Asn Ile Asp Met Ala Lys Ala Lys Glu Leu Gly Phe Gln Ile  
                   85                                  90                                  95  
 Thr Asn Val Pro Val Tyr Ser Pro Asn Ala Ile Ala Glu His Ala Ala  
                   100                                  105                                  110  
 30 Ile Gln Ala Ala Arg Ile Leu Arg Gln Ala Lys Ala Met Asp Glu Lys  
                   115                                  120                                  125  
 Val Ala Arg His Asp Leu Arg Trp Ala Pro Thr Ile Gly Arg Glu Val  
                   130                                  135                                  140  
 35 Arg Asp Gln Val Val Gly Val Val Gly Thr Gly His Ile Gly Gln Val  
                   145                                  150                                  155                                  160  
 Phe Met Gln Ile Met Glu Gly Phe Gly Ala Lys Val Ile Ala Tyr Asp  
                   165                                  170                                  175  
 Ile Phe Arg Asn Pro Glu Leu Glu Lys Lys Gly Tyr Tyr Val Asp Ser  
                   180                                  185                                  190  
 40 Leu Asp Asp Leu Tyr Lys Gln Ala Asp Val Ile Ser Leu His Val Pro  
                   195                                  200                                  205  
 Asp Val Pro Ala Asn Val His Met Ile Asn Asp Lys Ser Ile Ala Lys  
                   210                                  215                                  220  
 45 Met Lys Gln Asp Val Val Ile Val Asn Val Ser Arg Gly Pro Leu Val  
                   225                                  230                                  235                                  240  
 Asp Thr Asp Ala Val Ile Arg Gly Leu Asp Ser Gly Lys Val Phe Gly  
                   245                                  250                                  255  
 Tyr Ala Met Asp Val Tyr Glu Gly Glu Val Gly Val Phe Asn Glu Asp  
                   260                                  265                                  270  
 50 Arg Glu Gly Lys Glu Phe Pro Asp Ala Arg Leu Ala Asp Leu Ile Ala  
                   275                                  280                                  285  
 Arg Pro Asn Val Leu Val Thr Pro His Thr Ala Phe Tyr Thr Thr His  
                   290                                  295                                  300  
 55 Ala Val Arg Asn Met Val Val Lys Ala Phe Asp Asn Asn Leu Glu Leu  
                   305                                  310                                  315                                  320  
 Val Glu Gly Lys Glu Ala Glu Thr Pro Val Lys Val Gly  
                   325                                  330

<210> 34  
 <211> 45  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: LbrDLDH-F  
 <400> 34  
 gacacttttt caaacatgaa aattattgct tatggcattc gtgac 45

<210> 35



<211> 45  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 5 <223> Descripción de la secuencia artificial: LpDLDH-R  
 <400> 38  
 atcatcatca tccttgtaat cgtcaaactt aacttgcgtg tcagc 45

<210> 39  
 <211> 332  
 <212> PRT  
 <213> Lactobacillus pentosus  
 <220>  
 <223> LpDLDH  
 <400> 39  
 Met Lys Ile Ile Ala Tyr Ala Val Arg Asp Asp Glu Arg Pro Phe Phe  
                   5  10  15  
 Asp Thr Trp Met Lys Glu Asn Pro Asp Val Glu Val Lys Leu Val Pro  
                   20  25  30  
 20 Glu Leu Leu Thr Glu Asp Asn Val Asp Leu Ala Lys Gly Phe Asp Gly  
                   35  40  45  
 Ala Asp Val Tyr Gln Gln Lys Asp Tyr Thr Ala Glu Val Leu Asn Lys  
                   50  55  60  
 25 Leu Ala Asp Glu Gly Val Lys Asn Ile Ser Leu Arg Asn Val Gly Val  
                   65  70  75  80  
 Asp Asn Leu Asp Val Pro Thr Val Lys Ala Arg Gly Leu Asn Ile Ser  
                   85  90  95  
 Asn Val Pro Ala Tyr Ser Pro Asn Ala Ile Ala Glu Leu Ser Val Thr  
                   100   105   110  
 30 Gln Leu Met Gln Leu Leu Arg Gln Thr Pro Met Phe Asn Lys Lys Leu  
                   115   120   125  
 Ala Lys Gln Asp Phe Arg Trp Ala Pro Asp Ile Ala Lys Glu Leu Asn  
                   130   135   140  
 35 Thr Met Thr Val Gly Val Ile Gly Thr Gly Arg Ile Gly Arg Ala Ala  
                   145   150   155   160  
 Ile Asp Ile Phe Lys Gly Phe Gly Ala Lys Val Ile Gly Tyr Asp Val  
                   165   170   175  
 Tyr Arg Asn Ala Glu Leu Glu Lys Glu Gly Met Tyr Val Asp Thr Leu  
                   180   185   190  
 40 Asp Glu Leu Tyr Ala Gln Ala Asp Val Ile Thr Leu His Val Pro Ala  
                   195   200   205  
 Leu Lys Asp Asn Tyr His Met Leu Asn Ala Asp Ala Phe Ser Lys Met  
                   210   215   220  
 45 Lys Asp Gly Ala Tyr Ile Leu Asn Phe Ala Arg Gly Thr Leu Ile Asp  
                   225   230   235   240  
 Ser Glu Asp Leu Ile Lys Ala Leu Asp Ser Gly Lys Val Ala Gly Ala  
                   245   250   255  
 Ala Leu Val Thr Tyr Glu Tyr Glu Thr Lys Ile Phe Asn Lys Asp Leu  
                   260   265   270  
 50 Glu Gly Gln Thr Ile Asp Asp Lys Val Phe Met Asn Leu Phe Asn Arg  
                   275   280   285  
 Asp Asn Val Leu Ile Thr Pro His Thr Ala Phe Tyr Thr Glu Thr Ala  
                   290   295   300  
 55 Val His Asn Met Val His Val Ser Met Asn Ser Asn Lys Gln Phe Ile  
                   305   310   315   320  
 Glu Thr Gly Lys Ala Asp Thr Gln Val Lys Phe Asp  
                   325   330

<210> 40  
 <211> 42  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: LfDLDH-F  
 <400> 40  
 gacacttttt caaacatggc aaaaatttac gcatacggaa tc 42

<210> 41

<211> 44  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 5 <223> Descripción de la secuencia artificial: LfDLDH-R  
 <400> 41  
 atcatcatca tccttgtaat caccaacctt aactgggggtt tcag 44

<210> 42  
 <211> 332  
 <212> PRT  
 <213> Lactobacillus fermentum  
 <220>  
 <223> LfDLDH  
 15 <400> 42  
 Met Ala Lys Ile Tyr Ala Tyr Gly Ile Arg Lys Asp Glu Glu Pro Tyr  
                   5                  10                  15  
 Leu Asn Glu Trp Ala Lys Asn His Ala Asp Val Thr Val Asp Tyr Thr  
                   20                  25                  30  
 20 Ala Glu Leu Leu Thr Pro Glu Thr Ala Ala Gln Ala Ala Gly Ala Asp  
                   35                  40                  45  
 Gly Val Val Val Tyr Gln Gln Leu Asp Tyr Thr Ala Glu Thr Leu Gln  
                   50                  55                  60  
 25 Ala Leu Ala Asp Gln Gly Val Thr Lys Met Ser Leu Arg Asn Val Gly  
                   65                  70                  75                  80  
 Ile Asp Asn Ile Asp Met Ala Lys Ala Lys Glu Leu Gly Phe Glu Ile  
                   85                  90                  95  
 Thr Asn Val Pro Val Tyr Ser Pro Asn Ala Ile Ala Glu His Ala Ala  
                   100                  105                  110  
 30 Ile Gln Thr Ala Arg Ile Leu Arg Gln Ser Lys Lys Leu Asp Lys Lys  
                   115                  120                  125  
 Ile Glu Asn Gly Asp Leu Arg Trp Ala Pro Thr Ile Gly Arg Glu Val  
                   130                  135                  140  
 35 Arg Asp Gln Val Val Gly Val Val Gly Thr Gly His Ile Gly Gln Val  
                   145                  150                  155                  160  
 Phe Met Gln Ile Met Glu Gly Phe Gly Ala Lys Val Ile Ala Tyr Asp  
                   165                  170                  175  
 Val Phe Lys Asp Pro Glu Leu Glu Lys Lys Gly Tyr Tyr Val Ser Leu  
                   180                  185                  190  
 40 Asp Glu Ile Tyr Ala Gln Ala Asp Val Ile Ser Leu His Val Pro Ala  
                   195                  200                  205  
 Leu Glu Ser Thr Ile His Met Ile Asn Asp Glu Thr Ile Ala Lys Met  
                   210                  215                  220  
 45 Lys Asp Asp Ala Val Leu Val Asn Val Ser Arg Gly Pro Leu Val Asp  
                   225                  230                  235                  240  
 Thr Asp Ala Val Ile Arg Ala Leu Asp Ser Gly Lys Leu Phe Gly Phe  
                   245                  250                  255  
 Val Met Asp Thr Tyr Glu Asp Glu Val Gly Ile Phe Asn Glu Asp Trp  
                   260                  265                  270  
 50 Gln Gly Lys Glu Phe Pro Asp Ala Arg Leu Asn Asp Leu Ile His Arg  
                   275                  280                  285  
 Asp Asn Val Leu Val Thr Pro His Thr Ala Phe Tyr Thr Thr His Ala  
                   290                  295                  300  
 55 Val Arg Asn Met Val Leu Lys Ala Phe Asp Asn Asn Leu Ala Leu Val  
                   305                  310                  315                  320  
 Lys Gly Glu Glu Pro Glu Thr Pro Val Lys Val Gly  
                   325                  330

<210> 43  
 <211> 46  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Lp1DLDH-F  
 65 <400> 43  
 gacacttttt caaacatgaa aattattgca tatgctgtac gtgatg 46  
 <210> 44





<211> 48  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 5 <223> Descripción de la secuencia artificial: SaDLDH-R  
 <400> 50  
 gagctcgaat tcacatgta atttaaactg gtttcacatg taccagtg 48

<210> 51  
 <211> 351  
 <212> PRT  
 <213> Schizosaccharomyces pombe  
 <220>  
 <223> SaDLDH  
 <400> 51

15 Met Tyr Ile Ile Phe Asn Phe Thr His Leu Leu Phe Asn Leu Leu Lys  
 Ala Arg Phe Leu Ile Met Thr Lys Ile Met Phe Phe Gly Thr Arg Asp  
 20 Tyr Glu Lys Glu Met Ala Leu Asn Trp Gly Lys Lys Asn Asn Val Glu  
 Val Thr Thr Ser Lys Glu Leu Leu Ser Ser Ala Thr Val Asp Gln Leu  
 25 Lys Asp Tyr Asp Gly Val Thr Thr Met Gln Phe Gly Lys Leu Glu Asn  
 Asp Val Tyr Pro Lys Leu Glu Ser Tyr Gly Ile Lys Gln Ile Ala Gln  
 Arg Thr Ala Gly Phe Asp Met Tyr Asp Leu Asp Leu Ala Lys Lys His  
 30 Asn Ile Val Ile Ser Asn Val Pro Ser Tyr Ser Pro Glu Thr Ile Ala  
 Glu Tyr Ser Val Ser Ile Ala Leu Gln Leu Val Arg Arg Phe Pro Asp  
 35 Ile Glu Arg Arg Val Gln Thr His Asp Phe Thr Trp Gln Ala Glu Ile  
 Met Ser Lys Pro Val Lys Asn Met Thr Val Ala Ile Ile Gly Thr Gly  
 Arg Ile Gly Ala Ala Thr Ala Lys Ile Tyr Ala Gly Phe Gly Ala Thr  
 40 Ile Thr Ala Tyr Asp Ala Tyr Pro Asn Lys Asp Leu Asp Phe Leu Thr  
 Tyr Lys Asp Ser Val Lys Glu Ala Ile Lys Asp Ala Asp Ile Ile Ser  
 45 Leu His Val Pro Ala Asn Lys Glu Ser Tyr His Leu Phe Asp Lys Ala  
 Met Phe Asp His Val Lys Lys Gly Ala Ile Leu Val Asn Ala Ala Arg  
 Gly Ala Val Ile Asn Thr Pro Asp Leu Ile Ala Ala Val Asn Asp Gly  
 50 Thr Leu Leu Gly Ala Ala Ile Asp Thr Tyr Glu Asn Glu Ala Ala Tyr  
 Phe Thr Asn Asp Trp Thr Asn Lys Asp Ile Asp Asp Lys Thr Leu Leu  
 55 Glu Leu Ile Glu His Glu Arg Ile Leu Val Thr Pro His Ile Ala Phe  
 Phe Ser Asp Glu Ala Val Gln Asn Leu Val Glu Gly Gly Leu Asn Ala  
 Ala Leu Ser Val Ile Asn Thr Gly Thr Cys Glu Thr Arg Leu Asn  
 60

<210> 52  
 <211> 41  
 <212> ADN  
 65 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: LmDLDH-F  
 <400> 52

gacacttttt caaacatgaa gatttttgct tacggcattc g 41

<210> 53  
 <211> 45  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: LmDLDH-R  
 <400> 53

5 gagctcgaat tcacatgta atattcaaca gcaatagctg gcttc 45

<210> 54  
 <211> 331  
 <212> PRT  
 <213> Leuconostoc mesenteroides  
 <220>  
 <223> LmDLDH  
 <400> 54

20 Met Lys Ile Phe Ala Tyr Gly Ile Arg Asp Asp Glu Lys Pro Ser Leu  
 5 10 15  
 Glu Glu Trp Lys Ala Ala Asn Pro Glu Ile Glu Val Asp Tyr Thr Gln  
 20 25 30  
 Glu Leu Leu Thr Pro Glu Thr Ala Lys Leu Ala Glu Gly Ser Asp Ser  
 35 40 45  
 25 Ala Val Val Tyr Gln Gln Leu Asp Tyr Thr Arg Glu Thr Leu Thr Ala  
 50 55 60  
 Leu Ala Asn Val Gly Val Thr Asn Leu Ser Leu Arg Asn Val Gly Thr  
 65 70 75 80  
 30 Asp Asn Ile Asp Phe Asp Ala Ala Arg Glu Phe Asn Phe Asn Ile Ser  
 85 90 95  
 Asn Val Pro Val Tyr Ser Pro Asn Ala Ile Ala Glu His Ser Met Leu  
 100 105 110  
 Gln Leu Ser Arg Leu Leu Arg Arg Thr Lys Ala Leu Asp Ala Lys Ile  
 115 120 125  
 35 Ala Lys Arg Asp Leu Arg Trp Ala Pro Thr Thr Gly Arg Glu Met Arg  
 130 135 140  
 Met Gln Thr Val Gly Val Ile Gly Thr Gly His Ile Gly Arg Val Ala  
 145 150 155 160  
 40 Ile Asn Ile Leu Lys Gly Phe Gly Ala Lys Val Ile Ala Tyr Asp Lys  
 165 170 175  
 Tyr Pro Asn Ala Glu Leu Gln Ala Glu Gly Leu Tyr Val Asp Thr Leu  
 180 185 190  
 Asp Glu Leu Tyr Ala Gln Ala Asp Ala Ile Ser Leu Tyr Val Pro Gly  
 195 200 205  
 45 Val Pro Glu Asn His His Leu Ile Asn Ala Asp Ala Ile Ala Lys Met  
 210 215 220  
 Lys Asp Gly Val Val Ile Met Asn Ala Ala Arg Gly Asn Leu Met Asp  
 225 230 235 240  
 Ile Asp Ala Ile Ile Asp Gly Leu Asn Ser Gly Lys Ile Ser Asp Phe  
 245 250 255  
 50 Gly Met Asp Val Tyr Glu Asn Glu Val Ala Cys Ser Met Lys Ile Gly  
 260 265 270  
 Leu Val Lys Asn Ser Pro Asp Ala Lys Ile Ala Asp Leu Ile Ala Arg  
 275 280 285  
 55 Glu Asn Val Met Ile Thr Pro His Thr Ala Phe Tyr Thr Thr Lys Ala  
 290 295 300  
 Val Leu Glu Met Val His Gln Ser Phe Asp Ala Ala Val Ala Phe Ala  
 305 310 315 320  
 60 Lys Gly Glu Lys Pro Ala Ile Ala Val Glu Tyr  
 325 330

<210> 55  
 <211> 1116  
 <212> ADN  
 <213> Schizosaccharomyces pombe  
 <220>  
 <223> Gen leu1  
 <400> 55

	atgtgtgcaa	agaaaatcgt	cgtcttacca	ggagaccata	ttggccctga	aattgttgct	60
	tctgccttgg	aggttttgaa	agtcgttgag	aagaagcgac	ctgagttaa	actcgagttt	120
	gaagaacaca	agattggagg	tgcccttatt	gatgcctatg	gaaccccttt	gactgacgag	180
5	actgtgaagg	cttgttttga	agctgacggg	gttcttttgg	gtgccgttgg	tggtcctgaa	240
	tggaccaacc	ccaattgtcg	tcctgagcaa	ggtttattga	agcttcgtaa	gagtatgggt	300
	gtttgggcca	accttcgacc	ttgcaacttt	gccagcaagt	ctttagtcaa	gtacagccct	360
	ttgaagcctg	aaatcgttga	agggtgctgat	ttttgtgttg	tacgagaact	tactggaggt	420
	tgttactttg	gtgagcgcac	tgaggacaac	ggatcgggtt	atgctatgga	cacttggcct	480
10	tacagtttgg	aagaagtttc	tcgtattgct	cgtttggctg	cttggttagc	tgaaacttcc	540
	aaccctcctg	ctcccgtcac	attactcgac	aaagctaata	ttttggcaac	ttctcgtctt	600
	tggcgcaaga	ctgtagctaa	gatttttaag	gaggaatatc	ctcaccttac	cttaaaaaac	660
	cagctcattg	actccgcagc	catgcttttg	gtcaagagcc	ctcgtacact	taacgggtgt	720
	gttttgactg	acaacttggt	tggtgacatt	atctcagatg	aggcttctgt	cattcctggg	780
	agcttggggc	ttttgccttc	tgccctccct	tccggtgtgg	taggaaaatc	agaagaaaag	840
15	gttcattggt	tgggtgagcc	cattcacggg	agcgtccccg	atatcgctgg	caagggcatt	900
	gttaatcctg	ttggtacaat	tttatctgct	tcccttctcc	ttcgttatgg	tttgaatgct	960
	cctaaggagg	ctgaagctat	cgaagccgac	gtacgcaagg	tcttggatga	tacttcaatt	1020
	ggtggacgtg	gtctttatac	tcgcgatttg	ggaggtgagg	cttctaccgc	tgatattact	1080
20	aaggctgttg	ttgaagaact	tgaaaaaatt	ttgtaa			1116

<210> 56  
 <211> 795  
 <212> ADN  
 25 <213> Schizosaccharomyces pombe  
 <220>  
 <223> Gen Ura4  
 <400> 56

30	atggatgcta	gagtatttca	aagctattca	gctagagctg	aggggatgaa	aaatccatt	60
	gccaaggaat	tgttggcttt	gatggaagaa	aagcaaagca	acttgtcagt	cgcggtcgat	120
	ttgacgaaga	aatccgaaat	cttagaattg	gtagataaaa	ttggacccta	tgtctgtgtt	180
	atcaagacac	atattgacgt	tgtcgaggat	ttcgaccagg	atatggtaga	aaaactgggt	240
	gccttaggta	aaaagcatcg	ttttcttatt	tttgaggatc	gcaaattcgc	agacattgga	300
	aataccgtca	agctacaata	tgcatctggt	gtgtacaaaa	ttgcttcttg	ggctcataatc	360
35	acaaattgcc	atacagtgcc	aggcgagggt	attatacaag	gcctcaaaga	agttggttta	420
	cctttgggac	gtgggtctct	gcttttggct	gaaatgtctt	ccaaaggctc	tttggctact	480
	ggttcctaca	cagagaaaac	cttagaatgg	tttgagaagc	ataccgattt	ttgctttggc	540
	tttatagctg	gtcgtcgatt	tcctaaccct	caaagcgact	acataactat	gtcccctggg	600
	atcggcttgg	atgttaaagg	agacgggctg	ggacagcaat	atcgtaactc	tgaagaagtg	660
40	attgtaaact	gcggtagcga	tatcatcatt	gttggctcgtg	gagtctatgg	agctggtcgt	720
	aatcctgttg	tcgaagccaa	gagatataga	gaagctgggt	ggaaggcata	tcagcaaaga	780
	ctttctcagc	attaa					795

45

## REIVINDICACIONES

1. Transformante que utiliza *Schizosaccharomyces pombe* como huésped en el que se incorporan un gen de D-lactato deshidrogenasa de *Pediococcus acidilactici* y un gen de D-lactato deshidrogenasa de *Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus bulgaricus* o *Lactobacillus brevis*,  
 5 en el que los genes que codifican la piruvato descarboxilasa 2 del huésped *Schizosaccharomyces pombe* se han eliminado o inactivado.
2. Transformante, según la reivindicación 1,  
 10 en el que el gen de D-lactato deshidrogenasa se incorpora en un cromosoma de la *Schizosaccharomyces pombe*.
3. Procedimiento para la producción de un transformante usando *Schizosaccharomyces pombe* como huésped en el que se incorporan un gen de D-lactato deshidrogenasa de *Pediococcus acidilactici* y un gen de D-lactato deshidrogenasa de *Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus bulgaricus* o *Lactobacillus brevis*, y en el que los genes que  
 15 codifican la piruvato descarboxilasa 2 del huésped *Schizosaccharomyces pombe* se han eliminado o inactivado, comprendiendo el procedimiento:  
 una etapa de obtener un transformante mediante la introducción de un casete de expresión en el huésped,  
 en el que el casete de expresión consiste en un casete de expresión que incluye un promotor y un terminador que funcionan en la *Schizosaccharomyces pombe* y un gen de D-lactato deshidrogenasa de *Pediococcus acidilactici* y un  
 20 casete de expresión que incluye un promotor y un terminador que funcionan en la *Schizosaccharomyces pombe* y un gen de D-lactato deshidrogenasa de *Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus bulgaricus*, o *Lactobacillus brevis*, o  
 consiste en un casete de expresión que incluye un promotor o un terminador que funcionan en la *Schizosaccharomyces pombe*, un gen de D-lactato deshidrogenasa de *Pediococcus acidilactici*, y una D-lactato deshidrogenasa de *Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus bulgaricus* o *Lactobacillus brevis*, y  
 25 se utiliza un huésped en el que se han eliminado o inactivado los genes que codifican la piruvato descarboxilasa 2 como huésped, o se eliminan o inactivan los genes que codifican la piruvato descarboxilasa 2 del transformante obtenido.
4. Procedimiento para la producción de un transformante, según la reivindicación 3,  
 30 en el que el gen de D-lactato deshidrogenasa de *Pediococcus acidilactici* y el gen de D-lactato deshidrogenasa de *Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus bulgaricus* o *Lactobacillus brevis* se introducen en un cromosoma del huésped.
5. Procedimiento para la producción de ácido láctico,  
 en el que el transformante, según la reivindicación 1 o 2, es cultivado o fermentado en una solución de cultivo o una  
 35 solución de fermentación, y  
 se obtiene ácido D-láctico de la solución de cultivo o la solución de fermentación.
6. Procedimiento para la producción de ácido láctico, según la reivindicación 5,  
 en el que el cultivo o la fermentación se realizan utilizando una solución de cultivo o una solución de fermentación  
 40 que contienen glucosa o sacarosa en una concentración del 1% en masa al 50% en masa.
7. Procedimiento para la producción de ácido láctico, según la reivindicación 5 o 6,  
 en el que el cultivo o la fermentación se continúa adicionalmente después de que el pH de la solución de cultivo o la  
 45 solución de fermentación llegue a ser igual a o menor que 3,5 debido al ácido D-láctico producido por el transformante.
8. Procedimiento para la producción de ácido láctico, según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7,  
 en el que se ajusta una concentración celular bacteriana inicial del transformante en la solución de cultivo o la  
 50 solución de fermentación para que sea de 0,1 g/l a 50 g/l (expresada en términos de células bacterianas en seco).
9. Procedimiento para la producción de ácido láctico, según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8,  
 en el que el cultivo o la fermentación se continúan sin neutralizar el ácido D-láctico en la solución de cultivo o la  
 solución de fermentación que se produce por el transformante.
- 55 10. Procedimiento para la producción de ácido láctico, según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 9,  
 en el que el ácido láctico se separa de la solución de cultivo o la solución de fermentación sin neutralizar el ácido D-láctico en la solución de cultivo o la solución de fermentación que se produce por el transformante.

Figura 1

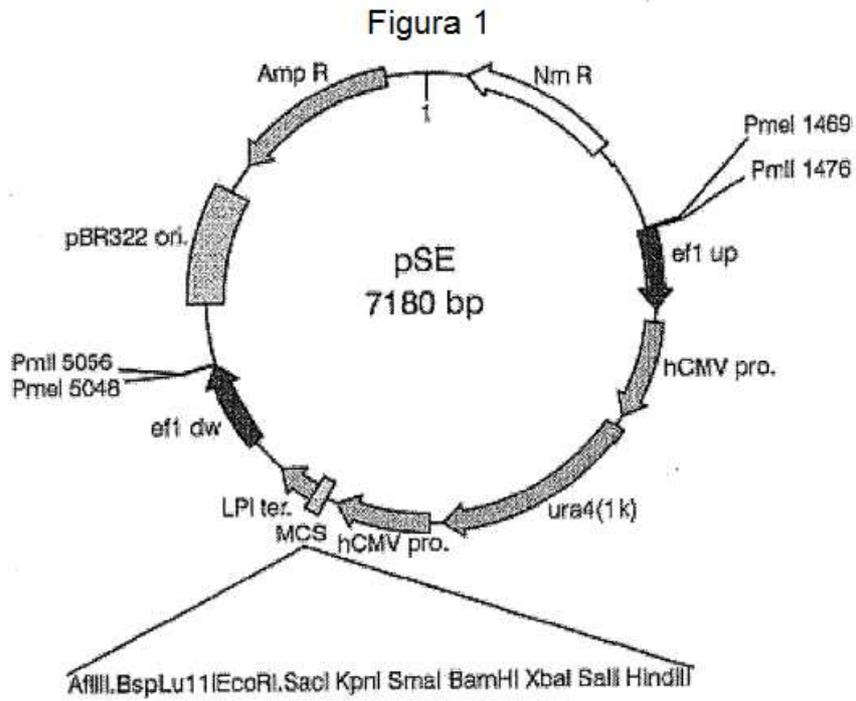


Figura 2

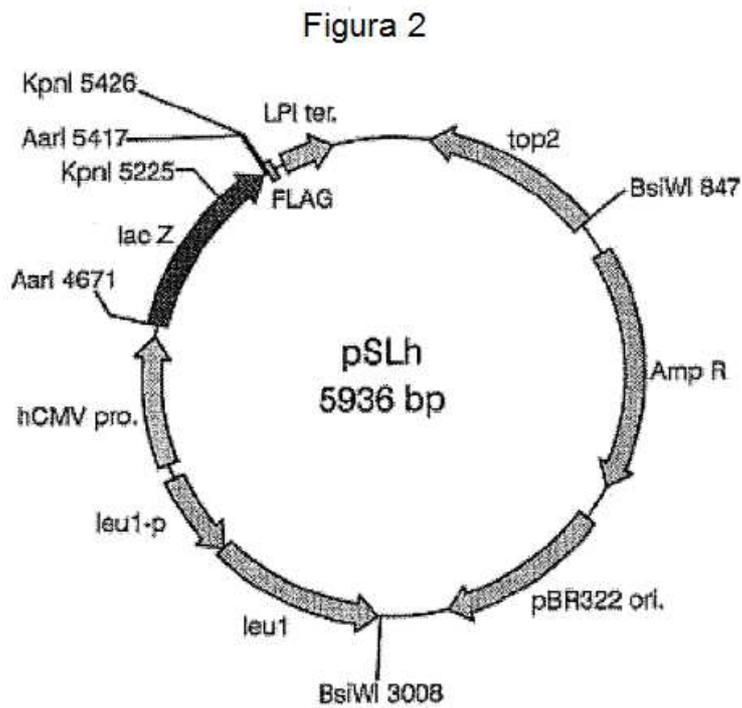


Figura 3

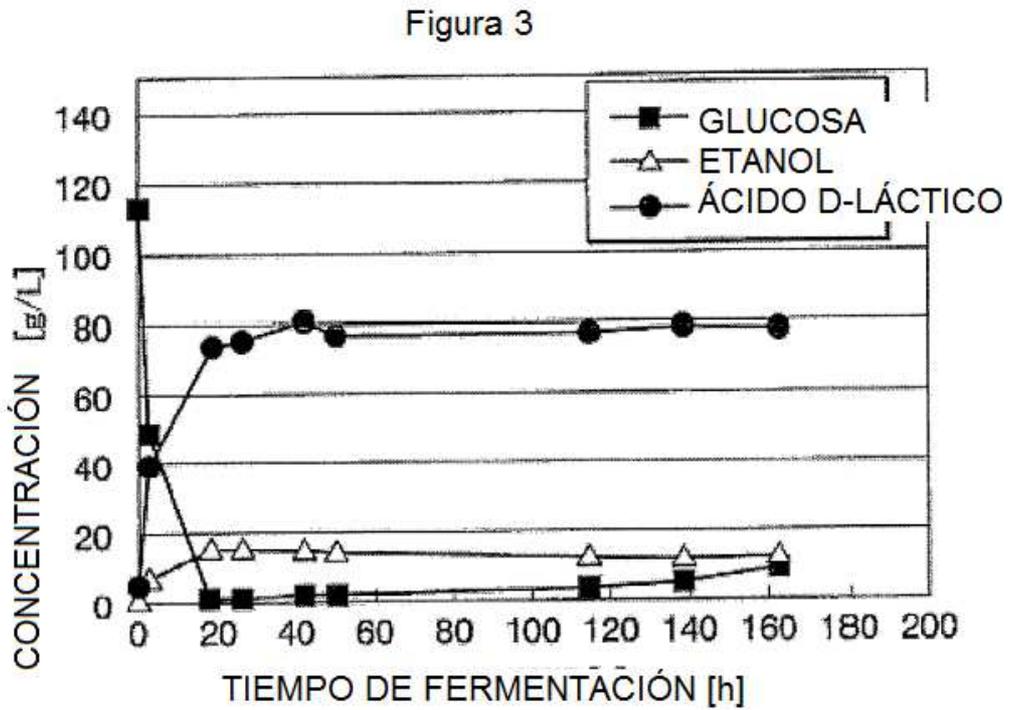


Figura 4

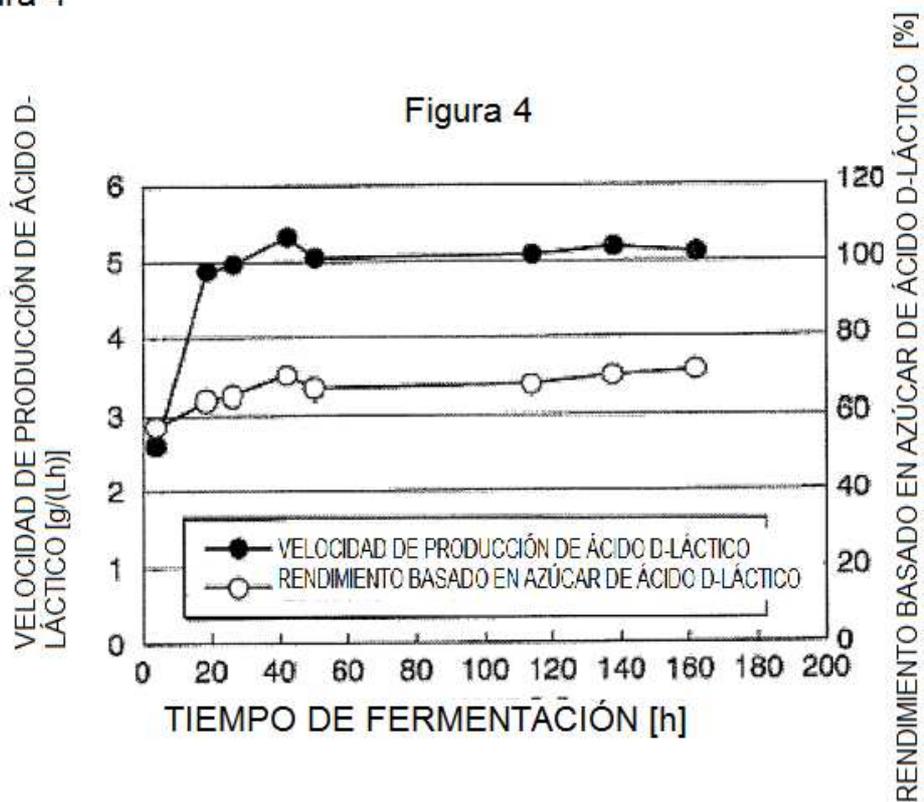


Figura 5

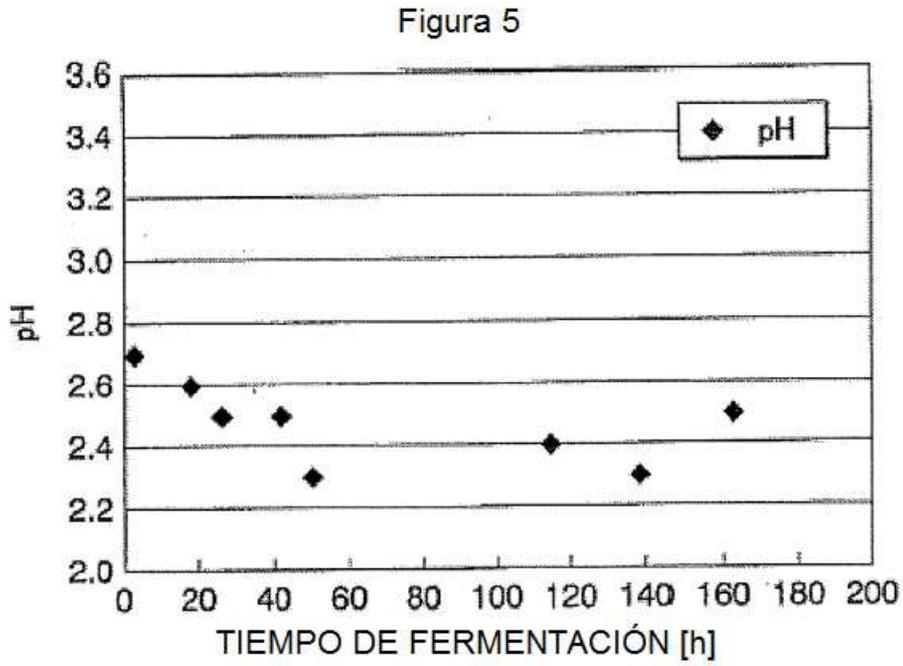


Figura 6

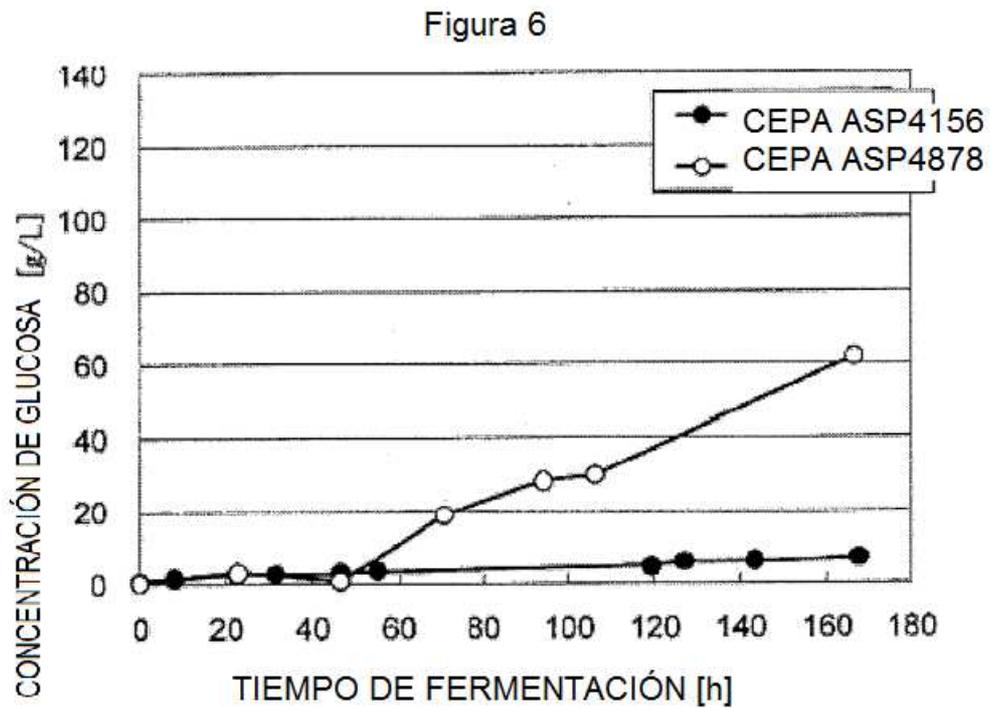


Figura 7

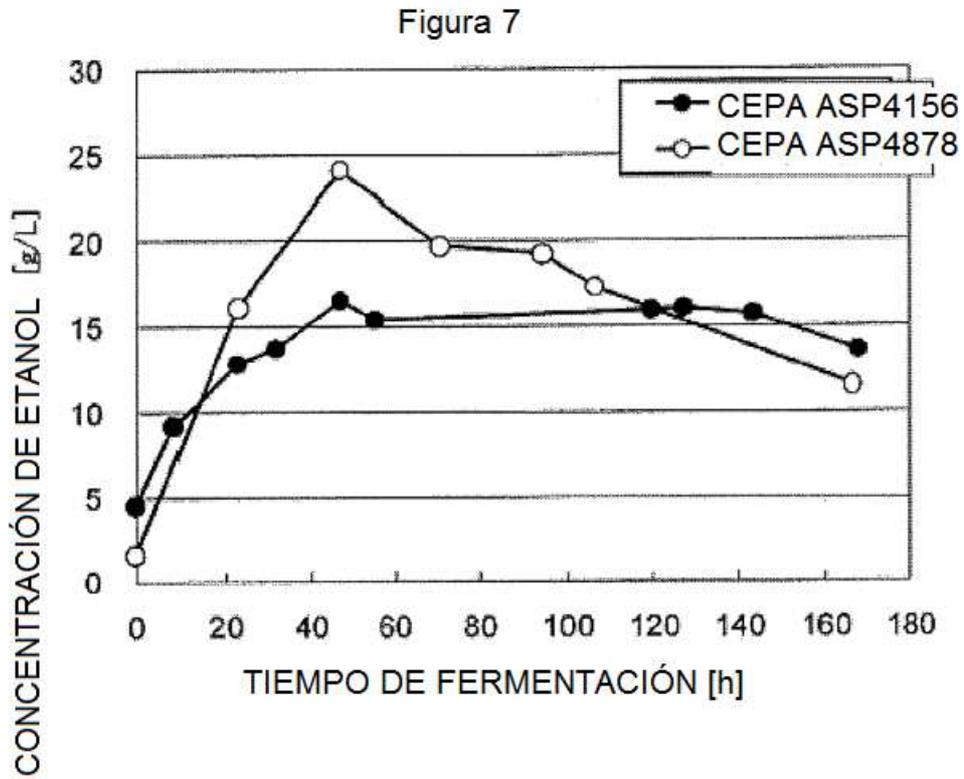


Figura 8

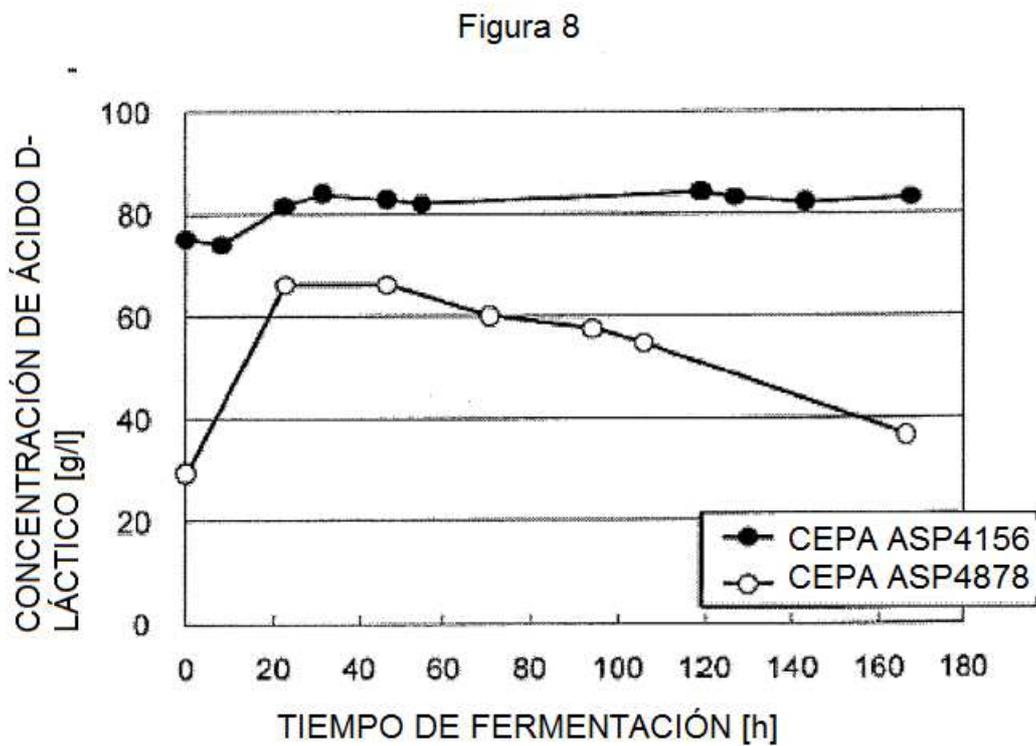


Figura 9

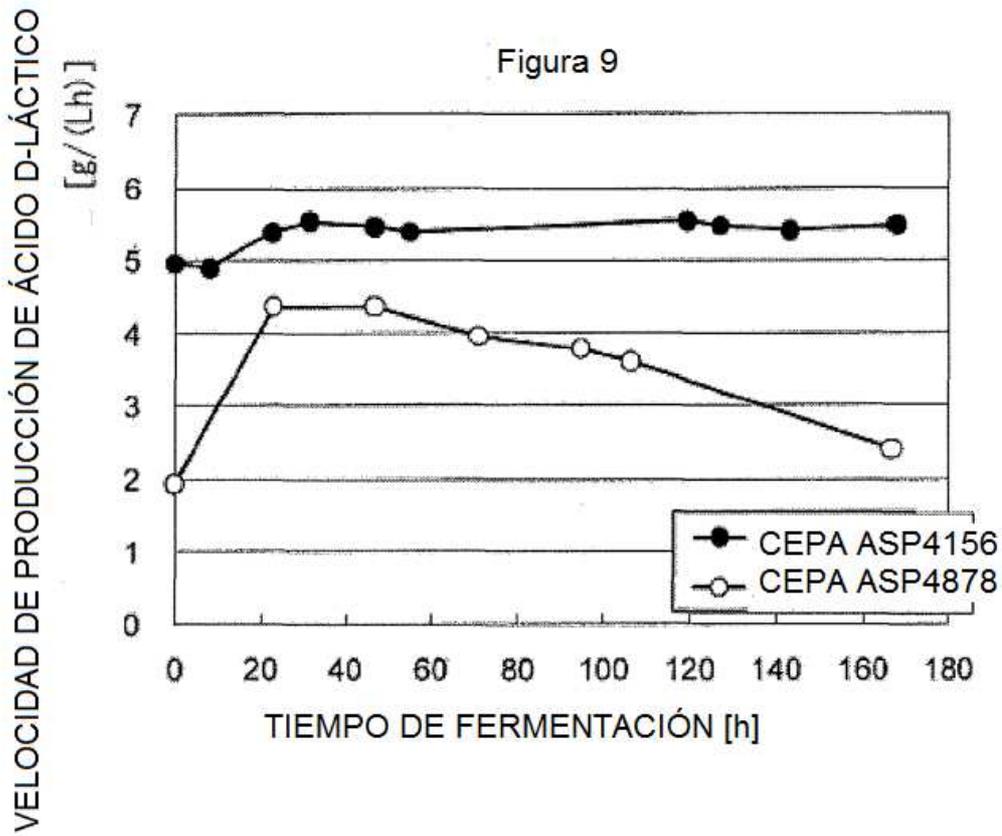


Figura 10

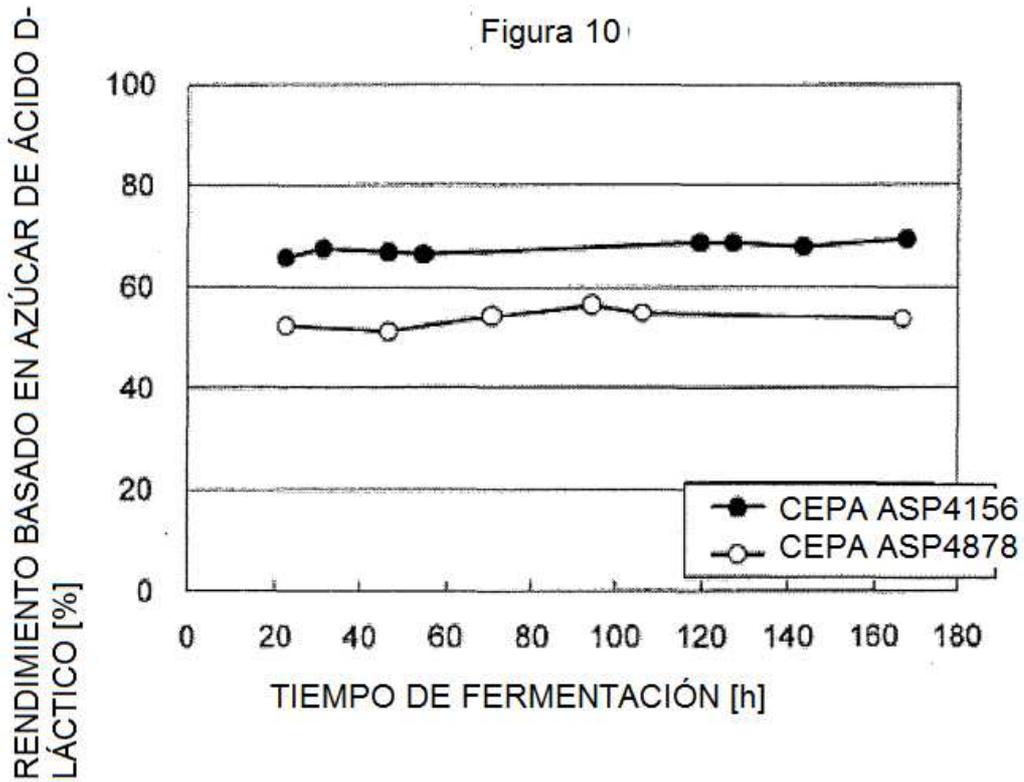


Figura 11

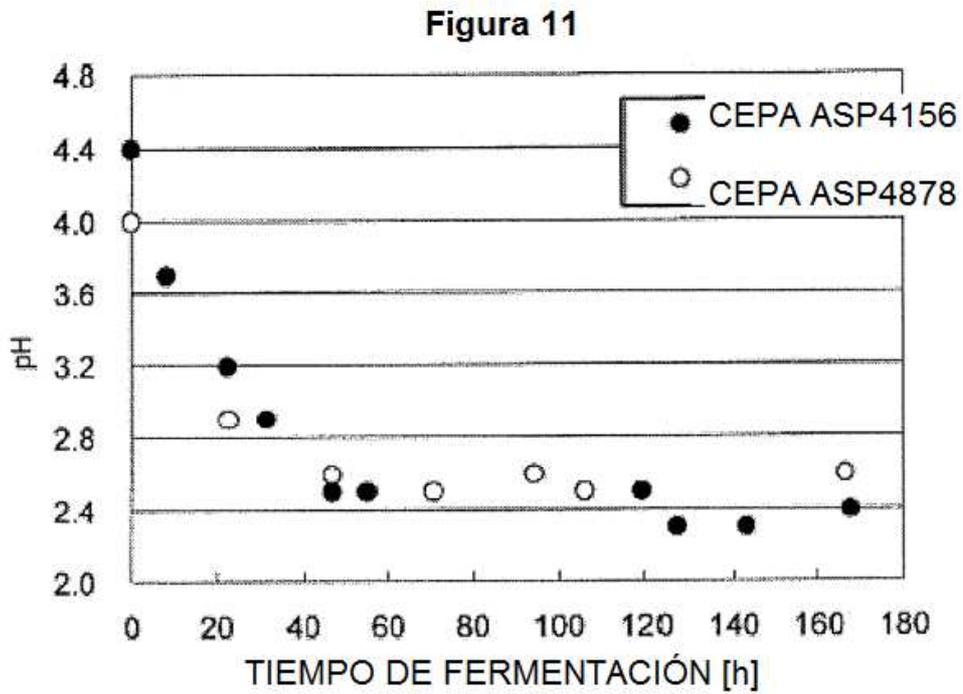


Figura 12

