

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 759 269**

51 Int. Cl.:

C12N 15/09	(2006.01)
C12N 1/19	(2006.01)
C12P 7/56	(2006.01)
C12R 1/645	(2006.01)
C12N 9/04	(2006.01)
C12N 1/16	(2006.01)
C12N 15/81	(2006.01)
C12N 9/88	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.10.2015 PCT/JP2015/078394**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **14.04.2016 WO16056566**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.10.2015 E 15849633 (1)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.08.2019 EP 3205721**

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

30 Prioridad:

10.10.2014 JP 2014209048

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
08.05.2020

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**HARA, FUTOSHI;
KASHIMA, AYAKO y
KIMURA, SHUICHIRO**

74 Agente/Representante:

SALVÀ FERRER, Joan

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 759 269 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 y su proceso de producción, y a un procedimiento para producir ácido láctico. Específicamente, un transformante que contiene un gen de lactato deshidrogenasa (un gen que codifica lactato deshidrogenasa (LDH), y en lo sucesivo también referido como gen de LDH) introducido en *Schizosaccharomyces pombe* (en lo sucesivo también denominado como *S. pombe*), en el que un gen que es una parte de un grupo de genes que codifican la piruvato descarboxilasa está eliminado o inactivado, un proceso de producción del transformante, y un procedimiento para producir ácido láctico mediante el cultivo del transformante en un caldo de cultivo y la recuperación del ácido láctico a partir del caldo de cultivo.

15 Estado de la técnica

El ácido láctico es ampliamente utilizado en alimentos y materias primas químicas utilizadas para la medicina, cosméticos, etc. Además, el ácido poliláctico obtenido utilizando ácido láctico ha atraído la atención como un plástico biodegradable que se degrada finalmente en dióxido de carbono y agua por microorganismos. Por lo tanto, es necesario producir ácido láctico a un bajo costo con una alta productividad.

Como procedimiento para producir ácido láctico, un procedimiento de producción biológica en el que un sacárido es fermentado por bacterias del ácido láctico. Sin embargo, dado que la resistencia a los ácidos del ácido láctico es baja, con el fin de lograr una alta productividad de este procedimiento, se requiere que el ácido láctico producido por fermentación se convierta en una sal de ácido láctico mediante la neutralización con un álcali. Tal neutralización con un álcali requiere una etapa para la restauración del ácido láctico a partir de la sal de ácido láctico, por lo que los pasos de producción se complican y el coste de producción se eleva.

Como procedimiento para la obtención de ácido láctico sin llevar a cabo la neutralización con un álcali, un procedimiento que utiliza un transformante preparado mediante la introducción de un gen que codifica LDH en un huésped de levadura. Por ejemplo, el Documento de Patente 1 describe que el ácido láctico se puede producir con una alta productividad, sin llevar a cabo una etapa de neutralización con un álcali, mediante el cultivo de un transformante que contiene un gen de LDH que deriva de mamíferos, tales como seres humanos y se introduce en un huésped de *S. pombe*, en el que un gen que es una parte de un grupo de genes que codifican la piruvato descarboxilasa del huésped de *S. pombe* está eliminado o inactivado. Además, el Documento de Patente 2 da a conocer que el ácido láctico se puede obtener mediante el uso de un transformante preparado introduciendo un gen de L-lactato deshidrogenasa de *Lactobacillus plantarum* en un *Saccharomyces cerevisiae* que no produce esencialmente etanol cuando se cultiva en un medio de cultivo.

Además, el Documento de Patente 3 describe que un transformante que contiene un gen de LDH de *Lactobacillus pentosus* (gen de LpLDH) introducido en un huésped de *S. pombe*, en el que un gen que es una parte de un grupo de genes que codifican la piruvato descarboxilasa del huésped de *S. pombe* está eliminado o inactivado, tiene una capacidad de producción de ácido láctico al mismo nivel que o un nivel mayor que el transformante descrito en el Documento de Patente 1. Y, particularmente, se describe que, mediante la introducción de un gen de LpLDH en combinación con un gen de LDH derivado de ser humano (gen de HsLDH), la capacidad de producción de ácido láctico puede ser mejorada significativamente en comparación con un transformante transformado con una sola copia del gen de HsLDH o un transformante transformado con una sola copia del gen de HsLDH y una sola copia de un gen de LDH derivado de otras especies.

50 Lista de citas

Bibliografía de Patentes

[Documento de patente 1] Publicación Internacional PCT N° WO2011/021629
 55 [Documento de patente 2] Traducción de la publicación japonesa No. 2007-512018 de la Publicación Internacional PCT
 [Documento de patente 3] Publicación Internacional PCT N° WO2014/030655

60 Características de la invención

Problema técnico

Para producir ácido láctico de manera eficiente, se prefiere un excelente transformante en la capacidad de producción de ácido láctico y en la capacidad de crecimiento. Sin embargo, tal como se describe en el siguiente Ejemplo 1, la tendencia general de una cepa mutante preparada mediante introducción de un gen de LDH exógeno es que tenga una alta capacidad de producción de ácido láctico y una baja capacidad de crecimiento.

La presente invención proporciona un transformante de *S. pombe* que puede producir ácido láctico con una elevada productividad sin requerir neutralización con un álcali y es excelente en la capacidad de producción de ácido láctico y capacidad de crecimiento, y el proceso de producción del mismo.

5 Además, la presente invención proporciona un procedimiento para producir ácido láctico, con una alta productividad sin requerir neutralización con un álcali, mediante el uso del transformante.

10 En el presente documento, el ácido láctico según la presente invención significa ácido L-láctico que se obtiene mediante un procedimiento biológico.

Solución al problema

15 Un transformante de *Schizosaccharomyces pombe* que comprende 3 copias de un gen de lactato deshidrogenasa humano e introducido en un huésped de *Schizosaccharomyces pombe*, en el que un gen que codifica piruvato descarboxilasa 2 del huésped de *Schizosaccharomyces pombe* está eliminado o inactivado, y el proceso de producción, tal como se define en las reclamaciones.

20 La presente solicitud da a conocer un transformante que contiene de 3 a 5 copias de un gen de lactato deshidrogenasa derivado de ser humano e introducido en un huésped de *Schizosaccharomyces pombe*, en el que un gen que es una parte de un grupo de genes que codifican la piruvato descarboxilasa del huésped de *Schizosaccharomyces pombe* está eliminado o inactivado.

25 Además, la presente solicitud también describe un transformante caracterizado por proporcionar una concentración celular de al menos 4,0 g (sobre una base de peso celular en seco)/litro de un caldo de cultivo preparado mediante inoculación de células, a una concentración celular inicial de 0,04 g (sobre una base de peso celular en seco)/litro, en un matraz de Sakaguchi de 500 ml que contiene 100 ml de un caldo de cultivo líquido que incluye 1% de extracto de levadura, 2% de peptona y 6% de glucosa, y a continuación el cultivo durante 20 horas a una temperatura de 32 °C con condiciones de agitación de 110 rpm y 7 cm de recorrido, y disposición de una concentración de ácido láctico

30 de por lo menos 80 g/l de un licor de fermentación preparado mediante inoculación de las células, a una concentración celular inicial de 0,04 g (sobre una base de peso celular en seco)/litro en un matraz de Sakaguchi de 500 ml que contiene 100 ml de un caldo de cultivo líquido que incluye 1% de extracto de levadura, 2% de peptona y 6% de glucosa, y a continuación el cultivo durante 20 horas a una temperatura de 32 °C con condiciones de agitación de 110 rpm y 7 cm de recorrido, seguido de la inoculación de las células obtenidas de este modo, a una

35 concentración celular inicial de 36 g (sobre una base de peso celular en seco)/litro en un tubo de ensayo que tiene un diámetro de 18 mm y una longitud de 150 mm y que contiene 4,5 ml de una solución acuosa de glucosa al 11,1% y, a continuación, la fermentación durante 3 horas a una temperatura de 32 °C con condiciones de agitación con un ángulo de agitación de 43,5 °, 110 rpm y 7 cm de recorrido.

40 El transformante es, preferiblemente, un transformante que contiene al menos un gen de lactato deshidrogenasa introducido en un huésped de *Schizosaccharomyces pombe*, en el que un gen que es una parte de un grupo de genes que codifican piruvato descarboxilasa del huésped de *Schizosaccharomyces pombe* está eliminado o inactivado.

45 El gen que codifica la piruvato descarboxilasa eliminado o inactivado es preferiblemente un gen de PDC2. Además, el gen de LDH está integrado preferiblemente en un cromosoma de *Schizosaccharomyces pombe*.

50 Además, el procedimiento para producir el transformante descrito en el presente documento es un proceso para producir un transformante que contiene de 3 a 5 copias de un gen de lactato deshidrogenasa derivado de ser humano y que presenta la delección o inactivación de un gen que es una parte de un grupo de genes que codifican la piruvato descarboxilasa, caracterizado por la introducción de un casete de expresión que comprende un promotor y un terminador capaz de funcionar en *Schizosaccharomyces pombe* y un gen de lactato deshidrogenasa en de las posiciones 3 a 5 del cromosoma de un huésped de *Schizosaccharomyces pombe* para obtener un transformante, y la utilización de un huésped en el que un gen que es una parte de un grupo de genes que codifica la piruvato

55 descarboxilasa está eliminado o inactivado como el huésped de *Schizosaccharomyces pombe* o la eliminación o inactivación de un gen que es una parte de un grupo de genes que codifican la piruvato descarboxilasa del transformante obtenido.

60 En el proceso para producir el transformante descrito en el presente documento, el casete de expresión se introduce preferiblemente en una región seleccionada de una región que comprende de 10.000 pb en dirección 5' a 10.000 pb en dirección 3' de un locus del gen *eno101*, una región que comprende de 10.000 pb en dirección 5' a 10.000 pb en dirección 3' de un locus del gen *leu1*, y una región que comprende de 10.000 pb en dirección 5' a 10.000 pb en dirección 3' de un locus del gen *gpml*.

65 Además, en el procedimiento para producir el transformante descrito en este documento, el gen que codifica piruvato descarboxilasa eliminado o inactivado es preferiblemente un gen de PDC2.

Además, el procedimiento para producir ácido láctico de la presente invención está compuesto de cultivar el transformante, y recuperar ácido láctico a partir de un caldo de cultivo.

5 En el procedimiento para producir ácido láctico de la presente invención, se usa preferiblemente un caldo de cultivo que tiene una concentración de glucosa del 1 al 50 % en masa para el cultivo del transformante. Además, se continúa el cultivo preferiblemente después de que el pH del caldo de cultivo sea de 3,5 o menor debido al ácido láctico producido por el transformante.

10 Además, el cultivo se continúa preferiblemente sin neutralizar el ácido láctico producido por el transformante en el caldo de cultivo, y el ácido láctico se separa preferiblemente del caldo de cultivo sin neutralizar el ácido láctico producido por el transformante en el caldo de cultivo.

La presente invención se define por las reivindicaciones.

15 Efectos ventajosos de la invención

El transformante de *S. pombe* de la presente invención es excelente en capacidad de crecimiento, y puede producir ácido láctico con una elevada productividad sin requerir neutralización con un álcali. Además, es adecuado para la producción de ácido láctico en presencia de alta concentración de sacáridos, en particular glucosa, fructosa, sacarosa y maltosa, y también es adecuado para un cultivo de alta densidad. Además, también es excelente en la capacidad de producción de ácido láctico a largo plazo en un cultivo continuo bajo condiciones de oxígeno elevado.

20 El transformante se puede producir convenientemente de acuerdo con el proceso de producción de transformante de la presente invención.

Además, el procedimiento de producción de ácido láctico de la presente invención puede producir ácido láctico con una elevada productividad sin llevar a cabo una etapa de neutralización con un álcali.

30 Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 es una figura esquemática que ilustra la estructura del vector recombinante PSM-HsLDH.

La Fig. 2 es una figura esquemática que ilustra la estructura del vector recombinante PSN-HsLDH.

35 La Fig. 3 es un diagrama de dispersión que muestra la concentración de ácido láctico (g/litro) después de la fermentación de 3 horas (eje vertical) y una concentración de células (g (sobre una base de peso celular en seco (dcw))/litro) de un caldo de cultivo después del cultivo durante 20 horas (eje horizontal), de cada transformante en el Ejemplo 1.

40 La Fig. 4 es un gráfico que muestra los resultados de medición de DO660 de un caldo de cultivo después del cultivo durante 60 horas y una concentración de ácido láctico (g/litro) de un licor de fermentación después de la fermentación de 3 horas, de cada transformante en el Ejemplo 2.

La Fig. 5 es un gráfico que muestra los cambios en el transcurso del tiempo en una concentración de ácido láctico (g/litro) de un licor de fermentación en la fermentación continua de cada transformante en el Ejemplo 3.

Descripción de las realizaciones

45 [Transformante]

50 El primer transformante descrito en el presente documento se caracteriza por que contiene de 3 a 5 copias de un gen de lactato deshidrogenasa derivado de ser humano e introducido en un huésped de *Schizosaccharomyces pombe*, en el que un gen que es una parte de un grupo de genes que codifican la piruvato descarboxilasa del huésped de *Schizosaccharomyces pombe* está eliminado o inactivado. El primer transformante tiene una capacidad suficientemente alta de crecimiento, a pesar de que tiene una capacidad de producción elevada de ácido láctico. Por lo tanto, es muy adecuado como bacteria de ácido láctico para la producción de ácido láctico a escala industrial.

55 El gen que codifica la piruvato descarboxilasa eliminado o inactivado es preferiblemente un gen de PDC2. Además, el gen de LDH está integrado preferiblemente en un cromosoma de *Schizosaccharomyces pombe*.

60 El segundo transformante descrito en este documento se caracteriza por proporcionar una concentración de células de al menos 4,0 g (sobre una base de peso celular seco)/litro de un caldo de cultivo preparado mediante la inoculación de células, a una concentración celular inicial de 0,04 g (sobre una base de peso celular seco)/litro, en un matraz de Sakaguchi de 500 ml que contiene 100 ml de un caldo de cultivo líquido que incluye 1% de extracto de levadura, 2% de peptona y 6% de glucosa, y a continuación el cultivo durante 20 horas a una temperatura de 32 °C con condiciones de agitación de 110 rpm y 7 cm de recorrido, y disposición de una concentración de ácido láctico de por lo menos 80 g/l de un licor de fermentación preparado mediante inoculación de las células, a una concentración celular inicial de 0,04 g (sobre una base de peso celular en seco)/litro en un matraz de Sakaguchi de 500 ml que contiene 100 ml de un caldo de cultivo líquido que incluye 1% de extracto de levadura, 2% de peptona y 6% de

glucosa, y a continuación el cultivo durante 20 horas a una temperatura de 32 °C con condiciones de agitación de 110 rpm y 7 cm de recorrido, seguido de la inoculación de las células obtenidas de este modo, a una concentración celular inicial de 36 g (sobre una base de peso celular en seco)/litro en un tubo de ensayo que tiene un diámetro de 18 mm y una longitud de 150 mm y que contiene 4,5 ml de una solución acuosa de glucosa al 11,1% y, a continuación, la fermentación durante 3 horas a una temperatura de 32 °C con condiciones de agitación con un ángulo de agitación de 43,5 °, 110 rpm y 7 cm de recorrido. Como se describió anteriormente, el segundo transformante n tiene una capacidad suficientemente alta de crecimiento, a pesar de que tiene una capacidad de producción de ácido láctico elevada. Por lo tanto, es muy adecuado como bacteria de ácido láctico para la producción de ácido láctico a escala industrial.

El segundo transformante es, preferiblemente, un transformante que contiene un gen de LDH introducido en un huésped de *S. pombe*, en el que un gen que es una parte de un grupo de genes que codifican la piruvato descarboxilasa del huésped de *S. pombe* está eliminado o inactivado. El primer transformante descrito en este documento es particularmente preferido como dicho segundo transformante.

<*S. pombe*>

S. pombe como huésped es una levadura del género *Schizosaccharomyces* (levadura de fisión), y es un microorganismo que es particularmente excelente en resistencia a los ácidos en comparación con otras levaduras. Además, se ha sabido que *S. pombe* es excelente en la productividad de ácido láctico bajo una alta concentración de glucosa y también es adecuado para un cultivo de alta densidad (cultivo utilizando una gran cantidad de levadura), en comparación con otras levaduras, tales como *Saccharomyces cerevisiae*. Por lo tanto, mediante el uso de un transformante de *S. pombe*, el ácido láctico puede producirse con una productividad significativamente alta.

Aquí, la secuencia de nucleótidos completa de los cromosomas de *S. pombe* se almacena y se abre al público en la base de datos "PomBase (<http://www.pombase.org/>)". Los datos de la secuencia de genes de *S. pombe* descritos en la presente memoria están disponibles a partir de la base de datos mediante la búsqueda con un nombre de gen o la ID sistemática mencionada anteriormente.

<Gen que codifica la piruvato descarboxilasa>

Hay 4 tipos de genes en el grupo de genes que codifican la piruvato descarboxilasa (gen de piruvato descarboxilasa, en lo sucesivo denominado "gen de PDC") de *S. pombe*, y el grupo está compuesto de un gen que codifica piruvato descarboxilasa 1 (en lo sucesivo denominado "gen de PDC 1"), un gen que codifica piruvato descarboxilasa 2 (en lo sucesivo denominado "gen de PDC 2"), un gen que codifica piruvato descarboxilasa 3 (en lo sucesivo denominado "gen de PDC 3") y un gen que codifica piruvato descarboxilasa 4 (en lo sucesivo denominado "gen de PDC 4"). Entre ellos, el gen de PDC 2 y el gen de PDC 4 son los genes de PDC que tienen importantes funciones en *S. pombe*. Las ID sistemáticas de los respectivos genes de PDC son los siguientes.

Gen de PDC 1 (Pdc 1): SPAC13A11.06
 Gen de PDC 2 (Pdc 2): SPAC1F8.07c
 Gen de PDC 3 (Pdc 3): SPAC186.09
 Gen de PDC 4 (Pdc 4): SPAC3G9.11c

Los datos de secuencia de cada gen de PDC se pueden obtener de la base de datos del gen de *S. pombe* descrito anteriormente mediante la búsqueda con los nombres de genes o los ID sistemáticos.

En el caso de *S. pombe* de tipo salvaje, la glucosa se metaboliza en ácido pirúvico por la vía glicolítica, el ácido pirúvico se convierte en acetaldehído por la piruvato descarboxilasa expresada a partir del gen de PDC mencionado anteriormente, y a continuación el acetaldehído se convierte en etanol por una alcohol deshidrogenasa, con lo cual se lleva a cabo la fermentación del etanol. Además, dado que *S. pombe* de tipo salvaje no tiene un gen de LDH funcional, no tiene una ruta para la producción de ácido láctico a partir de ácido pirúvico.

Por otro lado, la LDH expresada a partir del gen de LDH introducido produce ácido láctico mediante la reducción de ácido pirúvico a ácido láctico. Por lo tanto, incluso cuando *S. pombe* de tipo salvaje está activado para producir ácido láctico mediante la introducción de un gen de LDH al mismo, su productividad de ácido láctico no resulta suficientemente alta porque la fermentación del etanol y la fermentación del ácido láctico se llevan a cabo como si fueran tal cual.

El transformante de la presente invención tiene un cromosoma en el que una parte del grupo de genes que codifican la piruvato descarboxilasa está eliminada o inactivada. Mediante la eliminación o inactivación de un gen que es una parte del grupo de genes de PDC del transformante, la eficiencia de la fermentación en etanol del transformante disminuye y la cantidad de ácido pirúvico a convertir en etanol disminuye, con lo que aumenta la productividad del ácido láctico. Sin embargo, cuando todos los genes del grupo de genes de PDC son eliminados o inactivados, el crecimiento se inhibe debido a que la fermentación en etanol no puede llevarse a cabo en absoluto. Por lo tanto, la delección o inactivación se limita a una parte del grupo de genes de PDC.

Se prefiere particularmente que el gen de PDC que sea eliminado o inactivado sea el gen de PDC2. El gen de PDC2 es un gen de PDC que tiene una función particularmente principal.

5 Como se ha descrito anteriormente, si todos los genes de PDC son eliminados o inactivados, el crecimiento del transformante se inhibe porque no puede llevar a cabo la fermentación del etanol. Por lo tanto, la delección o inactivación de genes de PDC deben llevarse a cabo de manera que la eficiencia de la fermentación de ácido láctico se pueda incrementar mediante la disminución de la capacidad de fermentación del etanol, mientras se mantiene la capacidad de fermentación en etanol necesaria para el crecimiento para obtener una cantidad suficiente de transformantes. Los presentes inventores llevaron a cabo extensos estudios sobre este tema, y como resultado, han encontrado que cuando se elimina o inactiva el gen de PDC 2, el gen de PDC 4 es activado en un cierto grado, con lo que resulta posible lograr la capacidad de fermentación en etanol para la obtención de suficiente cantidad del transformante y la producción de ácido láctico a una alta eficiencia de fermentación.

15 La delección o inactivación de genes de PDC se puede llevar a cabo mediante procedimientos conocidos públicamente. Por ejemplo, se puede utilizar el sistema de Latour (Nucleic Acids Res., 2006, vol. 34, página e11, y WO2007/063919) para eliminar un gen de PDC.

20 Además, el gen de PDC puede ser inactivado al causar una delección, inserción, sustitución o adición en una parte de la secuencia de nucleótidos del gen de PDC. El gen puede mutarse por una sola de delección, inserción, sustitución y adición, o por dos o más de ellas.

25 Como procedimiento para introducir la mutación descrita anteriormente a una parte del gen de PDC, se pueden utilizar los procedimientos públicamente conocidos. Por ejemplo, un procedimiento de cribado de mutantes usando mutágenos (Koubo Bunshi Idengaku Jikken-Hou, 1996, Japón Scientific Societies Press), mutaciones al azar utilizando PCR (reacción en cadena de la polimerasa) (PCR Methods Appl., 1992, vol. 2, pág. 28- 33) y similares.

30 Además, el gen de PDC en el que se introdujo una mutación en una parte del mismo puede expresar una piruvato descarboxilasa de tipo mutante sensible a la temperatura. La piruvato descarboxilasa de tipo mutante sensible a la temperatura es una enzima que muestra una actividad equivalente a la de la piruvato descarboxilasa de tipo salvaje a una cierta temperatura de cultivo, pero muestra la desaparición o la reducción de la actividad cuando la temperatura de cultivo alcanza una temperatura específica o superior.

35 La cepa mutante que expresa dicha piruvato descarboxilasa de tipo mutante se puede obtener mediante la selección de una cepa que muestra una tasa de crecimiento equivalente a la de la levadura de tipo salvaje bajo una condición de temperatura a la que la actividad no se limita, mientras que muestra una significativa disminución de la tasa de crecimiento bajo una condición de temperatura específica en la que la actividad es limitada.

<Gen de LDH>

40 El transformante de la presente invención tiene al menos un gen de LDH. Tal como se describió anteriormente, *S. pombe* no tiene esencialmente un gen de LDH que muestra una fuerte actividad enzimática. Por lo tanto, el transformante se obtiene mediante la introducción de un gen de LDH de un organismo distinto de *S. pombe* en *S. pombe* mediante procedimientos de ingeniería genética.

45 El origen biológico del gen de LDH introducido en el segundo transformante descrito en el presente documento no está particularmente limitado. Además, el número de genes de LDH introducidos en el segundo transformante puede ser 1 o al menos 2. En el caso de introducir una pluralidad de genes de LDH en un huésped, se puede introducir una pluralidad de genes de LDH derivados de la misma especie biológica o se puede introducir una combinación de genes de LDH derivados de diferentes especies biológicas. Ajustando adecuadamente las especies biológicas y el número de copias de genes de LDH introducidos en un huésped de *S. pombe*, se puede obtener un transformante que tiene una alta capacidad de producción de ácido láctico sin perjudicar su capacidad de crecimiento de manera significativa.

55 El transformante descrito en este documento es preferiblemente un transformante que contiene de 3 a 5 copias de gen de HsLDH (número de acceso GenBank: X02152.1) introducidas en un huésped de *S. pombe*, en el que un gen que es una parte de un grupo de genes que codifican piruvato descarboxilasa del huésped de *S. pombe* está eliminado o inactivado (es decir, el primero transformante descrito anteriormente). El número de copias del gen de HsLDH contenidas en el transformante es más preferiblemente de 3 a 4, lo más preferiblemente 3. Como se muestra en el siguiente Ejemplo 1, la capacidad de crecimiento de un transformante, preparado mediante la introducción de 2 copias de gen de HsLDH en un huésped de *S. pombe* en las que un gen que es una parte del grupo de genes que codifican la piruvato descarboxilasa está eliminada o inactivada, se redujo en cierta medida, en comparación con un transformante preparado mediante la introducción de una sola copia del gen de HsLDH en el huésped de *S. pombe*, mientras se aumentó su capacidad de producción de ácido láctico. Mientras, la capacidad de crecimiento de un transformante preparado mediante la introducción de 3 copias del gen de HsLDH en el huésped de *S. pombe* era

casi idéntica a la del transformante preparado mediante la introducción de una sola copia del gen de HsLDH, y su capacidad de producción de ácido láctico fue significativamente elevada.

[Producción de transformante]

5 El transformante de la presente invención se prepara mediante el uso de un huésped de *S. pombe* en el que un gen que es una parte del grupo de genes de PDC está eliminado o inactivado, y la introducción de un gen de LDH al mismo mediante un procedimiento de ingeniería genética. Además, el transformante de la presente invención también se puede preparar mediante el uso de un huésped de *S. pombe* que no tiene delección o inactivación de genes de PDC en el mismo, y la introducción de un gen de LDH en el huésped de *S. pombe* mediante un procedimiento de ingeniería genética, seguida por la eliminación o la inactivación de un gen que es una parte del grupo de genes de PDC del transformante así obtenido. En los siguientes Ejemplos, se empleó el primer procedimiento para producir un transformante deseado, pero se pueden producir también transformantes casi equivalentes mediante el último procedimiento.

15 A continuación, el procedimiento de producción de un transformante se describirá haciendo referencia a un procedimiento de uso de un huésped de *S. pombe* en el que un gen que es una parte del grupo de genes de PDC está eliminado o inactivado, y la introducción de 3 copias del gen de HsLDH en el mismo mediante un procedimiento de ingeniería genética.

20 <Huésped>

El huésped de *S. pombe* puede ser de tipo salvaje o de tipo mutante en el que un gen específico está eliminado o inactivado, según la aplicación. Para la eliminación o inactivación de un gen específico, pueden utilizarse procedimientos públicamente conocidos. Específicamente, el sistema Latour (Nucleic Acids Res., 2006, vol. 34, página e11, y WO2007/063919) se puede utilizar para suprimir el gen. Además, el gen puede inactivarse mediante mutación del gen en una determinada posición mediante selección usando mutágenos mutante (koubo Bunshi Idengaku Jikken-Hou, 1996, Japón Sociedades Científicas Press), mutaciones al azar utilizando PCR (PCR Methods Appl., 1992, vol. 2, pág. 28-33) y similares. Como levadura del huésped del género *Schizosaccharomyces* en la que se elimina o inactiva un gen específico, se pueden utilizar las descritas en los documentos WO2002/101038, WO2007/015470, etc.

Además, la región a eliminar o inactivar puede ser un ORF (marco de lectura abierto) o una región reguladora de la expresión de un gen específico. Un procedimiento particularmente preferido es la recombinación homóloga mediada por PCR (Yeast, vol. 14, pág. 943-951, 1998) en el que un ORF de un gen estructural se sustituye por un gen marcador.

El tipo mutante en el que se elimina o inactiva un gen de PDC se utiliza preferiblemente como huésped para producir el transformante de la presente invención. Además, se puede utilizar un huésped de *S. pombe* en el que un gen específico distinto de genes de PDC está eliminado o inactivado, además de un gen de PDC. Dado que la eficacia de la expresión de una proteína heteróloga puede aumentar mediante la supresión o inactivación de un gen de la proteasa o similar, se puede esperar la mejora en la eficiencia de la producción de ácido láctico cuando se aplica al huésped de la presente invención.

Además, el *S. pombe* para ser utilizado como huésped es preferiblemente aquel que tiene un marcador para seleccionar un transformante. Por ejemplo, se prefiere utilizar un huésped que esencialmente requiera un factor nutriente específico para el crecimiento debido a la eliminación de un gen determinado. Cuando se prepara un transformante utilizando un vector que contiene una secuencia de gen diana, se puede obtener un transformante que carece de la auxotrofia del huésped mediante el uso de un vector que lleva el gen suprimido (marcador de complementación auxotrófico). Es posible seleccionar el transformante mediante el uso de la diferencia en la auxotrofia entre el huésped y el transformante.

Por ejemplo, un huésped de *S. pombe* que se ha hecho auxotrófico para uracilo por delección o inactivación de la orotidina fosfato descarboxilasa (gen de *ura4*) se transforma con un vector que contiene el gen de *ura4* (marcador de complementación auxotrófico), y los transformantes que contienen el vector se obtienen mediante la selección de los que carecen de auxotrofia de uracilo. El gen a eliminar para obtener un huésped auxotrófico no se limita a un gen de *ura4* cuando se utiliza para la selección de un transformante, y puede ser, por ejemplo, un gen de isopropil malato deshidrogenasa (gen *leu1*).

Además, una cepa de *S. pombe* que no tiene delección o inactivación de genes de PDC puede usarse como huésped para la producción de un transformante. En este caso, se puede utilizar como un huésped una que tenga una delección o inactivación de los genes distintos de los genes de PDC anteriormente mencionados (marcador auxotrófico, gen de la proteasa, etc.). Después de producir un transformante mediante el uso de este huésped, y la eliminación o inactivación de un gen que es una parte del grupo de genes de PDC del transformante obtenido de este modo, se puede obtener el transformante de la presente invención.

<Procedimiento de introducción de genes de HsLDH>

Como procedimiento para introducir genes de HsLDH en un huésped mediante un procedimiento de ingeniería genética, se pueden utilizar procedimientos públicamente conocidos. Como procedimiento para introducir un gen estructural de una proteína heteróloga en un huésped de *S. pombe*, se pueden utilizar los procedimientos descritos en los documentos JP-A-5-15380, WO95/09914, JP-A-10-234.375, JP-A-2000 a 262.284, JP-A-2005-198612, WO2011/021629, etc.

<Casete de expresión>

El casete de expresión es una combinación de ADN necesarios para la expresión de una proteína deseada, y contiene un gen estructural que codifica el gen deseado, y un promotor y un terminador capaz de funcionar en un huésped. En el caso de producir el transformante de la presente invención, el casete de expresión del gen de HsLDH contiene el gen de HsLDH, un promotor capaz de funcionar en *S. pombe* y un terminador capaz de funcionar en *S. pombe*. El casete de expresión puede contener al menos uno de una región 5' no traducida y una región 3' no traducida. Además, puede contener un marcador de complementación auxotrófico. El casete de expresión es preferiblemente un casete de expresión que contiene el gen de HsLDH, un promotor, un terminador, una región 5' no traducida, una región 3' no traducida, y un marcador de complementación auxotrófico. Múltiples copias del gen de HsLDH pueden estar presentes en un solo casete de expresión. Por ejemplo, el casete de expresión único puede contener de 2 a 5 copias del gen de HsLDH.

Como secuencia del gen del gen de HsLDH contenido en el casete de expresión, se puede utilizar como tal un gen del tipo salvaje. Sin embargo, para aumentar la expresión en un huésped de *S. pombe*, se prefiere modificar la secuencia del gen de tipo salvaje cambiando sus codones a unos altamente utilizados en *S. pombe*.

El promotor y el terminador capaz de funcionar en *S. pombe* pueden ser los que pueden mantener la expresión de LDH al funcionar en el transformante incluso si se vuelve ácido (incluso cuando resulta en pH 6 o inferior) debido a la acumulación de ácido láctico por el transformante de la presente invención. Como promotor capaz de funcionar en *S. pombe*, se pueden utilizar un promotor endógeno de *S. pombe* (preferiblemente uno que tiene una alta actividad transcripcional), o un promotor exógeno a *S. pombe* (tal como un promotor derivado de un virus). Además, dos o más tipos de promotores pueden estar contenidos en el vector.

Como promotor endógeno de *S. pombe*, se pueden mencionar, por ejemplo, un promotor del gen de alcohol deshidrogenasa, un promotor del gen *nmt1* involucrado en el metabolismo de tiamina, un promotor del gen de fructosa-1,6-bisfosfatasa implicado en el metabolismo de la glucosa, un promotor de gen de la invertasa implicado en la represión del catabolito (documento WO99/23223) o un promotor del gen de proteína de choque térmico (documento WO2007/26617).

Como promotor exógeno a *S. pombe*, se pueden mencionar, por ejemplo, promotores derivados de un virus de célula animal que se describen en JP-A-5-15380, JP-A-7-163373 y JP-A-10-234375. Entre estos promotores, se prefieren un promotor de hCMV y un promotor de SV40.

Como terminador capaz de funcionar en *S. pombe*, se pueden utilizar un terminador endógeno de *S. pombe* o un terminador exógeno de *S. pombe*. Además, dos o más tipos de terminadores pueden estar contenidos en el vector.

Como terminador, se pueden mencionar, por ejemplo, los terminadores derivados de ser humano que se describen en JP-A-5-15.380, JP-A-7-163.373 y JP-A-10-234375 y es preferente el terminador de la lipocortina I humana.

<Vector>

El transformante de la presente invención tiene un casete de expresión que contiene el gen de HsLDH en su cromosoma o como un gen extracromosómico. Aquí, tener el casete de expresión en su cromosoma significa que el casete de expresión está integrado en al menos una posición del cromosoma de una célula huésped, y tener un gen extracromosómico significa que un plásmido que contiene el casete de expresión está contenido en la célula. El transformante que tiene un casete de expresión que contiene el gen de HsLDH se puede obtener mediante la transformación de un huésped de *S. pombe* con un vector que contiene el casete de expresión del gen de HsLDH.

El vector puede producirse mediante la integración del casete de expresión en un vector que tiene una estructura de ADN circular o una estructura de ADN lineal. En el caso de la preparación de un transformante en el que el casete de expresión se mantiene en la célula huésped como un gen extracromosómico, el vector es preferiblemente un plásmido que contiene una secuencia necesaria para la replicación en la célula huésped, es decir, secuencia de replicación autónoma (ARS). Por otro lado, en el caso de la preparación de un transformante en el que el casete de expresión está integrado en el cromosoma de una célula huésped, el vector se introduce preferiblemente en la célula huésped como uno que tiene una estructura de ADN lineal y no contiene ARS. Por ejemplo, el vector puede ser un vector que consiste en ADN lineal, o un vector que tiene una estructura de ADN circular y que contiene un sitio de reconocimiento por enzimas de restricción para el corte abierto a ADN lineal en el momento de su introducción en la

célula huésped. Cuando el vector es un plásmido que contiene ARS, se puede introducir en un huésped después de la eliminación de la porción de ARS para formar una estructura de ADN lineal, o después de que la porción de ARS se corte abierta a una estructura de ADN lineal en la que se inactiva la función de ARS.

5 El vector de expresión preferiblemente tiene un marcador para la selección de un transformante. Como marcador, se pueden mencionar, por ejemplo, el gen de *ura4* (marcador de complementación auxotrófico) y el gen de isopropil malato deshidrogenasa (gen *leu1*).

10 Se prefiere introducir gen de HsLDH en el cromosoma de *S. pombe*. Mediante la introducción del gen de HsLDH en un cromosoma, se puede obtener un transformante que tiene una alta estabilidad de pase. Además, el transformante de la presente invención que contiene de 3 a 5 copias del gen de HsLDH puede ser aquel que contiene de 3 a 5 copias del gen de HsLDH introducidas en una posición del cromosoma, o uno que contiene la introducción de una copia del gen de HsLDH en de 3 a 5 posiciones del cromosoma.

15 Como procedimiento para introducir genes de HsLDH en un cromosoma, pueden utilizarse procedimientos públicamente conocidos. Por ejemplo, mediante el procedimiento descrito en el documento JP-A-2000-262284, múltiples copias del gen de HsLDH pueden introducirse en un cromosoma. Además, puede introducirse una sola copia del gen de HsLDH en un cromosoma. Además, como se describe a continuación, pueden introducirse una o varias copias del gen de LDH en múltiples posiciones en un cromosoma.

20 El procedimiento para introducir el gen de HsLDH en el cromosoma de *S. pombe* es preferiblemente un procedimiento de recombinación homóloga usando un vector que contiene un casete de expresión que contiene el gen de HsLDH y una región de recombinación.

25 La región de recombinación del vector es una región que tiene una secuencia de nucleótidos que puede inducir la recombinación homóloga con un sitio diana en el cromosoma de *S. pombe* en el que se quiere conseguir la recombinación homóloga. Además, el sitio diana es un sitio para convertirse en diana para la integración de un casete de expresión en el cromosoma de *S. pombe*. El sitio diana puede diseñarse libremente dejando que la región de recombinación del vector tenga una secuencia de nucleótidos que induce la recombinación homóloga con el sitio diana.

30 Se requiere que la región de recombinación tenga una homología de secuencia de nucleótidos de al menos 70% con la secuencia de nucleótidos del sitio diana. Además, la homología de secuencia de nucleótidos entre la región de recombinación y el sitio diana es preferiblemente de al menos 90%, más preferiblemente al menos 95%, en vista del aumento de la eficiencia de la recombinación homóloga. Mediante el uso de un vector que tiene dicha región de recombinación, el casete de expresión se integra en el sitio diana mediante recombinación homóloga.

35 La longitud (número de pares de bases) de la región de recombinación tiene preferiblemente de 20 a 2000 pb. Cuando la longitud de la región de recombinación tiene al menos 20 pb, es probable que la recombinación homóloga sea inducida. Además, cuando la longitud de la región de recombinación es como máximo de 2000 pb, es probable que se impida la reducción de la eficiencia de recombinación homóloga debido a un tamaño de vector demasiado grande. La longitud de la región de recombinación es preferiblemente de al menos 100 pb, más preferiblemente de al menos 200 pb. Además, la longitud de la región de recombinación es preferiblemente de como máximo 800 pb, más preferiblemente como máximo 400 pares de bases.

40 El vector puede contener otra región de ADN, además del casete de expresión y la región de recombinación descritos anteriormente. Por ejemplo, se pueden mencionar una región de origen de replicación llamado "ori", que es necesaria para la replicación en *E. coli*, un gen de resistencia a los antibióticos (gen de resistencia a neomicina o similares), etc. Estos son genes en general necesarios para la construcción de un vector que utiliza *E. coli*. La región de origen de replicación se elimina preferiblemente cuando se integra el vector en el cromosoma del huésped, tal como se describe a continuación.

45 En un caso en el que el gen de LDH está integrado en un cromosoma, el vector se introduce preferiblemente en una célula de *S. pombe* en la forma de una estructura de ADN lineal. Es decir, en el caso de utilizar un vector que tiene una estructura de ADN circular como un ADN plásmido habitual, el vector se corta preferiblemente abierto a una forma lineal por una enzima de restricción antes de su introducción en la célula de *S. pombe*.

50 En este caso, el vector que tiene una estructura de ADN circular se corta abierto en una posición dentro de la región de recombinación. El vector resultante tiene partes de las regiones de recombinación que existen en ambos extremos y está integrado completamente en el sitio diana de un cromosoma mediante recombinación homóloga.

55 El vector se puede construir mediante otros procedimientos sin cortar un vector que tiene una estructura de ADN circular, siempre que se pueda obtener una estructura de ADN lineal que tengas partes de la región de recombinación en ambos extremos.

60

Como vector, puede utilizarse adecuadamente un plásmido derivado de *E. coli*, tal como pBR322, pBR325, pUC118, pUC119, pUC18, pUC19 o similares.

5 En este caso, se prefiere que la región de origen de replicación llamada "ori" requerida para la replicación en *E. coli* se elimine del vector plásmido a utilizar para la recombinación homóloga. Por lo tanto, puede aumentar la eficiencia de la integración en el momento de la integración del vector descrito anteriormente en un cromosoma.

10 El procedimiento para construir el vector en el que se elimina la región de origen de replicación no está particularmente limitado, pero es preferiblemente el procedimiento descrito en el documento JP-A-2000-262284. Es decir, es preferible construir preliminarmente un vector precursor que contiene la región de origen de replicación en una posición a cortar dentro de la región de recombinación, de manera que la región de origen de replicación se cortará del vector en el momento de la preparación de una estructura de ADN lineal. Por lo tanto, se puede obtener fácilmente un vector en el que se elimina la región de origen de replicación.

15 Además, puede ser un procedimiento en el que se construye un vector precursor que contiene un casete de expresión y una región de recombinación mediante el uso de los vectores de expresión y sus procedimientos de construcción descritos en JP-A-5-15380, JP-A-7-163373, WO96/23890, JP-A-10-234375, y a continuación se elimina la región de origen de replicación del vector precursor mediante el uso de un procedimiento de ingeniería genética habitual para obtener un vector para ser utilizado para la recombinación homóloga.

20 <Sitio diana>

25 El sitio diana para la integración del vector puede estar presente en sólo una posición del cromosoma de *S. pombe*, o puede estar presente en dos o más posiciones del mismo. Cuando el sitio diana está presente en dos o más posiciones, el vector puede estar integrado en dos o más posiciones del cromosoma de *S. pombe*. Además, cuando están contenidas múltiples copias de gen de HsLDH en un solo vector, las múltiples copias del gen de HsLDH se pueden integrar en una posición del sitio diana. Además, el casete de expresión puede integrarse en dos o más tipos de sitios diana mediante el uso de dos o más tipos de vectores que tienen regiones de recombinación correspondientes a los respectivos sitios diana. De acuerdo con este procedimiento, se pueden integrar múltiples copias de gen de LDH en el cromosoma de *S. pombe*, aumentando así la cantidad de expresión de LDH y mejorando la productividad de ácido láctico.

30 Cuando el casete de expresión está integrado en un sitio diana, se puede usar, por ejemplo, el sitio diana que se describe en JP-A-2000-262284. Mediante el uso de dos o más tipos de vectores que tienen diferentes regiones de recombinación, cada uno de los vectores se puede integrar en diferentes sitios diana. Sin embargo, este procedimiento se complica en el caso de integrar vectores en dos o más posiciones del cromosoma.

35 Suponiendo que las secuencias de nucleótidos que son sustancialmente idénticas entre sí y presentes en las posiciones plurales de un cromosoma se pueden utilizar como sitios diana y los vectores pueden integrarse en las respectivas posiciones plurales de los sitios diana, los vectores se pueden integrar en dos o más posiciones del cromosoma mediante el uso de un único tipo de vector. Las secuencias de nucleótidos que son sustancialmente idénticas entre sí significa que la homología entre las secuencias de nucleótidos es al menos del 90%. La homología entre los sitios diana es preferiblemente al menos del 95%. Además, la longitud de las secuencias de nucleótidos que son sustancialmente idénticas entre sí es una longitud que abarca la región de recombinación de un vector, y es preferiblemente de al menos 1.000 pb. En comparación con un caso en el que múltiples copias del gen de HsLDH están integradas en un sitio diana, incluso si los números de integración del gen de HsLDH son los mismos, cuando el gen de HsLDH está integrado en sitios diana plurales de manera dispersa, es menos probable que ocurra el abandono de cada gen de HsLDH del cromosoma durante el cultivo, por lo que la aumenta estabilidad de mantenimiento durante el cultivo de transformantes.

40 Cuando la integración de un casete de expresión que contiene una sola copia del gen de LDH en cada uno de los sitios diana presentes en tres posiciones de la cromosoma, como sitio diana a integrar con el casete de expresión, se pueden mencionar, por ejemplo, tres posiciones seleccionadas de una región cerca del locus del gen de *ura4*, una región cerca del locus del gen *leu1*, una región cerca del locus del gen de *adh1*, una región cerca del locus del gen de *gpd1*, una región cerca del locus del gen *eno101*, una región cerca del locus del gen *leu1*, y una región cerca del locus del gen de *gpm1*.

45 Aquí, "una región cerca del locus del gen X" significa que una región que va desde 10 kpb (10000 pb) en dirección 5' del extremo en dirección 5' de un ORF del gen X a 10 kpb (10000 pb) en dirección 3' del extremo en dirección 3' del ORF, y que no tiene ORF de otro gen.

50 El transformante de la presente invención es preferiblemente uno en el que se introduce el gen de HsLDH en un sitio diana seleccionado de una región cerca del locus del gen *eno101*, una región cerca del locus del gen *leu1* y una región cerca del locus del gen *gpm1*. El transformante de la presente invención es preferiblemente uno en el que se introduce el gen de HsLDH en una región seleccionada de una región que comprende de 10.000 pb en dirección 5' a 10.000 pb en dirección 3' del locus del gen *eno101*, una región que comprende de 10.000 pb en dirección 5' a

10.000 pb en dirección 3' del locus del gen *leu1* y una región que comprende de 10.000 pb en dirección 5' a 10.000 pb en dirección 3' del locus del gen *gpml* del cromosoma de *S. pombe*, y es más preferiblemente uno en el que se introduce el gen en una región seleccionada entre una región que comprende de 5.000 pb en dirección 5' a 5.000 pb en dirección 3' del locus del gen *eno101*, una región que comprende de 5.000 pb en dirección 5' a 5.000 pb en dirección 3' del locus del gen *leu1*, y una región que comprende de 5.000 pb en dirección 5' a 5.000 pb en dirección 3' del locus del gen *gpml* de cromosoma de *S. pombe*.

El sitio diana presente en las posiciones plurales del cromosoma es preferiblemente el gen transposón Tf2. Tf2 es un gen transposón que existe en cada tres cromosomas (monoploide) de *S. pombe* en 13 posiciones en total y tiene una longitud (número de pares de bases) de aproximadamente 4.900 pb, con una homología de secuencia de nucleótidos del 99,7% (se hace referencia a la referencia identificada a continuación).

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 integrar un vector en una sola posición de Tf2 que existe en 13 posiciones del cromosoma. En tal caso, mediante la integración de un vector que contiene dos o más copias del gen de LDH, se puede obtener un transformante que tiene dos o más copias del gen de LDH. Además, mediante la integración de un vector en dos o más posiciones de Tf2, se puede obtener un transformante que tiene dos o más copias de gen de LDH. En este caso, mediante la integración de un vector que contiene dos o más copias del gen de LDH, se puede obtener un transformante que tiene incluso más copias del gen de LDH.

<Procedimiento de transformación>

Como procedimiento de transformación, se puede utilizar cualquier procedimiento de transformación conocido públicamente. Dicho procedimiento de transformación puede ser, por ejemplo, un procedimiento convencional como un procedimiento de acetato de litio, procedimiento de electroporación, procedimiento de esferoplastos, procedimiento de perlas de cristal o similares, y un procedimiento descrito en JP-A-2005-198612. Además, puede utilizarse un kit de transformación de levadura comercialmente disponible.

Como procedimiento para transformar un huésped de *S. pombe* mediante un procedimiento de recombinación homóloga, se puede utilizar un procedimiento de recombinación homóloga conocido públicamente. El procedimiento de transformación para producir el transformante de la presente invención es preferiblemente un procedimiento de uso de un huésped de *S. pombe* en el que un gen que es una parte del grupo de genes de PDC mencionados anteriormente está eliminado o inactivado, y la integración de un casete de expresión en el cromosoma utilizando el vector descrito anteriormente. De acuerdo con este procedimiento, el transformante de la presente invención se puede producir convenientemente.

Para la producción de un transformante, por lo general, después de llevar a cabo la recombinación homóloga, los transformantes obtenidos se someten a la selección. La selección puede llevarse a cabo, por ejemplo, de la siguiente manera. El cribado se lleva a cabo mediante un caldo de cultivo que puede seleccionar los transformantes por el marcador auxotrófico mencionado anteriormente y se seleccionan dos o más colonias entre las colonias obtenidas. A continuación, después de cultivarlas por separado en un caldo líquido, la cantidad de expresión de una proteína heteróloga (en la presente invención, HsLDH) en cada caldo líquido se mide a fin de seleccionar un transformante que muestre mayor cantidad de expresión de la proteína heteróloga. Se puede identificar la cantidad de vector y de casete de expresión integrados en los cromosomas sometiendo los transformantes seleccionados a un análisis genómico usando electroforesis en gel de campo pulsado.

La cantidad de vector integrado en los cromosomas se puede ajustar en cierta medida mediante el ajuste de las condiciones de integración, etc., pero la eficiencia de integración y la cantidad de integración también cambian debido al tamaño (número de pares de bases) y la estructura del vector.

En general, a medida que aumenta la cantidad de casete de expresión, se espera que aumente la eficacia de la expresión de LDH, y, además, también se espera que aumente la eficiencia de la producción de ácido láctico. Por lo tanto, se considera que la cantidad de expresión de LDH se puede aumentar y la productividad de ácido láctico puede mejorarse mediante la integración de múltiples copias del gen de LDH en el cromosoma de *S. pombe*. Sin embargo, también se considera que cuando el número de casetes de expresión es demasiado grande, la carga sobre la supervivencia y el crecimiento de las células resulta grande y la eficiencia de la producción de ácido láctico puede de ese modo reducirse. Por otro lado, mediante el uso de un vector de expresión único que contiene múltiples copias de genes, pueden ser integrarse múltiples copias del gen de LDH en el cromosoma, mientras que se reduce la cantidad de casete de expresión integrado en el cromosoma. Sin embargo, se considera que la eficiencia de la integración cromosómica disminuye a medida que aumenta el tamaño de un vector, por lo que se hace difícil aumentar la cantidad de integración de un vector, y como resultado, la propia producción de un transformante resulta difícil.

Los presentes inventores han considerado que es necesario seleccionar un gen de LDH exógeno que tiene una alta eficacia de expresión en *S. pombe* y expresa una LDH de alta actividad, para la obtención de un transformante de *S. pombe* que tiene una eficacia de producción de ácido láctico mayor incluso en el caso de la integración de una cantidad relativamente pequeña de casete de expresión que tiene un tamaño adecuado en un cromosoma. Entonces, han encontrado que se puede obtener un transformante que tiene una eficiencia la producción de ácido láctico significativamente mayor, en comparación con un transformante integrado con una sola copia o 2 copias del gen de HsLDH, sin perjudicar su capacidad de crecimiento, cuando se introducen 3 copias del gen de HsLDH en un transformante de *S. pombe* que tiene una delección o inactivación de un gen que es una parte del grupo de genes de PDC.

[Procedimiento de producción de ácido láctico]

El procedimiento para producir ácido láctico de la presente invención es un procedimiento para cultivar el transformante de la presente invención en un caldo de cultivo, y a continuación recuperar el ácido láctico a partir del caldo de cultivo.

Mediante el cultivo del transformante de la presente invención en un caldo de cultivo que contiene un sacárido, se reduce el ácido pirúvico obtenido a partir del sacárido por la vía glucolítica mediante LDH para generar ácido láctico, y el ácido láctico generado en el caldo de cultivo se recupera del caldo de cultivo para producir ácido láctico.

Como caldo de cultivo para la producción de ácido láctico, se puede utilizar un medio de cultivo de levadura convencional que contiene un sacárido, y puede contener, además, fuentes de nitrógeno, sales inorgánicas y similares que pueden ser utilizados por *S. pombe* y pueden llevar a cabo el cultivo de *S. pombe* de manera eficiente. Como caldo de cultivo, puede utilizarse un medio natural o un medio sintético.

Como fuentes de carbono, se pueden mencionar, por ejemplo, sacáridos, tales como glucosa, fructosa y sacarosa. Como fuentes de nitrógeno, se pueden mencionar, por ejemplo, ácidos inorgánicos o sales de amonio inorgánicas, tales como amoniaco, cloruro de amonio y acetato de amonio, peptona, casaminoácidos y extracto de levadura. Como sales inorgánicas, se pueden mencionar, por ejemplo, fosfato de magnesio, sulfato de magnesio y cloruro de sodio. Además, un acelerador de la fermentación, tal como un proteolípido o similar, puede estar contenido.

Según el procedimiento de producción de ácido láctico de la presente invención, se prefiere utilizar un caldo de cultivo que contiene especialmente la glucosa como sacárido. La concentración de glucosa del caldo de cultivo (100% en masa) en la etapa inicial del cultivo es preferiblemente al menos del 1% en masa, más preferiblemente de 1 a 50% en masa, más preferiblemente de 2 a 16% en masa. Dado que la concentración de glucosa disminuye a medida que avanza el cultivo, se prefiere continuar el cultivo mediante la adición de glucosa, según requiera el caso. La concentración de glucosa en la etapa final de cultivo puede ser como máximo el 1% en masa. Además, en un caso en el que el cultivo se realiza en continuo haciendo circular el caldo de cultivo mientras se separa el ácido láctico, se prefiere mantener la concentración de glucosa anteriormente mencionada. Cuando se hace que la concentración de glucosa sea al menos del 2% en masa, la productividad de ácido láctico aumenta aún más. Además, cuando la glucosa en el caldo de cultivo se hace para que sea como máximo del 16% en masa, la eficiencia de la producción de ácido láctico aumenta adicionalmente.

Además, con el fin de aumentar la productividad del ácido láctico, se prefiere llevar a cabo el cultivo de alta densidad. En el cultivo de alta densidad, se hace que la concentración inicial de células del transformante en el caldo de cultivo sea preferiblemente de 0,1 a 5 g/litro, sobre una base de peso celular en seco. La concentración inicial de células del transformante en el caldo de cultivo se hace que sea más preferiblemente de 0,2 a 2 g/litro, sobre una base de peso celular en seco. Al aumentar la concentración celular inicial, se puede lograr una alta productividad en un corto período de tiempo. Además, si la concentración celular inicial es demasiado alta, es probable que se produzca un problema, tal como la aglomeración de las células o una disminución en la eficiencia de purificación.

Además, la concentración celular que se muestra en los Ejemplos proporcionados a continuación es un valor calculado a partir de la absorbancia de luz a una longitud de onda de 660 nm (DO660) medida mediante un espectrómetro visible-ultravioleta V550 fabricado por JASCO corporación. DO660 = 1 corresponde a 0,2 g/litro de peso seco de levadura y 0,8 g/litro del peso en húmedo.

Para el cultivo, se puede utilizar un procedimiento de cultivo de levadura convencional y por ejemplo, el cultivo puede llevarse a cabo con agitación o mezcla.

La temperatura de cultivo es preferiblemente de 23 a 37 °C. El tiempo de cultivo se puede determinar adecuadamente.

El cultivo puede llevarse a cabo mediante cultivo discontinuo o cultivo continuo. Por ejemplo, después de llevar a cabo el cultivo mediante cultivo discontinuo, las células pueden separarse del caldo de cultivo para obtener un caldo de cultivo que contiene ácido láctico. Mientras que, en el procedimiento de cultivo continuo, por ejemplo, una parte

del caldo de cultivo se extrae del tanque de cultivo durante el cultivo; un sobrenadante de cultivo se recoge mientras que se separa el ácido láctico del caldo de cultivo extraído; se añade glucosa o un caldo de cultivo fresco al sobrenadante de cultivo y a continuación se devuelve al tanque de cultivo. Esta operación se repite para llevar a cabo de forma continua el cultivo. Al llevar a cabo el cultivo continuo, la productividad de ácido láctico aumenta aún más.

Dado que se utiliza un *S. pombe* particularmente excelente en la resistencia al ácido en el procedimiento para producir ácido láctico usando el transformante de la presente invención, incluso en un caso donde el pH es bajo (aproximadamente un pH de 2 a 4) debido a la acumulación de ácido láctico, el ácido láctico puede producirse sin llevar a cabo la neutralización. Por lo tanto, incluso después de que el pH del caldo de cultivo llega a 3,5 o más bajo, el ácido láctico puede producirse mediante cultivo continuo que continúa adicionalmente el cultivo. El pH en la etapa final del cultivo o el pH durante el cultivo continuo son preferiblemente como máximo 3,5, con especial preferencia de 2,3 a 3,5. Con el fin de aumentar la productividad de ácido láctico, se prefiere continuar el cultivo, incluso después de que el pH del caldo de cultivo llegue ser 3,5 o inferior. Dado que el transformante de la presente invención es excelente en resistencia a los ácidos, su cultivo puede continuarse sin neutralizar el ácido láctico producido por el transformante en el caldo de cultivo.

La recuperación de ácido láctico a partir de un caldo de cultivo se puede llevar a cabo mediante un procedimiento convencional. Particularmente, se prefiere recuperar el ácido láctico, sin llevar a cabo la neutralización del ácido láctico en el caldo de cultivo, mediante la separación del ácido láctico del caldo de cultivo. Por ejemplo, un procedimiento en el que las células se separan a partir de un caldo de cultivo después de la finalización del cultivo por centrifugación y a continuación se realiza la extracción con éter dietílico, acetato de etilo y similares después de ajustar el pH a 1 o menor, se puede mencionar un procedimiento en el que, después de la adsorción a un intercambio de iones y posterior lavado, se lleva a cabo la elución, un procedimiento en el que las impurezas se eliminan mediante el uso de carbón activado, un procedimiento en el que la destilación se lleva a cabo después de permitir que reaccione con un alcohol en presencia de un catalizador ácido, y un procedimiento en el que la separación se lleva a cabo mediante el uso de una membrana de separación. Además, en algunos casos, la recuperación de ácido láctico puede llevarse a cabo mediante la neutralización del ácido láctico en un caldo de cultivo y la separación del caldo de cultivo y la sal de ácido láctico. Por ejemplo, la recuperación del ácido láctico puede llevarse a cabo mediante un procedimiento en el que el ácido láctico en un caldo de cultivo se convierte en una sal de calcio o una sal de litio y, a continuación, se cristaliza la sal neutralizada.

Dado que se utiliza un *S. pombe* particularmente excelente en la resistencia al ácido en el procedimiento para producir ácido láctico de la presente invención, la producción de ácido láctico puede llevarse a cabo convenientemente con una alta productividad sin llevar a cabo la neutralización con un álcali. Además, puesto que la eficiencia de la fermentación en etanol se reduce debido a la delección o inactivación de un gen que es una parte del grupo de genes de PDC, aumenta el rendimiento de ácido láctico a base de sacárido (relación de la cantidad de ácido láctico producido con respecto a la cantidad de sacárido consumido). En la presente invención, el rendimiento de ácido láctico a base de sacárido puede aumentar fácilmente hasta el 50% o superior. En algunos casos, el rendimiento de ácido láctico a base de sacárido alcanza el 70% o superior. Además, el procedimiento para producir ácido láctico de la presente invención también es adecuado para un cultivo de alta densidad en el que el cultivo se lleva a cabo bajo una alta concentración de glucosa y por una alta concentración de transformante.

Ejemplos

A continuación, la presente invención se describirá con más detalle con referencia a los Ejemplos y Ejemplos Comparativos. Sin embargo, se debe entender que la presente invención no está en modo alguno restringida a los mismos. Además, en los siguientes Ejemplos, el término "%" significa "% en masa" a menos que se indique lo contrario.

[Ejemplo 1]

Mediante el uso de un huésped de *S. pombe*, se preparó un transformante en el que un gen de PDC2 está eliminado y se introducen 3 copias del gen de HsLDH.

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

Se transformó una cepa ARC010 de *S. pombe* auxotrófico de uracilo (genotipo: h-, leu1-32 ura4-D18) (referencia al documento WO 2007/015470) con un fragmento de delección de *pdc2* de acuerdo con el procedimiento de Tohoda (referencia a la patente de Estados Unidos No. 6,235,499), para obtener de este modo un transformante en el que se introduce el fragmento en una región cerca del locus del gen de *pdc2* del genoma de *S. pombe*. El transformante se sometió a un tratamiento FOA de conformidad con el sistema de Latour (Nucleic Acids Res., 2006, vol. 34, página e11, y WO2007/063919) para preparar una cepa con delección (cepa IGF 543) en el que el gen de PDC2 está eliminado (ID sistemática: SPAC1F8.07c).

ES 2 759 269 T3

Para la preparación del fragmento de delección de *pdc2* (2811 pb, SEQ ID NO: 11), el ADN genómico completo preparado a partir de la cepa ARC032 (genotipo: h-) de *S. pombe* (referencia a WO 2007/015470) mediante el uso de DNeasy (fabricado por QIAGEN) se utilizó como plantilla y se utilizaron los 8 tipos de oligo-ADN sintético (fabricado por Operon) que tenían las secuencias de nucleótidos mostradas en la Tabla 1.

5

[Tabla 1]

Oligo ADN para la preparación de fragmento de delección de <i>pdc2</i>		
Oligo ADN	Secuencia de nucleótidos	SEQ ID NO.
UF	5'-CTCTCCAGCTCCATCCATAAG-3'	1
UR	5'-GACACAACCTTCTACCAAAAAGCCTTTCTGCCCATGTTTTC TGTC-3'	2
OF	5'-GCTTTTTGGTAGGAAGTTGTGTC-3'	3
OR	5'-AGTGGGATTTGTAGCTAAGCTGTATCCATTTCAGCCGTTG TG-3'	4
DF	5'-AAGTTTCGTC AATATCACAAGCTGACAGAAAACATGGGCAG AAAG-3'	5
DR	5'-GTTCCCTTAGAAAAAGCAACTTTGG-3'	6
FF	5'-CATAAGCTTGCCACCACTTC-3'	7
FR	5'-GAAAAAGCAACTTTGGTATTCTGC-3'	8

Específicamente, cada una de la región UP, la región OL y la región DN se preparó mediante una amplificación por PCR utilizando KOD-Dash (fabricado por Toyobo Co. Ltd.) con UF y UR, OF y OR, y DF y DR, respectivamente. A conyinuación, utilizando estas regiones como plantillas respectivas, se prepararon fragmentos de delección de longitud completa mediante una amplificación por PCR similar utilizando FF y FR. En el momento de la preparación de los fragmentos de delección de longitud completa, se utilizaron los dos tipos de oligo-ADN sintético (fabricados por Operon) que se muestran en la Tabla 2, el ADN genómico completo preparado de forma similar a partir de la cepa ARC032 se utilizó como plantilla y un fragmento de la región de *ura4* preparado mediante una amplificación por PCR similar también fue utilizado como una plantilla.

10

15

[Tabla 2]

Oligo ADN para la preparación de fragmento de <i>ura4</i>		
Oligo ADN	Secuencia de nucleótidos	SEQ ID NO:
F	5'-AGCTTAGCTACAAATCCCACT-3'	9
R	5'-AGCTTGTGATATTGACGAAACTT-3'	10

Se encontró que la velocidad de crecimiento de la cepa de delección del gen de *PDC2* de *S. pombe* así obtenido (cepa IGF543, h-, *leu1-32 ura4-D18 pdc2-D23*) era lenta. Por lo tanto, a fin de restablecer su velocidad de crecimiento, se sembró la cepa IGF543 sobre placa YES (extracto de levadura al 0,5%/glucosa al 3%/suplemento de SP) y se cultivó a 25 °C y, a continuación, las colonias así obtenidas se subcultivaron en medio YPD (xtracto de levadura 1%/peptona 2%/glucosa 2%) y se cultivaron a 25 °C. A continuación, mediante el uso de un caldo de cultivo que tenía células suficientemente crecidas, se preparó una solución madre de glicerol y se conservó a -80 °C. El procedimiento mencionado anteriormente se repitió hasta que se obtuvo una velocidad de crecimiento apropiada, y se seleccionó una cepa restaurado con velocidad de crecimiento restaurada (el nombre IGF543 tuvo éxito).

20

25

<Preparación de la cepa de introducción de una sola copia del gen de HsLDH de *S. pombe*>

En primer lugar, se preparó un vector recombinante de tipo de integración de un solo locus vector PSM-HsLDH (4.562 pares de bases, figura 1) que contiene un casete de expresión HsLDH. El vector pSM-HsLDH fue preparado mediante síntesis de ADN como un fragmento de ADN que tiene una secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 12.

30

A continuación, la cepa IGF543 se transformó por el vector PSM-HsLDH. Mediante esta operación, el casete de expresión HsLDH se introdujo en una región cerca del locus del gen *gpml* del genoma. La cepa transformante así obtenida (cepa de introducción de una sola copia del gen de HsLDH) se denominó como cepa ASP3494.

35

<Preparación de la cepa de introducción de dos copias del gen de HsLDH de *S. pombe*>

40

La cepa ASP3494 se transformó de acuerdo con el procedimiento de Bahler et al. (Yeast, 1998, vol. 14, pág. 943-951) con un digesto BsiWI de enzimas de restricción de un vector recombinante de tipo integración sw un solo locus pSL17-HsLDH que contiene el promotor *ihc1* (referencia al documento de patente 3). Mediante esta operación, se introdujo el casete de expresión en una región cerca del locus del gen *leu1* del genoma, para preparar de este modo una cepa transformante en el que se introduce una sola copia del gen de HsLDH regulado por el promotor de hCMV en la región cerca del locus del gen *gpml* y se introduce otra copia única del gen de HsLDH regulado por el promotor

45

de ihc en la región cerca del locus del gen leu1 (2 copias del gen de HsLDH en total). La cepa transformante obtenida de este modo (cepa de introducción de 2 copias del gen de HsLDH) fue nombrada como cepa ASP4121.

<Restauración de auxotrofia de uracilo>

El gen de ura4 introducido en el genoma de *S. pombe* por el vector pSM-HsLDH es probable que abandone el genoma por recombinación homóloga, ya que se pone entre dos secuencias de promotor de hCMV.

Por lo tanto, la cepa ASP4121 se sometió a tratamiento FOA para restaurar su auxotrofia de uracilo.

<Preparación de la cepa de introducción de 3 copias del gen de HsLDH de *S. pombe*>

En primer lugar, se preparó un vector recombinante de tipo integración de un solo locus pSN-HsLDH (4535 pb, Figura 2) que contiene un casete de expresión HsLDH. El vector pSN-HsLDH se preparó mediante la síntesis de ADN como un fragmento de ADN que tiene una secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 13.

A continuación, la cepa ASP4121 se sometió a tratamiento FOA para restaurar su auxotrofia de uracilo, y la cepa transformante obtenida de este modo fue transformada por el vector pSN-HsLDH. Mediante esta operación, el casete de expresión HsLDH se introdujo en una región cerca del locus del gen eno101 del genoma, para preparar de este modo una cepa transformante en la que se introduce una sola copia del gen de HsLDH regulado por el promotor de hCMV en la región cerca del locus del gen gpml, se introduce una sola copia del gen de HsLDH regulado por el promotor ihc en la región cerca del locus del gen leu1, y se introduce una sola copia del gen de HsLDH regulado por el promotor de hCMV en la región cerca del locus del gen eno101 (3 copias del gen de HsLDH en total). La cepa transformante obtenida (cepa de introducción de 3 copias del gen de HsLDH) se nombró como cepa ASP4956.

<Restauración de auxotrofia de uracilo >

De la misma manera que para el caso de uso del vector pSM-HsLDH, el gen de ura4 introducido en el genoma de *S. pombe* mediante el vector pSN-HsLDH es probable que abandone el genoma por recombinación homóloga, ya que se intercala por dos secuencias del promotor de hCMV.

Por lo tanto, la cepa ASP4956 se sometió a tratamiento FOA para restaurar su auxotrofia de uracilo.

<Complementación de auxotrofia de uracilo >

La cepa ASP4956 se sometió a tratamiento FOA para restaurar su auxotrofia de uracilo, y la cepa transformante así obtenida se transformó con un fragmento de ADN que contenía el gen de ura4 (3277 pb, SEQ ID NO: 14), para preparar de este modo una cepa transformante que carece de auxotrofia de uracilo. La cepa transformante obtenida (cepa de introducción de 3 copias del gen de HsLDH y que carece de auxotrofia) fue denominada como cepa ASP5019.

<Prueba de cultivo>

En términos de la capacidad de crecimiento y la capacidad de producción de ácido láctico, la cepa ASP5019 se comparó con la cepa ASP3509, la cepa ASP2914, la cepa ASP3619, la cepa ASP3621, la cepa ASP3631, la cepa ASP3622 y la cepa ASP3623 descritas en el Documento de Patente 3. La cepa ASP3509 era una cepa preparada introduciendo una sola copia del gen de HsLDH en la cepa IGF543, la cepa ASP2914 era una cepa preparada introduciendo 2 copias del gen de HsLDH en la cepa IGF543, la cepa ASP3619 era una cepa preparada introduciendo una sola copia del gen de HsLDH y una sola copia de gen de LbLDH (gen de LDH de *Lactobacillus bulgaricus*) en la cepa IGF543, la cepa ASP3621 era una cepa preparada introduciendo una sola copia del gen de HsLDH y una sola copia del gen de SaLDH (gen de LDH de *Staphylococcus aureus*) en la cepa IGF543, la cepa ASP3631 era una cepa preparada introduciendo una sola copia del gen de HsLDH y una sola copia del gen de LpLDH en la cepa IGF543, la cepa ASP3622 era una cepa preparada introduciendo una sola copia del gen de HsLDH y una sola copia del gen de LpLDH (gen de LDH de *Lactobacillus plantarum*) en cepa IGF543, y la cepa ASP3623 era una cepa preparada introduciendo una sola copia del gen de HsLDH y una sola copia del gen de PaLDH (gen de LDH de *Pediococcus acidilactici*) en la cepa IGF543.

Cada cepa transformante se inoculó en 100 ml de medio líquido YPD6 (extracto de levadura 1%, peptona 2% y glucosa 6%) contenido en un matraz de Sakaguchi de 500 ml (fabricado por AGC Techno Glass, Co. Ltd.) a una concentración celular inicial de 0,04 g (sobre una base de peso celular en seco)/litro y se cultivó durante 20 horas a una temperatura de 32 °C bajo condiciones de agitación de 110 rpm velocidad de agitación y 7 cm de recorrido en la agitación. El cultivo se dio por terminado después de medir DO660 del caldo de cultivo, y se recogieron las células a continuación. Las células así obtenidas se inocularon en 4,5 ml de una solución acuosa de glucosa al 11,1% contenida en un tubo de ensayo con un diámetro de 18 mm y una longitud de 150 mm a una concentración inicial de células de 36 g (sobre una base de peso celular en seco)/litro y se cultivaron durante 3 horas a una temperatura de

32 °C bajo condiciones de agitación de 43,5 ° de ángulo de agitación, 110 rpm y 7 cm de recorrido. Al final del cultivo, se midió la concentración de ácido láctico (g/litro) del licor de fermentación. La concentración de células (g (sobre una base de peso celular en seco (dcw))/litro) del caldo de cultivo después del cultivo durante 20 horas y la concentración de ácido láctico (g/litro) después de la fermentación de 3 horas de cada transformante se muestran en la Tabla 3.

5

[Tabla 3]

Nombre de la cepa	Origen de LDH	Concentración celular después de cultivo durante 20 horas [g-dcw/l]	Concentración de ácido láctico [g/litro] después de fermentar durante 3 horas
ASP 3509	Hs	4,5	76,1
ASP 2914	Hs/Hs	3,7	78,3
ASP 3619	Hs/Lb	4,6	72,2
ASP 3621	Hs/Sa	4,6	72,5
ASP 3631	Hs/Lp	2,1	91,5
ASP 3622	Hs/Lpl	4,0	64,8
ASP 3623	Hs/Pa	3,1	73,1
ASP 5019	Hs/Hs/Hs	4,5	91,0

10 Cuando la cepa ASP3509 preparada introduciendo una sola copia del gen de HsLDH se comparó con la cepa ASP2914 preparada mediante la introducción de 2 copias de gen de HsLDH, se encontró que la cepa ASP2914 tenía una concentración de ácido láctico más elevada después de una fermentación de 3 horas, y se encontró que ASP3509 tenía un valor de DO660 mayor después de cultivar 20 horas. Además, la concentración celular después de cultivar 20 horas la cepa ASP3631, que mostró una concentración de ácido láctico significativamente alta después de la fermentación de 3 horas, se encontró que era muy baja. Los resultados de la Tabla 3 se representan como un diagrama de dispersión (Figura 3) que muestra una concentración de ácido láctico (g/litro) después de fermentación de 3 horas (eje vertical) y una concentración celular (g (sobre una base de peso celular en seco (dcw))/L) de un caldo de cultivo después de cultivo durante 20 horas (eje horizontal). Tal como se ilustra en la Figura 3, hay una tendencia a que a medida que la capacidad de producción de ácido láctico de un transformante aumenta, la capacidad de crecimiento disminuye. La línea recta que se encuentra en la Figura 3 es una línea recta que conecta las representaciones de la cepa ASP3509 y la cepa ASP3631. A partir de la tendencia, se puede esperar que una cepa de transformante preparada mediante la introducción de 3 copias de gen de HsLDH muestre una capacidad de producción de ácido láctico superior y una capacidad de crecimiento menor en comparación con una cepa de transformante preparada introduciendo 2 copias del gen de HsLDH (cepa ASP2914), y que si la capacidad de producción de ácido láctico de una cepa de transformante preparada mediante la introducción de 3 copias del gen de HsLDH es más alta que la de la cepa ASP3631, la capacidad de crecimiento de la cepa es más baja que la de la cepa ASP3631. Sin embargo, a pesar de esta expectativa, la cepa ASP5019 preparada introduciendo 3 copias del gen de HsLDH se encontró que tenía una alta capacidad de producción de ácido láctico en el casi mismo nivel que la cepa ASP3631 y tenía una capacidad de crecimiento suficiente a casi el mismo nivel que la cepa ASP3509.

30 [Ejemplo 2]

Cada una de la cepa ASP5019 y la cepa ASP3631 utilizadas en el Ejemplo 1 se cultivó en un matraz para comparar la capacidad de crecimiento y la capacidad de producción de ácido láctico de las respectivas cepas.

35 Específicamente, cada cepa transformante se inoculó en medio de cultivo líquido YES (extracto de levadura 5 g/litro, glucosa 30 g/litro, adenina 1 g/litro, histidina 1 g/litro, leucina 1 g/litro, uracilo 1 g/litro y ricina 1 g/litro), y se cultivaron durante 30 horas a una temperatura de 32 °C bajo una condición de agitación de 110 rpm. Al final del cultivo, se recogieron las células. Las células recogidas de este modo se inocularon en un fermentador de tarro de 3 litros lleno de un medio de cultivo que tenía la composición mostrada en la Tabla 4 y se añadieron al mismo cantidades apropiadas de elementos traza y vitaminas, y a continuación se cultivaron mediante cultivo por lotes alimentado durante 60 horas a una temperatura de 32 °C bajo un control de DO en cascada. Al final del cultivo, se midió la DO660 del caldo de cultivo.

45 A continuación, a partir del caldo de cultivo obtenido al final del cultivo, las células se separaron mediante centrifugación y a continuación se inocularon en una solución acuosa al 11,1% de glucosa a una concentración celular inicial de 36 g (sobre una base de peso celular seco)/litro (DO660 = 180) para preparar un licor de

fermentación. A partir de entonces, la fermentación se llevó a cabo durante 7 horas en un tubo de ensayo. Al final de la fermentación, se midió la concentración de ácido láctico (g/litro) del licor de fermentación.

[Tabla 4]

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

5 Con respecto a cada transformante, se midieron la DO660 del caldo de cultivo después de cultivar durante 60 horas y la concentración de ácido láctico (g/litro) del licor de fermentación después de la fermentación durante 7 horas, y los resultados se muestran en la Figura 4. Se encontró que la cepa ASP5019 tenía una alta capacidad de producción de ácido láctico como cepa ASP3631, y se confirmó que su capacidad de crecimiento era significativamente mayor que la de la cepa ASP3631.

[Ejemplo 3]

15 La cepa ASP5019 y la cepa ASP3631 utilizadas en el Ejemplo 1, se cultivaron mediante cultivo continuo para comparar sus capacidades de producción de ácido láctico.

20 Específicamente, se recogieron las células obtenidas mediante cultivo por lotes alimentado de 60 horas de la misma manera que en el Ejemplo 2, y las células recogidas de este modo se inocularon en un medio de fermentación que tenía la composición de la Tabla 5 y se añadieron las cantidades apropiadas de elementos traza y vitaminas al mismo, a una concentración inicial de células de 36 g (sobre una base de peso celular en seco)/litro (DO660 = 180), para preparar un licor de fermentación. Se transfirieron 0,5 litros de caldo de fermentación a un fermentador de jarra de 1 litro, y se hizo circular a través de una membrana de microfiltración de flujo cruzado. A continuación, se llevó a cabo una fermentación continua durante 200 horas o más a 28 °C mediante el suministro de un medio de fermentación con un caudal constante y la extracción de un filtrado de membrana. En ese momento, se empleó una velocidad de dilución de 0,066 (1/h). En la fermentación continua, se utilizó una membrana de microfiltración que tenía un tamaño de poro más pequeño que el tamaño de cada célula, mediante lo cual las células se devolvieron al tanque y se reciclaron durante la fermentación continua durante 200 horas o más. La neutralización del pH utilizando un álcali no se llevó a cabo.

[Tabla 5]

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

35 Los cambios con el tiempo en la concentración de ácido láctico (g/litro) del licor de fermentación en la fermentación continua se muestran en la Figura 5. Como resultado de la fermentación continua durante 200 horas o más, desde el principio de la fermentación hasta el punto de 120 horas después de la fermentación, la cepa ASP5019 y la cepa ASP3631 fueron casi idénticas en términos de sus concentraciones de ácido láctico y mostraron valores constantes. Después del punto de 150 horas después de la fermentación, se observó una tendencia de disminución. Sin embargo, la tendencia de disminución de la cepa ASP5019 fue más suave que la de la cepa ASP3631. Estos resultados indican que la cepa ASP5019 tiene una capacidad de producción de ácido láctico significativamente alta en condiciones de operación a largo plazo y de oxígeno elevado.

40 Aplicabilidad industrial

45 Dado que el transformante de la presente invención y el procedimiento de producción de ácido láctico utilizando el transformante pueden producir ácido láctico con una elevada productividad, incluso a un pH bajo, sin llevar a cabo la neutralización con un álcali, se pueden utilizar convenientemente para un procedimiento de producción industrial de ácido láctico.

Listado de Secuencias

<110> ASAHIGLASS COMPANY, LIMITED
 <120> TRANSFORMANTE Y PROCESO PARA LA PRODUCCIÓN DEL MISMO, Y PROCESO PARA LA
 PRODUCCIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO
 <130> K20140709
 5 <160> 14
 <210> 1
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 10 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: UF
 <400> 1
 ctctccagct ccatccataa g 21
 15 <210> 2
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: UR
 20 <400> 2
 gacacaact cctaccaaaa agcctttctg cccatgtttt ctgtc 45
 <210> 3
 <211> 23
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: OF
 <400> 3
 gcttttgggt aggaagttgt gtc 23
 30 <210> 4
 <211> 43
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 35 <223> Descripción de secuencia artificial: OR
 <400> 4
 agtgggattt gtagctaagc tgtatccatt tcagccgttt gtg 43
 <210> 5
 <211> 45
 40 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: DF
 <400> 5
 45 aagtttcgct aatatcacia gctgacagaa aacatgggca gaaag 45
 <210> 6
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: DR
 <400> 6
 gttccttaga aaaagcaact ttgg 24
 <210> 7
 55 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: FF
 60 <400> 7
 cataagcttg ccaccacttc 20
 <210> 8
 <211> 24
 <212> ADN
 65 <213> Secuencia artificial
 <220>

<223> Descripción de secuencia artificial: FR
 <400> 8
 gaaaaagcaa ctttggtatt ctgc 24
 <210> 9
 5 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: F para fragmento de ura4
 10 <400> 9
 agcttagcta caaatccac t 21
 <210> 10
 <211> 23
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: R para fragmento de ura4
 <400> 10
 agcttggat attgacgaaa ctt 23
 20 <210> 11
 <211> 2811
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 25 <223> Descripción de secuencia artificial: fragmento de ADN para la delección de pdc2
 <400> 11

	cataagcttg	ccaccacttc	tttccaagtg	tggaagatgt	tgaocgggtga	gtaaaaacgt	60
	aaatttcctt	ccaagtcttg	gcttggotta	atttggcctg	gcctggctga	tatgccacct	120
	gcaaagtggg	acttctaagt	atgttcgcat	attccttattg	ccaacaaaagt	caagtatacg	180
30	aaggagtgtt	cgggaaatth	cctccaacga	taatagattt	gccgagcctt	cgattagcat	240
	aagagataga	tgaccaatag	caatagagaa	taggcttctt	atthgtttaa	gaagctthaa	300
	cggataaacac	acaaccaatg	aacgttcccc	acacattcta	agaaatcgga	atgagaagtc	360
	tttgagtthc	caatgactca	taaatgcaca	acaggacaga	aaacatgggc	agaaaggctt	420
	tttggtagga	agttgtgtca	ttataaatag	cgagatgtat	tataacttcg	acaaatttcc	480
	ctttctthtt	gttataaatg	ttagtgtggg	acaagagaag	tgaagggtta	cgtagtaagc	540
35	ataaataata	ttttgtagtc	atatggattt	gaacatgaaa	ttagcgattc	ttcagtaatt	600
	ggatthttac	acaaacggct	gaaatggata	caagcttagc	tacaaatccc	actggctata	660
	tgtatgcaat	tgtgttaaaa	aagtttggat	agattattta	atctactcag	cattctthct	720
	ctaaatagga	atthgttact	taatggagaa	aaaaatgtht	cgattthacct	agtgthatttg	780
	tttgtataact	cacgtthtaat	ttcaaacatc	cattctatct	tgtgtaatth	ttggcatggt	840
	gaaaaagata	atcagcctta	taatctthac	aaaagtaaga	aattctgtaa	ataagcctta	900
40	atgccctthc	tttaaatthaa	aatggthctt	ttctagata	atgthtgcac	tttgtaata	960
	tattthtagat	agthctgtga	ggtataatta	agatgthtth	gagactthata	caattthgtc	1020
	thttataaath	cttaathgtat	thttaccatcc	cagththaaact	atgctthcgtc	ggcatctctg	1080
	cacatgtcgt	gthttctthac	cgtatthgtcc	taccaagaac	ctctthththg	cttggatcga	1140
	aathaaaggt	thaaaagcaa	agthtatggat	gctagagtht	thcaaagcta	thcagctaga	1200
	gctgagggga	tgaaaaatcc	cattgccaag	gaathgtthg	ctthgatgga	agaaaaagcaa	1260
45	agcaactthg	cagtcgctgg	cgattthgacg	aagaaatccg	aaatctthaga	atthgtagat	1320
	aaaathggac	cctatgtctg	tgttatcaag	acacatathg	acgthgtcga	ggattthcgac	1380
	caggatathg	tagaaaaact	ggtggcctta	ggtaaaaaagc	atcgththct	tatctthgag	1440
	gatcgcaaat	tcgcagacat	tggaaataacc	gtcaagctac	aatatgcatc	tgggtgtgtac	1500
50	aaaathgctt	cttgggctca	tatcacaaat	tgccatacag	tgccaggcga	gggtattata	1560
	caaggctca	aagaagthg	thtacctthg	ggacgtggtc	ctthgcttht	ggctgaaatg	1620
	tcttccaaag	gctctthggc	tactggttcc	tacacagaga	aaacctthaga	atgththgag	1680
	aagcataaccg	atththgctt	tggctthata	gctgthctc	gattthctaa	ccttcaaacg	1740
	gactacataa	ctatgtcccc	tggatcggc	ttggatgtht	aaggagacgg	gctgggacag	1800
	caatathcgt	ctcctgaaga	agtgattgta	aactgcggt	gcgatathcat	cattgthggt	1860
	cgtggagtct	atggagctgg	tcgtaactct	gthgtcgaag	ccaagagata	tagagaagct	1920
	ggttgaag	catatcagca	aagactthct	cagcathaaa	aaaagactaa	tgtaaaaatt	1980
55	thttggthg	thattgaaaa	agtcgathcc	thgtthcgt	thgtthctct	aggcgtthta	2040
	tgtcagaag	catttagaat	tagtatacaa	gthactctthg	gtaaaaattht	atgtagcgc	2100
	taaaaattht	actathatag	ataaacacct	tgggaataaaa	aagtaaththg	ctatagthaat	2160
	thattaaaca	tgctcctaca	acathaccac	aatctthct	ctthgattga	cattgthataa	2220
	gaaaagagth	aatthththt	gactthgtht	gataactatg	tacaaagcca	atgaaagatg	2280
	tatgtagatg	aatgthaaat	accatgtaga	caaacaagat	aaaactthggt	tataaacatt	2340
60	ggtgtggaa	cagaataaat	tagatgtcaa	aaagthctcgt	caatathcaca	agctthgacag	2400
	aaaacatggg	cagaaaagthc	caaagatgaa	cagcatcccg	ctthgtagaca	tgcgthaaac	2460
	cacathctct	gaaaaagthg	gtgttcccac	tgtatthcgt	ggthataaat	aathctgacc	2520
	thttgacgat	atthctatthc	ctcagaaaaa	atgathththt	catgthgttht	ctgththctcg	2580
	gaatgtgatc	gthththgaaa	thtagcagagc	tactcgagthg	thgtggththc	accgggaagc	2640
	tgtatthtaca	accgagaaa	gacathththc	cgagthgcat	thgctatcac	accgthththg	2700
65	agcacacag	caaaaaattht	gtgagthctc	atththgtcca	agthgctcga	ctcaaaaaaca	2760
	tatatatata	cacacgtgcc	atctggggca	gaataccaaa	gthgctththt	c	2811

ES 2 759 269 T3

<210> 12
 <211> 4562
 <212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: pSM-HsLDH

<400> 12

10	gtgggtgacc	aaattgtcaa	gcgtgagctt	gccactgggtg	tccccattgt	ctaccacttg	60
	gacaaggacg	gcaagtacgt	ctccaaggag	ctcattgaca	actagatttc	ctactagatt	120
	ttagtgcgct	atthtaacga	catatacact	gtttttctac	actaactcat	ttctatgatg	180
	ttgtataatg	caatttcctt	ttttgaaatc	aaatcaaact	acaaggtaga	cgaaataata	240
	gagtaattat	gagggagtaa	caagggagta	acgggggtgt	ggaagaagtg	agtgagttgg	300
15	tagtgcaagg	agagagaatc	gtaccaatac	attaggagga	agaaaaagta	tcgatttagt	360
	agaaagaaat	agcattatcg	tactgtgtga	agagtttaca	gtcttgctag	ttattaatag	420
	taatcaatta	cggggtcatt	agttcatagc	ccatatatgg	agttccgctg	tacataactt	480
	acggtaaatg	gccccctgg	ctgaccgccc	aacgaccccc	gcccattgac	gtcaataatg	540
	acgtatgttc	ccatagtaac	gccaataggg	actttccatt	gacgtcaatg	ggtggagtat	600
20	ttacggtaaa	ctgcccactt	ggcagtatc	caagtgtatc	atatgccaag	tacgccccct	660
	attgacgtca	atgacggtaa	atggcccgcc	tggcattttg	cccagtacat	gaccttatgg	720
	gactttccta	cttggcagta	catctacgta	ttagtcatcg	ctattaccat	ggtgatgctg	780
	ttttggcagt	acatcaatgg	gcgtggatag	cggtttgact	cacggggatt	tccaagtctc	840
	caccccattg	acgtcaatgg	gagtttgttt	tggcaccaaa	atcaacggga	ctttccaaaa	900
25	tgtcgttaaca	actccgcccc	attgacgcaa	atgggaggta	ggcgtgtacg	gtgggaggtc	960
	tatataagca	gatttctctt	tagttctttg	caagaaggta	gagataaaga	cactttttca	1020
	aatatggatg	ctagagtatt	tcaaagctat	tcagctagag	ctgaggggat	gaaaaatccc	1080
	attgccaagg	aattgttggc	tttgatggaa	gaaaagcaaa	gcaacttgtc	agtcgcggtc	1140
	gatttgacga	agaaatccga	aatcttagaa	ttggtagata	aaattggacc	ctatgtctgt	1200
30	gttatcaaga	cacatattga	cgttgtcgag	gatttcgacc	aggatatggt	agaaaaactg	1260
	gtggccttag	gtaaaaagca	tcgttttctt	atccttgagg	atcgcaaatt	cgcagacatt	1320
	ggaaataccg	tcaagctaca	atatgcatct	ggtgtgtaca	aaattgcttc	ttgggctcat	1380
	atcacaaatt	gccatacagt	gccaggcgag	ggtattatac	aaggcctcaa	agaagtgggt	1440
	ttacctttgg	gacgtggtct	cttgcttttg	gctgaaatgt	cttccaaagg	ctctttggct	1500
35	actggttcct	acacagagaa	aaccttagaa	tggtttgaga	agcataccga	tttttgcttt	1560
	ggctttatag	ctggtcgtcg	atttcctaac	cttcaaagcg	actacataac	tatgtcccct	1620
	ggtatcggct	tggatgttaa	aggagacggg	ctgggacagc	aatatcgtac	tcctgaagaa	1680
	gtgattgtaa	actgcggtag	cgatatcatc	attggtggtc	gtggagtcta	tggagctggt	1740

ES 2 759 269 T3

	cgtaatcctg	ttgtcgaagc	caagagatat	agagaagctg	gttgggaaggc	atatcagcaa	1800
	agactttctc	agcattaaaa	aaagactaat	gtaaaatfff	tttgggttgg	tattgaaaaa	1860
5	gtcgatgcct	tgtttgcggt	tgttttccta	ggcgtttttat	gtcagaaggc	atftagaatt	1920
	agtatacaag	tactctttgg	taaaatftr	tgtagcgact	aaaatattaa	ctattataga	1980
	taaacacctt	gggaataaaa	agtaatttgc	tatagtaatt	tattaaacat	gctcctacaa	2040
	cattacctct	agttatfaat	agtaaatcaat	tacggggtca	ttagttcata	gcccatafat	2100
	ggagttccgc	gttacataac	ttacggtaaa	tggcccgcct	ggctgaccgc	ccaacgacct	2160
10	ccgcccattg	acgtcaataa	tgacgtatgt	tcccatagta	acgccaatag	ggactttcca	2220
	ttgacgtcaa	tgggtggagt	atftacggta	aactgcccac	ttggcagtae	atcaagtgt	2280
	tcatatgcca	agtacgcccc	ctattgacgt	caatgacgg	aaatggcccc	cctggcattt	2340
	tgcccagtae	atgaccttat	gggactttcc	tacttggcag	tacatctacg	tattagtcat	2400
	cgctattacc	atggttatgc	ggttttggca	gtacatcaat	ggcgtgggat	agcggtttga	2460
15	ctcaacggga	tttccaagtc	tcccacccat	tgacgtcaat	gggagtttgt	tttggcacca	2520
	aaatcaacgg	gactttccaa	aatgtcgtaa	caactccgcc	ccattgacgc	aaatgggagg	2580
	taggcgtgta	cggtgggagg	tctatataag	cagattttctc	tttagttctt	tgcaagaagg	2640
	tagagataaa	gacacttttt	caaacatggc	aactctaaag	gatcagctga	tttataatct	2700
	tctaaaggaa	gaacagacct	cccagaataa	gattacagtt	gttgggggtt	gtgctgttgg	2760
20	catggcctgt	gccatcagta	tcttaatgaa	ggacttggca	gatgaacttg	ctcttgttga	2820
	tgtcatcgaa	gacaaattga	agggagagat	gatgatctc	caacatggca	gccttttct	2880
	tagaacacca	aagattgtct	ctggcaaa	ctataatgta	actgcaaact	ccaagctggt	2940
	cattatcacg	gctggggcac	gtcagcaaga	gggagaaagc	cgtcttaatt	tggccagcgc	3000
	taacgtgaac	atatttfaat	tcatcattcc	taatgttgt	aaatacagcc	cgaactgcaa	3060
25	gttgcttatt	gtttcaaate	cagtggatat	cttgacctac	gtggcttgg	agataagtgg	3120
	ttttcccaaa	aaccgtgtta	ttggaagtgg	ttgcaatctg	gattcagccc	gattccgtta	3180
	cctgatgggg	gaaaggctgg	gagttcaccc	attaagctgt	catgggtggg	tccttgggga	3240
	acatggagat	tccagttgtc	ctgtatggag	tggaatgaat	gttgcctggt	tctctctgaa	3300
	gactctgcac	ccagatttag	ggactgataa	agataaggaa	cagtggaaag	aggttcacaa	3360
30	gcaaggtggt	gagagtgcct	atgaggtgat	caaaactcaa	ggctacacat	cctgggctat	3420
	tggactctct	gtagcagatt	tggcagagag	tataatgaag	aatcttaggc	gggtgcacct	3480
	agtttccacc	atgattaagg	gtctttacgg	aataaaggat	gatgtcttcc	ttagtgttcc	3540
	ttgacttttg	ggacagaatg	gaatctcaga	ccttgtgaag	gtgactctga	cttctgagga	3600
	agaggccccg	ttgaagaaga	gtgcagatac	actttggggg	atccaaaagg	agctgcaatt	3660
35	ttaacatgtg	aattcgagct	cggtaccogg	ggatcctcta	gagtcgacct	gcaggcatgc	3720
	aagcttaaat	aggaaagttt	cttcaacagg	attacagtt	agctacctac	atgctgaaaa	3780
	atatagcctt	taaatcattt	ttatattata	actctgtata	atagagataa	gtccattttt	3840
	taaaaatggt	ttccccaaac	cataaaaacc	tatacaagtt	gttctagtaa	caatacatga	3900
	gaaagatgtc	tatgtagctg	aaaataaaat	gacgtcacia	gacgatctgc	ctcgcgcggt	3960
40	tcggtgatga	cggtgaaaac	ctctgacaca	tgcagctccc	ggagacgggc	acagcttgtc	4020
	tgtaaagcgg	tgccgggagc	agacaagccc	gtcagggcgc	gtcagcgggt	gttggcgggt	4080
	gtcggggcgc	agccatgacc	cagtcacgta	gcatagcgg	agtgtaatcg	tttgtgaaga	4140
	gtttacagtc	ttgcagcaag	tttctcaatg	ctttagagtg	cctatgtcta	cgatggatgc	4200
	tacgtcttcc	tctgaatagt	ctattaaaaa	tcaacaatac	ctttttgtta	caaggtgttg	4260
45	agtgtcatta	aaagacaaag	tgaatacaaa	ggggattatt	aagaaattat	agtgcggcgg	4320
	agcaaaagtag	actagtagtc	cattttctat	gcacagtaga	aaacaaaaag	tattcaacaa	4380
	aaaaaaaaaa	aaacagaata	cattgcaagg	attagaaagc	aaacaacct	tctttacaag	4440
	gatgtaatga	agcatatttt	tattatcaaa	aacattgatg	atgaaattgg	tatgcttttg	4500
50	gatactacta	ttgcttttta	ctctacgaca	atgacatttc	acattcaatt	ggtttaaacc	4560
	ac						4562

<210> 13

<211> 4535

<212> ADN

55 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: pSN-HsLDH

<400> 13

ES 2 759 269 T3

5
 gtgcaagtac aacgagcttc tccgtatcga ggaggaactc ggttccgagg gtgtttacgc 60
 tggtgcccat gctggcaagt acatcaaggc tgctaagttt taaactctga gcatacatta 120
 aatthtacta atgtttacaa tacatgttta tttttataga atgcaatgaa atthttatcc 180
 tttttgcgtt ttggattaat ttgccaggtt gcgtgtttat ttattattag tattaaagta 240
 aactgttggt gtagtagaag tagctgatat aattgttttg tgctaatttg catccttttt 300
 ttttttagat gatcatttta gttttcgttt atatagtgtt tttttttcaa tcatcttaat 360
 tttttttgga atgtgtgcat ctgctgtaaa acacagaaat ttgctagtta ttaatagtaa 420

ES 2 759 269 T3

	tcaattacgg	ggtcattagt	tcatagccca	tatatggagt	tccgcgttac	ataacttacg	480
	gtaaattggcc	cgctggctg	accgccaac	gacccccgcc	cattgacgtc	aataatgacg	540
5	tatgttccca	tagtaacgcc	aatagggact	ttccattgac	gtcaatgggt	ggagtattta	600
	cggtaaactg	cccacttggc	agtacatcaa	gtgtatcata	tgccaagtac	gccccctatt	660
	gacgtcaatg	acggtaaatg	gccccgctgg	cattttgccc	agtacatgac	cttatgggac	720
	tttcctactt	ggcagtacat	ctacgtatta	gtcatcgcta	ttaccatggt	gatgcggttt	780
	tggcagtaca	tcaatgggcg	tggatagcgg	tttgactcac	ggggatttcc	aagtctccac	840
10	cccattgacg	tcaatgggag	tttgttttgg	cacccaaaatc	aacgggactt	tccaaaatgt	900
	cgtaacaact	ccgccccatt	gacgcaaatg	ggcggtaggc	gtgtacgggt	ggagggtctat	960
	ataagcagat	ttctcttttag	ttctttgcaa	gaaggtagag	ataaagacac	tttttccaat	1020
	atggaatgca	gagtatttca	aagctattca	cttagagctg	aggggatgaa	aaatcccatt	1080
	gccaaggaat	tgttggcttt	gatggaagaa	aagcaaagca	acttgtcagt	cgcggtcgat	1140
15	ttgacgaaga	aatccgaaat	cttagaattg	gtagataaaa	ttggacccta	tgtctgtggt	1200
	atcaagacac	atattgacgt	tgtcgaggat	ttcgaccagg	atatggtaga	aaaactgggtg	1260
	gccttaggta	aaaagcatcg	ttttcttatc	tttgaggatc	gcaaattcgc	agacattgga	1320
	aataccgtca	agctacaata	tgcactctggt	gtgtacaaaa	ttgcttcttg	ggctcatatc	1380
	acaaattgcc	atacagtgcc	aggcgagggt	attatacaag	gcctcaaaga	agttggttta	1440
20	cctttgggac	gtggctctct	gcttttggct	gaaatgtctt	ccaaaggctc	tttggctact	1500
	ggttcttaca	cagagaaaac	cttagaatgg	tttgagaagc	ataccgattt	ttgctttggc	1560
	tttatagctg	gtcgtcgatt	tcctaacctt	caaagcgact	acataactat	gtcccctggt	1620
	atcggcttgg	atgttaaagg	agacgggctg	ggacagcaat	atcgtactcc	tgaagaagtg	1680
	attgtaaact	gcggtagcga	tatcatcatt	gttggctcgtg	gagtctatgg	agctggctcgt	1740
25	aatcctgttg	tcgaaagccaa	gagatataga	gaagctgggt	ggaaggcata	tcagcaaaga	1800
	ccttctcagc	attaaaaaaaa	gactaatgta	aaatTTTTT	ggttggttat	tgaaaaagtc	1860
	gatgccttgt	tctcgtttgt	tttcctaggc	gttttatgtc	agaaggcatt	tagaattagt	1920
	atactacaag	tactctttgg	taaaatttta	tgtagcgact	aaaatattaa	ctattataga	1980
	taaacacctt	gggaataaaa	agtaatttgc	tatagtaatt	tattaaacat	gctcctacaa	2040
30	cattacctct	agttattaat	agtaatcaat	tacggggtca	ttagttcata	gcccatatat	2100
	ggagttccgc	gttacataac	ttacggtaaa	tggccccgct	ggctgaccgc	ccaacgacc	2160
	ccgcccattg	acgtcaataa	tgacgtatgt	tcccatagta	acgccaatag	ggactttcca	2220
	ttgacgtcaa	tgggtggagt	atttacggta	aactgcccac	ttggcagtac	atcaagtgta	2280
	tcatatgcc	agtacgcccc	ctattgacgt	caatgacggg	aaatggcccc	cctggcattt	2340
35	tgccagtac	atgaccttat	gggactttcc	tacttggcag	tacatctacg	tattagtcat	2400
	cgctattacc	atgggtatgc	ggttttggca	gtacatcaat	gggctgggat	agcggtttga	2460
	ctcacgggga	tttccaagtc	tccaccccat	tgacgtcaat	gggagtttgt	tttggcacca	2520
	aaatcaacgg	gactttccaa	aatgtcgtaa	caactccgcc	ccattgacgc	aaatgggagg	2580
	taggcgtgta	cggtgggagg	tctatataag	cagatttctc	tttagttctt	tgcaagaagg	2640
40	tagagataaa	gacacttttt	caaacatggc	aactctaaag	gatcagctga	tttataatct	2700
	tctaaggaa	gaacagaccc	cccagaataa	gattacagtt	gttggggttg	gtgctgttgg	2760
	catggcctgt	gccatcagta	tcttaatgaa	ggacttggca	gatgaacttg	ctcttgttga	2820
	tgtcatcgaa	gacaaattga	aggagagat	gatgatctc	caacatggca	gccttttcc	2880
45	tagaacacca	aagattgtct	ctggcaaga	ctataatgta	actgcaaact	ccaagtgggt	2940
	cattatcacg	gctggggcac	gtcagcaaga	gggagaaagc	cgtcttaatt	tggctcagcg	3000
	taacgtgaac	atattttaa	tcatcattcc	taatgttgta	aaatacagcc	cgaactgcaa	3060
	gttgcttatt	gtttcaaatc	cagtggatat	cttgacctac	gtggcttgg	agataagtg	3120
	ttttcccaa	aaccgtgta	ttggaagtgg	ttgcaatctg	gattcagccc	gattccgtta	3180
	cctgatgggg	gaaaggctgg	gagttcacc	attaagctgt	catgggtggg	tccttgggga	3240
50	acatggagat	tccagtgtgc	ctgtatggag	tggaatgaat	gttgcctggg	tctctctgaa	3300
	gactctgcac	ccagatttag	ggactgataa	agataaggaa	cagtggaaag	aggttcacaa	3360
	gcaggtggtt	gagagtgctt	atgaggtgat	caaactcaaa	ggctacacat	cctgggctat	3420
	tggactctct	gtagcagatt	tggcagagag	tataatgaag	aatcttaggc	gggtgcaccc	3480
	agtttccacc	atgattaagg	gtctttacgg	aataaaggat	gatgtcttcc	ttagtgttcc	3540
55	ttgcattttg	ggacagaatg	gaatctcaga	ccttgtgaag	gtgactctga	cttctgagga	3600
	agaggccccg	ttgaagaaga	gtgcagatac	actttggggg	atccaaaagg	agctgcaatt	3660
	ttaacgggtac	ccggggatcc	tctagagtcc	acctgcaggc	atgcaagctt	aaataggaaa	3720
	gtttcttcaa	caggattaca	gtgtagctc	ctacatctg	aaaaatatag	cctttcaatc	3780
	atTTTTTatat	tataactctg	tataactagag	ataagtccat	TTTTTaaaa	tgttttcccc	3840
60	aaaccataaa	accctataca	agttgttcta	gtaacaatac	atgagaaaga	tgtctatgta	3900
	gctgaaaata	aaatgacgtc	acaagacgat	ctgcctcgcg	cgtttcgggtg	atgacgggtga	3960
	aaacctctga	cacatgcagc	tcccggagac	ggtcacagct	tgtctgtaag	cggatgccgg	4020
	gagcagacaa	gcccgtcagg	gcgcgtcagc	gggtgttggc	gggtgtcggg	gcgcagccat	4080
	gaccagctca	cgtagcgata	gccgagtgta	atcgtttctg	taaacacag	aaatTTTgtct	4140
65	ttgacctagt	acatattttt	atgtgtagcc	aaaatTTTTg	gatacctttg	ctctttatca	4200

ES 2 759 269 T3

5 gtcactttac tactactaac actggaaaat gttctattcc tcagcatctt acctactagt 4260
atttataata ttcacatcaac tagaatgaaa ataacaatat tattaacata attcatctac 4320
attacaatag taaaatattg aaccagaaaa gccaaaaaaa aaaaagcata tagaaaagga 4380
aatcatttgt acagaaaagt catgaacgaa aaacatgtca taaattaagg accgtatagg 4440
ctttatgcat ttaagtataa aaaaaaaaaa aaagaacagc attaaagtgg tgaaacaaat 4500
taaacaacaa gggaaatcaa agccgtttaa accac 4535

10

<210> 14
<211> 3277
<212> ADN

15

<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: fragmento de ADN de ura4
<400> 14

ES 2 759 269 T3

	gtgtgtactt	tgaaagtcta	gctttacagc	ttggcattgt	tcatacaaac	gtcttcagca	60
	tatctttcca	cacttgctct	gtacacgtat	tctttccctc	ttatcattcc	tgtttttctt	120
5	ttttaataaa	ccaacatgcc	tgtaagtagt	tttatcttta	gaaatctgtg	catcatggat	180
	cctaactatg	tcttttagac	ggttcaaac	ccctctcagc	gtcgtgcaaa	cacacagttt	240
	cagaagaaca	ttactcgtcg	tgtaaaaaa	aattcaaaag	aacgttatgt	tgccaaacat	300
	cctcctacca	agattcctcg	taacattgcc	agtaagtaag	aattgatcct	attgtagca	360
	actttggctt	gtgtttcata	ctgacaatgc	atcttagtgt	tttttattct	tctcatgtca	420
10	ggaggaatta	ttttgggaat	acttagat	cttttgacgt	tttttctta	agaacatgtg	480
	attggagcaa	ttttaaaacc	tatttgcacc	gatatttgtgt	attatactcc	gagaaaaagt	540
	atactagttt	tgaaataata	agcttgtgat	attgacgaaa	ctttttgaca	tctaatttat	600
	tctgttccaa	caccaatggt	tataaccaag	ttttatcttg	tttgtctaca	tggtatttta	660
	cattcatcta	catacatctt	ctattggctt	tgtacatagt	tatcattaca	agtctaaaaa	720
15	aattcactct	tttcttattc	aatgtcaatc	caagagaaaa	gattgtggta	atggtgtagg	780
	agcatgttta	ataaattact	atagcaaatt	actttttatt	ccaaggtgt	ttatctataa	840
	tagttaatat	tttagtcgct	acataaaatt	ttaccaaaga	gtacttgtat	actaattcta	900
	aatgccttct	gacataaaac	gcctaggaaa	acaaacgcaa	acaaggcatc	gactttttca	960
	ataaccaacc	aaaaaaaaatt	tacattagtc	tttttttaat	gctgagaaa	tctttgctga	1020
20	tatgccttcc	aaccagcttc	tctatatctc	ttggcttcga	caacaggatt	acgaccagct	1080
	ccatagactc	cacgaccaac	aatgatgata	tcgtaccgc	agtttacaat	cacttcttca	1140
	ggagtacgat	attgctgtcc	cagcccgctc	cctttaaact	ccaagccgat	accaggggac	1200
	atagttatgt	agtcgctttg	aaggtttagga	aatcgacgac	cagctataaa	gccaaagcaa	1260
	aaatcgggat	gcttctcaaa	ccattctaag	gttttctctg	tgtaggaacc	agtagccaaa	1320
25	gagcctttgg	aagacatttc	agccaaaagc	aagagaccac	gtcccaaagg	taaaccaact	1380
	tctttgaggc	cttgtataat	accctcgctc	ggcactgtat	ggcaatttgt	gatatgagcc	1440
	caagaagcaa	ttttgtacac	accagatgca	tattgtagct	tgacgggtatt	tccaatgtct	1500
	gcaattttgc	gatcctcaaa	gataagaaaa	cgatgctttt	tacctaaggc	caccagtttt	1560
	tctaccatat	cctggtcgaa	atcctcgaca	acgtcaatat	gtgtccttga	aacacagaca	1620
30	tagggtccaa	ttttatctac	caattctaag	atttcggatt	tcttcgtcaa	atcgaccgcg	1680
	actgacaagt	tgctttgctt	ttcttccatc	aaagccaaca	attccttggc	aatgggattt	1740
	ttcatcccct	cagctctagc	tgaatagctt	tgaataactc	tagcatccat	aactttgctt	1800
	ttaaaccctt	aatttcgatc	caagcaaaaa	agaggttctt	ggtaggacaa	tacggtaaga	1860
	aaacacgaca	tgtgcagaga	tgccgacgaa	gcatagttaa	actgggatgg	taaaatcaat	1920
35	taagaattta	taaagacaaa	attgtataag	tctctaaaaac	atcttaatta	tacctcacag	1980
	aactatctaa	aatatattca	caaagtgcga	acattatcat	gaaaaagaac	cattttaatt	2040
	taaagcaagg	gcattaaggc	ttatttacag	aatttcttac	ttttgtaaag	attataaggc	2100
	tgattatctt	tttcaccatg	ccaaaaatta	cacaagatag	aatggatggt	tgaaattaaa	2160
	cgtgagtata	caaacaaata	cactaggtaa	atcgaaacat	ttttttctcc	attaagtaac	2220
40	aaattcctat	ttagagaaa	aatgctgagt	agattaaata	atctatacaa	acttttttaa	2280
	cacaaatgca	tacatatagc	cagtgggatt	tgtagctaag	cttcaggagt	tttatccatt	2340
	taatgtatgg	aatcaaaatt	taaagcttct	gtcaaaagtt	aacaatattt	cttttgggtt	2400
	aatcaaatc	ttccatgcga	ttaagaagat	agatgctgaa	caaaagaagc	acatggataa	2460
45	ccacaaaagc	agtttgctca	tgggtaaaac	catgaatttt	tttttcgaca	atgattcaaa	2520
	gaccagtata	tccaatacgc	atcctagaat	ctagtcaaag	aagaacctaa	agtagagatg	2580
	caaatgcgct	aaaaagagtg	gatataaatt	caatatcatt	tataaaacaa	cttcttccat	2640
	taaaaattcc	ttgggcaaaa	caaaagttcc	aatcataaaa	agttaataag	ttctgagttg	2700
	tgtcaaatct	gacatggcat	tcctcaataa	tgacactcac	tattatgta	agcatcgaaa	2760
	acataattaa	atctatacaa	gctgttttgt	cattacggtc	tggcatcaac	tttttagag	2820
50	gcggtacgaa	gatgattttg	cacacggata	accaattctt	catgagatcc	gctagtttta	2880
	agtgaatttt	ttttacaata	ctcaattaac	tgtttttttg	accattgact	aggaggactt	2940
	tgagaaatgg	aggatgaagc	tgtctccctg	gaattgtctg	tgataggact	aactacaacc	3000
55	gccaggaag	aagcagcaat	aattgcagca	aacgataaag	ttaagacatt	agctattttc	3060
	atcgaagatg	aaatacaaat	gagtaaaaag	aacccaaaaa	tgaaaactgt	tattaaaaag	3120
	gagattttga	aaatttaaag	gttgaggtaa	agaacggttg	tagaagacga	gcatctagag	3180
	gaagacgccc	ccaactgtgg	ccaacgtttt	tcattaccca	aattcatctg	acattgatta	3240
60	tgatacattg	aaggtgtgct	tacatctttc	tagtcat			3277

REIVINDICACIONES

- 5 1. Transformante de *Schizosaccharomyces pombe* que comprende 3 copias de un gen de lactato deshidrogenasa humano, en el que las 3 copias del gen de lactato deshidrogenasa humano están integradas en el cromosoma de *Schizosaccharomyces pombe*, y en el que un gen que codifica piruvato descarboxilasa 2 del huésped de *Schizosaccharomyces pombe* está eliminado o inactivado.
- 10 2. Procedimiento para producir un transformante de *Schizosaccharomyces pombe* que comprende 3 copias de un gen de lactato deshidrogenasa humano integrado en el cromosoma de *Schizosaccharomyces pombe* y que tiene una delección o inactivación de un gen que codifica piruvato descarboxilasa 2, comprendiendo el procedimiento:
 - a1) proporcionar un huésped de *Schizosaccharomyces pombe* en que un gen que codifica piruvato descarboxilasa 2 está eliminado o inactivado, y
 - 15 b1) integrar, en el huésped proporcionado en la etapa a1), tres casetes de expresión, que comprenden cada uno un promotor y un terminador capaces de funcionar en *Schizosaccharomyces pombe* y un gen de lactato deshidrogenasa humano, en 3 posiciones del cromosoma de dicho huésped para obtener el transformante;
 - o
 - a2) proporcionar un huésped de *Schizosaccharomyces pombe*,
 - b2) integrar, en el huésped proporcionado en la etapa a2), tres casetes de expresión, que comprenden cada uno un promotor y un terminador capaces de funcionar en *Schizosaccharomyces pombe* y un gen de lactato
 - 20 deshidrogenasa humano, en 3 posiciones del cromosoma de dicho huésped para obtener el transformante y
 - c2) eliminar o inactivar un gen que codifica la piruvato descarboxilasa 2 del transformante obtenido.
- 25 3. Procedimiento para producir el transformante de *Schizosaccharomyces pombe*, según la reivindicación 2, en el que los tres casetes de expresión se integran respectivamente en una región que comprende de 10.000 pb en dirección 5' a 10.000 pb en dirección 3' de un locus del gen eno101, una región que comprende de 10.000 pb en dirección 5' a 10.000 pares de bases en dirección 3' de un locus del gen leu1 y una región que comprende de 10.000 pb en dirección 5' a 10.000 pb en dirección 3' de un locus del gen gpm1.
- 30 4. Procedimiento para producir ácido láctico, que comprende cultivar el transformante de *Schizosaccharomyces pombe*, tal como se define en la reivindicación 1, y recuperar el ácido láctico a partir del caldo de cultivo.
- 35 5. Procedimiento para producir ácido láctico, según la reivindicación 4, en el que se utiliza un caldo de cultivo que tiene una concentración de glucosa del 1 al 50% en masa para cultivar el transformante.
- 40 6. Procedimiento para producir ácido láctico, según la reivindicación 4 o 5, en el que el cultivo continúa adicionalmente después de que el pH del caldo de cultivo llega a 3,5 o inferior debido al ácido láctico producido por el transformante.
7. Procedimiento para producir ácido láctico, según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, en el que el cultivo se continúa sin neutralizar el ácido láctico producido por el transformante en el caldo de cultivo.
- 45 8. Procedimiento para producir ácido láctico, según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7, en el que el ácido láctico se separa del caldo de cultivo sin neutralizar el ácido láctico producido por el transformante en el caldo de cultivo.

FIG. 3

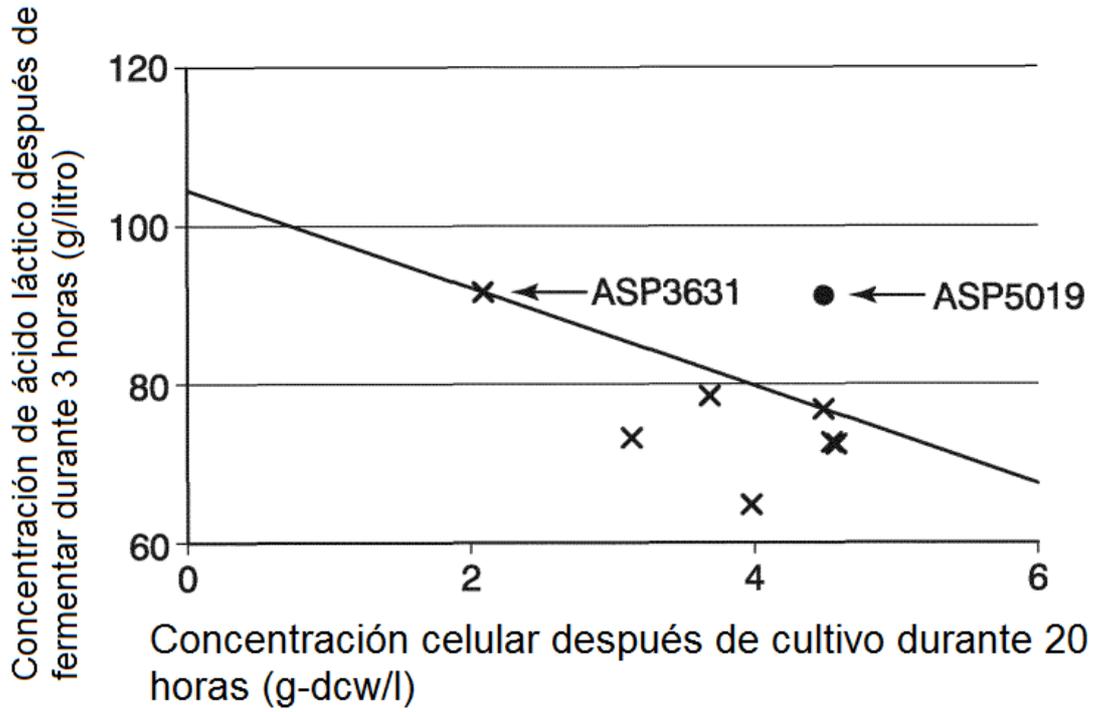


FIG. 4

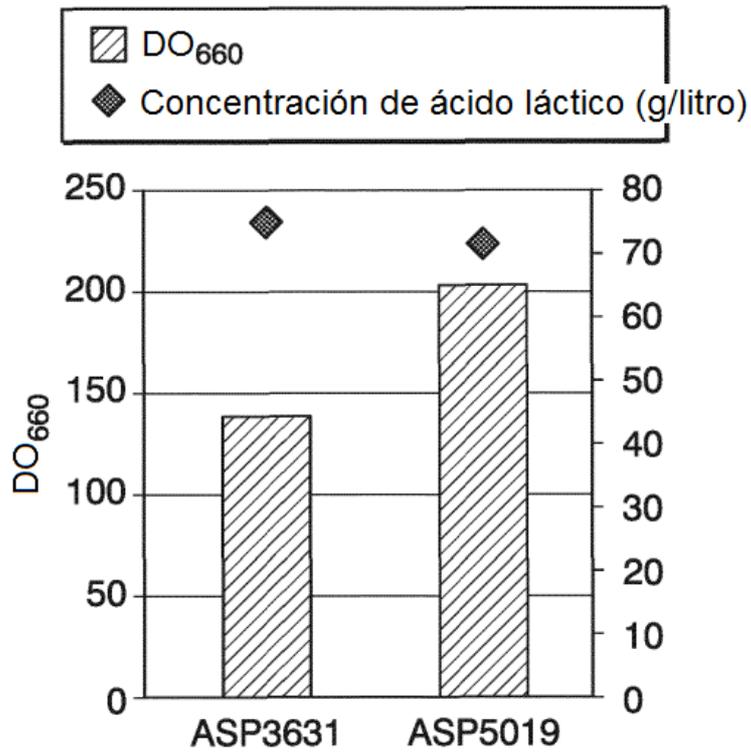


FIG. 5

