



* B R P I 0 9 1 9 2 1 8 B 1 *

República Federativa do Brasil

Ministério do Desenvolvimento, Indústria,
Comércio e Serviços

Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0919218-2 B1

(22) Data do Depósito: 11/09/2009

(45) Data de Concessão: 11/02/2025

(54) Título: MÉTODO DE PRODUÇÃO DE ÁCIDO LÁTICO A PARTIR DE MATÉRIA-PRIMA DERIVADA DE PLANTAS, E BACTÉRIA PRODUTORA DE ÁCIDO LÁTICO

(51) Int.Cl.: C12N 1/21; C12N 15/09; C12P 7/56.

(30) Prioridade Unionista: 13/02/2009 JP 2009-032043; 16/09/2008 JP 2008-237177.

(73) Titular(es): MITSUI CHEMICALS, INC..

(72) Inventor(es): KATSUYUKI TAKAHASHI; HITOSHI TAKAHASHI; DAISUKE MIYAZAWA; TAKASHI MORISHIGE; MITSUFUMI WADA; DAISUKE MOCHIZUKI; TADASHI ARAKI.

(86) Pedido PCT: PCT JP2009065957 de 11/09/2009

(87) Publicação PCT: WO 2010/032698 de 25/03/2010

(85) Data do Início da Fase Nacional: 15/03/2011

(57) Resumo: MÉTODO DE PRODUÇÃO DE ÁCIDO LÁTICO A PARTIR DE MATÉRIA-PRIMA DERIVADA DE PLANTAS, E BACTÉRIA PRODUTORA DE ÁCIDO LÁTICO. A presente invenção apresenta: uma Escherichia coli produtora de ácido lático que compreende ao menos um gene do grupo de genes de sacarose não PTS, incluindo ao menos um gene de hidrolase de sacarose (desde que sejam excluídas uma combinação de uma proteína repressora (cscR), uma hidrolase de sacarose (cscA), uma frutoquinase (cscK), uma permease de sacarose (cscB), e uma combinação de uma hidrolase de sacarose (cscB)), onde a Escherichia coli produtora de ácido lático possui um sistema de aumento da produção de ácido lático fornecido pela recombinação genética; e um método de produção de ácido lático que inclui a produção de ácido lático a partir da matéria-prima contendo sacarose derivada de planta por meio da utilização de uma Escherichia coli produtora de ácido lático.

MÉTODO DE PRODUÇÃO DE ÁCIDO LÁTICO A PARTIR DE MATÉRIA-
PRIMA DERIVADA DE PLANTAS, E BACTÉRIA PRODUTORA DE ÁCIDO
LÁTICO

Campo técnico

5 A presente invenção refere-se a um método de produção de ácido lático a partir de uma matéria-prima derivada de plantas, e a uma bactéria produtora de ácido lático.

Técnica Relacionada

O ácido lático é uma substância útil, a qual se tem
10 dado atenção, nos últimos anos, como sendo uma matéria-prima para polímeros, ou como um intermediário para agroquímicos e medicamentos. O ácido lático inclui o ácido L-lático e o ácido D-lático. O ácido polilático, industrialmente produzido no presente, é um polímero de
15 ácido L-lático. Entretanto, o ácido D-lático também vem atraindo cada vez mais atenção, nos últimos anos, como uma matéria-prima para polímeros, ou como um intermediário para agroquímicos e medicamentos. Na natureza, estão presentes micro-organismos que produzem o ácido lático com alta
20 eficácia, tais como os Lactobacilos e as bactérias filamentosas. Os métodos conhecidos de produção de ácido lático que utilizam os micro-organismos incluem um método de utilização de *Lactbacillus delbrueckii*, ou similares, como um micro-organismo produtor de ácido L-lático com alta
25 eficácia, e um método que utiliza micro-organismos que pertencem ao gênero *Sporolactobacillus*, ou similares, como micro-organismos produtores de ácido D-lático com alta eficácia.

Entretanto, o ácido lático como uma matéria-prima
30 precisa apresentar uma pureza óptica elevada em qualquer

utilização.

Com o recente avanço da pesquisa, foram inventados micro-organismos produtores de ácido D-lático com alta seletividade e alta produtividade (veja o Folheto da publicação Internacional (WO) n° 2005/033324).

Ademais, há também o conhecimento de uma *Escherichia coli* produtora de ácido D-lático de alta produtividade a partir da sacarose, que é uma matéria-prima de açúcar pouco dispendiosa (veja *Biotechnology Letters*, Vol. 27, pp. 1891-1896 (2005)). Entretanto, a *Escherichia coli*, produtora de ácido D-lático a partir da sacarose, possui baixa produtividade e leva um longo período para a assimilação da sacarose, o que impõe um problema na industrialização.

A respeito do ácido L-lático, é conhecida uma *Escherichia coli* produtora de ácido L-lático de alta seletividade e alta produtividade, que utiliza a glicose como matéria-prima (Pedido de Patente Japonesa Submetida à Inspeção Pública (JP-A) n° 2007-49993). Entretanto, não se conhece uma *Escherichia coli* produtora de ácido L-lático a partir da sacarose.

Com base em entendimento convencional, os mecanismos de assimilação da sacarose por um micro-organismo são a grosseiramente divididos em sacarose PTS (Sistema Fosfotransferase de Açúcar do Fosfoenolpiruvato) e uma sacarose não PTS (por exemplo, o JP-A n° 2001-346578). Quando a assimilação de sacarose é realizada através da sacarose não PTS, o micro-organismo incorpora a sacarose como ela é, e, então, decompõe a sacarose em glicose e frutose. Por outro lado, quando a assimilação de sacarose é realizada através da sacarose PTS, o micro-organismo

fosforila a sacarose quando a incorpora, e, então, converte a sacarose em sacarose-6-fosfato. Subsequentemente, a sacarose-6-fosfato é decomposta em glicose-6-fosfato e frutose dentro do micro-organismo.

5 Ou seja, em qualquer dos mecanismos, a frutose derivada de sacarose aparece, a princípio, dentro do micro-organismo em uma forma não fosforilada. Para fins de incorporação da frutose não fosforilada (doravante referida como "frutose não fosforilada") em um sistema glicolítico,
10 a frutose precisa ser isomerizada em glicose, ou fosforilada. Entretanto, a literatura sugere que uma atividade de isomerização de uma frutose não fosforilada em glicose e uma atividade de fosforilação da frutose são muito baixas no caso de o micro-organismo ser uma
15 *Escherichia coli* (exceto para algumas cepas de *Escherichia coli*, capazes de assimilar a sacarose) (veja FEMS Yeast Res., Vol. 05, pp. 1055-1062 (2005); PNAS, Vol. 98(26), pp. 15257-15259 (2001); e J. Bacteriology, Vol. 184(19), pp. 5307-5316 (2002)). Sendo assim, ainda que a frutose não
20 fosforilada fosse feita para aparecer, com sucesso, dentro de uma *Escherichia coli*, não se esperaria a assimilação da frutose não fosforilada pela *Escherichia coli*, a menos que tomadas medidas especiais.

Sabe-se que a sacarose não PTS é composta de quatro
25 fatores, CscB (que incorpora a sacarose), CscA (que decompõe a sacarose dentro do micro-organismo), CscK (que fosforila a frutose), e CscR (que controla a expressão de CscB, A e K). O documento Biotechnology Letters, Vol. 27, pp. 1891-1896 (2005) descreve que a introdução dos quatro
30 fatores na *Escherichia coli* produtora de ácido D-lático

atingiu a produção a partir da sacarose com um rendimento de 93% referente ao açúcar, e uma produtividade de 96,5 g/L/120 horas. Entretanto, a produtividade encontra-se em um nível insuficiente em termos de industrialização, e há
5 uma necessidade adicional de melhoria da produtividade.

Ademais, Can. J. Microbiol., Vol. 45, pp. 418-422 (1999) revela que uma *Escherichia coli* se torna capaz de crescer na sacarose como uma matéria-prima por meio da introdução do *CscA* único na *Escherichia coli*. Todavia,
10 esse documento não descreve a assimilação da frutose derivada da sacarose. Uma questão importante na produção de uma substância pela *Escherichia coli*, que utiliza a sacarose como uma matéria-prima, é a obtenção de uma produção de alto rendimento a partir da matéria-prima da
15 sacarose. A assimilação eficaz da frutose derivada de sacarose, bem como da glicose derivada de sacarose, é uma condição essencial para a obtenção de um alto rendimento. Ao passo que esse documento demonstra que a introdução do *CscA* único em uma *Escherichia coli* resultou na assimilação
20 da sacarose, este não revela quaisquer dados quanto ao grau de assimilação da frutose derivada de sacarose.

A respeito do *CscA*, sabe-se que a produção de aminoácidos derivados do ácido fosfoenolpirúvico (PEP), por exemplo, o triptofano, é ainda aumentada pela introdução de
25 genes *cscA*, *cscB*, *cscK* e *cscR* (por exemplo, o JP-A n° 2007-49993).

Conforme acima descrito, os métodos convencionais de produção de ácido lático a partir da sacarose ainda apresentam baixa produtividade, e exigem muito tempo para a
30 assimilação da sacarose. Sendo assim, existe ainda a

necessidade de melhoria nas tecnologias de produção industrial do ácido lático que utilizem suficientemente a sacarose, que é pouco dispendiosa e possui um alto valor de utilidade industrial.

5

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

Problema Técnico

É um objeto da presente invenção o fornecimento de uma bactéria produtora de ácido lático que assimile a sacarose em um tempo mais curto, e que seja útil para a produção mais eficaz de ácido lático a partir da sacarose, e um método de produção de ácido lático.

Solução Técnica

A presente invenção fornece uma bactéria produtora de ácido lático e um método de produção de ácido lático. Ou seja, a presente invenção inclui o seguinte:

[1]. Uma *Escherichia coli* produtora de ácido lático que compreende ao menos um gene do grupo de genes da sacarose não PTS, que inclui ao menos um gene da hidrolase da sacarose, desde que excluídas uma combinação de uma proteína repressora (cscR), uma hidrolase de sacarose (cscA), uma frutoquinase (cscK) e uma permease de sacarose (cscB), e uma combinação de uma hidrolase de sacarose (cscA), uma frutoquinase (cscK) e uma permease de sacarose (cscB),

25 onde a *Escherichia coli* produtora de ácido lático compreende um sistema de aumento de produção de ácido lático fornecido pela recombinação genética.

[2]. A *Escherichia coli* produtora de ácido lático de acordo com o descrito em [1], em que a *Escherichia coli* produtora de ácido lático compreende apenas o gene de

hidrolase de sacarose dentre o grupo de genes da sacarose não PTS, e a *Escherichia coli* produtora de ácido lático compreende o sistema de aumento de produção de ácido lático fornecido pela recombinação genética.

5 [3]. A *Escherichia coli* produtora de ácido lático, conforme descrito em [1] ou [2], onde a *Escherichia coli* produtora de ácido lático compreende ainda um sistema de melhoria da capacidade metabólica da frutose.

10 [4]. A *Escherichia coli* produtora de ácido lático, de acordo com o descrito em qualquer um dos itens de [1] a [3], em que o sistema de aumento de produção de ácido lático inclui a inativação ou atenuação da atividade piruvato formiato liase.

15 [5]. A *Escherichia coli* produtora de ácido lático, de acordo com o descrito em qualquer um dos itens de [1] a [4], em que o sistema de aumento de produção de ácido lático inclui o aumento da atividade da lactato desidrogenase dependente de NADH para a produção de ácido D-lático ou ácido L-lático.

20 [6]. A *Escherichia coli* produtora de ácido lático, de acordo com o descrito em qualquer um dos itens de [1] a [4], em que o sistema de aumento de produção de ácido lático inclui o aumento da atividade da D-lactato e a inativação ou atenuação da atividade inata D-lactato
25 desidrogenase dependente de FAD da *Escherichia coli*.

[7]. A *Escherichia coli* produtora de ácido lático, de acordo com o descrito em qualquer um dos itens de [1] a [4], em que o sistema de aumento de produção de ácido lático inclui o aumento da atividade da L-lactato
30 desidrogenase e a inativação ou atenuação de ao menos uma

da atividade inata de D-lactato desidrogenase da *Escherichia coli* ou da atividade de L-lactato desidrogenase dependente de FMN da *Escherichia coli*.

[8]. A *Escherichia coli* produtora de ácido lático,
5 conforme descrito em qualquer um dos itens de [3] a [7], em que o sistema de melhoria da habilidade metabólica da frutose é o aumento da habilidade de fosforilação ou o aumento da capacidade de absorção da frutose em via metabólica da frutose.

10 [9]. A *Escherichia coli* produtora de ácido lático, conforme descrito em [8], em que o aumento da capacidade de fosforilação em uma via metabólica da frutose deriva da atividade quinática da frutose-1-fosfato.

[10]. A *Escherichia coli* produtora de ácido lático,
15 conforme descrito em [8], em que o aumento da capacidade de absorção da frutose em uma via metabólica da frutose deriva da inativação ou atenuação da atividade FruR da *Escherichia coli*.

[11]. A *Escherichia coli* produtora de ácido lático,
20 conforme descrito em qualquer um dos itens de [1] a [10], em que o gene da hidrolase da sacarose deriva de uma bactéria pertencente ao gênero *Escherichia*.

[12]. A *Escherichia coli* produtora de ácido lático,
25 conforme descrito em qualquer um dos itens de [1] a [10], em que o gene da hidrolase da sacarose deriva de uma bactéria *Escherichia coli* O157.

[13]. A *Escherichia coli* produtora de ácido lático,
30 conforme descrito em qualquer um dos itens de [9] a [12], em que a frutose-1-fosfato quinase deriva de uma bactéria pertencente ao gênero *Escherichia*.

[14]. A *Escherichia coli* produtora de ácido láctico, conforme descrito em qualquer um dos itens de [9] a [12], em que a frutose-1-fosfato quinase é a proteína derivada da *Escherichia coli* MG1655.

5 [15]. A *Escherichia coli* produtora de ácido láctico, conforme descrito em qualquer um dos itens de [1] a [14], em que a *Escherichia coli* é uma variante derivada da *Escherichia coli* K12.

[16]. Um método de produção de ácido láctico, sendo que
10 o método compreende:

a produção de ácido láctico a partir de uma matéria-prima contendo sacarose, derivada de plantas, por meio do uso da *Escherichia coli* produtora de ácido láctico descrita em quaisquer itens de [1] a [5].

15 Efeitos Vantajosos da Invenção

Segundo a invenção, são fornecidos uma bactéria produtora de ácido láctico que assimila a sacarose em um tempo mais curto e que é útil para a produção de ácido láctico com maior eficácia, e um método de produção de ácido
20 láctico.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A FIG. 1 é um gráfico que mostra a quantidade de acumulação de ácido láctico produzido quando uma cultura de 48 horas foi conduzida utilizando várias bactérias produtoras de ácido láctico de acordo com o Exemplo 10 da invenção.
25

MODALIDADES PARA A REALIZAÇÃO DA INVENÇÃO

A bactéria produtora de ácido láctico de acordo com a invenção é a *Escherichia coli*, que possui ao menos um gene do grupo de genes da sacarose não PTS, incluindo ao menos
30

um gene de hidrolase de sacarose (desde que sejam excluídas uma combinação de uma proteína repressora (cscR), uma hidrolase de sacarose (cscA), uma frutoquinase (cscK), uma permease de sacarose (cscB), e uma combinação de uma
5 hidrolase de sacarose (cscA), uma frutoquinase (cscK), e uma permease de sacarose (cscB)), onde a *Escherichia coli* produtora de ácido lático possui um sistema de aumento da produção de ácido lático fornecido pela recombinação genética.

10 O método de produção de ácido lático de acordo com a invenção é um método de produção de ácido lático que inclui a produção de ácido lático a partir de uma matéria-prima contendo sacarose derivada de planta, por meio da utilização de uma bactéria produtora de ácido lático.

15 A bactéria produtora de ácido lático de acordo com a invenção possui ao menos um gene, incluindo ao menos um gene de hidrolase de sacarose do grupo de genes da sacarose não PTS (desde que sejam excluídas uma combinação de uma proteína repressora (cscR), uma hidrolase de sacarose
20 (cscA), uma frutoquinase (cscK), e uma permease de sacarose (cscB), e uma combinação de hidrolase de sacarose (cscA), uma frutoquinase (cscK), e uma permease de sacarose (cscB), e que também possui um sistema de aumento da produção de ácido lático, como um resultado do qual a bactéria
25 produtora de ácido lático, de acordo com a invenção, pode fosforilar a frutose derivada da sacarose, incorporar a frutose derivada de sacarose na célula, e converter a frutose em ácido lático utilizando o sistema de aumento de produção de ácido lático. Até o momento, não houve relato a
30 respeito de qualquer exemplo no qual ao menos um gene do

grupo de genes da sacarose não PTS, incluindo ao menos um gene de hidrolase de sacarose, é conferido a uma bactéria que não possua a capacidade de assimilação da sacarose de modo a produzir a substância por meio da utilização de 5 sacarose como uma fonte de carbono.

Na invenção, descobriu-se que a frutose derivada da sacarose é assimilada com grande eficácia, e a produtividade é notavelmente elevada, se comparada aos métodos convencionais, quando alguns, mas não todos, dos 10 genes do grupo de genes da sacarose não PTS são introduzidos na *Escherichia coli* produtora de ácido lático, isto é, quando ao menos um gene de sacarose não PTS, incluindo ao menos um gene de hidrolase de sacarose, em uma *Escherichia coli* produtora de ácido lático. Como 15 consequência, o ácido lático pode ser obtido em um curto tempo a partir da sacarose derivada de plantas, que é pouco dispendiosa e possui um alto valor industrial.

Particularmente, a bactéria produtora de ácido lático de acordo com a invenção é capaz de produzir ácido lático 20 por meio da assimilação de sacarose, ou frutose, que é um produto de decomposição da sacarose, independentemente da presença ou da ausência de glicose ou outra fonte de açúcar. Sendo assim, a bactéria produtora de ácido lático de acordo com a invenção é mais eficaz, posto que a 25 bactéria produtora de ácido lático possa produzir ácido lático mesmo antes da diminuição ou do esgotamento de outros substratos de açúcar, tais como a glicose.

Sabe-se, geralmente, que a absorção da glicose é usualmente preferida à absorção da frutose na *Escherichia coli*, e, assim, a frutose não é suficientemente 30

metabolizada na presença da glicose. Ademais, o metabolismo do açúcar é uma função fundamental dos organismos. Sendo assim, é surpreendente que o aumento da atividade de fosforilação ou a capacidade de absorção da frutose da via metabólica da frutose tenha alcançado uma produção eficaz de ácido lático sem causar a supressão do crescimento bacteriano, e sem sofrer a influência da repressão catabólica pela glicose.

O termo "grupo de genes da sacarose não PTS", conforme utilizado na invenção, refere-se a um grupo de genes envolvidos no sistema não PTS da via de assimilação da sacarose de um micro-organismo. Especificamente, o grupo de genes da sacarose não PTS é um grupo de genes que consiste em uma proteína repressora (cscR), uma hidrolase de sacarose (cscA), uma frutoquinase (cscK) e uma permease de sacarose (cscB). Na invenção, utiliza-se ao menos um gene que inclui ao menos uma cscA, e que é selecionado desses genes, e os exemplos de ao menos um gene incluem uma cscA única, uma combinação de uma cscA e uma cscK, uma combinação de uma cscA e uma cscB, uma combinação de uma cscA e uma cscR, uma combinação de uma cscA, uma cscB e uma cscR, e uma combinação de uma cscA, uma cscK e uma cscR. Na invenção, uma combinação de uma proteína repressora (cscR), uma hidrolase de sacarose (cscA), uma frutoquinase (cscK) e uma permease de sacarose (cscB), e uma combinação de uma hidrolase de sacarose (cscA), uma frutoquinase (cscK) e uma permease de sacarose (cscB) são excluídas das possíveis combinações de genes de um grupo de genes de sacarose não PTS a serem introduzidos.

Particularmente, prefere-se que o ao menos um gene a

ser introduzido inclua apenas o gene codificador de *cscA*, e não inclua outros genes, a partir do ponto de vista de uma produção de ácido lático mais eficiente.

O termo "hidrolase de sacarose" (invertase, *CscA*"),
5 conforme utilizado na invenção, é um termo genérico para as enzimas classificadas com o número de enzima 3.2.1.26, de acordo com o relatório do comitê de enzimas da União Internacional de Bioquímica (U.I.B), e que catalisam uma reação de geração de D-glicose e D-frutose a partir da
10 sacarose.

Essa enzima é uma que a cepa de *Escherichia coli* de K12, ou similar, não possui naturalmente, e essa enzima é uma das enzimas da via metabólica não PTS, incluindo uma co-transportadora de prótons, uma invertase, uma
15 frutoquinase e uma repressora de sacarose específica (veja Canadian Journal of Microbiology, (1991) vol. 45, pp 418-422). Como resultado da conferência de *CscA* na invenção (especialmente a conferência de uma *CscA* única), a sacarose fora da célula é decomposta em glicose e frutose na
20 membrana celular e liberada para fora da célula, e elas são fosforiladas e incorporadas no citoplasma através da glicose PTS e da frutose PTS. Como resultado, a frutose pode ser fornecida a um sistema metabólico de frutose da bactéria, e pode ser assimilada utilizando um sistema
25 glicolítico.

Como sendo o gene da hidrolase de sacarose (invertase, *CscA*) a ser introduzido na bactéria hospedeira de acordo com a invenção, podem-se utilizar um DNA com uma sequência de base de um gene que codifica uma hidrolase de sacarose
30 (invertase, *CscA*) e que é obtido a partir de um organismo

que possua a enzima, ou uma sequência de DNA sintético baseada em uma sequência de base conhecida do gene. Os exemplos preferidos correspondentes incluem aqueles derivados de bactérias pertencentes ao gênero *Erwinia*,
5 bactérias pertencentes ao gênero *Proteus*, bactérias pertencentes ao gênero *Vibrio*, bactérias pertencentes ao gênero *Agrobacterium*, bactérias pertencentes ao gênero *Rhizobium*, bactérias pertencentes ao gênero *Staphylococcus*,
10 bactérias pertencentes ao gênero *Bifidobacterium*, e bactérias pertencentes ao gênero *Escherichia*. Os respectivos exemplos incluem um DNA com uma sequência de base de um gene derivado de uma cepa de *Escherichia coli* O157. Um DNA com uma sequência de base de um gene derivado de uma cepa de *Escherichia coli* O157 é particularmente
15 preferível. Ademais, prefere-se que a sequência de sinais para a transferência da *cscA* ao periplasma da célula bacteriana seja adicionada à *cscA*.

Como o gene da proteína repressora (*CscR*) a ser introduzido na bactéria hospedeira de acordo com a
20 invenção, podem-se utilizar um DNA com uma sequência de base de um gene que codifica uma proteína repressora (*CscR*) e que é obtido a partir de um organismo que possua a enzima, ou uma sequência sintética de DNA baseada em uma sequência de base conhecida do gene. Os exemplos preferidos
25 correspondentes incluem aqueles derivados de bactérias pertencentes ao gênero *Erwinia*, bactérias pertencentes ao gênero *Proteus*, bactérias pertencentes ao gênero *Vibrio*, bactérias pertencentes ao gênero *Agrobacterium*, bactérias pertencentes ao gênero *Rhizobium*, bactérias pertencentes ao
30 gênero *Staphylococcus*, bactérias pertencentes ao gênero

Bifidobacterium, e bactérias pertencentes ao gênero *Escherichia*. Os respectivos exemplos incluem um DNA com uma sequência de base de um gene derivado de uma cepa de *Escherichia coli* O157. Um DNA com uma sequência de base de um gene derivado de uma cepa de *Escherichia coli* O157 é particularmente preferível.

Como o gene da frutoquinase (CscK) a ser introduzido na bactéria hospedeira de acordo com a invenção, podem-se utilizar um DNA com uma sequência de base de um gene que codifica uma frutoquinase (CscK) e que é obtido a partir de um organismo que possua a enzima, ou uma sequência sintética de DNA baseada em uma sequência de base conhecida do gene. Os exemplos preferidos correspondentes incluem aqueles derivados de bactérias pertencentes ao gênero *Erwinia*, bactérias pertencentes ao gênero *Proteus*, bactérias pertencentes ao gênero *Vibrio*, bactérias pertencentes ao gênero *Agrobacterium*, bactérias pertencentes ao gênero *Rhizobium*, bactérias pertencentes ao gênero *Staphylococcus*, bactérias pertencentes ao gênero *Bifidobacterium*, e bactérias pertencentes ao gênero *Escherichia*. Os respectivos exemplos incluem um DNA com uma sequência de base de um gene derivado de uma cepa de *Escherichia coli* O157. Um DNA com uma sequência de base de um gene derivado de uma cepa de *Escherichia coli* O157 é particularmente preferível.

Como o gene da permease de sacarose (CscB) a ser introduzido na bactéria hospedeira de acordo com a invenção, podem-se utilizar um DNA com uma sequência de base de um gene que codifica uma permease de sacarose (CscB) e que é obtido a partir de um organismo que possua a

enzima, ou uma sequência sintética de DNA baseada em uma sequência de base conhecida do gene. Os exemplos preferidos correspondentes incluem aqueles derivados de bactérias pertencentes ao gênero *Erwinia*, bactérias pertencentes ao gênero *Proteus*, bactérias pertencentes ao gênero *Vibrio*, bactérias pertencentes ao gênero *Agrobacterium*, bactérias pertencentes ao gênero *Rhizobium*, bactérias pertencentes ao gênero *Staphylococcus*, bactérias pertencentes ao gênero *Bifidobacterium*, e bactérias pertencentes ao gênero *Escherichia*. Os respectivos exemplos incluem um DNA com uma sequência de base de um gene derivado de uma cepa de *Escherichia coli* O157. Um DNA com uma sequência de base de um gene derivado de uma cepa de *Escherichia coli* O157 é particularmente preferível.

O termo "assimilação de sacarose", conforme utilizado na invenção, refere-se à capacidade de incorporação direta da sacarose, ou após a conversão dessa em substâncias de pesos moleculares mais baixos, ou após a conversão dessa em uma substância de peso molecular mais alto (dentre os quais a conversão em substâncias de pesos moleculares mais baixos é preferida), ou à capacidade de conversão metabólica da sacarose em outra substância. Ademais, o termo "assimilação", conforme utilizado na invenção, inclui a decomposição que posteriormente converte a sacarose em uma substância de pesos moleculares mais baixos. Especificamente, a assimilação inclui a decomposição da sacarose em D-glicose e D-frutose.

O termo "melhoria da capacidade metabólica da frutose", conforme utilizado na invenção, refere-se ao estado no qual a incorporação da frutose na célula

bacteriana é aumentada. O sistema de melhoria da capacidade metabólica da frutose significa uma estrutura de melhoria da capacidade metabólica da frutose.

Ademais, o termo "hospedeiro", conforme utilizado na invenção, significa uma *Escherichia coli* que se torna uma *Escherichia coli* produtora de ácido lático, de acordo com a invenção, como um resultado da introdução de um ou mais genes a partir do exterior da célula bacteriana.

Cada faixa numérica descrita no presente relatório descritivo representa uma faixa que inclui os valores indicados como o valor mínimo e o valor máximo, respectivamente.

O termo "sistema de aumento de produção de ácido lático", na invenção, refere-se a uma estrutura de melhoria da capacidade de produção de ácido lático, em que a estrutura é introduzida ou alterada por meio de recombinação genética. O sistema de aumento da produção de ácido lático pode ser qualquer sistema, contanto que aumente a produção de ácido lático na *Escherichia coli* alvo, em comparação à produção original de ácido lático. Os exemplos preferidos do sistema incluem a inativação, atenuação ou melhoria da atividade enzimática envolvida na atividade de produção de ácido lático, e uma combinação desses. Esse sistema, quando combinado à atividade da *CscA*, permite que uma *Escherichia coli* que originalmente perdeu a capacidade de assimilação da sacarose possa efetivamente produzir ácido lático a partir da sacarose.

A expressão "por meio de recombinação genética", conforme utilizada na invenção, engloba qualquer modificação na sequência de bases devido à inserção de um

DNA diferente na sequência de bases de um gene inato, ou uma substituição ou eliminação de uma certa porção do gene, ou uma combinação dessas. Por exemplo, a modificação pode ser um resultado de mutação.

5 O termo "inativação", conforme utilizado na invenção, refere-se a um estado no qual a atividade da enzima de interesse ou do fator de transcrição FruR medido se encontra abaixo do limite de detecção referente ao sistema de medição dentre os sistemas de medição existentes. O
10 termo "atividade do FruR", conforme aqui utilizado, refere-se ao valor quantificado da quantidade ou função das proteínas geradas por expressão de genes controlados pelo FruR.

O termo "atenuação", na invenção, refere-se a um
15 estado no qual a atividade da enzima de interesse ou do fator de transcrição FruR é significativamente diminuída por meio de recombinação genética do gene que codifica a enzima ou o FruR, em comparação a um estado anterior à condução de um tratamento de recombinação. O termo "atividade do FruR",
20 conforme aqui utilizado, refere-se ao valor quantificado da quantidade ou função das proteínas geradas por expressão de genes controlados pelo FruR.

O sistema de aumento de produção de ácido lático, de acordo com a invenção, inclui, preferivelmente, a
25 inativação ou a atenuação da atividade da piruvato formiato liase (Pfl), o aumento da atividade da lactato desidrogenase dependente de NADH para a produção de ácido D-lático ou ácido L-lático, ou ambos, a partir do ponto de vista da redução de subprodutos e do aumento do rendimento
30 do ácido lático (a respeito da inativação ou atenuação da

atividade da lactato desidrogenase liase (Pfl), veja o WO2005/033324; a respeito do aumento da atividade lactato desidrogenase dependente de NADH, veja um documento de Yang, ET AL (Metab. Eng. Vol. 1(2), pp141-152(1999)).

5 A piruvato formiato liase (Pfl), na invenção, é uma enzima classificada no número de enzima 2.3.1.54, de acordo com o relatório do comitê de enzimas da União Internacional de Bioquímica (U.I.B), e também é denominada formiato acetil transferase. O termo "piruvato formiato liase" é um nome
10 genérico para as enzimas que catalisam, de modo reverso, uma reação de geração de ácido fórmico a partir do ácido pirúvico.

Os exemplos de lactato desidrogenase dependente de NADH, na invenção, incluem a D-lactato desidrogenase (LdhA)
15 e a L-lactato desidrogenase (Ldh2). A LdhA refere-se a uma enzima derivada de *Escherichia coli* que gera o ácido D-lático e NAD a partir de ácido pirúvico e NADH. Ldh2 refere-se a uma enzima que gera ácido L-lático e NAD a partir de ácido pirúvico e NADH, e exemplos dessa incluem
20 uma enzima derivada de *Bifidobacterium longum*.

A expressão "aumento da atividade de lactato desidrogenase", conforme utilizada na invenção, refere-se a um estado no qual a atividade da enzima produzida a partir do gene que codifica a LdhA ou a Ldh2 é aumentada
25 significativamente por meio de recombinação genética do gene que codifica a LdhA ou a Ldh2, em comparação ao estado anterior à condução do tratamento de recombinação.

O ácido lático inclui isômeros ópticos de ácido D-lático e ácido L-lático. Na invenção, um sistema que inclui
30 o aumento da atividade da D-lactato desidrogenase

dependente de NADH ou da L-lactato desidrogenase dependente de NADH, a fim de melhorar o rendimento de qualquer isômero óptico, é especialmente referido como "sistema para o aumento da produção de ácido D-lático" ou "sistema para o aumento da produção de ácido L-lático", em alguns casos. Sendo assim, o tipo de sistema de aumento de produção de ácido lático pode ser selecionado, caso apropriado, a depender do tipo de ácido lático desejado.

Particularmente, o sistema de aumento de produção de ácido D-lático pode ainda incluir a inativação ou atenuação da atividade inata da D-lactato desidrogenase (Dld) dependente de FAD da *Escherichia coli*, para fins de geração mais rápida de ácido D-lático. O sistema de aumento de produção de ácido D-lático mais preferível inclui ambas (i) inativação ou atenuação da atividade inata da D-lactato desidrogenase (Dld) dependente de FAD da *Escherichia coli* e (ii) ao menos uma (a) inativação ou atenuação da atividade da piruvato formiato liase (Pfl) ou (b) aumento da atividade da D-lactato desidrogenase dependente de NADH, e, mais preferivelmente, inclui a inativação ou atenuação da atividade da Dld, e tanto (i) a inativação ou atenuação da atividade da Pfl quanto (ii) o aumento da atividade da D-lactato desidrogenase (LdhA) dependente de NADH derivada de *Escherichia coli*.

Ademais, o sistema de aumento da produção de ácido lático pode também incluir a inativação ou a atenuação da atividade inata da L-lactato desidrogenase (LldD) dependente de FMN ou da atividade inata da D-lactato desidrogenase (LdhA) da *Escherichia coli*, preferivelmente a inativação ou atenuação simultânea da atividade da LldD e

da atividade da LdhA, para fins de geração mais rápida de ácido L-lático. É mais preferível que ao menos uma atividade dentre a atividade da PFL, a atividade da lld, ou a atividade da ldhA seja inativada ou atenuada enquanto a
5 atividade da L-lactato desidrogenase dependente de NADH é aumentada. É mais preferível que a atividade da Pfl e tanto a atividade da LldD quanto da LdhA sejam inativadas ou atenuadas enquanto a atividade da L-lactato desidrogenase dependente de NADH derivada da
10 *Bifidobacterium* é aumentada.

A L-lactato desidrogenase (LldD) dependente de FMN, na invenção, é uma enzima classificada no número de enzima 1.1.2.3, de acordo com o relatório do comitê de enzimas da União Internacional de Bioquímica (U.I.B). O termo "L-lactato desidrogenase dependente de FMN" é um nome genérico
15 para as enzimas catalisadoras de uma reação de geração de ácido pirúvico a partir de ácido L-lático.

Um exemplo da bactéria na qual a atividade da LdhA é aumentada, e a atividade da Pfl, inativada ou atenuada, na
20 invenção, é a MT-10934/pGlyldhA descrita no WO2005/033324.

Um método que inclui a integração de um gene que codifica a LdhA ou a Ldh2 em um plasmídeo de expressão para que seja ligado a um promotor de gene que controla a expressão de uma proteína envolvida em um sistema
25 glicolítico, um sistema de biossíntese de ácido nucléico, ou um sistema de biossíntese de aminoácido, e a introdução do plasmídeo de expressão na bactéria desejada, é uma medida eficaz de aumento da atividade da LdhA ou da Ldh2 na invenção. Nesse caso, o promotor de gene que controla a
30 expressão de uma proteína envolvida no sistema glicolítico,

no sistema de biossíntese de ácido nucléico, ou no sistema de biossíntese de aminoácido refere-se a um promotor forte que funciona constantemente em uma bactéria, preferencialmente na *Escherichia coli*, e que é menos suscetível à supressão da expressão, ainda que na presença de glicose. Os exemplos específicos correspondentes incluem o promotor de gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, ou o promotor de serina hidroximetiltransferase (GlyA). A bactéria assim obtida exibe uma quantidade de acumulação aumentada de ácido D-lático ou ácido L-lático, uma concentração reduzida de ácido pirúvico como uma impureza, e pode melhorar a pureza óptica do ácido D-lático ou do ácido L-lático quando produz o ácido D-lático ou o ácido L-lático sob condições aeróbicas, em comparação ao caso no qual a expressão de ldhA ou ldh2 não é aumentada.

A "D-lactato desidrogenase (Dld) dependente de FAD", na invenção, é um nome genérico para as enzimas catalisadoras de uma reação de geração de ácido pirúvico a partir de ácido D-lático em presença de flavina adenina dinucleotídeo oxidada que serve de coenzima.

Um exemplo de micro-organismo no qual a atividade da Dld é inativada ou atenuada, e/ou a atividade da Pfl é inativada ou atenuada, e/ou a atividade da LdhA é aumentada, na invenção, pode ser uma cepa de *Escherichia coli* MT-10994 (FERM BP-10058) descrita no WO2005/033324.

O promotor de gene que controla a expressão de uma proteína envolvida no sistema glicolítico, no sistema de biossíntese de ácido nucléico, ou no sistema de biossíntese de aminoácido refere-se a um promotor forte que funciona constantemente em um micro-organismo, e que é menos

suscetível à supressão da expressão, ainda que na presença de glicose. Os exemplos específicos correspondentes incluem o promotor de gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (doravante referida, às vezes, como "GAPDH") ou o promotor
5 de serina hidroximetiltransferase.

O promotor, na invenção, refere-se a um sítio no qual a RNA polimerase que possui um fator sigma se liga, e na qual a transcrição é iniciada. Por exemplo, o promotor de GAPDH derivado de *Escherichia coli* é descrito na Base de n.
10 397 a 440, na informação da sequência de bases do número de acesso X02662 do GenBank.

O micro-organismo no qual o promotor do gene que controla a expressão de uma proteína envolvida no sistema glicolítico, no sistema de biossíntese do ácido nucléico,
15 ou no sistema de biossíntese de aminoácido permite que um gene que codifica a LdhA no genoma expresse a ldhA, que a atividade da Pfl seja inativada ou atenuada, e/ou que a atividade da Dld seja inativada ou atenuada, na invenção, pode ser, por exemplo, uma cepa de *Escherichia coli* MT-
20 10994 (FERM BP-10058) descrita no WO2005/033324.

A cepa de *Escherichia coli* MT-10994 é configurada para a expressão de um gene de ldhA devido à ligação funcional do gene de ldhA ao promotor de GAPDH no genoma, e as respectivas PflB e Dld são inativadas por ruptura do gene.
25 Essa cepa encontra-se depositada desde 19 de março de 2004, com um número de depósito FERM BP-10058 no International Patent Organism Depositary (Depositário Internacional de Organismos de Patentes) do National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (Instituto Nacional de
30 Ciência e Tecnologia Industrial Avançada), situado em 6, 1-

1-1 Higashi, Tsukuba City, Ibaraki Prefecture, em conformidade com o Tratado de Budapeste sobre o Reconhecimento Internacional do Depósito de Microorganismos para fins de Procedimento de Patentes.

5 Prefere-se, a partir do ponto de vista da eficiência da produção de ácido láctico, que a bactéria produtora de ácido láctico, de acordo com a invenção, inclua, ainda, um sistema de melhoria da capacidade metabólica de frutose. Os exemplos do sistema de melhoria da capacidade metabólica de frutose incluem um sistema que aumente a capacidade de fosforilação ou da capacidade de absorção de frutose em uma via metabólica de frutose. É mais preferível, a partir do ponto de vista da eficiência da produção de ácido láctico, que o aumento da capacidade de fosforilação em uma via metabólica de frutose seja uma conferência da atividade da frutose-1-fosfato quinase, e que o aumento da capacidade de absorção de frutose derive da atenuação da atividade da FruR.

O escopo da "conferência" ou "aumento" da capacidade, na invenção, engloba a introdução de um gene que codifica uma enzima em uma bactéria de hospedeiro a partir do exterior da uma bactéria para o interior da bactéria, o aumento da atividade do promotor para um gene de enzima que a bactéria hospedeira possui em seu genoma, e a expressão forte de um gene de enzima provocada pela substituição com outro promotor.

O "aumento da capacidade de fosforilação", na invenção, refere-se a um estado no qual a atividade da enzima de fosforilação é aumentada de modo que a quantidade de substrato fosforilado ou da quantidade de um metabólito

derivado de um substrato fosforilado é significativamente aumentada.

O termo "capacidade de absorção de frutose", na invenção, refere-se a um estado no qual a atividade da
5 enzima controlada pelo FruR é significativamente diminuída por meio de recombinação genética do gene que codifica a enzima ou o FruR, em comparação a um estado anterior à condução de um tratamento de recombinação.

A atividade de uma enzima, na invenção, pode ser uma
10 atividade medida por qualquer um dos sistemas de medição existentes.

A frutose-1-fosfato quinase (FruK), na invenção, é uma enzima classificada no número de enzima 2.7.1.56, de acordo com o relatório do comitê de enzimas da União Internacional
15 de Bioquímica (U.I.B), e também é referida como "fosfofrutoquinase 1". A absorção de frutose pelas bactérias tais como a *Escherichia coli*, é geralmente suprimida na presença da glicose. Até o momento, não houve descoberta de que a expressão aumentada de FruK promova a
20 absorção de frutose ainda que na presença de glicose, e que contribua para a melhoria na eficácia da produção de ácido D-lático em uma bactéria produtora de ácido D-lático. Ademais, é inesperado que a eficiência da produção de ácido lático seja melhorada por meio do aumento da expressão de
25 fruK única, em uma série de sistemas metabólicos de frutose, subsequente à absorção de frutose gerada a partir da sacarose pela CscA na célula e de seu metabolismo em frutose-1-fosfato.

Como o gene da frutose-1-fosfato quinase (FruK) a ser
30 introduzido na bactéria hospedeira de acordo com a

invenção, podem-se utilizar um DNA com uma sequência de base de um gene que codifica uma frutose-1-fosfato quinase (FruK) e que é obtido a partir de um organismo que possua a enzima, ou uma sequência sintética de DNA baseada em uma
5 sequência de base conhecida do gene. Os exemplos preferidos desses incluem os derivados de bactérias pertencentes ao gênero *Escherichia*, bactérias pertencentes ao gênero *Pseudomonas*, bactérias pertencentes ao gênero *Aerobacter*, e bactérias pertencentes ao gênero *Clostridium*,
10 particularmente bactérias pertencentes ao gênero *Escherichia*. Os respectivos exemplos incluem um DNA com uma sequência de base de um gene derivado de uma cepa de *Escherichia coli* MG1655. Um DNA com uma sequência de base de um gene derivado de uma cepa de *Escherichia coli* MG1655
15 é particularmente preferível.

A FruR, na invenção, controla a expressão de um grupo de genes que constituem a via PTS de frutose (isto é, operação frutose), através da qual o micro-organismo fosforila a frutose e incorpora o resultante na célula.
20 No caso da *Escherichia coli*, um exemplo específico de FruR é um gene que possui a sequência de 88028 a 89032 da sequência de genoma da cepa *Escherichia coli* MG1655, que é descrita no número de acesso U00096 do GenBank. A ruptura do gene de FruR é conhecida por suprimir a atividade da
25 síntese do ácido fosfoenolpirúvico (PEP), que é um doador de fosfato para a frutose; sendo assim, é uma expectativa geral de que a ruptura de um gene de FruR resultará na falha da absorção da frutose na célula bacteriana (veja *Microbiology Reviews*, Sept., pp. 543-594 (1993)). Portanto,
30 é totalmente inesperado que a expressão atenuada de fruR

possa promover a absorção de frutose, e é uma descoberta completamente nova que a expressão atenuada de fruR contribui para uma melhora na eficácia da produção de ácido D-lático em uma bactéria produtora de ácido D-lático.

5 O gene de FruR do qual a expressão é atenuada, na invenção, não é limitada, contanto que o gene seja um gene inato de uma bactéria hospedeira, e pode ser um DNA com uma sequência de bases de um gene inato da bactéria hospedeira que codifica a FruR, ou uma sequência sintética de DNA
10 introduzida baseada em uma sequência de bases conhecida de um gene de FruR.

É mais preferível que cada uma de hidrolase de sacarose e frutose-1-fosfato quinase (FruK) seja obtida por meio da introdução de um gene que codifica a proteína
15 correspondente derivada de Escherichia coli O157 ou Escherichia coli MG1655. O uso de genes derivados de tais bactérias assegura a expressão das funções.

A "bactéria a qual foi conferida a atividade enzimática", na invenção, refere-se a uma bactéria na qual
20 a atividade enzimática foi fornecida a partir do exterior de uma bactéria para o interior de uma bactéria, por meio de um determinado método. Essa bactéria pode ser preparada, por exemplo, por meio da introdução de um gene que codifica a enzima ou a proteína a partir do exterior da
25 bactéria para o interior da bactéria, por meio da utilização de uma técnica de recombinação de genes. Os métodos, por exemplo, de preparo de um DNA genômico necessário para a introdução de um gene de fora da bactéria dentro de uma bactéria, para a clivagem e a ligação de DNA,
30 transformação, reação em cadeia da polimerase (PCR), e

desenvolvimento e síntese de oligonucleotídeos utilizados como primários, podem ser métodos usuais bem conhecidos para um técnico no assunto. Esses métodos são descritos, por exemplo, em Sambrook, J., et al., "Molecular Cloning A
5 Laboratory Manual, Second Edition", Cold Spring Harbor Laboratory Press, (1989).

A "bactéria na qual a atividade enzimática é atenuada", na invenção, refere-se a uma bactéria na qual a atividade original é deteriorada por um determinado método
10 a partir do exterior da bactéria ao interior da bactéria, semelhante à bactéria à qual a atividade enzimática foi conferida. A bactéria pode ser preparada, por exemplo, pela ruptura de um gene que codifica a enzima ou a proteína (ruptura de gene).

15 A "ruptura de gene", na invenção, refere-se à mutação da sequência de bases de um determinado gene, inserindo outro DNA na sequência de bases do gene, ou retirando uma porção do gene, a fim de evitar que a função do gene seja exercida. Como resultado da ruptura do gene, o gene não
20 pode ser transcrito em mRNA, de modo que a translação em um gene estrutural não ocorre, ou o gene é transcrito em um mRNA incompleto, de modo que a sequência de aminoácidos da proteína estrutural obtida pela translação possui mutação ou eliminação e, assim, a sua função original não pode ser
25 exercida.

O preparo de uma variante rompida por gene pode ser realizado por qualquer método, contanto que se possa obter uma variante rompida na qual a expressão da enzima ou proteína não ocorra. Foi reportada uma variedade de métodos
30 de ruptura de gene (reprodução natural, adição de

mutagênico, irradiação UV, exposição à radiação, mutação aleatória, uso de transposons (agentes de transposição), e ruptura de genes de sítio específico). A partir do ponto de vista da capacidade de ruptura de apenas um gene específico, prefere-se a ruptura de genes por recombinação homóloga. As técnicas que utilizam a recombinação homóloga são descritas em in J. Bacteriol., 161, 1219-1221 (1985) e J. Bacteriol., 177, 1511-1519 (1995) ou Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A, 97, 6640-6645 (2000). Um técnico no assunto pode facilmente realizar a ruptura do gene por tal método, ou um pedido desse.

O termo "*Escherichia coli*", de acordo com o utilizado na invenção, refere-se a uma *Escherichia coli* com a capacidade de produção de ácido lático a partir de uma matéria-prima derivada de planta por meio da utilização de certos meios, independentemente de a *Escherichia coli* possuir, intrinsecamente, a capacidade de produção de ácido lático a partir de uma matéria-prima derivada de planta.

A *Escherichia coli* na qual os genes individuais acima descritos são introduzidos pode ser uma *Escherichia coli* comum sem a capacidade de produção de ácido lático, e pode ser qualquer *Escherichia coli* que permita a introdução e a modificação dos genes individuais acima descritos. Mais preferivelmente, a *Escherichia coli* pode ser uma *Escherichia coli* a qual a capacidade produtora de ácido lático tenha sido conferida com antecedência, por meio da qual o ácido lático pode ser produzido com maior eficiência. Particularmente, o ácido lático pode ser eficientemente produzido a partir da sacarose por meio da conferência da capacidade de assimilação de sacarose a uma

Escherichia coli que não possuia intrinsecamente a capacidade de assimilação da sacarose, de acordo com a invenção. Os exemplos de *Escherichia coli* que não possuem intrinsecamente a capacidade de assimilação da sacarose 5 incluem a cepa K12, a cepa B, a cepa C, e as cepas derivadas dessas.

Os exemplos de bactéria produtora de ácido láctico incluem: uma *Escherichia coli* na qual a atividade da piruvato formiato liase (Pfl) é inativada ou atenuada e a 10 atividade da D-lactose desidrogenase (LdhA) dependente de NADH derivada de *Escherichia coli* é aumentada, que é descrita no folheto da Publicação Internacional n° 2005/033324; uma *Escherichia coli* que possui as características acima e, ainda, na qual a atividade da D- 15 lactato desidrogenase (Dld) dependente de FAD é inativada; e uma *Escherichia coli* na qual a atividade da malato desidrogenase (Mdh) é inativada ou atenuada, e na qual a atividade da Pfl é inativada ou atenuada, e/ou a atividade da Dld é inativada ou atenuada.

20 O promotor de expressão de genes individuais, na invenção, pode ser qualquer promotor que possa controlar a expressão de qualquer um dos genes acima descritos. O promotor é preferivelmente um promotor forte que funcione constantemente em um microrganismo e do qual a expressão é 25 menos suscetível de supressão, ainda que na presença de glicose. Os exemplos específicos desse incluem um promotor de gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (doravante referida, às vezes, como "GAPDH") e um promotor de serina hidroximetiltransferase.

30 Os meios de inativação de genes individuais a serem

empregados podem ser selecionados, sem limitações particulares, a partir dos meios comumente utilizados para esse fim. Os meios podem ser, por exemplo, a ruptura do gene por meio de recombinação homóloga, ou similares.

5 O método de produção de ácido lático de acordo com a invenção inclui a produção de ácido lático a partir de uma matéria-prima contendo sacarose derivada de planta, por meio da utilização da bactéria produtora de ácido lático acima descrita. Especificamente, o método inclui um
10 processo de contato da bactéria produtora de ácido lático com uma matéria-prima contendo sacarose derivada de planta, e um processo de coleta que recolhe o ácido lático obtido como resultado do contato.

A matéria-prima derivada de planta utilizada no método
15 de produção de ácido lático pode ser selecionada, sem limitações particulares, a partir de matérias-primas contendo sacarose derivadas de plantas que sejam fontes de carbono obtidas a partir de plantas. O escopo da matéria-prima derivada de planta, na invenção, engloba órgãos, tais
20 como raízes, caules, troncos, galhos, folhas, flores ou sementes, organismos vegetais, incluindo os órgãos, e os produtos de decomposição dos órgãos das plantas. Ademais, as fontes de carbono obtidas a partir de organismos vegetais, órgãos de plantas, e produtos de decomposição
25 desses, e que podem ser utilizados por micro-organismos como fontes de carbono durante o cultivo são também incluídas no escopo da matéria-prima derivada de plantas.

Os exemplos gerais de fontes de carbono inclusas na
matéria-prima derivada de planta apresentam, além da
30 sacarose: sacarídeos, tais como amido, glicose, frutose,

xilose e arabinose; madeira e produtos de decomposição herbácea contendo esses componentes em altos teores; hidrolisados de celulose contendo esses componentes de sacarídeos em altos teores; e combinações desses. Além
5 disso, a glicerina derivada de óleo vegetal, ou ácidos graxos, podem ser incluídos no escopo da fonte de carbono de acordo com a invenção.

A matéria-prima derivada de plantas, na invenção, é, preferivelmente, por exemplo, uma cultura agrícola, tal
10 como cereal, milho, arroz, trigo, soja, cana de açúcar, beterraba, algodão, ou uma combinação desses. A respectiva forma, quando utilizada como uma matéria-prima não é particularmente limitada, e pode ser um material não processado, um sumo, um material moído, ou similares.
15 Ademais, a matéria-prima derivada de plantas pode assumir uma forma que consiste em fonte(s) de carbono única(s).

O contato entre a bactéria produtora de ácido lático e a matéria-prima derivada de planta, no processo de contato, é geralmente realizado por meio da cultura da bactéria
20 produtora de ácido lático em um meio que contem a matéria-prima derivada de planta.

A densidade do contato entre a matéria-prima derivada de planta e a bactéria produtora de ácido lático pode variar dependendo a atividade da bactéria produtora de
25 ácido lático. Em geral, a concentração inicial de açúcar (em termos de concentração equivalente à glicose) como a concentração da matéria-prima derivada de planta, no meio, pode ser de 20%, em massa, ou menos, relativa ao total de massa da mistura, e a concentração inicial de açúcar é,
30 preferivelmente, de 15%, em massa, ou menos, a partir do

ponto de vista da tolerância da bactéria à glicose. Outros componentes podem adicionar quantidades usuais para a adição a um meio microbiano, e as suas quantidades não são particularmente limitadas.

5 O teor da bactéria produtora de ácido lático no meio pode variar dependendo do tipo de atividade da bactéria. Em geral, a concentração inicial bacteriana pode ser de 0,1%, em massa, a 30%, em massa, e, preferivelmente, de 1%, em massa, a 10%, em massa, referentes ao líquido da
10 cultura, a partir do ponto de vista do controle das condições de cultura.

O meio utilizado para a cultura da bactéria produtora de ácido lático não é particularmente limitado, caso o meio contenha uma fonte de carbono, uma fonte de nitrogênio, um
15 íon inorgânico, elementos-traço orgânicos, ácidos nucléicos, vitaminas, e similares, que são requisitados pelo micro-organismo para fins de produção do ácido lático.

Os exemplos de fontes de carbono utilizadas como adequadas incluem: sacarídeos, como a glicose, frutose e
20 melação; ácidos orgânicos, como o ácido fumárico, ácido cítrico e ácido succínico; alcoóis, tais como metanol, etanol e glicerol, e outras fontes de carbono. Os exemplos de fontes de nitrogênio utilizadas como adequadas incluem: fontes de nitrogênio inorgânico, tais como sais orgânicos
25 de amônio, sais de amônio inorgânicos, gás amônia e amônia aquosa; fontes de nitrogênio orgânico, como hidrolisados proteicos; e outras fontes de nitrogênio. Os exemplos de íons inorgânicos utilizados como adequados e necessários incluem os íons de magnésio, os íons de fosfato, os íons de
30 potássio, os íons de ferro, os íons de manganês, e outros

íons inorgânicos.

Os exemplos de elementos-traço orgânicos, utilizados como adequados, incluem: vitaminas; aminoácidos; extratos de levedura, peptona, processamento de milho, produtos de decomposição a caseína, e outros materiais, que incluem 5 vitaminas e aminoácidos.

O meio a ser utilizado na invenção é, preferivelmente, um meio líquido, considerando a aplicação para a produção industrial.

10 Um exemplo preferível do meio é um meio adicionado com dois ou mais aminoácidos. A utilização do meio desse tipo permite uma produção mais eficiente do ácido lático. O meio adicionado com dois ou mais aminoácidos significa um meio que inclui ao menos dois aminoácidos dentre os vários 15 aminoácidos de ocorrência natural, e o seu escopo engloba um meio que inclui uma hidrolase de um produto natural ou um extrato de produto natural, tal como um extrato de levedura, ácido casamino, peptona, soro de leite, melaços e processamento de milho. Para a obtenção de resultados 20 favoráveis, prefere-se um meio que inclua ao menos um selecionado de extrato de levedura, peptona, soro de leite, melaços, ou processamento de milho, ou uma mistura desses, com um teor de 0,5%, em massa, a 20%, em massa, e o teor é, mais preferivelmente, de 2%, em massa, a 15%, em massa. 25 Especialmente, a adição de processamento de milho produz um amplo efeito, caso esse no qual os sais, tais como o sulfato de amônia, às vezes, produz melhores resultados. O meio é, usualmente, um meio líquido.

As condições de cultura variam dependendo das 30 bactérias preparadas e do aparelho de cultura. Em geral, a

temperatura da cultura durante a mesma é, preferivelmente, de 20°C a 40°C, e mais preferivelmente, de 25°C a 35°C. O pH durante a cultura é, preferivelmente, de 4 a 9, mais preferivelmente, 6,0 a 7,2, e, mais preferivelmente, 6,5 a 6,9, por ajuste com NaOH, NH₃, ou similares. O tempo de cultura não é particularmente limitado, e é um período de tempo necessário para as bactérias crescerem suficientemente e produzirem ácido láctico.

A cultura é, geralmente, realizada utilizando um recipiente de cultivo capaz de controlar a temperatura, o pH, as condições aeróbicas e a velocidade de agito. Entretanto, a utilização de um recipiente de cultivo não é essencial na cultura, de acordo com a invenção. No caso de a cultura ser conduzida utilizando um recipiente de cultivo, se necessário, a cultura da semente pode ser realizada antecipadamente como uma pré-cultura, e uma quantidade necessária da cultura resultante pode ser inoculada em um meio em um recipiente de cultivo que foi preparado com antecedência.

A produção de ácido láctico por meio da cultura do micro-organismo obtido na invenção pode ser realizada sem a realização da aeração; entretanto, a aeração é preferivelmente realizada a fim de obter resultados mais favoráveis. Aqui, "segundo condições de aeração" não exige, necessariamente, a passagem do ar através do líquido de cultura, e o seu escopo abrange, dependendo da forma do recipiente de cultivo, uma aeração de superfície na qual uma camada de ar acima do líquido da cultura é substituída enquanto o líquido de cultura é agitado moderadamente; "segundo condições de aeração" refere-se à permissão de um

gás contendo oxigênio fluir em direção ao recipiente de cultivo.

No caso da aeração no líquido, a concentração dissolvida de oxigênio varia com a combinação de pressão
5 interna, posição da lâmina de agito, formato da lâmina de agito e velocidade de agito. Sendo assim, as condições ideais podem ser determinadas conforme segue, utilizando a eficiência da produção de ácido lático, a quantidade de ácidos orgânicos sem ser o ácido lático, ou similar, como
10 indicadores. Por exemplo, no caso em que 500 g de líquido de cultura é utilizado para o cultivo em um recipiente de cultivo relativamente pequeno como o aparelho de cultura BMJ-01, fabricado pela ABLE Corporation, os resultados favoráveis podem ser obtidos sob condições de aeração que
15 podem ser atingidas com uma taxa de aeração de 0,005 L/min a 0,5 L/min e uma velocidade de agito de 50 rpm a 500 rpm em pressão normal, mais preferivelmente com uma taxa de aeração de 0,05 L/min a 0,25 L/min e uma velocidade de agito de 100 rpm a 400 rpm em pressão normal. Essas
20 condições de aeração/agito permitem o fornecimento de oxigênio em um coeficiente K_{La} de transferência de oxigênio de 1/h a 400/h, relativo à água a uma temperatura de 30°C, com pressão normal.

As condições de aeração acima descritas não necessitam
25 de implementação todo o tempo, do início ao fim da cultura, e os resultados favoráveis podem ser também obtidos por meio da implementação de condições de aeração para uma parte da duração do processo de cultura.

No processo de coleta, o ácido lático obtido como
30 resultado do contato é coletado. O processo de coleta é

usualmente realizado por meio da coleta de ácido láctico a partir do produto de cultura obtido por meio do cultivo.

O produto de cultura, na invenção, refere-se às células bacterianas e a um líquido de cultura, produzidos
5 pelo método acima descrito, e por seus produtos processados.

O método de coleta de ácido láctico a partir do produto de cultura pode ser um método comumente conhecido, no caso de coleta, por exemplo, a partir de um líquido de cultura.
10 Os exemplos de métodos, que podem ser empregados, incluem: um método de remoção de células bacterianas por meio de centrifugação, ou similar, e, depois, a acidificação do resultante, e, então, a submissão do resultante à destilação direta; um método de formação e destilação do
15 lactídeo; um método de adição de um álcool e um catalisador para provocar a esterificação, e, então, a destilação do resultante; um método de extração em um solvente orgânico; um método de separação utilizando uma coluna de troca de
20 íons; um método de concentração e separação por eletrodialise; e combinações desses. Adicionalmente, uma vez que a célula bacteriana produzida pelo método de acordo com a invenção produz um grupo de enzimas adequadas para a produção de ácido láctico, a produção de ácido láctico que utiliza a célula bacteriana e a coleta de ácido láctico
25 produzido é também referida como uma modalidade do método de coleta de ácido láctico a partir do produto de cultura.

EXEMPLOS

Os exemplos da invenção encontram-se descritos. Entretanto, os exemplos não devem ser interpretados como
30 limitação da invenção. Salvo indicação em contrário, "%" e

"parte(s)" são com base na massa.

[Exemplo 1]

<Preparação de uma variante de *Escherichia coli* MG1655 eliminada por gene de *dld*>

5 A sequência completa de bases do DNA genômico da *Escherichia coli* é conhecida (número de acesso do GenBank: U00096), e a sequência de bases de um gene que codifica a D-lactato desidrogenase dependente de FAD da *Escherichia coli* (doravante referida, às vezes, como "dld") foi também
10 relatada (Número de acesso do GenBank: M10038).

Com base nas informações de genes das regiões do DNA genômico da cepa de *Escherichia coli* MG1655 adjacente ao gene da *dld*, quatro tipos de oligonucleotídeos iniciadores, CAACACCAAGCTTTTCGCG (SEQ ID NO: 1), TTCCACTCCTTGTGGTGGC (SEQ
15 ID NO: 2), AACTGCAGAAATTACGGATGGCAGAG (SEQ ID NO: 3), e TGTCTAGAAAGTTCTTTGAC (SEQ ID NO: 4), foram sintetizados.

Um DNA genômico da cepa de *Escherichia coli* MG1655 foi preparado de acordo com o método descrito em *Current Protocols in Molecular Biology* (John Wiley & Sons). A PCR
20 foi conduzida segundo condições usuais utilizando o DNA genômico como um padrão e utilizando os iniciadores de SEQ ID NO: 1 e SEQ ID NO: 2, como um resultado do qual um fragmento de DNA de cerca de 1,4 kbp (doravante referido, às vezes, como "fragmento *dld*-L") foi amplificado. A PCR
25 foi conduzida segundo condições usuais utilizando o DNA genômico como um padrão e utilizando os iniciadores de SEQ ID NO: 3 e SEQ ID NO: 4, como um resultado do qual um fragmento de DNA de cerca de 1,2 kbp (doravante referido, às vezes, como "fragmento *dld*-R") foi amplificado. O
30 fragmento *dld*-L resultante foi digerido com enzimas de

restrição *Hind*III e *Pst*I, e o fragmento dld-R resultante foi digerido com enzimas de restrição *Pst*I e *Xba*I. Esses fragmentos digeridos foram misturados com um fragmento que havia sido obtido por meio da digestão de um plasmídeo

5 pTH18cs1 sensível à temperatura (Hashimoto-Gotoh, T., et al., *Gene*, Vol. 241(1), pp 185-191 (2000)) com *Hind*III e *Xba*I, e os fragmentos foram ligados utilizando uma ligase. Posteriormente, a célula DH5a competente (DNA-903, Toyobo Co., Ltd.) foi transformada com o produto de ligação, e foi

10 obtido um transformante crescido sobre uma placa de LB ágar que contém 10 µg/mL de cloranfenicol a 30°C. A colônia resultante foi cultivada durante a noite a 30°C, em um meio líquido de LB contendo 10 µg/mL de cloranfenicol. Então, o plasmídeo foi recuperado a partir das células bacterianas

15 resultantes. O plasmídeo obtido foi denominado "pTHΔdld".

Ademais, a cepa de *Escherichia coli* MG1655 encontra-se disponível a partir da *American Type Culture Collection* (ATCC - Coleção de Cultura de Tipos Americana), que é um banco para células, micro-organismos e genes.

20 [Exemplo 2]

A cepa de MG1655 foi transformada com o plasmídeo pTHΔdld, obtido no Exemplo 1, a 30°C, e foi obtido um transformante crescido sobre uma placa de LB ágar que contém 10 µg/mL de cloranfenicol. O transformante

25 resultante foi aplicado sobre a placa de ágar, e cultivado, durante a noite, a 30°C. Em seguida, a fim de obter células bacterianas desse, o transformante cultivado foi aplicado sobre uma placa de ágar contendo 10 µg/mL de cloranfenicol, como resultado do qual se obteve uma colônia crescida a

30 42°C.

Ademais, a operação de obtenção de colônias únicas crescidas a 42°C foi novamente repetida, selecionando, dessa maneira, um clone em que o plasmídeo inteiro foi integrado no cromossomo por meio de recombinação homóloga.

5 Confirmou-se que o clone não continha o plasmídeo no citoplasma.

Em seguida, o clone acima mencionado foi aplicado na placa de LB ágar, cultivado, durante a noite, a 30°C, inoculado em um meio líquido de LB (3 ml/ tubo de ensaio),
10 e, depois, cultivado com agitação a 42°C por um período de 3 a 4 horas. Esse foi aproximadamente diluído (cerca de 10^{-2} vezes a 10^{-6} vezes), a fim de se obterem colônias únicas, e o líquido diluído foi aplicado sobre a placa de LB ágar, e cultivado, durante a noite, a 42°C, como
15 resultado do qual foram obtidas colônias. A partir das colônias que apareceram, 100 colônias foram escolhidas aleatoriamente, e lhes foram permitidas o crescimento sobre uma placa de LB ágar, e sobre uma placa de LB ágar contendo 10 µg/ml de cloranfenicol. Foram selecionados os clones
20 sensíveis ao cloranfenicol que cresceram apenas sobre a placa de LB ágar. Além disso, um fragmento de cerca de 2,0 kb contendo dld foi amplificado pela PCR que utilizando o DNA cromossômico de cada um desses clones-alvo, e selecionou-se uma variante na qual a região do gene da dld
25 foi eliminada. O clone que passou pelas seleções acima foi considerado como uma variante eliminada por dld, e a variante resultante foi denominada "variante MG1655Δdld"

[Exemplo 3]

<Preparação de uma variante de *Escherichia coli* MG1655
30 eliminada por genes de dld e pflB>

A sequência completa de bases do DNA genômico da *Escherichia coli* é conhecida (número de acesso do GenBank: U00096), e a sequência de bases de um gene que codifica a piruvato formiato liase de *Escherichia coli* (pflB) foi também relatada (Número de acesso do GenBank: X08035).

A fim de que as regiões do clone adjacentes à sequência de bases do gene de pflB, quatro tipos de oligonucleotídeos iniciadores, GCACGAAAGCTTTGATTACG (SEQ ID NO: 5), TTATTGCATGCTTAGATTTGACTGAAATCG (SEQ ID NO: 6), TTATTGCATGCTTATTTACTGCGTACTTCG (SEQ ID NO: 7), e AAGGCCTACGAAAAGCTGCAG (SEQ ID NO: 8), foram sintetizados.

A PCR foi conduzida segundo condições usuais utilizando o DNA genômico de cepa de *Escherichia coli* MG1655 como um padrão e utilizando os iniciadores de SEQ ID NO: 5 e SEQ ID NO: 6, como um resultado no qual um fragmento de DNA de cerca de 1,8 kbp (doravante referido, às vezes, como "fragmento pflB-L") foi amplificado. A PCR foi conduzida segundo condições usuais utilizando o DNA genômico de cepa de *Escherichia coli* MG1655 como um padrão e utilizando os iniciadores de SEQ ID NO: 7 e SEQ ID NO: 8, como um resultado no qual um fragmento de DNA de cerca de 1,3 kbp (doravante referido, às vezes, como "fragmento pflB-L") foi amplificado. Esses fragmentos de DNA foram separados por eletroferose em gel de agarose e recuperados, e o fragmento da pflB-L foi digerido com *Hind*III e *Sph*I, e o fragmento da pflB-L foi digerido com *Sph*I e *Pst*I, respectivamente. Esses dois tipos de fragmentos digeridos, e um produto obtido por meio da digestão de um plasmídeo pTH18cs1 sensível à temperatura (número de acesso do GenBank: AB019610) com *Hind*III e *Pst*I foram permitidos

reagir na presença da T4 DNA ligase. Posteriormente, a célula DH5 α competente de *Escherichia coli* (DNA-903, Toyobo Co., Ltd.) foi transformada com o produto de ligação, como resultado de um plasmídeo que contém dois fragmentos -
5 fragmento adjacente à montante e o fragmento adjacente à jusante 3' - do gene de pfl B foi obtido e denominado "pTH Δ pfl".

A variante MG1655 Δ dld, obtida no Exemplo 2, foi transformada com o plasmídeo resultante pTH Δ pfl, e um
10 transformante crescido a 30°C sobre uma placa de LB ágar que contém 10 μ g/mL de cloranfenicol foi obtido. O transformante resultante foi aplicado sobre a placa de ágar, e cultivado, durante a noite, a 30°C. Em seguida, a fim de obter células bacterianas cultivadas desse, o
15 transformante cultivado foi aplicado sobre uma placa de ágar contendo 10 μ g/mL de cloranfenicol, como resultado do qual se obteve colônias crescidas a 42°C.

A variante MG1655 Δ dld rompida pelo gene de pfl foi obtida a partir do clone resultante de acordo com um método
20 semelhante ao empregado no Exemplo 2, e foi denominada "variante MG1655 Δ pfl Δ dld".

[Exemplo 4]

<Preparação de uma variante MG1655 Δ pfl Δ dld Δ mdh de *Escherichia coli* MG1655>

25 A sequência completa de bases do DNA genômico da *Escherichia coli* é conhecida (número de acesso do GenBank: U00096), e a sequência de bases de um gene de mdh de *Escherichia coli* também foi relatada (Número de acesso do GenBank: M24777). A fim de clonar regiões adjacentes à
30 sequência de bases do gene de mdh (939 bp), quatro tipos de

oligonucleotídeos iniciadores,
AAAGGTACCAGAATACCTTCTGCTTTGCC (SEQ ID NO: 9),
AAAGGATCCCCTAAACTCCTTATTATATTG (SEQ ID NO: 10),
AAAGGATCCAAACCGGAGCACAGACTCCGG (SEQ ID NO: 11), e
5 AAATCTAGAATCAGATCATCGTCGCCTTAC (SEQ ID NO: 12), foram
sintetizados.

A PCR foi conduzida segundo condições usuais utilizando o DNA genômico de cepa de *Escherichia coli* MG1655 como um padrão e utilizando uma combinação de
10 iniciadores de SEQ ID NO: 9 e SEQ ID NO: 10, como um resultado no qual um fragmento de DNA de cerca de 800 bp (doravante referido, às vezes, como "fragmento mdh-L") foi amplificado. A PCR foi conduzida segundo condições usuais utilizando o DNA genômico de cepa de *Escherichia coli*
15 MG1655 como um padrão e utilizando uma combinação de iniciadores de SEQ ID NO: 11 e SEQ ID NO: 12, como um resultado no qual um fragmento de DNA de cerca de 1000 bp (doravante referido, às vezes, como "fragmento mdh-R") foi amplificado. Esses fragmentos de DNA foram separados por
20 meio de eletroferose em gel de agarose e recuperados. O fragmento mdh-L foi digerido com *KpnI* e *BamHI*, e o fragmento mdh-R foi digerido com *BamHI* e *XbaI*. Esses dois tipos de fragmentos digeridos, e um produto obtido por meio da digestão de um plasmídeo pTH18cs1 sensível à temperatura
25 (número de acesso do GenBank: AB019610) com *KpnI* e *XbaI* foram permitidos reagir na presença da T4 DNA ligase. Posteriormente, a célula DH5a competente de *Escherichia coli* (DNA-903, Toyobo Co., Ltd.) foi transformada com o produto de ligação, como resultado do qual um plasmídeo que
30 contém dois fragmentos – fragmento adjacente à montante 5'

e o fragmento adjacente à jusante 3'- do gene que codifica a mdh foi obtido, e o plasmídeo obtido foi denominado "pTHΔmdh".

A variante MG1655ΔpflΔdld de *Escherichia coli* obtida no Exemplo 3 foi transformada com o plasmídeo pTHΔmdh, e uma variante MG1655ΔpflΔdld rompida por gene de mdh foi preparada de acordo com um método semelhante ao empregado no Exemplo 2. Essa variante foi denominada "variante MG1655ΔpflΔdldΔmdh".

10 [Exemplo 5]

<Preparação de uma variante MG1655ΔpflΔdldΔmdhΔasp de *Escherichia coli* MG1655 >

A sequência completa de bases do DNA genômico da *Escherichia coli* é conhecida (número de acesso do GenBank: U00096), e a sequência de bases de um gene aspA de uma *Escherichia coli* foi também relatada (Número de acesso do GenBank: X04066). A fim de clonar as regiões adjacentes à sequência de bases do gene aspA (1.482 bp), quatro tipos de iniciador de oligonucleotídeos,

20 TTTTGAGCTCGATCAGGATTGCGTTGGTGG (SEQ ID NO: 13),
CGAACAGTAATCGTACAGGG (SEQ ID NO: 14),
TACGATTACTGTTCGGCATCGACCGAATACCCGAG (SEQ ID NO: 15), and
TTTTTCTAGACCTGGCAGCCTCTCTTCTC (SEQ ID NO: 16), foram sintetizados.

25 A PCR foi conduzida segundo condições usuais utilizando o DNA genômico de cepa de *Escherichia coli* MG1655 como um padrão e utilizando uma combinação de iniciadores de SEQ ID NO: 13 e SEQ ID NO: 14, como um resultado no qual um fragmento de DNA de cerca de 910 bp

30 (doravante referido, às vezes, como "fragmento aspA-L") foi

amplificado. A PCR foi conduzida segundo condições usuais utilizando o DNA genômico de cepa de *Escherichia coli* MG1655 como um padrão e utilizando uma combinação de iniciadores de SEQ ID NO: 15 e SEQ ID NO: 16, PCR, como um
5 resultado do qual um fragmento de DNA de cerca de 1.100 bp (doravante referido, às vezes, como "fragmento aspA-L") foi amplificado. Esses fragmentos de DNA foram separados por meio de eletroferose em gel de agarose e recuperados. Tanto o fragmento de aspA-L quando o fragmento de aspA-R
10 foram bloqueados terminalmente com o *DNA Blunting Kit* (Kit the Bloqueamento de DNA) (Takara Bio Inc.), e, então, os terminais 5' desses foram fosforilados por meio da utilização de T4 polinucleotídeo quinase, de acordo com um método convencional. Separadamente, o plasmídeo pTH18cs1
15 sensível à temperatura foi digerido com *SmaI*, e, então, submetido a um tratamento de desfosforilação utilizando uma fosfatase alcalina. Os dois tipos de fragmento fosforilado e de plasmídeo desfosforilado foram permitidos reagir na presença de T4 DNA ligase. Posteriormente, a célula DH5 α
20 competente de *Escherichia coli* (DNA-903, Toyobo Co., Ltd.) foi transformada com o produto de ligação, como resultado do qual um plasmídeo que contém dois fragmentos – fragmento adjacente à montante 5' e o fragmento adjacente à jusante 3' – do gene de aspA foi obtido. Esse plasmídeo foi
25 denominado "pTH Δ asp".

A variante MG1655 Δ pfl Δ dld Δ mdh de *Escherichia coli* obtida no Exemplo 4 foi transformada com o plasmídeo pTH Δ asp, e uma variante MG1655 Δ pfl Δ dld Δ mdh rompida por gene de aspA foi obtida, a qual foi denominada "variante
30 MG1655 Δ pfl Δ dld Δ mdh". O método específico de obtenção dessa

variante foi semelhante ao método descrito no Exemplo 2 de acordo com a invenção.

[Exemplo 6]

<Substituição do promotor de GAPDH para o promotor de ldhA ou genoma da variante MG1655 Δ pfl Δ dld Δ mdh Δ asp de *Escherichia coli*>

A sequência de bases de um gene de ldhA da *Escherichia coli* já foi também relatada (Número de acesso do GenBank: U36928). A fim de obter um promotor de gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), foi realizada a amplificação por um método de PCR utilizando o DNA genômico da cepa de *Escherichia coli* MG1655 como um padrão e utilizando AACGAATTCTCGCAATGATTGACACGATTC (SEQ ID NO: 17) and ACAGAATTCGCTATTTGTTAGTGAATAAAAGG (SEQ ID NO: 18). O fragmento de DNA resultante foi digerido com uma enzima de restrição *EcoRI*, fornecendo, dessa forma, um fragmento de cerca de 100 bp que codificou o promotor de GAPDH. A fim de obter um promotor de D-lactato desidrogenase (ldhA), foi realizada a amplificação por um método de PCR utilizando o DNA genômico da cepa de *Escherichia coli* MG1655 como um padrão e utilizando GGAATTCGGAGAAAGTCTTATGAAACT (SEQ ID NO: 19) e CCCAAGCTTTTAAACCAGTTCGTTTCGGGC (SEQ ID NO: 20). O fragmento de DNA resultante foi digerido com enzimas de restrição *EcoRI* e *HindIII*, fornecendo, dessa forma, um fragmento de gene de D-lactato desidrogenase (ldhA) de cerca de 1,0 kbp. Os dois fragmentos de DNA acima foram misturados com um fragmento obtido por meio da digestão de um plasmídeo pUC18 com enzimas de restrição *EcoRI* e *HindIII*, e os fragmentos misturados foram ligados utilizando uma ligase. Posteriormente, a célula DH5 α

competente (DNA-903, Toyobo Co., Ltd.) da *Escherichia coli* foi transformada com o produto de ligação, e foi obtido um transformante crescido sobre uma placa de LB ágar que contém 50 µg/mL de ampicilina. A colônia resultante foi cultivada com um meio líquido de LB contendo 50 µg/mL de ampicilina, durante a noite, a 30°C, e um plasmídeo pGAP-ldhA foi recuperado a partir das células bacterianas resultantes.

A PCR foi realizada utilizando o DNA genômico de *Escherichia coli* como um padrão e utilizando AAGGTACCACCAGAGCGTTCTCAAGC (SEQ ID NO: 21) e GCTCTAGATTCTCCAGTGATGTTGAATCAC (SEQ ID NO: 22), que foram preparados com base nas informações do gene de uma região adjacente 5' do gene de ldhA da cepa de *Escherichia coli* MG1655, amplificando, dessa maneira, um fragmento de DNA de cerca de 1000 bp.

Ademais, uma PCR foi realizada utilizando o plasmídeo pGAPldhA preparado acima como um padrão e utilizando GGTCTAGAGCAATGATTCACACGATTCG (SEQ ID NO: 23) preparada com base nas informações da sequência de um promotor de gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) de cepa de *Escherichia coli* MG1655, e AACTGCAGGTTTCGTTCTCATAACGTTCC (SEQ ID NO: 24) preparada com base nas informações de sequência do gene de ldhA de cepa de *Escherichia coli* MG1655, como um resultado do qual foi obtido um fragmento de DNA de cerca de 850 bp que continha o promotor de GAPDH e uma região do gene de ldhA no, ou entorno do, códon.

Os fragmentos acima obtidos foram digeridos com enzimas de restrição KpnI e XbaI, e XbaI e PstI, respectivamente. Os fragmentos resultantes foram

misturados com um fragmento obtido por meio da digestão de um plasmídeo pTH18cs1 com *KpnI* e *PstI*, e os fragmentos misturados foram ligados utilizando uma ligase. Posteriormente, a célula DH5a competente (DNA-903, Toyobo Co., Ltd.) foi transformada com o produto de ligação, a 30°C, e obteve-se um transformante crescido sobre uma placa de LB ágar contendo 10 µg/mL de cloranfenicol. A colônia resultante foi cultivada em um meio líquido de LB contendo 10 µg/mL de cloranfenicol, durante a noite, a 30°C. Então, o plasmídeo foi recuperado a partir das células bacterianas resultantes, e foi denominado "pTH-GAPldhA".

A variante $\Delta pfl\Delta dld\Delta mdh\Delta asp$ da *Escherichia coli* MG1655 obtida no Exemplo 5 foi transformada com o plasmídeo resultante pTH-GAPldhA, e cultivada sobre uma placa de LB ágar contendo 10 µg/mL de cloranfenicol, durante a noite, a 30°C, como resultado do qual foi obtido um transformante. O transformante resultante foi inoculado em um meio líquido de LB contendo 10 µg/mL de cloranfenicol, e cultivado durante a noite, a 30°C. Em seguida, a fim de obter células bacterianas desse, o transformante cultivado foi aplicado sobre uma placa de ágar contendo 10 µg/mL de cloranfenicol, como resultado do qual se obteve uma colônia crescida a 42°C. A colônia resultante foi cultivada em um meio líquido de LB sem o cloranfenicol, durante a noite, a 30°C, e ainda aplicada sobre uma placa de LB ágar sem cloranfenicol, como resultado do qual uma colônia crescida a 42°C foi obtida.

A partir das colônias que apareceram, 100 colônias foram escolhidas aleatoriamente, e cada uma foi cultivada sobre uma placa de LB ágar sem cloranfenicol, e sobre uma placa de LB ágar contendo 10 µg/ml de cloranfenicol, e

clones sensíveis ao cloranfenicol foram selecionados. Além disso, um fragmento de cerca de 800 bp contendo o promotor de GAPDH e o gene de *ldhA* foi amplificado pela PCR utilizando o DNA cromossômico de cada um desses clones-alvo, e uma variante, na qual a região promotora de *ldhA* foi substituída pelo promotor de GAPDH, foi selecionada. O clone que passou pelas seleções acima foi denominado "variante inserida no genoma MG1655 Δ pfl Δ dld Δ mdh Δ asp/GAPldhA".

10 [Exemplo 7]

<Preparação de uma variante de *Escherichia coli* MG1655 inserida no genoma MG1655 Δ pfl Δ dld Δ mdh Δ asp Δ fruR/GAPldhA >

A sequência completa de bases do DNA genômico da *Escherichia coli* é conhecida (número de acesso do GenBank: U00096), e a sequência de bases de um gene de fruR de uma *Escherichia coli* foi também relatada. Ou seja, o gene da fruR é descrito entre as sequências 88028 e 89032 da sequência de genoma da cepa da *Escherichia coli* MG1655 descrita no número de acesso U00096 do GenBank.

20 A fim de clonar as regiões adjacentes à sequência de bases do gene fruR (1005 bp), quatro tipos de iniciador de oligonucleotídeos, TACTGCAGATCTCAATAACCGCTATCTGG (SEQ ID NO: 25), GCTCTAGATAGCCATTGTACTGGTATGG (SEQ ID NO: 26), TATCTAGATGCTCAGCCGTAGCTAAGC (SEQ ID NO: 27), e
25 CGAATTCATCCATCTGACATTCGCTGG (SEQ ID NO: 28), foram sintetizados.

A PCR foi conduzida segundo condições usuais utilizando o DNA genômico de cepa de *Escherichia coli* MG1655 como um padrão e utilizando uma combinação de
30 iniciadores de SEQ ID NO: 25 e SEQ ID NO: 26, como um

resultado do qual um fragmento de DNA de cerca de 950 bp (doravante referido, às vezes, como "fragmento fruR-L") foi amplificado. A PCR foi conduzida segundo condições usuais utilizando o DNA genômico de cepa de *Escherichia coli* MG1655 como um padrão e utilizando uma combinação de iniciadores de SEQ ID NO: 27 e SEQ ID NO: 28, como um resultado do qual um fragmento de DNA de cerca de 880 bp (doravante referido, às vezes, como "fragmento fruR-R") foi amplificado. Esses fragmentos de DNA foram separados por meio de eletroferose em gel de agarose e recuperados. O fragmento fruR-L foi digerido com *Pst*I e *Xba*I, e o fragmento fruR-R foi digerido com *Xba*I e *Eco*RI. Esses dois tipos de fragmentos digeridos, e um produto obtido por meio da digestão de um plasmídeo pTH18cs1 sensível à temperatura (número de acesso do GenBank: AB019610) com *Pst*I e *Eco*RI foram permitidos reagir na presença da T4 DNA ligase. Posteriormente, a célula DH5 α competente de *Escherichia coli* (DNA-903, Toyobo Co., Ltd.) foi transformada com o produto de ligação, como resultado do qual um plasmídeo que contém dois fragmentos – fragmento adjacente à montante 5' e o fragmento adjacente à jusante 3' do gene de fruR – foi obtido. Esse plasmídeo foi denominado "pTH Δ fruR".

A variante de *Escherichia coli* MG1655 inserida no genoma MG1655 Δ pfl Δ dld Δ mdh Δ asp/GAPldhA obtida no Exemplo 6 foi transformada com um plasmídeo pTH Δ fruR, e uma variante inserida no genoma MG1655 Δ pfl Δ dld Δ mdh Δ asp/GAPldhA rompida pelo gene de fruR foi preparada de maneira semelhante ao Exemplo 2. Essa variante foi denominada "variante inserida no genoma MG1655 Δ pfl Δ dld Δ mdh Δ asp Δ fruR/GAPldhA".

30 [Exemplo 8]

<Construção de vetor de expressão de gene de hidrolase da sacarose (invertase) derivado de *Escherichia coli* O157 e transformante com o vetor de expressão>

A sequência de aminoácidos da invertase da *Escherichia coli* O157 e a sequência de bases do gene dessa já foram
5 relatadas. Ou seja, o gene que codifica a invertase (cscA) é descrito entre 3274383 e 3275816 da sequência de genoma da cepa de *Escherichia coli* O157 descrita no número de acesso AE005174 do GenBank. Em um lado do terminal-N da
10 proteína codificada pelo gene, há uma sequência correspondente à sequência de aminoácidos representada por MTQSRLHAA (SEQ ID NO: 35) em um código de aminoácido de única letra, que possui alta hidrofobicidade, e que é clivada pela sinal-peptase. A sequência do promotor de
15 gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase derivada de *Escherichia coli* (doravante referida, às vezes, como GAPDH), que é descrita em 397-440 nas informações de sequência de bases de número de acesso do GenBank X02662, pode ser utilizada como a sequência de base de um promotor
20 necessário para a expressão do gene.

A fim de obter um promotor de GAPDH, foi realizada a amplificação por um método de PCR utilizando o DNA genômico da cepa de *Escherichia coli* MG1655 como um padrão e utilizando CGAGCTACATATGCAATGATTGACACGATTCCG (SEQ ID NO:
25 29) e TCTAGAGCTATTTGTTAGTGAATAAAAGG (SEQ ID NO: 30). O fragmento de DNA resultante foi digerido com uma enzima de restrição *NdeI*, fornecendo, dessa forma, um fragmento de cerca de 110 bp correspondente ao promotor de GAPDH. O fragmento de DNA resultante foi misturado com um fragmento
30 obtido por meio da digestão de um plasmídeo pBR322 (número

de acesso J01749 do GenBank) com enzimas de restrição *NdeI* e *PvuII*, e os fragmentos misturados foram ligados utilizando uma ligase. Posteriormente, a célula DH5 α competente (DNA-903, Toyobo Co., Ltd.) da *Escherichia coli* foi transformada com o produto de ligação, e foi obtido um transformante crescido sobre uma placa de LB ágar contendo 50 $\mu\text{g/mL}$ de ampicilina. A colônia resultante foi cultivada em um meio líquido de LB contendo 50 $\mu\text{g/mL}$ de ampicilina, durante a noite, a 37°C, e um plasmídeo pBRgapP foi recuperado a partir das células bacterianas resultantes.

A fim de obter um gene da invertase, foi realizada uma amplificação por um método de PCT utilizando o DNA genômico (SIGMA-ALDRICH: IRMM449) de *Escherichia coli* O157 como um padrão, e utilizando GATCTAGACGGAGAAAGTCTTATGACGCAATCTCGATTGCATG (SEQ ID NO: 31) e ATGGTACCTTAACCCAGTTGCCAGAGTGC (SEQ ID NO: 32). O fragmento de DNA resultante foi digerido com uma enzima de restrição *XbaI*, fornecendo, dessa forma, um fragmento de gene de invertase de cerca de 1,4 kbp. O fragmento de DNA resultante foi misturado com um fragmento obtido por meio da digestão de um plasmídeo pBRgapP, preparado acima com as enzimas de restrição *XbaI* e *PshAI*, e os fragmentos misturados foram ligados utilizando uma ligase. Posteriormente, a célula DH5 α competente (DNA-903, Toyobo Co., Ltd.) da *Escherichia coli* foi transformada com o produto de ligação, e foi obtido um transformante crescido sobre uma placa de LB ágar contendo 50 $\mu\text{g/mL}$ de ampicilina. A colônia resultante foi cultivada com um meio líquido de LB contendo 50 $\mu\text{g/mL}$ de ampicilina, durante a noite, a

37°C, e um plasmídeo pGAP- cscA foi recuperado a partir das células bacterianas resultantes.

Uma célula competente de variante inserida no genoma MG1655ΔpflΔdldΔmdhΔaspΔfruR/GAPldhA preparada no Exemplo 7
5 foi transformada com o plasmídeo pGAP-cscA, e o transformante resultante foi cultivado em uma placa de LB ágar / caldo de Miller (*Miller's LB Broth agar plate*) contendo 50 µg/mL de ampicilina, durante a noite, a 37°C, como resultado do qual foi obtida uma variante inserida no
10 genoma MG1655ΔpflΔdldΔmdhΔaspΔfruR/GAPldhA/ variante pGAP-cscA.

Ademais, uma célula competente de variante inserida no genoma MG1655ΔpflΔdldΔmdhΔasp/GAPldhA preparada no Exemplo 6 foi transformada com o plasmídeo pGAP-cscA, e o
15 transformante resultante foi cultivado em uma placa de LB ágar / caldo de Miller (*Miller's LB Broth agar plate*) contendo 50 µg/mL de ampicilina, durante a noite, a 37°C, como resultado do qual foi obtida uma variante inserida no genoma MG1655ΔpflΔdldΔmdhΔaspΔfruR/GAPldhA/ variante pGAP-
20 cscA.

[Exemplo 9]

<Construção de vetor de expressão de gene de invertase derivado de *Escherichia coli* O157 e gene de frutose-1-fosfato quinase derivado de *Escherichia coli* MG1655, e
25 transformante com o vetor de expressão>

A sequência de aminoácidos da frutose-1-fosfato quinase da *Escherichia coli* MG1655, e a sequência de bases do gene dessa já foram relatadas. Ou seja, o gene que codifica a frutose-1-fosfato quinase (fruK) é descrito
30 entre as sequências 2260387 e 2259449 da sequência de

genoma da cepa da *Escherichia coli* MG1655 descrita no número de acesso U00096 do GenBank.

A fim de obter um promotor de gene da frutose-1-fosfato quinase, foi realizada a amplificação por um método de PCR utilizando o DNA genômico da *Escherichia coli* MG1655 como um padrão e utilizando ATGGTACCGGAGAAAGTCTTATGAGCAGACGTGTTGCTAC (SEQ ID NO: 33) e TCGGATCCTTATGCCTCTCCTGCTGTCAG (SEQ ID NO: 34). O fragmento de DNA resultante foi digerido com uma enzima de restrição *KpnI*, fornecendo, dessa forma, um fragmento de gene de frutose-1-fosfato quinase de cerca de 1,0 kbp. O fragmento de DNA resultante foi misturado com um fragmento obtido por meio da digestão de um plasmídeo pGAP-cscA construído no Exemplo 8 com as enzimas de restrição *KpnI* e *EcoRV*, e os fragmentos misturados foram ligados utilizando uma ligase. Posteriormente, a célula DH5 α competente (DNA-903, Toyobo Co., Ltd.) da *Escherichia coli* foi transformada com o produto de ligação, e foi obtido um transformante crescido sobre uma placa de LB ágar contendo 50 μ g/mL de ampicilina. A colônia resultante foi cultivada em um meio líquido de LB contendo 50 μ g/mL de ampicilina, durante a noite, a 37°C, e um plasmídeo pGAP-cscA-fruK foi recuperado a partir das células bacterianas resultantes.

Uma célula competente de variante inserida no genoma of MG1655 Δ pfl Δ dld Δ mdh Δ asp/GAPldhA preparada no Exemplo 6 foi transformada com o plasmídeo pGAP-cscA-fruK, e o transformante resultante foi cultivado em uma placa de LB ágar / caldo de Miller (*Miller's LB Broth agar plate*) contendo 50 μ g/mL de ampicilina, durante a noite, a 37°C, como resultado do qual foi obtida uma variante inserida no

genoma MG1655 Δ pfl Δ dld Δ mdh Δ asp/GAPldhA / variante pGAP-cscA-fruK.

[Exemplo 10]

<Produção de ácido D-lático pela variante inserida no

5 genoma MG1655 Δ pfl Δ dld Δ mdh Δ asp Δ fruR/GAPldhA/ variante pGAP-cscA, variante inserida no genoma MG1655 Δ pfl Δ dld Δ mdh Δ asp/GAPldhA/ variante pGAP-cscA-fruK, variante inserida no genoma MG1655 Δ pfl Δ dld Δ mdh Δ asp/GAPldhA/ variante pGAP-cscA>

10 A variante inserida no genoma MG1655 Δ pfl Δ dld Δ mdh Δ asp Δ fruR/GAPldhA/ variante pGAP-cscA (doravante referida, às vezes, como "variante rompida por fruR" ou "variante Δ fruR") obtida no Exemplo 8, variante inserida no genoma MG1655 Δ pfl Δ dld Δ mdh Δ asp/GAPldhA /
15 variante pGAP-cscA (doravante referida, às vezes, como "variante cscA"), e a variante inserida no genoma MG1655 Δ pfl Δ dld Δ mdh Δ asp/GAPldhA / variante pGAP-cscA-fruK (doravante referida, às vezes, como "variante aumentada por fruK" ou "variante +fruK"), obtidas no Exemplo 9, foram,
20 respectivamente, semeadas em três balões Erlenmeyer com um volume de 500 ml, cada um equipado com um defletor e com um líquido de cultura de LB caldo de Miller de 25 ml (Difco244620), e o cultivo foi realizado com a agitação, durante a noite, a 35° C e 120 rpm como uma pré-cultura.
25 Então, todos os teores dos respectivos balões foram separadamente semeados em três recipientes de cultivo de 1L ((BMJ-01, aparelho de cultura fabricado pela ABLE Corporation), cada um contendo 475 g do meio mostrado na Tabela 1).

30 Tabela 1

Composição do meio

Sacarose	12%
Processamento de milho (fabricado por Nihon Shokuhin Kako Co., Ltd.)	3%
Água	Equilíbrio

O cultivo foi realizado por 48 horas em pressão atmosférica, uma taxa de aeração de 0,25 L/min, uma velocidade de agitação de 200 rpm, uma temperatura de cultura de 35°C, e um pH de 7,4 (ajustado com 24% de NaOH). Após a conclusão do cultivo, a concentração de ácido lático no líquido de cultura resultante foi analisada utilizando uma cromatografia líquida de alta velocidade (produzida por Hitachi, Ltd.) com a definição. Os resultados são mostrados na Tabela 2 e na FIG. 1.

Coluna: ULTRON PS-80H (fabricado por Shinwa Chemical Industries Ltd.)

Efluente: Solução aquosa de ácido perclórico (pH 2,1)

Taxa de Fluxo: 1,0 mL/min.

Detector: Detector de UV

Comprimento de onda de medição: 280 nm

Tabela 2

variante inserida no genoma	variante inserida no genoma	variante inserida no genoma
MG1655ΔpflΔdldΔmdh	MG1655ΔpflΔdldΔmdh	MG1655ΔpflΔdldΔmdh
Δasp/GAPldhA/variante pGAP-cscA (variante cscA)	Δasp/GAPldhA/variante cscA-fruK (variante	ΔaspΔfruR/GAPldhA genome /variante pGAP-cscA

		aumentada por fruK)	(variante rompida por fruR)
Tempo de Cultura (hr)	48	48	48
Quantidade de ácido D-lático acumulado (g/L)	95,5	114,6	103,6
Sacarose (g/L)	0	0	0
Glicose (g/L)	0	2,8	3,3
Frutose (g/L)	14,3	10,7	0

Em um exemplo conhecido no qual 4 genes (*cscA*, *cscR*, *cscK*, e *cscB*) e da via de assimilação de sacarose não PTS incluindo a *cscA* foram introduzidos na *Escherichia coli* e o ácido lático foi produzido a partir da sacarose (Biotechnology Letters. 27, 1891-1896 (2005)), a produção de 96,5 g de ácido lático levou um tempo de cultura de 120 horas. Diferentemente, cada *Escherichia colis* produtora de ácido lático (*cscA*, variante aumentada por fruK, e variante rompida por fruR), de acordo com a presente invenção, produz uma quantidade comparável, ou superior, de ácido lático por meio de cultivo por apenas 48 horas. Ademais, demonstra-se, q respeito da assimilação da sacarose, que o

tempo de produção do ácido lático pode ser amplamente reduzido por meio da incorporação da atividade de alguns dos genes da sacarose não PTS, particularmente se incorporada apenas a cscA.

5 Particularmente, demonstrou-se que a introdução de um gene fruK na presença de cscA resultou em uma melhoria de 1,2 vez na eficácia da produção de ácido D-lático utilizando a sacarose como matéria-prima, e a ruptura do gene da fruR resultou em uma melhoria de 1,1 vez na
10 eficácia da produção de ácido D-lático.

Nesse momento, a sacarose adicionada no início do cultivo desapareceu completamente em todas as variantes. Ademais, demonstrou-se que a introdução de um gene de fruK ou a ruptura do gene de fruK leva a uma assimilação mais
15 rápida da frutose obtida por meio da decomposição da sacarose, se comparado à cepa que não foi submetida à introdução ou à ruptura do gene.

[Exemplo Comparativo 1]

<Produção de ácido D-lático pela variante inserida no
20 genoma MG1655 Δ pfl Δ dld Δ mdh Δ asp/GAPldhA / variante pBRgapP >

A produção de ácido D-lático pela variante inserida no genoma MG1655 Δ pfl Δ dld Δ mdh Δ asp/GAPldhA / variante pBRgapP foi examinada de maneira semelhante ao Exemplo 10. Essa variante é basicamente a mesma da variante inserida no
25 genoma MG1655 Δ pfl Δ dld Δ mdh Δ asp/GAPldhA / variante pGAP-cscA, exceto pelo fato de que o gene de cscA não está contido no plasmídeo introduzido. A composição do meio também foi a mesma do Exemplo 10; entretanto, a sacarose foi submetida à esterilização de filtro antes do uso. Após o cultivo de 48
30 horas, a concentração de ácido D-lático no líquido de

cultura foi 0 g/L. Nesse momento, as concentrações de glicose e frutose no líquido de cultura também foram 0 g/L.

A partir desses resultados, confirmou-se que a produção de ácido lático através da assimilação de sacarose é impossível quando o gene de *cscA* é eliminado.

[Exemplo 11]

<Produção de ácido D-lático a partir do melaço pela variante inserida no genoma MG1655 Δ pfl Δ dld Δ mdh Δ asp Δ fruR/GAPldhA / variante pGAP-*cscA* >

Produção de ácido D-lático a partir do melaço pela variante inserida no genoma MG1655 Δ pfl Δ dld Δ mdh Δ asp Δ fruR/GAPldhA / variante pGAP-*cscA* foi examinada de maneira semelhante ao Exemplo 10.

A quantidade inteira (25 mL) dos mesmos teores do balão pré-cultivado que os do balão pré-cultivado no Exemplo 10 foi semeado em 475 g de um meio mostrado na Tabela 3.

Tabela 3

Composição do meio

Melaços	20%
Processamento de milho (fabricado por Nihon Shokuhin Kako Co., Ltd.)	5%
Água	Equilíbrio

O cultivo foi realizado em pressão atmosférica, uma taxa de aeração de 0,25 L/min, uma velocidade de agitação de 300 rpm, uma temperatura de cultura de 35°C, e um pH de 7,4 (ajustado com 24% de NaOH) por 48 horas.

Após o cultivo de 48 horas, a concentração de ácido D-lático no líquido de cultura foi 96.47 g/L. Nesse momento, as concentrações de glicose, frutose e sacarose no líquido

de cultura foram 0 g/L.

A partir desses resultados, confirmou-se que o ácido lático pode ser produzido a partir de melaços como a matéria-prima por meio da utilização de *Escherichia coli* produtora de ácido lático de acordo com esta invenção.

[Exemplo 12]

<Construção do vetor de expressão para o gene de ldh2 derivado de *Bifidobacterium* (*Bifidobactéria*) e a variante MG1655Δpfl/pGAP-ldh2 como transformato com o vetor de expressão>

A sequência de aminoácidos da L-lactato desidrogenase da *Bifidobacterium longum*, e a sequência de bases do gene dessa já foram relatadas. Ou seja, o gene que codifica a L-lactose desidrogenase (ldh2) é descrito entre as sequências 555 e 1517 da sequência de genoma da cepa da *Bifidobacterium* descrita no número de acesso M33585 do GenBank

A sequência do promotor de gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase derivada de *Escherichia coli* (doravante referida, às vezes, como GAPDH), que é descrita em 397-440 nas informações de sequência de bases de número de acesso do GenBank X02662, pode ser utilizada como a sequência de base de um promotor necessário para a expressão do gene.

A fim de obter um promotor de GAPDH, foi realizada a amplificação por um método de PCR utilizando o DNA genômico da cepa de *Escherichia coli* MG1655 como um padrão e utilizando CGAGCTACATATGCAATGATTGACACGATTCCG (SEQ ID NO: 29) e TCTAGAGCTATTTGTTAGTGAATAAAAGG (SEQ ID NO: 30). O fragmento de DNA resultante foi digerido com uma enzima de restrição *NdeI*, fornecendo, dessa forma, um fragmento de

cerca de 110 bp correspondente ao promotor de GAPDH. O fragmento de DNA resultante foi misturados com um fragmento obtido por meio da digestão de um plasmídeo pBR322 (número de acesso J01749 do GenBank) com enzimas de restrição NdeI e PvuII, e os fragmentos misturados foram ligados utilizando uma ligase. Posteriormente, a célula DH5 α competente (DNA-903, Toyobo Co., Ltd.) da *Escherichia coli* foi transformada com o produto de ligação, e foi obtido um transformante crescido sobre uma placa de LB ágar contendo 50 μ g/mL de ampicilina. A colônia resultante foi cultivada em um meio líquido de LB contendo 50 μ g/mL de ampicilina, durante a noite, a 37°C, e um plasmídeo pBRgapP foi recuperado a partir das células bacterianas resultantes.

A fim de obter um gene de L-lactato desidrogenase, foi realizada a amplificação por um método de PCR utilizando *Bifidobacterium longum* (ATCC 15707) como um padrão e utilizando AATCTAGACGGAGAAAGTCTTATGGCGGAAACTACCGTTAAGC (SEQ ID NO: 36) e CTGTCTAGATCAGAAGCCGAACTGGGCG (SEQ ID NO: 37). O fragmento de DNA resultante foi digerido com uma enzima de restrição *Xba*I, fornecendo, dessa forma, um fragmento de gene de L-lactato desidrogenase de cerca de 1,0 kbp. O fragmento de DNA resultante foi misturado com um fragmento obtido por meio da digestão de um plasmídeo pBRgapP, preparado acima com uma enzima de restrição *Xba*I, e os fragmentos misturados foram ligados utilizando uma ligase. Posteriormente, a célula DH5 α competente (DNA-903, Toyobo Co., Ltd.) da *Escherichia coli* foi transformada com o produto de ligação, e foi obtido um transformante crescido sobre uma placa de LB ágar contendo 50 μ g/mL de ampicilina. A colônia resultante foi cultivada em um meio líquido de LB

contendo 50 µg/mL de ampicilina, durante a noite, a 37°C, e um plasmídeo pGAP-ldh2 foi recuperado a partir das células bacterianas resultantes.

Uma célula competente de cepa MG1655, na qual o gene pfl havia sido eliminado por meio da utilização do pTHΔpfl preparado no Exemplo 3 de maneira semelhante ao Exemplo 2 (referido como "variante MG1655Δpfl"), foi transformada com o plasmídeo pGAP-ldh2, e o transformante resultante foi cultivado em uma placa de LB caldo ágar de Miller (Miller's LB Broth agar plate) contendo 50 µg/mL de ampicilina, durante a noite, a 37°C, como resultado do qual foi obtida uma variante MG1655Δpfl/pGAP-ldh2.

[Exemplo 13]

<Produção de ácido L-lático pela variante MG1655Δpfl/pGAP-ldh2>

A produção de ácido L-lático a partir da glicose pela variante MG1655Δpfl/pGAP-ldh2 obtida no Exemplo 12 foi examinada de maneira semelhante ao Exemplo 10.

25 mL dos teores do balão pré-cultivado da mesma maneira que as pré-culturas obtidas no Exemplo 10 foi semeado em 475 g de um meio mostrado na Tabela 4 abaixo.

Tabela 4

Glicose	12%
Extrato de levedura (fabricado por Difco Laboratories Inc.)	3%
Água	Equilíbrio

O cultivo foi realizado em pressão atmosférica, uma taxa de aeração de 0,25 L/min, uma velocidade de agitação de 200 rpm, uma temperatura de cultura de 35°C, e um pH de 7,5 (ajustado com 24% de NaOH), por 18 horas.

Após o cultivo de 18 horas, a concentração de ácido L-lático no líquido de cultura foi 97.02 g/L.

A partir desses resultados, confirmou-se que o ácido L-lático pode ser produzido a partir da glicose por meio da
5 utilização da L-lactato desidrogenase derivada da *Bifidobacterium*.

[Exemplo 14]

<Preparação de uma variante inserida no gene
MG1655 Δ pfl Δ dld Δ mdh Δ asp/GAPldhA/variante pGAP-ldh2 >

10 Foi preparado um transformante em que o plasmídeo pGAP-ldh2 preparado no Exemplo 12 foi introduzido na variante produtora de ácido D-lático preparada no Exemplo 6. Especificamente, utilizou-se o seguinte procedimento.

Uma célula competente de variante inserida no genoma
15 MG1655 Δ pfl Δ dld Δ mdh Δ asp/GAPldhA preparada no Exemplo 6 foi transformada com o plasmídeo pGAP-ldh2. O transformante resultante foi cultivado em uma placa de LB caldo ágar de Miller (Miller's LB Broth agar plate) contendo 50 μ g/mL de ampicilina, durante a noite, a 37°C, como resultado do qual
20 foi obtida uma variante inserida no genoma MG1655 Δ pfl Δ dld Δ mdh Δ asp/GAPldhA / variante pGAP-ldh2.

[Exemplo 15]

<Produção de ácido L-lático pela variante inserida no genoma MG1655 Δ pfl Δ dld Δ mdh Δ asp/GAPldhA / variante pGAP-ldh2>

25 A produção de ácido L-lático a partir da glicose pela variante inserida no genoma MG1655 Δ pfl Δ dld Δ mdh Δ asp/GAPldhA obtida no Exemplo 14 foi examinada de maneira semelhante ao Exemplo 13.

O cultivo foi realizado em pressão atmosférica, uma
30 taxa de aeração de 0,25 L/min, uma velocidade de agitação

de 200 rpm, uma temperatura de cultura de 35°C, e um pH de 7,5 (ajustado com 24% de NaOH), por 18 horas.

Após o cultivo de 18 horas, a concentração de ácido L-lático no líquido de cultura foi 116.84 g/L.

5 A partir desses resultados, confirmou-se que o ácido L-lático pode ser produzido a partir da glicose como uma matéria-prima utilizando uma variante de *Escherichia coli* para a produção de ácido D-lático. A produção de ácido L-lático foi confirmada por meio da medição da quantidade de
10 ácido L-lático e da quantidade de ácido D-lático, utilizando um F-Kit D-/ácido L-lático (Código do produto 1112821, J.K.. International Inc.).

[Exemplo 16]

<Preparação de uma variante inserida no gene
15 MG1655ΔpflΔmdhΔaspΔlldDΔldhA/GAPldh2 e uma variante inserida no gene MG1655ΔpflΔmdhΔaspΔlldDΔldhAΔfruR/GAPldh2>

Uma variante de *Escherichia coli* para a produção de ácido L-lático foi preparada por meio da substituição do gene de ldh2 pelo gene de ldhA da variante de *Escherichia*
20 *coli* para a produção de ácido lático no Exemplo 6 (variante inserida no gene MG1655ΔpflΔlldΔmdhΔasp/GAPldhA) e a ruptura de lldD, na qual é um gene de catalisação enzimática da decomposição de ácido L-lático. Ademais, uma variante de *Escherichia coli* rompida por fruR para a
25 produção de ácido lático foi preparada por meio da ruptura do gene fruR. Especificamente, utilizou-se o seguinte procedimento.

(Preparação de variante rompida por gene de ldhA)

Com base nas informações de genes das regiões do DNA
30 genômico de MG1655 adjacente ao gene da ldhA, quatro tipos

de iniciadores de oligonucleotídeos,
 AAGGTACCACCAGAGCGTTCTCAAGC (SEQ ID NO: 21)
 GCTCTAGATTCTCCAGTGATGTTGAATCAC (SEQ ID NO: 22),
 GCTCTAGAGCATTCCCTGACAGCAGAAGC (SEQ ID NO: 38) e
 5 AACTGCAGTCGGCGTGTAGTAGTGAACC (SEQ ID NO: 39), foram
 sintetizados. Com o uso desses parâmetros, um plasmídeo
 pTH Δ ldhA, para a ruptura do gene, foi construído de acordo
 com um método semelhante ao empregado no Exemplo 1.
 Ademais, uma célula competente de variante inserida no
 10 genoma MG1655 Δ pfl Δ dld Δ mdh Δ asp/GAPldhA foi transformada com
 o pTH Δ ldhA, e uma variante eliminada por ldhA foi
 selecionada de acordo com um método semelhante ao empregado
 no Exemplo 2. A variante resultante foi denominada
 "variante Δ ldhA inserida no genoma
 15 MG1655 Δ pfl Δ dld Δ mdh Δ asp/GAPldhA".

(Preparação de reverso do gene dld)

Com base nas informações de genes das regiões de DNA
 genômico de *Escherichia coli* MG1655 adjacente ao gene da
 dld, dois tipos de iniciadores de oligonucleotídeos,
 20 CAACACCAAGCTTTTCGCG (SEQ ID NO: 40), e TGTTCTAGAAAGTTCTTTGAC
 (SEQ ID NO: 41), foram sintetizados. A PCR foi realizada
 utilizando esses parâmetros e o DNA genômico de *Escherichia*
coli MG1655 como um padrão, e o fragmento de DNA resultante
 foi clivado com as enzimas de restrição *Hind*III e *Xba*I.
 25 Além disso, o plasmídeo pTH18cs1 foi clivado com enzimas de
 restrição *Hind*III e *Xba*I, e misturado com o fragmento de
 dld. Subsequentemente, os fragmentos foram ligados
 utilizando uma ligase, fornecendo, dessa maneira, um
 plasmídeo pTHDL Δ . Além disso, uma célula competente de
 30 variante inserida no genoma of

MG1655 Δ pfl Δ dld Δ mdh Δ asp/GAPldhA foi transformada com o pTHDLD, e um reverso dld foi selecionado de acordo com um método semelhante ao empregado no Exemplo 2. A variante resultante foi denominada "variante Δ ldhA inserida no

5 genoma MG1655 Δ pfl Δ mdh Δ asp/GAPldhA".

(Preparação de variante rompida por gene de lldD)

Com base nas informações de genes das regiões do DNA genômico da cepa de MG1655 adjacente ao gene da lldD, quatro tipos de iniciadores de oligonucleotídeos,

10 GGAAGCTTCAAATTGGCGTCTCTGATCT (SEQ ID NO: 42),
AAACCCGGGCCATCCATATAGTGAACAGGAACGG (SEQ ID NO: 43),
GGGCTCGAGTGGCGATGACGCTGACTGG (SEQ ID NO: 44) e
CGTCTAGAACGGGTAAATCTGGTGGTGACCGTCACCCG (SEQ ID NO: 45),
foram sintetizados. Com o uso desses parâmetros, um

15 plasmídeo pTH Δ lldD, para a ruptura do gene, foi construído de acordo com um método semelhante ao empregado no Exemplo 1. Ademais, uma célula competente de variante Δ ldhA inserida no genoma MG1655 Δ pfl Δ mdh Δ asp/GAPldhA foi transformada com o pTH Δ lldD, e uma variante eliminada por

20 lldD foi selecionada de acordo com um método semelhante ao empregado no Exemplo 2. A variante resultante foi denominada "variante Δ ldhA inserida no genoma MG1655 Δ pfl Δ mdh Δ asp Δ lldD/GAPldhA".

<Preparação de uma variante inserida no gene ldh2 >

25 A sequência de aminoácidos da L-lactato desidrogenase da *Bifidobacterium longum*, e a sequência de bases do gene dessa já foram relatadas. Ou seja, o gene que codifica a L-lactose desidrogenase (ldh2) é descrito entre as sequências 555 e 1517 da sequência de genoma da cepa da

30 *Bifidobacterium* descrita no número de acesso M33585 do

GenBank

A fim de se obter um gene (*ldh2*) que codifica a L-lactato desidrogenase, dois tipos de iniciadores oligonucleotídeos,

5 AAGAATTCCGGAGAAAGTCTTATGGCGGAAACTACCGTTAAGC (SEQ ID NO: 46)
e CTGTCTAGATCAGAAGCCGAACTGGGCG (SEQ ID NO: 47), foram sintetizados utilizando o DNA genômico de *Bifidobacterium longum* (ATCC15707) como um padrão. A PCR foi realizada utilizando iniciadores, e o fragmento de DNA resultante foi
10 clivado com enzimas de restrição *EcoRI* e *XbaI*.

A fim de obter um promotor de GAPDH, dois tipos de iniciadores de oligonucleotídeos, GGTCTAGAGCAATGATTGACACGATTCCG (SEQ ID NO: 48) and CGGAATTCCGCTATTTGTTAGTGAATAAAAG (SEQ ID NO: 49), foram
15 sintetizados utilizando o DNA genômico de cepa de *Escherichia coli* MG1655 como um padrão. O fragmento de DNA resultante foi clivado com enzimas de restrição *EcoRI* e *XbaI*.

O plasmídeo obtido por meio da clivagem de pTH Δ ldhA
20 obtido acima com *XbaI*, e o fragmento de *EcoRI-XbaI* de uma *ldh2* derivada de *Bifidobacterium longum* e o fragmento de *EcoRI-XbaI* do promotor GAPDH derivado de *Escherichia coli* obtido acima, foram misturados, e os fragmentos foram ligados utilizando uma ligase. Posteriormente, a célula
25 DH5 α competente (DNA-903, Toyobo Co., Ltd.) da *Escherichia coli* foi transformada com o produto de ligação, e foi obtido um transformante crescido sobre uma placa de LB ágar contendo 50 μ g/mL de ampicilina. A colônia resultante foi cultivada em um meio líquido de LB contendo 50 μ g/mL de
30 ampicilina, durante a noite, a 37°C, e um plasmídeo

pTH Δ ldhA::GAPLDH2 foi recuperado a partir das células bacterianas resultantes. Uma variante Δ ldhA inserida no genoma MG1655 Δ pfl Δ mdh Δ asp Δ lld/GAPldhA foi transformada com o plasmídeo resultante, e uma variante inserida no genoma ldh2 foi selecionada com base na amplificação de ldh2, de acordo com um método semelhante ao empregado no Exemplo 2.

A variante resultante foi denominada "variante inserida no genoma MG1655 Δ pfl Δ mdh Δ asp Δ lld Δ ldhA/GAPldh2".

(Preparação de variante rompida por gene de fruR)

10 Uma variante inserida no genoma MG1655 Δ pfl Δ mdh Δ asp Δ lld Δ ldhA/GAPldh2 foi transformada com um plasmídeo pTH Δ fruR, preparado no Exemplo 7, e uma variante inserida no genoma MG1655 Δ pfl Δ mdh Δ asp Δ lld Δ ldhA/GAPldh2, na qual o gene de fruR foi rompido, foi obtida de acordo com um método semelhante ao do empregado no Exemplo 2. Essa variante foi denominada "variante inserida no genoma MG1655 Δ pfl Δ mdh Δ asp Δ lld Δ ldhA Δ fruR/GAPldh2".

[Exemplo 17]

20 <Produção de variante pGAP-cscA inserida no genoma MG1655 Δ pfl Δ mdh Δ asp Δ lld Δ ldhA/GAPldh2/ e variante pGAP-cscA inserida no genoma MG1655 Δ pfl Δ mdh Δ asp Δ lld Δ ldhA Δ fruR/GAPldh2>

O vetor de expressão para o gene da hidrolase da sacarose (invertase) foi introduzido em cada variante da *Escherichia coli* para a produção de ácido L-lático e a variante de *Escherichia coli* rompida por fruR para a produção de ácido L-lático, que foram preparados no Exemplo 16, preparando, dessa maneira, uma variante de *Escherichia coli* produtora de ácido L-lático a partir da sacarose.

Especificamente, utilizou-se o seguinte procedimento.

Células competentes de variante inserida no genoma MG1655 Δ pfl Δ mdh Δ asp Δ lldD Δ ldhA/GAPldh2 e variante inserida no genoma MG1655 Δ pfl Δ mdh Δ asp Δ lldD Δ ldhA Δ fruR/GAPldh2, no Exemplo 16, foram transformadas com o plasmídeo pGAP-cscA preparado no Exemplo 8, e o transformante resultante de cada variante foi cultivado em uma placa de LB calda ágar de Miller (Miller's LB Broth agar plate) contendo 50 μ g/mL de ampicilina, durante a noite, a 37°C, como resultado do qual foram obtidas obtida uma variante pGAP-cscA inserida no genoma MG1655 Δ pfl Δ mdh Δ asp Δ lldD Δ ldhA/GAPldh2 ou uma variante pGAP-cscA inserida no genoma MG1655 Δ pfl Δ mdh Δ asp Δ lldD Δ ldhA Δ fruR/GAPldh2 .

[Exemplo 18]

<Preparação de variante pGAP-cscA-fruK inserida no genoma MG1655 Δ pfl Δ mdh Δ asp Δ lldD Δ ldhA/GAPldh2>

A variante de *Escherichia coli* para a produção de ácido L-lático no Exemplo 16 foi transformada com o vetor de expressão para os genes da hidrolase da sacarose (invertase) e da frutose-1-fosfato quinase, fornecendo, dessa maneira, uma variante de *Escherichia coli* aumentada por fruK produtora de ácido L-lático. Especificamente, utilizou-se o seguinte procedimento.

Uma célula competente de variante inserida no genoma de MG1655 Δ pfl Δ mdh Δ asp Δ lldD Δ ldhA/GAPldh2 preparada no Exemplo 16 foi transformada com o plasmídeo pGAP-cscA-fruK preparado no Exemplo 9, e o transformante resultante foi cultivado em uma placa de LB ágar / caldo de Miller (Miller's LB Broth agar plate) contendo 50 μ g/mL de

ampicilina, durante a noite, a 37°C, como resultado do qual foi obtida uma variante pGAP-cscA-fruK inserida no genoma MG1655ΔpflΔmdhΔaspΔlldDΔldhA/GAPldh2.

[Exemplo 19]

5 <Produção de ácido L-lático pela variante pGAP-cscA inserida no genoma MG1655ΔpflΔmdhΔaspΔlldDΔldhA/GAPldh2, variante pGAP-cscA inserida no genoma MG1655ΔpflΔmdhΔaspΔlldDΔldhAΔfruR/GAPldh2, variante pGAP-cscA-fruK inserida no genoma
10 MG1655ΔpflΔmdhΔaspΔlldDΔldhA/GAPldh2>

Examinou-se a produção de ácido L-lático a partir do melão pela variante pGAP-cscA inserida no genoma MG1655ΔpflΔmdhΔaspΔlldDΔldhA/GAPldh2, variante pGAP-cscA inserida no genoma
15 MG1655ΔpflΔmdhΔaspΔlldDΔldhAΔfruR/GAPldh2, variante pGAP-cscA-fruK inserida no genoma MG1655ΔpflΔmdhΔaspΔlldDΔldhA/GAPldh2.

A variante pGAP-cscA inserida no genoma MG1655ΔpflΔmdhΔaspΔlldDΔldhA/GAPldh2, a variante pGAP-cscA
20 inserida no genoma MG1655ΔpflΔmdhΔaspΔlldDΔldhAΔfruR/GAPldh2, e a variante pGAP-cscA-fruK inserida no genoma MG1655ΔpflΔmdhΔaspΔlldDΔldhA/GAPldh2, obtidas no Exemplo 17 e Exemplo 18, foram, respectivamente, semeadas em balões
25 Erlenmeyer com um volume de 500 mL, cada um equipado com um defletor e com 50 mL do meio de cultura mostrado na Tabela 5, e o cultivo foi realizado com a agitação, durante a noite, a 35° C e 120 rpm como uma pré-cultura. Então, 25 mL dos teores de pré-cultura de cada balão foram
30 individualmente semeados em 475 g do meio mostrado na

Tabela 6 abaixo, e os experimentos de cultivo foram realizados de maneira semelhante ao Exemplo 10.

Tabela 5

Composição do meio de pré-cultura

Melaços	2%
Processamento de milho (fabricado por Nihon Shokuhin Kako Co., Ltd.)	10%
Água	Equilíbrio

5 pH 7,8 após autoclave (ajustada em 24% de NaOH)

Tabela 6

Composição do meio

Melaços	20%
Processamento de milho (fabricado por Nihon Shokuhin Kako Co., Ltd.)	5%
Água	Equilíbrio

10 O cultivo foi realizado em pressão atmosférica, uma taxa de aeração de 0,25 L/min, uma velocidade de agitação de 350 rpm, uma temperatura de cultura de 35°C, e um pH de 7,5 (ajustado com 24% de NaOH), por 24 horas.

15 Após o cultivo por 24 horas, a concentração de ácido L-lático no líquido de cultura foi de 75,12 g/L, no caso da variante (cscA) pGAP-cscA inserida no genoma MG1655ΔpflΔmdhΔaspΔlldDΔldhA/GAPldh2, 83,79 g/L, no caso da variante (variante rompida por fruR) pGAP-cscA inserida no genoma MG1655ΔpflΔmdhΔaspΔlldDΔldhAΔfruR/GAPldh2, e 84,32 g/L, no caso de uma variante (variante aumentada por fruR) pGAP-cscA-fruK inserida no genoma MG1655ΔpflΔmdhΔaspΔlldDΔldhA/GAPldh2, respectivamente.

20

A partir desses resultados, confirmou-se que o ácido L-lático pode ser produzido a partir de melaços como a

matéria-prima por meio da utilização de *Escherichia coli* produtora de ácido lático de acordo com esta invenção. Ademais, demonstrou-se que a ruptura do gene da fruR da *Escherichia coli* produtora de ácido lático melhora a eficiência da produção de ácido L-lático. Ademais, demonstrou-se que o aumento do gene da fruR da *Escherichia coli* produtora de ácido lático também melhora a eficiência da produção de ácido L-lático.

[Exemplo Comparativo 2]

10 <Construção de vetor de expressão de gene de invertase derivado de *Escherichia coli* O157 e gene da proteína promotora do transporte da glicose (glf) derivada de *Zymomonas*, e o transformante com o vetor de expressão>

A sequência de bases de um gene de *Escherichia coli* de GAPDH já foi relatada. A fim de obter um promotor de gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), um iniciador com uma sequência de bases de CCAAGCTTCTGCAGGTCGACGGATCCGAGCTCAGCTATTTGTTAGTGAATAAAAGG (SEQ ID NO: 50) foi sintetizado. O fragmento de DNA foi amplificado por um método de PCR que utiliza o DNA genômico de cepa de *Escherichia coli* MG1655 como um padrão e utilizando uma combinação de iniciadores de SEQ ID NO: 50 e SEQ ID NO: 29. O iniciador de SEQ ID NO: 29 possui um sítio de reconhecimento de *NdeI* no terminal 5', e o iniciador de SEQ ID NO: 50 possui sítios de reconhecimento de *HindIII*, *PstI*, *SalI*, *BamHI*, e *SacI*, nessa ordem, a partir do terminal 5'. O fragmento de DNA resultante foi digerido com enzimas de restrição *NdeI* e *HindIII*, fornecendo, dessa forma, um fragmento codificador do promotor de GAPDH de cerca de 110 bp. Em seguida, o

fragmento de DNA acima foi misturado com um vetor pBR322 de clonagem da *Escherichia coli* (número de acesso do GenBank J01749) que foi digerido com *NdeI* e *HindIII*, e os fragmentos foram ligados utilizando uma ligase.

5 Posteriormente, a célula DH5a competente (fabricada por Takara Bio Inc.) da *Escherichia coli* foi transformada com o produto de ligação, e foi obtido um transformante crescido sobre uma placa de LB ágar contendo 50 µg/mL de ampicilina. A colônia resultante foi cultivada em um meio líquido de LB
10 contendo 50 µg/mL de ampicilina, durante a noite, a 37°C, e um plasmídeo foi recuperado a partir das células bacterianas resultantes. Esse plasmídeo foi denominado "pGAP".

Uma célula competente de variante inserida no genoma
15 MG1655ΔpflΔdldΔmdhΔasp/GAPldhA preparada no Exemplo 6 foi transformada com o plasmídeo pGAP-cscA-glf, e o transformante resultante foi cultivado em uma placa de LB caldeira ágar de Miller (Miller's LB Broth agar plate) contendo 50 µg/mL de ampicilina, durante a noite, a 37°C,
20 como resultado do qual foi obtida uma variante inserida no genoma MG1655ΔpflΔdldΔmdhΔasp/GAPldhA / variante pGAP-cscA-glf.

A sequência de bases de um gene invertase (*cscA*) da cepa de *Escherichia coli* 0157 já foi relatada. Ou seja, o
25 gene de invertase (*cscA*) é descrito entre 3274383 e 3275816 da sequência de genoma da cepa de *Escherichia coli* 0157 descrita no número de acesso AE005174 do GenBank. A fim de obter um gene de *cscA*, iniciadores com as respectivas
sequências de bases de
30 GCGGATCCGCTGGTGGAAATATATGACGCAATCTCGATTGC (SEQ ID NO: 51) e

GACGCGTCGACTTAACCCAGTTGCCAGAGTGC (SEQ ID NO: 52) foram preparados. O iniciador de SEQ ID NO: 51 possui um sítio de reconhecimento de BamHI e uma sequência de ligação de ribossomos de base longa 13 do gene de GAPDH, nessa ordem, a partir do terminal 5'. O iniciador de SEQ ID NO: 52 possui um sítio de reconhecimento de SalI no terminal 5'. A PCR foi realizada segundo condições normais utilizando os dois tipos de iniciadores acima descritos e utilizando o DNA genômico (SIGMA-ALDRICH:IRMM449) da cepa de *Escherichia coli* O157 como um padrão, e o fragmento de DNA resultante foi digerido com enzimas de restrição BamHI e SalI, fornecendo, assim, um fragmento de gene de invertase (cscA) de cerca de 1,4 kbp. Esse fragmento de DNA foi misturado com um fragmento obtido por meio da digestão de um plasmídeo pGAP com enzimas de restrição BamHI e SalI, e os fragmentos misturados foram ligados utilizando uma ligase. Posteriormente, a célula DH5a competente (fabricada por Takara Bio Inc.) da *Escherichia coli* foi transformada com o produto de ligação, e foi obtido um transformante crescido sobre uma placa de LB ágar contendo 50 µg/mL de ampicilina. A colônia resultante foi cultivada com um meio líquido de LB contendo 50 µg/mL de ampicilina, durante a noite, a 30°C, e um plasmídeo pGAP- cscA foi recuperado a partir das células bacterianas resultantes. Dessa maneira, um vetor de expressão para o gene da invertase (cscA) foi construído.

A sequência de bases do gene da proteína promotora do transporte da glicose (glf) da enzima transportadora de açúcar da *Zymomonas mobilis* (ATCC 29191) já havia sido relatada (número de acesso do GenBank M60615). A fim de

obter o gene da *glf*, os iniciadores com as respectivas sequências de bases de CCTGTCGACGCTGGTGGAAATATATGAGTTCTGAAAGTAGTCAGG (SEQ ID NO: 53) e CTACTGCAGCTACTTCTGGGAGCGCCACA (SEQ ID NO: 54) foram preparados. O iniciador de SEQ ID NO: 51 possui um sítio de reconhecimento de *SalI* e uma sequência de ligação de ribossomos de base longa 13 do gene de GAPDH, nessa ordem, a partir do terminal 5'. O iniciador de SEQ ID NO: 54 possui um sítio de reconhecimento de *PstI* no terminal 5'.

10 A PCR foi realizada segundo condições normais utilizando os dois tipos de iniciadores e o DNA genômico da *Zymomonas mobilis* como um padrão, e o fragmento de DNA resultante foi digerido com enzimas de restrição *SalI* e *PstI*, fornecendo, assim, um fragmento de gene da proteína promotora do

15 transporte da glicose (*glf*) da enzima transportadora de açúcar de cerca de 1,4 kbp. Esse fragmento de DNA foi misturado com um fragmento obtido por meio da digestão de um plasmídeo pGAP-cscA com enzimas de restrição *SalI* e *PstI*, e os fragmentos misturados foram ligados utilizando

20 uma ligase. Posteriormente, a célula DH5a competente (fabricada por Takara Bio Inc.) da *Escherichia coli* foi transformada com o produto de ligação, e foi obtido um transformante crescido sobre uma placa de LB ágar contendo 50 µg/mL de ampicilina. A colônia resultante foi

25 cultivada com um meio líquido de LB contendo 50 µg/mL de ampicilina, durante a noite, a 37°C, e um plasmídeo pGAP-cscA foi recuperado a partir das células bacterianas resultantes. Dessa maneira, um vetor de expressão para o gene da invertase (*cscA*) e para o gene da proteína

30 promotora do transporte da glicose (*glf*) foi construído.

<Produção de ácido D-lático pela variante inserida no genoma MG1655 Δ pfl Δ dld Δ mdh Δ asp/GAPldhA / variante pGAP-cscA-glf, variante inserida no genoma MG1655 Δ pfl Δ dld Δ mdh Δ asp/GAPldhA / variante pGAP-cscA >

5 A variante inserida no genoma MG1655 Δ pfl Δ dld Δ mdh Δ asp/GAPldhA/variante pGAP-cscA-glf foi semeada em um tubo de ensaio de 3 ml de um líquido de cultura de LB caldeira de Miller (Difco244620), e o cultivo foi realizado com a agitação a 30°C e 200 rpm por 9 horas
10 como uma pré-cultura.

Então, o líquido de uma pré-cultura de 100 μ L foi semeado em cada um dos quatro balões Erlenmeyer de 100 mL, cada um equipado com um defletor, adicionados com 10 g de CaCO₃ (primeiro grau, Junsei Chemical e antecipadamente
15 esterilizados, e com 20 mL do meio mostrado na Tabela 7. O cultivo foi realizado com agitação a 35°C e 90 rpm, por 48 horas. Como controle, a variante inserida no genoma cscAMG1655 Δ pfl Δ dld Δ mdh Δ asp/GAPldhA/ variante pGAP-cscA, descrita no Exemplo 10, foi cultivada da mesma maneira.
20 Após a conclusão do cultivo, a concentração de ácido lático no líquido de cultura resultante foi analisado de acordo com o método descrito no Exemplo 10.

Após o cultivo por 48 horas, a concentração de ácido D-lático no líquido da cultura foi de 48,9 g/L, no caso da
25 cscA, e 9,3 g/L, no caso da variante inserida no genoma MG1655 Δ pfl Δ dld Δ mdh Δ asp/GAPldhA/ variante pGAP-cscA-glf.

A partir desses resultados, demonstrou-se que um efeito em termos de melhoria na eficiência da produção de ácido lático não é observado quando a absorção do açúcar é
30 aumentada por meio do uso de um gene de proteína promotora

de transporte da glicose (glf), que é, similarmente à cscA, envolvida no sistema metabólico do açúcar.

Tabela 7

Composição do meio

Sacarose	10%
Processamento de milho (fabricado por Nihon Shokuhin Kako Co., Ltd.)	5%
Água	Equilíbrio

5 Ajustado ao pH 8,0 em NaOH.

As divulgações do Pedido de Patente Japonesa n° 2008-237177, depositado em 16 de setembro de 2008, e o Pedido de Patente Japonesa n° 2009-32043, depositado em 13 de fevereiro de 2009 são aqui incorporados, em sua totalidade,
10 a título de referência.

Todas as publicações, pedidos de patentes, e normas técnicas mencionados neste relatório descritivo são aqui incorporados por referência ao mesmo conteúdo, como se cada publicação individual, pedido de patente, ou norma técnica
15 fosse indicado, específica e individualmente, para a incorporação por referência.

REIVINDICAÇÕES

1. *Escherichia coli* produtora de ácido lático **caracterizado** pelo fato de compreender um gene de hidrolase de sacarose (cscA) que é operacionalmente ligado a um
5 promotor constitutivo,
onde a *Escherichia coli* produtora de ácido lático é uma *Escherichia coli* produtora de D-ácido lático, na *Escherichia coli* produtora de D-ácido lático,
o gene de piruvato-formiato-liase é deletado,
10 o gene de lactato desidrogenase dependente de NADH é operacionalmente ligado a um promotor constitutivo, onde a lactato desidrogenase dependente de NADH é uma D-lactato desidrogenase,
uma D-lactato desidrogenase dependente de FAD inata é
15 deletada, e
um gene de frutose-1-fosfato quinase é operacionalmente ligado a um promotor constitutivo, ou
um gene FruR inato é deletado, ou
onde a *Escherichia coli* produtora de ácido lático é uma
20 *Escherichia coli* produtora de L-ácido lático, na *Escherichia coli* produtora de L-ácido lático,
o gene da piruvato-formiato-liase é deletado,
o gene de lactato desidrogenase dependente de NADH é operacionalmente ligado a um promotor constitutivo, onde a
25 lactato desidrogenase dependente de NADH é uma L-lactato desidrogenase, que produz L-lactato,
um gene de D-lactato desidrogenase inato é deletado e um gene de L-lactato desidrogenase dependente de FMN inato é deletado, e
30 um gene de frutose-1-fosfato quinase é

operacionalmente ligado a um promotor constitutivo, ou um gene FruR inato é deletado.

2. *Escherichia coli* produtora de ácido láctico, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada** pelo fato de
5 que na *Escherichia coli* produtora de ácido láctico a atividade da frutose-1-fosfato quinase é aumentada.

3. *Escherichia coli* produtora de ácido láctico, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de
10 que na *Escherichia coli* produtora de ácido láctico a atividade inata da FruR da *Escherichia coli* é inativada ou aumentada.

4. *Escherichia coli* produtora de ácido láctico, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, **caracterizada** pelo fato de que o gene de hidrolase da
15 sacarose deriva de uma bactéria pertencente ao gênero *Escherichia*.

5. *Escherichia coli* produtora de ácido láctico, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, **caracterizado** pelo fato de que o gene da hidrolase da
20 sacarose deriva de uma bactéria *Escherichia coli* O157.

6. *Escherichia coli* produtora de ácido láctico, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizado** pelo fato de que a frutose-1-fosfato quinase deriva de uma bactéria pertencente ao gênero *Escherichia*.

25 7. *Escherichia coli* produtora de ácido láctico, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizado** pelo fato de que a frutose-1-fosfato quinase é uma proteína derivada de *Escherichia coli* MG1655.

30 8. *Escherichia coli* produtora de ácido láctico, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de

que a *Escherichia coli* produtora de ácido lático é derivada da *Escherichia coli* K12.

9. Método de produção de ácido lático, **caracterizado** pelo fato de que o método compreende:

5 produção de ácido lático a partir de uma matéria-prima contendo sacarose derivada de planta por meio da utilização de uma *Escherichia coli* produtora de ácido lático conforme qualquer uma das reivindicações de 1 a 8.

FIG.1

