



(21) PI 1008141-0 A2



(22) Data do Depósito: 02/06/2010

República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(43) Data da Publicação Nacional: 07/04/2020

(54) **Título:** POLIPEPTÍDEO POLINUCLEOTÍDEO, CONSTRUÇÃO DE DNA TRANSFORMANTES LEVEDURAS TRANSFORMADAS E MÉTODOS DE PRODUÇÃO DE ÁCIDO DLACTICO

(51) **Int. Cl.:** C12N 15/09; C12N 1/15; C12N 1/19; C12N 1/21; C12N 5/10; (...).

(30) **Prioridade Unionista:** 03/06/2009 JP 2009-13213.

(71) **Depositante(es):** TORAY INDUSTRIES.

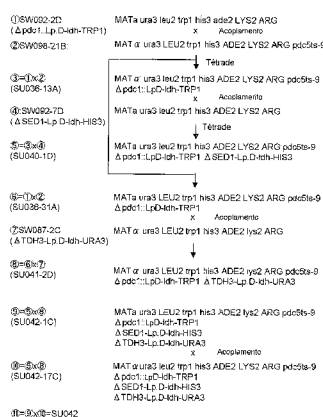
(72) **Inventor(es):** KENJI SAWAI; HIDEKI SAWAI; JUNYA YAMAGISHI; KATSUSHIGE YAMADA; KAZUMI SUDA.

(86) **Pedido PCT:** PCT JP2010059306 de 02/06/2010

(87) **Publicação PCT:** WO 2010/140602 de 09/12/2010

(85) **Data da Fase Nacional:** 30/11/2011

(57) **Resumo:** POLIPEPTÍDEO, POLINUCLEOTÍDEO, CONSTRUÇÃO DE DNA, TRANSFORMANTES, LEVEDURAS TRANSFORMADAS E MÉTODOS DE PRODUÇÃO DE ÁCIDO D-LÁCTICO A presente invenção trata sobre a fermentação de ácido D-lático altamente produtiva é alcançada através do uso de um transformante obtido pela introdução, em uma célula hospedeira, de um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo conforme definido em qualquer um dentre os seguintes (A) a (C) de tal modo que o polipeptídeo seja expresso, sendo que o polipeptídeo tem uma atividade de D-lactato desidrogenase superior àquela de polipeptídeos convencionais: (A) um polipeptídeo que tem a sequência de aminoácidos mostrada na SEQ 1D N0:1 ou 2; (B) um polipeptídeo que tem a mesma sequência de aminoácidos conforme mostrado na SEQ 1D N0:1 ou 2 exceto que um ou diversos aminoácidos são substituídos, deletados, inseridos e/ou adicionados, sendo que o polipeptídeo tem uma atividade de D-lactato desidrogenase; e (C) um polipeptídeo que tem uma sequência de aminoácidos que tem uma identidade de sequência não menor que 80% em relação à sequência de aminoácidos mostrada na SEQ 1D N0:1 ou 2, sendo que o polipeptídeo tem uma atividade de D-lactato desidrogenase.



**“POLIPEPTÍDEO, POLINUCLEOTÍDEO, CONSTRUÇÃO DE DNA,
TRANSFORMANTES, LEVEDURAS TRANSFORMADAS E MÉTODOS DE
PRODUÇÃO DE ÁCIDO D-LÁTICO”**

CAMPO DA INVENÇÃO

5 A presente invenção refere-se a um novo polipeptídeo para a
produção de ácido D-lático, cujo polipeptídeo tem uma atividade de D-lactato
desidrogenase; um polinucleotídeo que codifica o polipeptídeo; e um
transformante em que o polinucleotídeo é introduzido. A presente invenção
também se refere a um método de produção de ácido D-lático que compreende
10 cultivar o transformante.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

 A partir da ideia de neutralidade de carbono, é necessário que se
preste muita atenção aos ácidos poliláticos (PLAs) que utilizam um recurso
renovável, biomassa, como material de partida. Os PLAs têm um custo
15 relativamente baixo e são resistentes ao calor, tendo um ponto de fusão de
cerca de 170°C; portanto, espera-se que sejam como um polímero
biodegradável que pode ser moldado por fundição. Ademais, sabe-se que um
ácido polilático com estereocomplexo pode ser obtido pela mistura de ácido
poli-L-lático e ácido poli-D-lático (Documentos de Patente 1 a 3). O ácido
20 polilático com estereocomplexo é conhecido por exibir um ponto de fusão mais
alto e cristalizabilidade mais alta, se comparado a polímeros únicos, e
fornecem artigos moldados úteis, como artigos moldados de fibras, filmes e
resina. Para ambos os materiais de partida do mesmo, ácido L-lático e ácido D-
lático, há uma demanda por um método de produção dos mesmos com alto
25 grau de pureza e alto grau de eficiência.

 Na natureza, existem bactérias que produzem eficientemente
ácidos lácticos, como bactérias de ácido lático, e alguns daqueles métodos de
produção de ácido lático que utilizam tais bactérias já foram colocados em

prática. Exemplos de bactérias que produzem eficientemente ácido L-lático incluem *Lactobacillus delbrueckii*. Ademais, como bactérias que produzem eficientemente ácido D-lático, os micróbios, como *Sporolactobacillus laevolacticus* são conhecidos (Documento de Patente 4). Em qualquer um desses casos, a quantidade de ácido lático acumulado alcançou um alto nível em cultura anaeróbica; entretanto, já que ácido D-lático e ácido L-lático são produzidos como subprodutos na fermentação de ácido L-lático e na fermentação de ácido D-lático, respectivamente, a pureza óptica é diminuída. Além disso, é extremamente difícil separar esses ácidos lácticos.

Portanto, como um método de produção de ácido lático que tem uma alta pureza óptica, examinou-se a introdução de um gene que codifica L-lactato desidrogenase ou D-lactato desidrogenase em uma levedura que intrinsecamente não tem a habilidade de produzir ácido lático e submeteu-se a levedura à fermentação de ácido L-lático e ácido D-lático (Documentos de Patente 4 a 6 e Documento de não-patente 1). Em relação à fermentação de ácido L-lático por leveduras geneticamente modificadas, ao introduzir um gene altamente ativo originado de *Xenopus laevis* que codifica a L-lactato desidrogenase, a fermentação do ácido lático pode ser eficientemente realizada com pureza óptica alta (Documento de Patente 4). Por outro lado, em relação à fermentação de ácido D-lático por levedura geneticamente modificada, embora ácido D-lático que tem pureza óptica alta possa ser obtido da mesma forma como no caso da fermentação de ácido L-lático, o rendimento do mesmo é um problema (Documentos de Patente 5 e 6 e Documento de não-patente 1).

DOCUMENTOS DO ESTADO DA TÉCNICA

DOCUMENTOS DE PATENTE

Documento de Patente 1: JP S61-36321A

Documento de Patente 2: JP S63-241024A

Documento de Patente 3: JP 2000-17163A

Documento de Patente 4: WO2007/043253

Documento de Patente 5: JP 2007-074939A

Documento de Patente 6: WO2004/104202

5

DOCUMENTOS DE NÃO-PATENTE

Documento de não-patente 1: Ishida N, *et al.*, Journal of Bioscience and Bioengineering (2006), 101, 172 a 7

DESCRIÇÃO RESUMIDA DA INVENÇÃO

PROBLEMAS A SEREM SOLUCIONADOS PELA INVENÇÃO

10

Um objeto da presente invenção é realizar a fermentação de ácido D-lático altamente produtiva com o uso de um polipeptídeo que tem uma atividade de D-lactato desidrogenase mais alta que aquela de polipeptídeos convencionais e um polinucleotídeo que codifica o polipeptídeo.

MEIOS PARA SOLUCIONAR OS PROBLEMAS

15

Os presentes inventores estudaram intensivamente uma variedade de D-lactato desidrogenases para encontrar um polipeptídeo que aumenta a produção de ácido D-lático e também tem uma atividade de D-lactato desidrogenase para render apenas uma pequena quantidade de subproduto; e um polinucleotídeo que codifica o polipeptídeo, completando, por meio disso, a presente invenção.

20

Ou seja, a presente invenção é constituída pelos seguintes modos.

(1) Polipeptídeo que é qualquer um dos seguintes (A) a (C):

(A) polipeptídeo que tem a sequência de aminoácidos mostrada

25

na SEQ ID NO:1 ou 2;

(B) polipeptídeo que tem a mesma sequência de aminoácidos, conforme mostrado na SEQ ID NO:1 ou 2, exceto por um ou diversos aminoácidos que são substituídos, excluídos, inseridos e/ou adicionados, em

que o polipeptídeo tem uma atividade de D-lactato desidrogenase; e

(C) polipeptídeo que tem uma sequência de aminoácidos que tem uma identidade de sequência de não menos que 80% em relação à sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO:1 ou 2, em que o polipeptídeo tem uma atividade de D-lactato desidrogenase.

(2) Polinucleotídeo que é qualquer um dos seguintes (a) a (e):

(a) polinucleotídeo que tem a sequência de nucleotídeos mostrada na SEQ ID NO:3 ou 4;

(b) polinucleotídeo que tem a mesma sequência de nucleotídeos conforme mostrado na SEQ ID NO:3 ou 4 exceto por um ou diversos nucleotídeos que são substituídos, excluídos, inseridos e/ou adicionados, sendo que o polinucleotídeo codifica um polipeptídeo que tem uma atividade de D-lactato desidrogenase;

(c) polinucleotídeo que hibridiza sob condições severas com a totalidade ou uma parte do polinucleotídeo que tem a sequência de nucleotídeos mostrada na SEQ ID NO:3 ou 4 ou uma fita complementar dos mesmos, sendo que o polinucleotídeo codifica um polipeptídeo que tem uma atividade D-LDH;

(d) polinucleotídeo que tem uma sequência de nucleotídeos que tem uma identidade de sequência não menor que 80% em relação à sequência de nucleotídeos mostrada na SEQ ID NO:3 ou 4, sendo que o polinucleotídeo codifica um polipeptídeo que tem uma atividade de D-lactato desidrogenase; e

(e) polinucleotídeo que codifica o polipeptídeo, de acordo com (1).

(3) Construção de DNA em que o polinucleotídeo, conforme descrito em (2), e um promotor capaz de expressar o dito polinucleotídeo, estão ligados.

(4) A construção de DNA, de acordo com (3), caracterizada pelo fato de que o dito promotor descrito acima é um promotor do gene de piruvato

descarboxilase 1 (gene PDC1), gene de supressão de defeito exponencial 1 (gene SED1) ou gene de gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase 3 (gene TDH3).

(5) A construção de DNA, de acordo com (3) ou (4), em que o promotor descrito acima é selecionado a partir de qualquer um dos seguintes

5 (I) a (III):

(I) um promotor que tem a sequência de nucleotídeos mostrado em qualquer uma das SEQ ID NOs:5 a 7;

(II) um promotor que tem a sequência de nucleotídeos que hibridiza sob condições severas com a sequência de nucleotídeos mostrada
10 em qualquer uma das SEQ ID NOs:5 a 7 ou a sequência de nucleotídeos que compreende parte da mesma; e

(III) um promotor que tem a mesma sequência de nucleotídeos, conforme mostrado em qualquer uma das SEQ ID NOs:5 a 7, exceto um ou diversos nucleotídeos que são excluídos, substituídos e/ou adicionados.

15 (6) Transformante em que o polinucleotídeo, de acordo com (2), ou a construção de DNA, de acordo com qualquer um dentre (3) a (5), é introduzido.

(7) Uma levedura transformada em que o polinucleotídeo, de acordo com (2), ou a construção de DNA, de acordo com qualquer um dentre
20 (3) a (5), é introduzido.

(8) A levedura transformada, de acordo com (7), em que pelo menos um dentre o gene de piruvato descarboxilase 1 (gene PDC1), gene de supressão de defeito-exponencial 1 (gene SED1) e gene de gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase 3 (gene TDH3) da levedura transformada descrita acima
25 é substituído pelo polinucleotídeo, de acordo com (2), ou a construção de DNA, de acordo com qualquer um dentre (3) a (5).

(9) A levedura transformada, de acordo com (8), em que pelo menos um dos genes descritos acima é o gene PDC1.

(10) Método de produção de ácido D-lático, que compreende a etapa de cultura do transformante, de acordo com (6), ou da levedura transformada, de acordo com qualquer um dentre (7) a (9).

(11) Transformante em que um polinucleotídeo que codifica D-lactato desidrogenase originado a partir da família Limulidae ou a construção de DNA na qual o dito polinucleotídeo e um promotor capaz de expressar o dito polinucleotídeo estão ligados, é introduzido.

(12) Levedura transformada em que um polinucleotídeo que codifica D-lactato desidrogenase originado a partir da família Limulidae ou uma construção de DNA na qual o dito polinucleotídeo e um promotor capaz de expressar o dito polinucleotídeo estão ligados, é introduzido.

(13) A levedura transformada, de acordo com (12), em que pelo menos um dentre gene de piruvato descarboxilase 1 (gene PDC1), gene de supressão de defeito exponencial 1 (gene SED1) e gene de gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase 3 (gene TDH3) da dita levedura transformada descrita acima é substituído pelo dito polinucleotídeo descrito acima que codifica o dito D-lactato desidrogenase originado a partir da família Limulidae ou dita construção de DNA na qual o dito polinucleotídeo e um promotor capaz de expressar o polinucleotídeo estão ligados, é introduzido.

(14) Um método de produção de ácido D-lático, que compreende a etapa de cultura do transformante, de acordo com (11), ou a levedura transformada de acordo com (12) ou (13).

EFEITOS DA INVENÇÃO

De acordo com a presente invenção, um polipeptídeo que tem uma atividade de D-lactato desidrogenase adequada para a produção fermentativa de ácido D-lático e um polinucleotídeo que codifica o polipeptídeo são providos. Ademais, ao usar o polinucleotídeo da presente invenção, um transformante capaz de ter uma alta produção de ácido D-lático pode ser

facilmente obtido, e, por sua vez, o ácido D-lático pode ser eficientemente produzido com alta pureza ao cultivar o transformante.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

A Figura 1 mostra os procedimentos para preparar uma dente as
5 cepas de levedura SU042, de acordo com a presente invenção.

A Figura 2 mostra os resultados de cultura contínua de membrana integrada de cepa SU042 de levedura, de acordo com a presente invenção.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

Os modos para realizar a presente invenção serão, agora,
10 explicados com detalhes.

O termo "atividade de D-lactato desidrogenase (daqui em diante, também chamada de "D-LDH")" é uma atividade para converter a nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida (NADH) e ácido pirúvico em ácido D-lático e nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidado (NAD⁺).

15 A presente invenção é caracterizada pela inclusão de um polipeptídeo que tem a sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO:1 ou 2 ou um homólogo da mesma, cujo polipeptídeo tem uma atividade de D-LDH.

O polipeptídeo que tem a sequência de aminoácidos mostrada na
20 SEQ ID NO:1 ou 2 é um polipeptídeo originado de *Limulus polyphemus*, que pertence à família Limulidae e gênero *Limulus*.

Exemplos do homólogo do polipeptídeo que tem a sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO:1 ou 2 incluem um polipeptídeo que tem a mesma sequência de aminoácidos conforme mostrado na SEQ ID NO:1 ou 2
25 exceto pelo fato de que um ou diversos, de preferência de 1 a 10, com maior preferência de 1 a 5, com ainda mais preferência 1 ou 2 aminoácidos são substituídos, excluídos, inseridos e/ou adicionados, cujo polipeptídeo também tem uma atividade de D-LDH.

Além disso, um homólogo do polipeptídeo mostrado na SEQ ID NO:1 ou 2 também pode ser um polipeptídeo que tem uma sequência de aminoácidos que tem uma identidade de sequência não menor que 80%, de preferência 90%, com maior preferência não menos que 95% em relação à
5 sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO:1 ou 2, cujo polipeptídeo também tem uma atividade D-LDH. Aqui, a identidade de sequência de uma sequência de aminoácidos pode ser facilmente verificada com o uso de BLAST, que é um software amplamente usado no estado da técnica. Qualquer um pode usar o BLAST através do site do NCBI (Centro Nacional para Informações de
10 Biotecnologia), e a identidade pode ser facilmente verificada pelo uso dos parâmetros padrão.

Ademais, o homólogo do polipeptídeo que tem a sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO:1 ou 2 também pode ser um polipeptídeo originado de um organismo vivo pertencente à família Limulidae, de preferência
15 um organismo vivo que pertence ao gênero *Limulus* ou *Tachypleus*, com maior preferência, *Limulus polyphemus* pertencente ao gênero *Limulus*, ou *Tachypleus tridentatus*, *Tachypleus gigas* ou *Tachypleus rotundicauda* pertencente ao gênero *Tachypleus*, cujo polipeptídeo tem uma atividade de D-LDH.

20 O polipeptídeo que tem a sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO:1 ou 2 pode ser extraído de *Limulus polyphemus* por um método conhecido ou preparado com o uso de um método de síntese de peptídeo conhecido. Além disso, também pode ser preparado pela técnica de recombinação de gene com o uso de um polinucleotídeo codificando a
25 sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO:1 ou 2. O polipeptídeo que tem a sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO:1 ou 2 também pode ser extraído de um organismo vivo pertencente ao gênero *Tachypleus* por um método conhecido ou preparado com o uso de um método de síntese de

peptídeo conhecido. Além disso, também pode ser preparado pela técnica de recombinação de gene com o uso de um polinucleotídeo codificando a sequência de aminoácidos do polipeptídeo.

O homólogo do polipeptídeo que tem a sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO:1 ou 2 pode ter uma atividade de D-LDH melhorada e/ou uma estabilidade térmica melhorada, se comparado ao polipeptídeo que tem a sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO:1 ou 2. Aqui, o termo "uma atividade de D-LDH melhorada" refere-se a uma melhoria na afinidade de substrato e atividade molecular (K_{cat}) para ácido pirúvico e NADH, assim como um deslocamento no pH ótimo para a atividade enzimática do polipeptídeo mais próximo a um pH adequado para o crescimento de células que expressam o polipeptídeo. Tal polipeptídeo pode ser artificialmente projetado com base no polipeptídeo que tem a sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO:1 ou 2, ou pode ser separado da natureza. Ademais, uma mutação pode ser aleatoriamente introduzida ao gene de D-lactato desidrogenase por um método de engenharia molecular evolucionário para triar um polipeptídeo preferido do mesmo.

A presente invenção é caracterizada por incluir um polinucleotídeo que tem a sequência de nucleotídeos mostrada na SEQ ID NO:3 ou 4 ou um homólogo do mesmo, sendo que o polinucleotídeo codifica um polipeptídeo que tem uma atividade de D-LDH. Aqui, a origem de "polinucleotídeo" não importa e pode ser um cDNA, DNA genômico, DNA sintético, mRNA, RNA sintético, replicon de RNA; entretanto, é preferível que um DNA ou RNA, mais preferivelmente DNA. Além disso, o "polinucleotídeo" pode ser ou de fita única ou de fita dupla com uma fita complementar do mesmo. Além disso, o "polinucleotídeo" também pode conter um derivado de nucleotídeo natural ou artificial.

O polinucleotídeo que tem a sequência de nucleotídeos mostrada

na SEQ ID NO:3 ou 4 é um polinucleotídeo originado de *Limulus polyphemus* e caracterizado pela codificação de um polipeptídeo que tem a atividade descrita acima de D-LDH.

Exemplos do homólogo do polinucleotídeo mostrado na SEQ ID NO:3 ou 4 incluem um polinucleotídeo que tem a mesma sequência de nucleotídeos conforme mostrado na SEQ ID NO:3 ou 4 exceto pelo fato de que um ou diversos, de preferência 1 a 40, com maior preferência 1 a 30, com ainda mais preferência 1 ou 20, especialmente de preferência 1 a 10, com mais preferência 1 a 5 nucleotídeos são substituídos, excluídos, inseridos e/ou adicionados, sendo que o polinucleotídeo também codifica um polipeptídeo que tem uma atividade de D-LDH.

Ademais, os exemplos do homólogo do polinucleotídeo mostrado na SEQ ID NO:3 ou 4 também incluem um polinucleotídeo que hibridiza sob condições severas com a totalidade ou parte do polinucleotídeo tendo a sequência de nucleotídeos mostrada na SEQ ID NO:3 ou 4 ou uma fita complementar do mesmo, sendo que o polinucleotídeo também codifica um polipeptídeo que tem uma atividade de D-LDH. Aqui, o termo "um polinucleotídeo que hibridiza sob condições severas" refere-se a, por exemplo, um polinucleotídeo que é hibridizado por uma técnica de hibridização conhecida (Current Protocols I Molecular Biology edit. Ausubel *et al.*, (1987) Publish. John Wiley & Sons, Section 6.3 a 6.4) ou similares com o uso, como sonda(s), um ou uma pluralidade de polinucleotídeos selecionados que têm pelo menos 20, de preferência 25, com maior preferência pelo menos 30 nucleotídeos consecutivos arbitrários da sequência de nucleotídeos original. Aqui, condições severas podem ser alcançadas, por exemplo, pela realização de hibridização na presença de 50% de formamida a uma temperatura de hibridização de 37°C, 42°C para uma condição mais severa, 65°C para uma condição ainda mais severa, e lavando o resultante com uma solução de 0,1× a

2× de SSC (citrato salino-sódio) (composição de 1× solução de SSC: 150 mM de cloreto de sódio e 15 mM de citrato de sódio).

Ademais, o homólogo do polinucleotídeo mostrado na SEQ ID NO:3 ou 4 também pode ser um polinucleotídeo que tem uma sequência de nucleotídeos que tem uma identidade de sequência não menor que 80%, com mais preferência não mais que 90%, com ainda mais preferência, não menor que 95% em relação à sequência de nucleotídeos mostrada na SEQ ID NO:3 ou 4, sendo que o polinucleotídeo também codifica um polipeptídeo que tem uma atividade de D-LDH. A identidade de sequência da sequência de nucleotídeos de polinucleotídeo usada aqui pode ser determinada pelo uso do programa de análise de gene BLAST descrito acima ou similares.

Além disso, o homólogo do polinucleotídeo mostrado na SEQ ID NO:3 ou 4 também pode ser um polinucleotídeo originado de um organismo vivo pertencente à família Limulidae, de preferência, um organismo vivo pertencente ao gênero *Limulus* ou *Tachypleus*, com maior preferência, *Limulus polyphemus*, *Tachypleus tridentatus*, *Tachypleus gigas* ou *Tachypleus rotundicauda*, sendo que o polinucleotídeo codifica um polipeptídeo que tem uma atividade de D-LDH.

Embora o polinucleotídeo descrito acima possa ser preparado por clonagem a partir de um organismo vivo pertencente à família Limulidae, de preferência um organismo vivo pertencente à família Limulidae e gênero *Limulus* (daqui em diante, esses serão coletivamente chamados de "Limulus"), ele também pode ser sintetizado quimicamente ou pelo emprego da técnica de Fujimoto *et al.* (Hideya Fujimoto, Production Method of Synthetic Gene, Plant Cell Engineering Series 7, Plant PCR Experimental Protocol, 1997, Shujunsha Co., Ltd., p.95 a 100), que é conhecida como um método de síntese de DNA de cadeia longa. Normalmente, o polinucleotídeo clonado de *Limulus* pode ser isolado por um método conhecido. Exemplos de tal método incluem um em

que, com o uso de um iniciador sintetizado baseado na sequência de cDNA que é altamente conservada na D-lactato desidrogenase, sendo que o cDNA é preparado a partir de poli A (+) RNA isolado de hemócitos de *Limulus*, um fragmento parcial é amplificado e sequenciado, e toda a sequência ORF da
5 mesma é, então, determinada por métodos 5' RACE e 3' RACE, seguido pela amplificação por PCR para obter um polinucleotídeo. Ademias, a clonagem de *Limulus* também pode ser realizada ao complementar a função de D-lactato desidrogenase. O princípio da mesma é descrito em detalhes em DOMINIQUE, G., *Appl Environ Microbiol*, United States (1995), 61, 266 a 272. Dessa forma, o
10 polinucleotídeo da presente invenção que tem uma sequência de nucleotídeos uma vez determinado pode ser novamente obtido a partir de hemócitos de *Limulus*; entretanto, também pode ser diretamente sintetizado quimicamente com o uso de um aparelho de síntese de DNA.

Aqui, o polipeptídeo ou o polinucleotídeo descritos acima podem
15 ser modificados conforme apropriado ao introduzir apropriadamente uma substituição(ões), deleção(ões), inserção(ões) e/ou mutação (ões) de adição à sequência de aminoácidos ou sequência de nucleotídeos da mesma com o uso de um método de introdução de mutação específica (*Current Protocols I Molecular Biology* edit. Ausubel *et al.*, (1987) Publish. John Wiley & Sons Section
20 8.1 a 8.5) ou similares. Ademais, tal modificação de uma sequência de aminoácidos de polipeptídeo ou sequência de nucleotídeos do polinucleotídeo não é restrita àquelas realizadas por introdução artificial ou síntese de uma mutação, mas engloba não apenas aquelas realizadas em um tratamento de mutação artificial, mas também aquelas de ocorrência natural por uma mutação
25 em um aminoácido.

O polinucleotídeo descrito acima pode ser usado para a preparação de uma célula produtora de ácido D-lático por recombinação de gene. Para que uma célula hospedeira em que o polinucleotídeo da presente

invenção é introduzido por recombinação de gene (daqui em diante, também chamado de "transformante") se torne capaz de produzir ácido D-lático, é exigido que o polipeptídeo que tem uma atividade D-LDH que é codificada pelo polinucleotídeo seja expresso no transformante. Nesse caso, como um método
5 que permite que o polipeptídeo tenha uma atividade de D-LDH a ser expresso, é útil utilizar uma construção de DNA em que o polinucleotídeo e um promotor capaz de expressá-lo estejam ligados, ou seja, uma construção de DNA em que o polinucleotídeo é ligado à terminação 3' do promotor, e tal construção de DNA também seja incluída na presente invenção. A construção de DNA da
10 presente invenção pode ser preparada por um método em que o polinucleotídeo (DNA) da presente invenção e um promotor capaz de expressar o polinucleotídeo são, cada um, digeridos com uma enzima(s) de restrição apropriada e, então, inseridos em um sítio de enzima de restrição ou sítio de multiclonagem do DNA de vetor descrito abaixo a ser ligado ou ao ligar o
15 polinucleotídeo (DNA) da presente invenção e o promotor ao realizar PCR.

Em um modo preferível da construção de DNA descrito acima, a construção de DNA é carregada por um vetor como um plasmídeo (DNA), bacteriófago (DNA), retrotransposição (DNA) ou cromossomo artificial (por exemplo, YAC, PAC, BAC ou MAC). Dependendo do modo de introdução da
20 construção de DNA (dentro ou fora do genoma hospedeiro) e do tipo da célula hospedeira, um vetor procariótico, vetor eucariótico, vetor de célula animal ou vetor de célula vegetal, que seja conhecido no estado da técnica, é selecionado, conforme apropriado.

Aqui, exemplos do plasmídeo incluem vetores ponte de
25 *Escherichia coli*-levedura do tipo YCp, como pRS413, pRS415, pRS416, YCp50, pAUR112 e pAUR123; vetores ponte de *Escherichia coli*-levedura do tipo YEp, como pYES32 e YEp13; vetores ponte de *Escherichia coli*-levedura do tipo YIp, como pRS403, pRS404, pRS405, pRS406, pAUR101 e pAUR135;

plasmídeos originados de *Escherichia coli* (por exemplo, plasmídeos do tipo ColE, como pBR322, pBR325, pUC18, pUC19, pUC119, pTV118N, pTV119N, pBluescript, pHSG298, pHSG396 e pTrc99A; plasmídeos do tipo p1A, como pACYC177 e pACYC184; e plasmídeos do tipo pSC101, como pMW118, pMW119, pMW218 e pMW219); e plasmídeos originados de *Bacillus subtilis* (como pUB110 e pTP5). Exemplos do bacteriófago incluem λ -fagos (como Charon4A, Charon21A, EMBL3, EMBL4, λ gt100, gt11 e zap), ϕ X174, M13mp18 e M13mp19. Um exemplo de retrotransposição é o fator Ty e aquele de YAC é pYACC2.

O "promotor" na construção de DNA descrita acima significa uma sequência de nucleotídeos envolvida na iniciação da transcrição de mRNA a partir de um gene e normalmente se refere a uma sequência a montante da terminação 5' do gene existente no cromossomo. O comprimento da sequência de nucleotídeos promotora é, de preferência, de 1 a 3,000 bp, com mais preferência de 1 a 1,000 bp; entretanto, não é particularmente restrito, contanto que a sequência de nucleotídeos possa iniciar a transcrição de mRNA do gene que existe a jusante. Ademais, uma mutação e operação para melhorar a atividade de transcrição de um promotor são conhecidas e o "promotor" também inclui aqueles que são modificados por um método conhecido. O promotor na construção de DNA descrita acima não é particularmente restrito, contanto que tenha uma atividade promotora no transformante introduzido com a construção de DNA; entretanto, conforme descrito abaixo, já que é preferível que a construção de DNA da presente invenção seja introduzida em uma levedura, o promotor é, de preferência, funcional na levedura.

Exemplos preferidos do promotor que funciona na levedura incluem aqueles de gene fosfatase ácida (PHO5), genes de gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (TDH1, 2 e 3), genes de álcool desidrogenase (ADH1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7), genes relacionados a metabolismo de galactose (GAL1, 7 e 10),

gene de citocromo c (CYC1), gene de triose-fosfato isomerase (TPI1), gene de fosfoglicerato quinase (PGK1), gene de fosfofructose quinase (PFK1) e genes de piruvato descarboxilase (PDC1, 5, 6), assim como aqueles promotores de gene de enolase-1 (ENO1), gene de proteína relacionada à parede celular 2 (CWP2) e gene de supressão de defeito exponencial 1 (SED1) que são descritos e usados no pedido internacional PCT/JP 2008/072129 e exibem uma quantidade de expressão de gene não menor que 5 vezes a expressão relativa padrão de todos os genes após 50 horas ou depois a partir do início da cultura de levedura.

Mais exemplos preferíveis do promotor que funciona em levedura incluem o promotor de PDC1 e o promotor de TDH3, que são altamente expressos na trajetória de fermentação de etanol de levedura; e o promotor de SED1 que é altamente expresso em uma levedura cultivada por um período prolongado, e exemplos mais específicos incluem o promotor PDC1 mostrado na SEQ ID NO:5, o promotor de SED1 mostrado na SEQ ID NO:6 e o promotor de TDH3 mostrado na SEQ ID NO:7.

Ademais, o promotor de PDC1, promotor de SED1 ou promotor de TDH3 também pode ter, contanto que sua atividade de promotor seja mantida, a mesma sequência de nucleotídeos mostrada em uma dentre as SEQ ID NOs:5 a 7, respectivamente, exceto pelo fato de que um ou diversos, de preferência 1 a 40, com maior preferência 1 a 30, com ainda mais preferência 1 a 20, especialmente preferivelmente 1 a 10, com maior preferência 1 a 5 nucleotídeos são excluídos, substituídos e/ou adicionados.

Ademais, o promotor de PDC1, o promotor de SED1 ou o promotor de TDH3 também pode ter, contanto que sua atividade de promotor seja mantida, uma sequência de nucleotídeos que hibridiza sob condições severas com uma sequência de nucleotídeos que contém a sequência de nucleotídeos mostrada em uma das SEQ ID NOs:5 a 7 ou parte delas,

respectivamente. Aqui, uma sequência de nucleotídeos que "hibridiza sob condições severas" refere-se a, por exemplo, um polinucleotídeo que é hibridizada por uma técnica de hibridização conhecida (Current Protocols I Molecular Biology edit. Ausubel *et al.*, (1987) Publish. John Wily & Sons, Section 6.3 a 6.4) ou similares, como o uso, como sonda(s), de um ou uma pluralidade de polinucleotídeos selecionados tendo pelo menos 20, de preferência 25, com maior preferência pelo menos 30 nucleotídeos consecutivos arbitrários da sequência de nucleotídeos original. Aqui, condições severas podem ser alcançadas, por exemplo, ao realizar a hibridização na presença de 50% de formamida a uma temperatura de hibridização de 37°C, 42°C para condição mais severa, 65°C para condição ainda mais severa, e lavar o resultante com uma solução de 0,1× a 2× de SSC (citrato de salina-sódio) (composição de solução de 1× SSC: 150 mM de cloreto de sódio e 15 mM de citrato de sódio).

A presente invenção também inclui um transformante obtido pela introdução do polinucleotídeo descrito acima ou construção de DNA em uma célula hospedeira. A célula hospedeira não é particularmente restrita, contanto que retenha de maneira estável o polinucleotídeo ou construção de DNA, e os exemplos dos mesmos incluem bactérias como *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* e bactérias de ácido láctico; levedura; células de inseto; células animais; e células vegetais; e levedura é de preferência, usada já que é resistente a ácido e capaz de crescer mesmo quando ácido D-lático é altamente produzido pela expressão de um polipeptídeo que tem uma atividade de D-LDH.

Exemplos da levedura incluem aquelas pertencentes aos gêneros *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Candida*, *Pichia*, *Hansenura*, *Yarrowia*, *Zygosaccharomyces*, *Torulopsis*, *Debaryomyces*, *Issachenkia* e *Fellomyces*; entretanto, de preferência, a levedura é uma pertencente ao gênero *Saccharomyces*, *Candida* ou *Kluyveromyces*, com mais

preferência, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida utilis*, *Candida glabrata*, *Candida albicans*, *Candida boidinii*, *Candida sonorensis*, *Kluyveromyces lactis* ou *Kluyveromyces marxianus*.

Ademais, uma levedura poliplóide é, de preferência, usada na
5 presente invenção já que pode manter de maneira estável uma alta
produtividade de ácido D-lático por um período prolongado sob condições
simples, de modo que o ácido D-lático possa ser produzido de maneira estável
a um baixo custo. Aqui, o termo "levedura poliplóide" refere-se à levedura que
tem 2 ou mais conjuntos de cromossomos na célula. O número de conjuntos de
10 cromossomos na levedura poliplóide não é particularmente restrito; entretanto,
a levedura diplóide que tem 2 conjuntos de cromossomos é preferida.
Exemplos da levedura poliplóide incluem as leveduras de padeiro, leveduras de
saquê, leveduras de vinho e leveduras de cerveja que são frequentemente
usadas na indústria de fermentação. A levedura poliplóide a ser usada pode ser
15 uma isolada de um ambiente natural ou uma cujas propriedades são
parcialmente modificadas por mutação ou recombinação de gene.

Ademais, na presente invenção, uma levedura prototrófica é, de
preferência, usada, já que não só permite o uso de um meio de cultura que
contém menos nutrientes do que o meio convencional, ou seja, um meio de
20 baixo custo, mas também permite a manutenção estável de uma alta
produtividade de ácido D-lático por um período prolongado sob condições de
operação simples, de modo que o ácido láctico possa ser produzido de maneira
estável a um baixo custo. Aqui, o termo "auxotrófico" significa que uma
mutação ocorreu em um gene de síntese de nutriente de levedura do tipo
25 selvagem por alguma razão, resultando em uma deficiência na capacidade de
sintetizar o nutriente. Ou seja, "levedura prototrófica" é uma que não tem o
genótipo exibindo auxotrofia ou uma em que tal genótipo é complementado.
Exemplos de um método para o preparo de uma levedura prototrófica ao

reverter à auxotrofia de uma levedura auxotrófica incluem um método em que uma auxotrofia é revertida pela introdução de um gene de síntese de nutriente por uma técnica de recombinação de gene; e um método em que os processos de acoplar leveduras que têm auxotrofias diferentes uma à outra, permitindo a
5 formação de asco e revertendo uma auxotrofia alvo, são repetidos até que todas as auxotrofias sejam eventualmente revertidas para obter uma levedura prototrófica. Nota-se aqui que se uma levedura é ou não prototrófica pode ser julgado com base em se a levedura é ou não capaz de crescer em um meio SD, o que é um meio mínimo para leveduras.

10 Além disso, a levedura é um micro-organismo que realiza de forma vigorosa a fermentação de etanol, e na trajetória metabólica da mesma, o ácido pirúvico, que é um produto glicolítico, é convertido em acetaldeído por piruvato descarboxilase, que é, então, convertido em etanol por álcool desidrogenase. Portanto, prefere-se que a cepa de levedura em que o gene de
15 piruvato descarboxilase serve como ponto de partida da trajetória metabólica do etanol é destruída seja usada como hospedeira, já que isso permite que o ácido pirúvico, que deveria ser naturalmente metabolizado na trajetória metabólica de etanol, seja usado na trajetória metabólica de ácido D-lático.

Particularmente no caso de *Saccharomyces cerevisiae*, há três
20 tipos de genes que codifica uma piruvato descarboxilase: gene de piruvato descarboxilase 1 (PDC1), gene de piruvato descarboxilase 5 (PDC5) e gene de piruvato descarboxilase 6 (PDC6). Dentre esses genes, apenas o PDC1 e o PDC5 são considerados como tendo atividade de piruvato desidrogenase na célula de levedura; portanto, é preferível que uma cepa que tenha destruído o
25 gene PDC1 ou o gene PDC5 seja usada e é mais preferível que uma cepa que tenha destruído o gene PDC1 seja usada. Além disso, conforme descrito em JP 2008-048726A, na cepa que destruiu o gene PDC1, uma cepa que tem um gene PDC5 do tipo mutante, que inclui uma mutação resultante em uma

diminuição na atividade de PDC5, é preferível, e uma cepa que tem um gene PDC5 do tipo mutante sensível à temperatura é mais preferível. Aqui, o "gene PDC5 do tipo mutante sensível à temperatura" se refere a um PDC5 do tipo mutante que tem uma propriedade de exibir uma atividade de piruvato

5 descarboxilase comparável àquela do PDC5 do tipo selvagem a uma certa temperatura de cultura, mas exibe uma deleção de ou diminuição na atividade de PDC5 quando a temperatura de cultura é modificada para não menos que a temperatura de cultura certa. A temperatura de cultura normal de *Saccharomyces cerevisiae* é de 28 a 30°C e é preferida à temperatura na qual

10 tal sensibilidade à temperatura é exibida por estar próxima à temperatura de cultura normal, já que isso torna a quantidade de calor necessária para a modificação da temperatura de cultura menor, de modo que o custo de cultura possa ser reduzido. Em particular, é preferido que o PDC5 do tipo mutante sensível à temperatura exiba a sensibilidade à temperatura a uma temperatura

15 não menor que 34°C.

Exemplos de um método para permitir que um polipeptídeo tenha uma atividade de D-LDH a ser expressa em uma levedura transformada ao introduzir o polinucleotídeo descrito acima ou construção de DNA na levedura incluem, conforme já descrito, um método em que um vetor que contém a

20 construção de DNA seja introduzido de maneira extracromossomal em uma levedura e um método em que o polinucleotídeo ou construção de DNA seja introduzido em um cromossomo de levedura, e ambos os métodos podem ser empregados.

No método de introdução do polinucleotídeo descrito acima em

25 um cromossomo de levedura, uma construção que contém o polinucleotídeo da presente invenção e um segmento de DNA para a recombinação homóloga, cuja sequência é homóloga àquela do cromossomo de levedura (daqui em diante, também chamada de "construção de DNA para recombinação

homóloga") pode ser preferencialmente usado. O segmento de DNA para recombinação homóloga tem uma sequência de DNA que é homóloga àquela na proximidade do sítio alvo no cromossomo de levedura ao qual o polinucleotídeo da presente invenção deve ser introduzido. A construção
5 contém pelo menos um, de preferência dois tais segmentos de DNA para a recombinação homóloga. Em casos em que a construção contém dois segmentos de DNA para a recombinação homóloga, é preferível que os dois segmentos de DNA para a recombinação homóloga tenham, cada um, uma sequência de DNA homóloga ao DNA a jusante ou a montante do sítio alvo
10 localizado no cromossomo e que o polinucleotídeo da presente invenção esteja ligado entre esses segmentos de DNA.

O método de realização da recombinação homóloga com o uso da construção de DNA para a recombinação homóloga não é particularmente restrito, e um método em que a construção de DNA para a recombinação
15 homóloga é ampliada por PCR e o fragmento de PCR resultante é inserido em um plasmídeo que é, então, introduzido em uma levedura ou um método em que o fragmento de PCR é introduzido em uma levedura pode ser empregado. Ademais, é preferível que a construção de DNA para a recombinação homóloga contenha um terminador para regular a expressão do polinucleotídeo
20 da presente invenção. Aqui, o "terminador" significa uma sequência que termina a transcrição de mRNA a partir de um gene e normalmente se refere a uma sequência a jusante da terminação 3' do gene existente no cromossomo.

Além disso, é preferível que a construção de DNA para a recombinação homóloga contenha, além do polinucleotídeo ou construção de
25 DNA da presente invenção, um marcador seletivo para marcar a seleção de levedura transformada facilmente. Exemplos do marcador seletivo usado aqui incluem genes completos auxotróficos, como URA3 e TRP1 e genes resistentes a fármaco, como gene resistente a G418 e gene resistente a

neomicina.

Uma construção de DNA para a recombinação homóloga que contém o polinucleotídeo descrito acima, o terminador e o marcador seletivo podem ser feitos por PCR de acordo com, por exemplo, as seguintes etapas de
5 1 a 3.

Etapa 1: Com o uso de um plasmídeo em que um terminador é ligado à jusante do polinucleotídeo da presente invenção como modelo e os iniciadores 1 e 2 como conjunto de iniciadores, um fragmento que contém o polinucleotídeo da presente invenção e o terminador é amplificado por PCR. O
10 iniciador 1 é projetado de tal maneira a adicionar uma sequência não menor que 40 bp de complementaridade a montante do sítio alvo de introdução, e o iniciador 2 é projetado com base em uma sequência originada do plasmídeo que é localizado a jusante do terminador.

Etapa 2: Com o uso de um plasmídeo que tem um marcador
15 seletivo, como pRS400, pRS424 ou pRS426 como modelo e iniciadores e 4 como o conjunto de iniciador, um fragmento que contém o marcador seletivo é ampliado por PCR. O iniciador 3 é projetado de tal maneira a adicionar uma sequência de não menos que 30 bp que tem uma homologia a uma sequência localizada a jusante do terminador do fragmento de PCR obtido na etapa 1, e o
20 iniciador 4 é projetado de tal maneira a adicionar uma sequência de não menos que 40 bp correspondente a jusante do sítio alvo de introdução.

Etapa 3: Com o uso de uma mistura dos fragmentos de PCR obtidos nas etapas 1 e 2 como modelo e iniciadores 1 e 4 como o conjunto de iniciador, a PCR é realizada para obter uma construção de DNA para a
25 recombinação homóloga que contém o polinucleotídeo da presente invenção, terminador e marcador seletivo de levedura, em que as sequências correspondentes a montante e a jusante do sítio alvo de introdução são adicionadas a ambas as respectivas extremidades.

Para introduzir a construção de DNA descrita acima para a recombinação homóloga em uma levedura, um método, como a transfecção, co-transfecção ou eletroporação pode ser empregado. Os exemplos específicos incluem um método que usa acetato de lítio e método de
5 protoplasto.

Ao introduzir o polinucleotídeo descrito acima em um cromossomo de levedura por recombinação homóloga, a introdução é realizada de tal maneira que o polinucleotídeo possa ser regulado por um promotor de um gene endógeno localizado no cromossomo de levedura. Nesse caso, pela introdução
10 do polinucleotídeo descrito acima, o gene endógeno a ser naturalmente regulado pelo promotor pode ser simultaneamente destruído e o polinucleotídeo exógeno da presente invenção pode ser expresso no lugar desse gene endógeno. Esse método é particularmente útil quando o promotor é um promotor de alta expressão em levedura, conforme descrito acima, e
15 quando um gene endógeno que funciona para inibir a trajetória metabólica de ácido D-lático de levedura deve ser destruído.

Exemplos preferíveis do gene endógeno que serve como alvo quando se introduz o polinucleotídeo descrito acima em um cromossomo de levedura incluem gene de fosfatase ácida (PHO5), genes para gliceraldeído-3-
20 fosfato desidrogenase (TDH1, 2 e 3), genes de álcool desidrogenase (ADH1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7), genes relacionados ao metabolismo de galactose (GAL1, 7 e 10), gene de citocromo c (CYC1), gene de triose-fosfato isomerase (TPI1), gene de fosfoglicerato quinase (PGK1), gene de fosfofructose quinase (PFK1) e genes de piruvato descarboxilase (PDC1, 5, 6), assim como promotores de
25 gene de enolase-1 (ENO1), gene de proteína relacionada à parede celular 2 (CWP2) e gene de supressão de defeito exponencial 1 (SED1) que são descritos e usados no pedido internacional PCT/JP 2008/072129 e exibem uma quantidade de expressão genética de não menos que 5 vezes o padrão em

relação à quantidade de expressão de todos os genes após 50 horas ou posteriormente a partir do início da cultura de levedura. Em particular, exemplos mais preferíveis incluem os genes PDC1 e TDH3, que são altamente expressos na trajetória de fermentação de etanol de levedura; e o gene SED1, que é altamente expresso em uma levedura cultivada por um período prolongado. Conforme descrito acima, é ainda mais preferível que o polinucleotídeo descrito acima seja introduzido de tal maneira a destruir pelo menos o gene PDC1 servindo como o ponto de partida da trajetória de fermentação de etanol ou gene PDC5, de preferência, o gene PDC1, já que isso permite que o ácido pirúvico metabolizado na trajetória metabólica de etanol seja usado na trajetória metabólica de ácido D-lático.

Ademais, já que o método de introdução da construção de DNA descrita acima em um cromossomo de levedura, da mesma maneira como no caso da introdução do polinucleotídeo descrito acima em um cromossomo de levedura, uma construção de DNA para a recombinação homóloga pode ser preparado e introduzido em um sítio intencionado localizado no cromossomo por recombinação homóloga. Nota-se que, já que a construção de DNA descrita acima já contém um promotor capaz de expressar o polinucleotídeo descrito acima, não é necessário realizar a introdução da construção de DNA de tal maneira que o polinucleotídeo descrito acima possa ser regulado por um promotor de um gene endógeno localizado no cromossomo de levedura.

Aqui, se o polinucleotídeo descrito acima ou construção de DNA foi introduzido ou não na posição desejada no cromossomo de levedura pode ser confirmado por PCR ou método de hibridização Southern. Por exemplo, a confirmação pode ser realizada pelo preparo de DNA a partir de uma levedura transformada e realização de PCR com uma introdução de iniciador específico de sítio, seguido pela detecção da banda esperada pela realização de eletroforese para o produto de PCR resultante. Alternativamente, a confirmação

pode ser realizada pela realização de PCR com um iniciador marcado com um corante fluorescente ou similares. Esses métodos são conhecidos para aqueles técnicos no assunto.

A presente invenção também inclui um método de produção de
5 ácido D-lático que compreende a etapa de cultivar o transformante descrito acima. Quando o transformante descrito acima é cultivado, a expressão de um polipeptídeo que tem uma atividade de D-LDH é novamente fornecida ou aprimorada no transformante e, portanto, a trajetória metabólica de ácido D-lático é novamente fornecida ou aprimorada. Como consequência, o ácido D-
10 lático pode ser obtido pela realização da etapa de separação de ácido D-lático da cultura. O termo "cultura" usado aqui abrange um sobrenadante de cultura, assim como transformante e homogenato do mesmo.

O método de cultivar o transformante descrito acima não é particularmente restrito e um método conhecido é empregado. Por exemplo,
15 como o método de cultivar a levedura transformada descrita acima, um descrito em "M.D. Rose *et al.*, 'Methods In Yeast Genetics', Cold Spring Harbor Laboratory Press (1990)" ou similares podem ser empregados. Aqui, em casos em que um plasmídeo que contém a construção de DNA descrita acima ou construção de DNA para a recombinação homóloga contém um marcador
20 seletivo, ao cultivar o transformante descrito acima em um meio livre de nutrientes ou meio suplementado com fármaco, dependendo do marcador seletivo, um transformante desejado pode ser selecionado.

Como meio em que o transformante descrito acima é cultivado, contanto que contenha uma fonte de carbono, fonte de nitrogênio, sais
25 inorgânicos e similares que possam ser utilizados pelo transformante e permitem a cultura eficiente do mesmo, qualquer meio natural ou sintético pode ser usado. Por exemplo, no caso de uma levedura transformada, como a fonte de carbono, os carboidratos, como glicose, frutose, sacarose, galactose,

maltose, rafinose, trealose, sorbose, celobiose, lactose, melibiose, melesitose, inulina, xilose, arabinose, ribose, ramnose, glucosamina, eritritol, ribitol, manitol, glucitol, salicina e amido; os ácidos orgânicos, como ácido acético, ácido propiônico e ácido cítrico; e álcool, como etanol e propanol, podem ser usados.

- 5 Como a fonte de nitrogênio, além dos sais de amônio de um ácido inorgânico ou orgânico, como amônia, cloreto de amônio, sulfato de amônio, acetato de amônio e fosfato de amônio e outros compostos que contêm nitrogênio, peptona, extrato de carne, água de maceração de milho e similares podem ser usados. Como composto inorgânico, fosfato monopotássico, fosfato de
- 10 magnésio, sulfato de magnésio, cloreto de sódio, sulfato ferroso, sulfato de manganês, sulfato de cobre, carbonato de cálcio e similares podem ser usados.

Na cultura do transformante descrito acima, normalmente, a condição da mesma é determinada como uma em que uma boa produtividade de ácido láctico é obtida, variando de uma condição aeróbica, como cultura com

15 agitação ou cultura com aeração e agitação, a uma condição anaeróbica em que a aeração não é realizada, e a cultura é, de preferência, realizada sob uma condição microaeróbica ou condição anaeróbica. A cultura pode ser realizada a uma temperatura de cultura de 25 a 37°C; entretanto, uma temperatura de 28 a 35°C é preferível. Já que o pH da cultura diminui conforme o ácido D-lático é

20 acumulado no meio, ele também pode ser neutralizado por uma substância alcalina como um hidróxido de cálcio, carbonato de cálcio, hidróxido de sódio, hidróxido de potássio, amônia aquosa ou gás de amônia. Ademais, para facilitar a purificação subsequente do ácido láctico, a cultura também pode ser realizada sem tal neutralização. Além disso, o método de cultura não é

25 particularmente restrito, contanto que possa produzir de maneira fermentativa o ácido D-lático de interesse, e cultura em batelada, cultura alimentada em batelada, cultura de quimiostato, cultura contínua ou similares pode ser empregada. De preferência, a cultura é realizada como cultura em batelada ou

como cultura contínua com o uso de uma membrana descrita em WO2007/097260, em que a cultura de fermentação é separada em filtrado e não-filtrado com o uso de uma membrana de separação não inclinada à coagulação e um produto de fermentação desejado é coletado do filtrado, e, ao mesmo tempo, o não-filtrado é retido ou refluxado para a cultura de fermentação.

O método de medição de ácido D-lático obtido na cultura descrita acima não é particularmente restrito, e exemplos do mesmo incluem um método com o uso de HPLC e um método que usa o kit F (fabricado pela Roche).

O ácido D-lático contido na cultura de fermentação descrita acima pode ser separado e purificado por uma combinação daqueles métodos de concentração, destilação, cristalização e similares convencionalmente conhecidos, e exemplos dos mesmos incluem um método em que o pH de líquido de fermentação separado e filtrado é ajustado para não ser mais alto que 1, seguido da extração com dietil éter, acetato de etila ou similares; um método em que se permite que o ácido lático absorva a uma resina de troca de íon seguido pela lavagem e eluição; um método em que se permite que o ácido lático reaja com um álcool na presença de um catalisador ácido para obter um éster, que é, então, destilado; um método em que o ácido lático é cristalizado na forma de um sal de cálcio ou sal de lítio; e um método de separação e purificação em que o nanofiltro apresentado em WO2009/004922 e a destilação são usados em combinação.

EXEMPLOS

Os modos para executar a presente invenção serão agora descritos a título de exemplo; entretanto, esses modos são meramente exemplos da presente invenção e a presente invenção não é restrita aos mesmos.

EXEMPLO 1

SEQUENCIAMENTO DE NUCLEOTÍDEOS DE POLINUCLEOTÍDEOS ORIGINADOS A PARTIR
DE *LIMULUS POLYPHEMUS* QUE CODIFICA UM POLIPEPTÍDEO QUE TEM UMA ATIVIDADE
DE D-LDH (DAQUI EM DIANTE, CHAMADA DE "GENES DE D-LDH ORIGINADOS DE
LIMULUS POLYPHEMUS")

Para a preparação de cDNAs de *Limulus polyphemus*, poliA (+) RNA foi purificado. O poliA (+) RNA foi isolado dos hemócitos de *Limulus polyphemus*. O RNA total foi separado dos hemócitos de *Limulus polyphemus* (adquirido junto ao Marine Biological Laboratory (EUA)), de acordo com o método AGPC (consultar Experimental Medicine Vol. 9 (1991), p.1937 a 1940). O poliA (+) RNA foi isolado do, então, RNA total separado como uso de "Kit Oligotex-dT30 Super" (fabricado por Takara Bio Inc.). A seguir, com o uso de "Transcriptase Reversa SuperScript II" (fabricado por Invitrogen) e oligo d (T) como iniciador, os cDNAs foram sintetizados. Então, com o uso da então obtida solução de reação como modelo e os oligo DNAs mostrados na SEQ ID NOs:8 e 9 como iniciadores, sendo que os oligo DNAs foram projetados com atenção dada às sequências de DNA altamente conservadas nos genes de D-LDH, a PCR foi realizada para amplificar as sequências parciais dos genes D-LDH originados de *Limulus polyphemus*. A PCR foi realizada sob as seguintes condições: 95°C (3 minutos); {95°C (30 segundos) - 45°C (30 segundos) - 72°C (30 segundos)} × 35 ciclos; 72°C (5 minutos). Portanto, os então ampliados segmentos de DNA foram verificados por eletroforese com o uso de 1,0% de gel de agarose, e depois de purificar um fragmento ampliado de 600 bp com o uso de "kit de extração rápida de gel QIA" (fabricado por Qiagen), esse fragmento foi clonado em um vetor de plasmídeo "pGEMt-fácil" (fabricado por Promega) e o DNA foi sequenciado. O sequenciamento de nucleotídeo foi realizado com o uso de "Kit de Sequenciamento de Ciclo de Terminador Taq DyeDeoxy" (fabricado por Applied Biosystems) de acordo com o método de

Sanger. Como consequência, dois tipos de sequências parciais (D-LDH1 e D-LDH2), que são consideradas como correspondentes aos genes de D-LDH que originaram de *Limulus polyphemus* foram obtidos.

A seguir, com o uso de métodos 5' RACE e 3' RACE, todas as
5 sequências ORF de D-LDH1 e D-LDH2 foram esclarecidas. O 5' RACE foi
realizado pelo seguinte método. Primeiro, 50 µL do oligo DNA mostrado na
SEQ ID NO:10 (para D-LDH1) ou SEQ ID NO:11 (para D-LDH2) foi ajustado
para 100 µM, 50 unidades de T4 polinucleotídeo quinase (fabricada por Takara
Bio Inc.), 10 µL de 10× tampão de quinase (500 mM de Tris-HCl pH7,6, 100
10 mM de MgCl₂, 50 mM de DTT, 1 mM de espermidina, 1 mM de EDTA), 1 µL de
100 mM ATP e 34 µL de água destilada foram misturados e deixou-se que
descansassem a 37°C por 1 hora para fosforilar a terminação 5' do oligo DNA,
e esse oligo DNA foi purificado pela realização de um tratamento de álcool
fenol-clorofórmio-isoamil e precipitação de etanol. A seguir, com o uso de poli A
15 (+) RNA de *Limulus polyphemus* como modelo, "Transcriptase Reversa
SuperScript II" (fabricado por Invitrogen) e o oligo DNA fosforilado descrito
acima como iniciadores, o cDNA foi sintetizado. Posteriormente, o cDNA de fita
única foi concatemerizado por reação de ligação com o uso de "Conjunto de
Núcleo RACE 5'-completo" (fabricado por Takara Bio Inc.) e a primeira PCR foi
20 realizada com o uso do cDNA concatemerizado produzido dessa forma como
modelo e o oligo DNAs mostrado na SEQ ID NOs:12 e 13 (para D-LDH1) ou
aqueles mostrados na SEQ ID NOs:14 e 15 (para D-LDH2) como iniciadores.
Ademais, a segunda PCR foi realizada com o uso da solução de reação
resultante como modelo e os oligo DNAs mostrados na SEQ ID NOs:16 e 17
25 (para D-LDH1) ou aqueles mostrados na SEQ ID NOs:18 e 19 (para D-LDH2)
como iniciadores. A verificação e purificação dos fragmentos ampliados e do
sequenciamento de nucleotídeo dos mesmos foi realizada conforme descrito
acima.

O 3' RACE foi realizado pelo método a seguir. Primeiramente, com o uso do poli A (+) RNA de *Limulus polyphemus* como modelo, "Transcriptase Reversa SuperScript II" (fabricada por Invitrogen) e oligo d (T) como iniciador, o cDNA foi sintetizado. A seguir, com o uso dessa solução de
 5 reação como modelo e o oligo d (T) e o oligo de DNA mostrados na SEQ ID NO:13 (para D-LDH1) ou SEQ ID NO:15 (para D-LDH2) como iniciadores, a primeira PCR foi realizada. Adicionalmente, a segunda PCR foi realizada com o uso da solução de reação resultante como modelo e do oligo d (T) e do oligo de DNA mostrados na SEQ ID NO:17 (para D-LDH1) ou SEQ ID NO:19 (para D-
 10 LDH2) como iniciadores. A verificação e purificação dos fragmentos ampliados e o sequenciamento de nucleotídeo dos mesmos foram realizados conforme descrito acima.

A sequência de aminoácidos (SEQ ID NO:1) do gene D-LDH originado a partir de *Limulus polyphemus* e a sequência ORF de cDNA (SEQ
 15 ID NO:3), ou a sequência de aminoácidos (SEQ ID NO:2) do D-LDH2 e a sequência ORF de cDNA (SEQ ID NO:4) foram determinadas através da ligação das sequências obtidas no método descrito acima. É observado aqui que as identidades de sequência entre as sequências de aminoácido mostradas nas SEQ ID NOs:1 e 2 e entre as sequências de nucleotídeo
 20 mostradas nas SEQ ID NOs:3 e 4 foram determinadas por BLAST para serem 93% e 82%, respectivamente.

EXEMPLO 2

CONSTRUÇÃO DE UM PLASMÍDEO QUE EXPRESSA OS GENES D-LDH ORIGINADOS A

PARTIR DE *LIMULUS POLYPHEMUS*

25 Usando, como um conjunto de iniciadores, os oligos de DNA mostrados nas SEQ ID NOs:20 e 21 ou aqueles mostrados nas SEQ ID NOs:22 e 23, que correspondem respectivamente ao lado 5' da ORF e ao lado 3' da ORF do gene D-LDH e gene D-LDH2 que foram sequenciados no

Exemplo 1 e são considerados como sendo os genes D-LDH originados a partir de *Limulus polyphemus* (doravante no presente documento, denominados como "gene D-LDH Lp." e "gene D-LDH2 Lp.", respectivamente) e, como modelo, o cDNA sintetizado a partir do poli A (+) RNA de *Limulus polyphemus*, a PCR foi realizada para clonar os genes. Então, os fragmentos de DNA obtidos foram digeridos com enzimas de restrição XhoI e NotI e introduzidos nos sítios de clivagem do vetor pTRS11 de expressão de levedura (que carrega o promotor TDH3 e o marcador seletivo gene URA3; consultar JP 2006-280368A: aqui é observado que, neste, o promotor e terminador TDH3 são indicados como promotor e terminador GAPDH), que foi digerido no mesmo modo com as enzimas de restrição XhoI e NotI, para preparar os vetores de plasmídeo que contêm uma construção de DNA no qual o promotor TDH3 e o gene D-LDH Lp. ou gene D-LDH2 Lp. são ligados. Doravante no presente documento, esses vetores de plasmídeo são denominados como "pTRS205" (que carrega o D-LDH1 Lp.) e "pTRS206" (que carrega o D-LDH2 Lp.). Aqui, o vetor pTRS11 foi preparado pela digestão do vetor pNV11 (ver Nature, vol. 357, 25 JUNE 1992, p.700) com a enzima de restrição XhoI e, após a remoção de inserções, permitiu-se que o mesmo se auto-ligasse.

EXEMPLO 3

INTRODUÇÃO DO PLASMÍDEO QUE EXPRESSA OS GENES D-LDH ORIGINADOS A PARTIR DE *LIMULUS POLYPHEMUS* EM LEVEDURA

O pTRS205 e pTRS206 obtidos conforme descrito no Exemplo 2, foram introduzidos na cepa SW029-1B de *Saccharomyces cerevisiae* de levedura (genótipo: MATa ura TRP(Δ pdcl1::TRP1) his ade lys leu) (doravante no presente documento, denominada como "cepa SW029-1B"). A introdução dos plasmídeos foi executada por um método de acetato de lítio usando "Sistema de Transformação de Levedura YEASTMAKER" (fabricado por Clontech) (para detalhes, ver o protocolo em anexo). A cepa SW029-1B

usada como a hospedeira é uma cepa com ausência da capacidade de síntese de uracila e, através da ação do marcador seletivo gene URA3 do pTRS205 e 206 transformou a levedura na qual o pTRS205 e pTRS206 foram introduzidos, pode ser selecionada em um meio livre de uracila. A introdução dos vetores
5 que expressam o gene D-LDH nos transformantes obtidos nesse modo foi confirmada pela extração do DNA genômico contendo DNA de plasmídeo a partir dos transformantes cultivados em um meio líquido livre de uracila usando um kit de extração de DNA genômico "Dr. GenTLE" (fabricado por Takara Bio Inc.) e realizando a PCR com o uso do então extraído DNA genômico como
10 modelo. Como iniciadores, aqueles que foram usados para clonar os genes D-LDH originados a partir de *Limulus polyphemus* foram empregados, respectivamente. Como resultado, foi confirmado que cada um dos genes D-LDH originados a partir de *Limulus polyphemus* foi introduzido respectivamente em todas as células de levedura transformada.

EXEMPLO 4

TESTE DE PRODUTIVIDADE 1 DE ÁCIDO D-LÁTICO

Com o uso das cepas SW029-1B de *Saccharomyces cerevisiae* obtidas conforme descrito no Exemplo 3 nas quais o pTRS205 e 206 foram introduzidos (doravante no presente documento, denominados como "cepa
20 SW029-1B/pTRS205" e "cepa SW029-1B/pTRS206", respectivamente), o teste de produtividade de ácido D-lático foi executado.

O meio de SC3 que tem a composição mostrada na Tabela 1 a partir da qual a uracila foi removida (meio de SC3-Ura) foi adicionado em tubos de teste em uma quantidade de 10 ml. Uma pequena quantidade de cada cepa
25 foi inoculada nos mesmos e cultivada de um dia para o outro a 30°C (pré-cultura). A seguir, 10 ml de meio de SC3-Ura foram adicionados em tubos de teste e 100 µl de cada do meio de pré-cultura já obtido foram inoculados nos mesmos, seguido da cultura a 30°C com agitação (cultura principal). Após 40

horas desde o início da cultura principal, o meio de cultura foi centrifugado e o ácido láctico nos sobrenadantes resultantes foi medido por HPLC sob as condições a seguir:

Coluna: "Shim-Pack SPR-H" (fabricada por Shimadzu Corporation)

Fase móvel: 5 mM de ácido p-toluenosulfônico (taxa de fluxo = 0,8 ml/min)

Solução de reação: 5 mM de ácido p-toluenosulfônico, 20 mM de Bistris, 0,1 mM de EDTA·2Na (taxa de fluxo = 0,8 ml/min)

Método de detecção: eletrocondutividade

Temperatura: 45°C.

Em adição, com base nos resultados de medição das concentrações de ácido D-lático e ácido L-lático através do método de HPLC sob as condições a seguir, a pureza óptica do ácido D-lático foi calculada com o uso das seguintes equações.

Coluna: "TSK-gel Enantio LI" (marca registrada: fabricada por Tosoh Corporation)

Fase móvel: 1 mM de solução de sulfato de cobre aquosa

Taxa de fluxo: 1,0 ml/min

Método de detecção: UV 254 nm

Temperatura: 30°C

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

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

Nas equações acima, L representa a concentração de ácido L-lático e D representa a concentração de ácido D-lático.

TABELA 1

Glicose	100	g/l
Sulfato de amônio	1,5	g/l

Nitrogênio Levedura Base sem aminoácido e sulfato de amônio (fabricados por Difco)	1,7	g/l
19 aminoácidos padrão diferentes de leucina	152	mg/l
Leucina	760	mg/l
Inositol	152	mg/l
p-aminobenzoato	16	mg/l
Adenina	40	mg/l
Uracila	152	mg/l

Como resultado, a concentração do ácido D-lático acumulado foi de 13 g/l para a cepa SW029-1B/pTRS205 e 12 g/l para a cepa SW029-1B/pTRS206. Em adição, apenas o ácido D-lático foi detectado no meio de cultura e o nível de ácido L-lático não foi superior ao limite de detecção. Foi confirmado que a levedura transformada foi capaz de produzir ácido D-lático introduzindo na mesma os genes D-LDH clonados de *Limulus polyphemus*.

EXEMPLO 5

INTRODUÇÃO DOS GENES D-LDH ORIGINADOS A PARTIR DE *LIMULUS POLYPHEMUS* EM CROMOSSOMO DE LEVEDURA

Através das etapas 1 a 3 a seguir, uma construção de DNA para recombinação homóloga que contém os genes D-LDH originados a partir de *Limulus polyphemus* foi preparado.

ETAPA 1

Usando o pTRS205 que carrega o gene D-LDH Lp. e o pTRS206 que carrega o gene D-LDH2 Lp. que foram obtidos no Exemplo 2 como modelos e os oligos de DNA mostrados nas SEQ ID NOs:24 e 25 ou aqueles mostrados nas SEQ ID NOs:26 e 25 como conjunto de iniciadores, a PCR foi

realizada para ampliar os fragmentos de DNA obtidos de cerca de 1,1 kb contendo cada um dos genes D-LDH. Aqui, os oligos de DNA mostrados nas SEQ ID NOs:24 e 26 foram projetados de tal maneira que uma sequência que tem uma homologia para a região 65 bp a montante do gene PDC1 seja
5 adicionada.

ETAPA 2

A seguir, com o uso do plasmídeo pRS424 (Número de Acesso GenBank: U03453) como modelo e os oligos de DNA mostrados nas SEQ ID NOs:27 e 28 como conjunto de iniciadores, a PCR foi realizada para ampliar
10 um fragmento de DNA de cerca de 1,4 kb contendo o gene TRP1, que é um marcador de deleção de levedura. Aqui, o oligo de DNA mostrado na SEQ ID NO:28 foi projetado de tal maneira que uma sequência que tem uma homologia para a região 65 bp a jusante do gene PDC1 seja adicionada.

ETAPA 3

15 Após a separação dos fragmentos de DNA obtidos através de 1% de eletroforese em gel de agarose, esses foram purificados usando "kit de extração em gel rápido de QIA" (fabricado por Qiagen). Usando uma mistura dos fragmentos assim obtidos de 1,1 kb que contêm os genes D-LDH respectivos e fragmentos de 1,4 kb que contêm o gene TRP1 como modelo e
20 os oligos de DNA mostrados nas SEQ ID NOs:24 e 28 ou aqueles mostrados nas SEQ ID NOs:26 e 28 como conjunto de iniciadores, a PCR foi realizada para ampliar uma construção de DNA de cerca de 2,5 kb usada para recombinação homóloga na qual cada um dos genes D-LDH, terminador TDH3 e gene TRP 1 foram ligados.

25 A construção de DNA para a recombinação homóloga preparada no modo descrito acima foi transformada em cepa SW092-2D de *Saccharomyces cerevisiae* (doravante no presente documento, denominada como "cepa SW092-2D"), que é uma cepa NBRC10505 de *Saccharomyces*

cerevisiae (doravante no presente documento, denominada como "cepa NBRC10505") na qual a auxotrofia para lisina é revertida.

A cepa SW092-2D foi preparada pelo método a seguir. Usando o DNA genômico da cepa BY4741 de *Saccharomyces cerevisiae* fabricada por Funakoshi Corporation como modelo e os oligonucleotídeos (SEQ ID NOs:29 e 30) como conjunto de iniciadores, a PCR foi realizada para ampliar um fragmento de PCR de cerca de 2 kb que corresponde à metade do último citado do gene LYS2. Após a separação do fragmento de PCR por 1% de eletroforese em gel de agarose e purificação do mesmo de acordo com um método convencional, o fragmento de PCR foi transformado na cepa NBRC10505 para cancelar a mutação âmbar no gene LYS2. Através da cultura da cepa de levedura em um meio livre de lisina, um transformante no qual a capacidade de síntese de lisina foi revertida (cepa NBRC10505(LYS2)) foi selecionado. Com a finalidade de confirmar que o então obtido transformante é uma levedura na qual a mutação âmbar no gene LYS2 foi cancelada, as etapas a seguir foram executadas. Primeiramente, as células diploides foram obtidas pelo acoplamento do então transformante obtido com a cepa LOGY7 de *Saccharomyces cerevisiae* que tem o gene LYS2 do tipo selvagem e as células diploides foram cultivadas em um meio de formação de asco para permitir a formação de asco. Os ascos resultantes foram anatomizados com o uso de um micromanipulador para obter células haploides respectivas (tétrades) e a auxotrofia foi examinada para cada uma das células haploides. Foi confirmado que todas dentre as então obtidas células haploides têm a capacidade de síntese de lisina. As então obtidas cepa NBRC10505(LYS2) e cepa NBRC10506 foram acopladas e os ascos resultantes foram anatomizados com o uso de um micromanipulador para obter a cepa SW092-2D (genótipo: MATa ura3 leu2 trp1 his3 ade2 LYS2).

A cepa SW092-2D foi transformada com a construção de DNA descrita acima para a recombinação homóloga e cultivada em um meio livre de triptofano para selecionar leveduras transformadas. As leveduras transformadas obtidas nesse modo são denominadas doravante no presente documento como "cepa SW092-2D (Δ pd₁::Lp.D-LDH1-TRP1)" e "cepa SW092-2D (Δ pd₁::Lp.D-LDH2-TRP1)".

EXEMPLO 6

TESTE DE PRODUTIVIDADE 2 DE ÁCIDO D-LÁTICO

Usando a cepa SW092-2D (Δ pd₁::Lp.D-LDH1-TRP1), cepa SW092-2D (Δ pd₁::Lp.D-LDH2-TRP1) e um fermentador de mini-jarra (fabricado por B.E. Marubishi Co., Ltd., 5 L), sua fermentação foi avaliada.

O meio de SC3 mostrado na Tabela 1 foi adicionado a um tubo de teste em uma quantidade de 10 ml e uma pequena quantidade de cada cepa foi inoculada no mesmo e cultivada de um dia para o outro a 30°C (pré-cultura). Então, para 45 ml de meio de SC3 colocado em um frasco Erlenmeyer, 5 ml do então obtido meio de pré-cultura foram adicionados e cultivados a 30°C por mais 8 horas (pré-cultura). A quantidade total do então obtido meio de pré-cultura foi inoculada em 1 l de meio de SC3 colocado no fermentador de mini-jarra e cultivada por 30 horas. As condições de cultura são mostradas abaixo:

pH: pH 5

Aeração: 100 ml/min

Agitação: 120 rpm

Neutralizador: 1N de hidróxido de sódio.

A quantidade do meio de cultura no término do período de cultura e as concentrações de ácido D-lático e glicose no meio de cultura foram medidas através do teste "Glucose Test Wako C" (marca registrada) (fabricado por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) para determinar o rendimento de

ácido láctico em relação ao sacarídeo com base na glicose adicionada calculado a partir da então medidas concentrações de ácido láctico e glicose. Como resultado, foi confirmado que a SW092-2D (Δ pdc1::Lp.D-LDH1-TRP1) e SW092-2D (Δ pdc1::Lp.D-LDH2-TRP1) produziram ácido D-lático com um rendimento de ácido láctico em relação ao sacarídeo de 45% e 42%, respectivamente.

EXEMPLO COMPARATIVO 1

CLONAGEM DO GENE D-LDH ORIGINADO A PARTIR DA BACTÉRIA DE ÁCIDO LÁCTICO E

AVALIAÇÃO DA FERMENTAÇÃO

Como um gene D-LDH capaz de realizar de maneira eficiente a produção fermentativa de ácido D-lático em levedura transformada, o gene D-LDH originado a partir da cepa ATCC 9135 de *Leuconostoc mesenteroides* é conhecido (ver, WO2004/104202). Através da clonagem desse gene D-LDH (doravante no presente documento, denominado como "gene D-LDH Lm.") e introdução do mesmo na levedura para permitir a fermentação, a atividade de D-LDH do gene D-LDH Lm. foi examinada, comparando essa àquela do gene D-LDH Lp. ou gene D-LDH2 Lp. originado a partir de *Limulus polyphemus*.

Usando um conjunto de iniciadores (SEQ ID NOs:31 e 32) que foi projetado pela referência às sequências de nucleotídeo descritas em WO2004/104202 e a cepa ATCC 9135 como modelo, o gene D-LDH Lm. foi clonado por PCR de colônia (usando "KOD-Plus-polimerase" fabricada por Toyobo Co., Ltd.). Após a purificação do então obtido fragmento ampliado por PCR e fosforilação da extremidade do mesmo com "T4 Polinucleotídeo Quinase" (fabricada por Takara Bio Inc.), o fragmento foi ligado ao vetor pUC118 (que foi digerido com uma enzima de restrição HincII e a superfície de corte foi desfosforilada). A ligação foi executada com o uso do "Kit de ligação de DNA Ver.2" (fabricado por Takara Bio Inc.). A DH5 α de *Escherichia coli* foi transformada com a ligação do produto de plasmídeo e o DNA de plasmídeo foi

coletado para obter um plasmídeo no qual o gene D-LDH Lm. foi subclonado. O plasmídeo pUC118 assim obtido no qual foi inserido o gene D-LDH Lm. foi digerido com enzimas de restrição XhoI e NotI, e os fragmentos de DNA resultantes obtidos foram inseridos, cada um, no sítio de clivagem XhoI/NotI do
 5 vetor pTRS11 para a expressão de levedura. Nesse modo, o plasmídeo pTRS207 que expressa o gene D-LDH Lm. foi obtido.

A seguir, o gene D-LDH Lm. foi introduzido no locus do gene PDC1 no cromossomo da cepa SW092-2D de *Saccharomyces cerevisiae* no mesmo modo como no Exemplo 5, exceto que o pTRS207 foi usado como
 10 modelo e o conjunto de iniciadores mostrado na SEQ ID NO:33 foi usado no lugar do iniciador mostrado na SEQ ID NO:24 ou 26. A levedura transformada assim preparada é doravante no presente documento denominada como "SW092-2D (Δ pdc1::D-LDH Lm.-TRP1)". Então, no mesmo modo como no Exemplo 6, a produtividade de D-lactato foi avaliada por cultura em batelada.
 15 Como resultado, o rendimento em relação ao sacarídeo através de SW092-2D (Δ pdc1::D-LDH Lm.-TRP1) foi de 38%. O resultado é mostrado na Tabela 2 junto com os resultados do Exemplo 6.

Tabela 2

Nome da cepa	SW092-2D (Δ pdc1::Lp. D-LDH1-TRP1)	SW092-2D (Δ pdc1::Lp. D-LDH2-TRP1)	SW092-2D (Δ pdc1::D-LDH Lm.-TRP1)
Rendimento de ácido láctico em relação ao sacarídeo (%)	45	42	38

EXEMPLO DE REFERÊNCIA 1

20 **PREPARAÇÃO DE UMA LEVEDURA INTRODUZIDA COM O GENE L-LDH ORIGINADO A PARTIR DE *XENOPUS LAEVIS***

De acordo com o método descrito em JP 2008-029329A, a levedura na qual o gene L-LDH originado a partir de *Xenopus laevis* (gene X. L-

LDH) foi introduzido no locus do gene PDC1 gene foi preparada. Aqui, assim como a levedura usada para a introdução do gene no cromossomo, uma cepa NBRC10506 na qual a auxotrofia para adenina é revertida (cepa SU013-1D) foi usada. A cepa SU013-1D foi preparada através do método a seguir. Usando o plasmídeo pRS422 como modelo e os oligonucleotídeos (SEQ ID NOs:34 e 35) como conjunto de iniciadores, a PCR foi realizada para ampliar um fragmento de PCR de cerca de 2 kb que corresponde ao gene ADE2. Após a separação do fragmento de PCR por 1% de eletroforese em gel de agarose e purificação do mesmo de acordo com um método convencional, o fragmento de PCR foi transformado para cancelar a mutação no gene ADE2. Através da cultura da cepa de levedura em um meio livre de adenina, um transformante no qual foi revertida a capacidade de síntese de adenina foi selecionado.

Com a finalidade de confirmar que o transformante assim obtido é uma levedura na qual a mutação no gene ADE2 foi cancelada, as etapas a seguir foram executadas. Primeiramente, as células diploides foram obtidas por acoplamento do transformante assim obtido com a cepa LOGY77 de *Saccharomyces cerevisiae* que tem o gene ADE2 do tipo selvagem e as células diploides foram cultivadas em um meio de formação de asco para permitir a formação de asco. Os ascos resultantes foram anatomizados com o uso de um micromanipulador para obter as células haploides respectivas (tétrades) e a auxotrofia foi examinada para cada uma das células haploides. Todas dentre as células haploides assim obtidas foram confirmadas como tendo capacidade de síntese de adenina. A cepa NBRC10506(ADE2) e a cepa NBRC10505 assim obtidas foram acopladas e os ascos resultantes foram anatomizados com o uso de um micromanipulador para obter a cepa SU013-1D (genótipo: MAT α ura3 leu2 trp1 his3 ADE2 lys2). A levedura transformada assim obtida é denominada doravante no presente documento como "cepa SU013-1D (Δ pdc1::X. L-LDH-TRP1)".

EXEMPLO 7**EXEMPLO COMPARATIVO 2****TESTE DE PRODUTIVIDADE 3 DE ÁCIDO D-LÁTICO**

A cepa SU013-1D (Δ pdc1::X. L-LDH-TRP1) preparada no Exemplo de Referência 1 foi acoplada com cada uma dentre a cepa SW092-2D (Δ pdc1::Lp. D-LDH1-TRP1), cepa SW092-2D (Δ pdc1::Lp. D-LDH2-TRP1) e cepa SW092-2D (Δ pdc1::D-LDH Lm.-TRP1), as quais foram preparadas no Exemplo 5 e Exemplo Comparativo 1, desse modo, preparando leveduras diploides que têm o gene L-LDH e D-LDH de forma heterozigota no locus do gene PDC1. As leveduras diploides assim preparadas são denominadas doravante no presente documento como "cepa Lp1-X, cepa Lp2-X e cepa Lm-X, respectivamente".

Então, a cepa Lp1-X, cepa Lp2-X e cepa Lm-X foram cultivadas em batelada sob as mesmas condições como no Exemplo 5, e a pureza óptica do ácido láctico produzido foi avaliada (Tabela 3).

TABELA 3

Nome da cepa	Lp1-X	Lp2-X	Lm-X
Rendimento de ácido D-lático (%)	48,3	47,5	43,8
Pureza óptica de ácido D-lático (%)	52,3	51,7	44,4

Como resultado, a levedura que tem o gene D-LDH originado a partir de *Limulus polyphemus* produziu ácido D-lático com uma pureza óptica não inferior a 50%, enquanto que a pureza óptica do ácido D-lático produzido pela levedura que tem o gene D-LDH originado a partir de *Leuconostoc mesenteroides* foi de 44,4%. Visto que o rendimento em relação ao sacarídeo no qual cada levedura produz ácido D-lático e a pureza óptica do mesmo são considerados como sendo proporcionais à atividade de D-LDH nas leveduras

transformadas com o gene D-LDH, a partir dos resultados mostrados nas Tabelas 2 e 3, foi confirmado que, quando introduzido na levedura, o gene D-LDH originado a partir de *Limulus polyphemus* codifica um polipeptídeo que tem uma atividade maior do que aquela de um polipeptídeo codificado pelo gene D-LDH originado a partir de *Leuconostoc mesenteroides*.

EXEMPLO 8

INTRODUÇÃO DE MÚLTIPLAS CÓPIAS DO GENE D-LDH NO CROMOSSOMO DE LEVEDURA E PREPARAÇÃO DE LEVEDURA PDC5 DO TIPO MUTANTE SENSÍVEL À TEMPERATURA

A seguir, a preparação de uma levedura introduzida com o gene D-LDH originado a partir de *Limulus polyphemus* também nos loci do gene diferentes do locus do gene PDC1 foi examinada com o objetivo de aperfeiçoar adicionalmente o rendimento de ácido D-lático, e o gene D-LDH foi introduzido no gene TDH3 cujo efeito de introdução é descrito em JP 2008-029329A e o locus do gene SED1 cujo efeito de introdução é descrito no pedido de patente internacional PCT/JP 2008/072129. Adicionalmente, o gene PDC5 do tipo mutante sensível à temperatura descrito em JP 2008-048726A também foi introduzido.

INTRODUÇÃO DO GENE D-LDH NO LOCUS DO GENE TDH3

Para a introdução no locus do gene TDH3, no mesmo modo como o método de preparação do pTRS150 descrito em JP 2008-029329A, foi preparado um plasmídeo pTRS208 no qual o terminador TDH3 do pTRS205 que carrega o gene D-LDH Lp. foi substituído pelo terminador ADH1. Então, usando a SEQ ID NO:36 no lugar da SEQ ID NO:8 de JP 2008-029329A como iniciador e o pTRS208 como modelo, uma construção de DNA para a recombinação homóloga para ser usada para a introdução no locus do gene TDH3 foi obtido.

Como a levedura na qual a construção de DNA descrita acima para a recombinação homóloga é introduzida, uma cepa prototrófica de leucina

da cepa SU013-1D (cepa SW087-2C) foi empregada. O método de preparação da cepa SW087-2C é descrito a seguir. Usando o plasmídeo pRS425 como modelo e os oligonucleotídeos (SEQ ID NOs:37 e 38) como conjunto de iniciadores, a PCR foi realizada para ampliar um fragmento de PCR de cerca de 2 kb que corresponde ao gene LEU2. Após a separação do fragmento de PCR por 1% de eletroforese em gel de agarose e purificação do mesmo de acordo com um método convencional, o fragmento de PCR assim purificado foi transformado na cepa SU013-1D para cancelar a mutação no gene LEU2. Através da cultura da cepa de levedura em um meio livre de leucina, um transformante no qual foi revertida a capacidade de síntese de leucina foi selecionado. Com a finalidade de confirmar que o transformante assim obtido é uma levedura na qual a mutação no gene LEU2 foi cancelada, as etapas a seguir foram executadas. Primeiramente, as células diploides foram obtidas pelo acoplamento do transformante assim obtido com a cepa LOGY77 de *Saccharomyces cerevisiae* que tem o gene LEU2 do tipo selvagem e as células diploides foram cultivadas em um meio de formação de asco para permitir a formação de asco. Os ascos resultantes foram anatomizados usando um micromanipulador para obter células haploides respectivas (tétrades) e a auxotrofia foi examinada para cada uma das células haploides. Foi confirmado que todas as células haploides assim obtidas têm capacidade de síntese de leucina. A cepa SU013-1D(LEU2) e a cepa NBRC10505 assim obtidas foram acopladas e os ascos resultantes foram anatomizados usando um micromanipulador para obter a cepa SW087-2C (genótipo: MAT α ura3 LEU2 trp1 his3 ADE2 lys2).

A cepa SW087-2C foi transformada com a construção de DNA descrita acima para a recombinação homóloga e cultivada em um meio livre de uracila para a seleção para obter uma levedura transformada introduzida com o gene D-LDH Lp. no locus do gene TDH3. A levedura transformada assim obtida

é denominada doravante no presente documento como "cepa SW087-2C (Δ TDH3::Lp. D-LDH-URA3)".

INTRODUÇÃO DO GENE D-LDH EM LOCUS DO GENE SED1

A introdução no locus do gene SED1 foi executada pela
5 modificação do método descrito no Exemplo 2 do pedido de patente internacional PCT/JP 2008/072129. Ou seja, usando o pTRS205 no lugar do pTRS102 como modelo de PCR e a SEQ ID NO:39 no lugar da SEQ ID NO:14 da publicação do pedido de patente internacional descrita acima como iniciador, uma construção de DNA para a recombinação homóloga a ser usada
10 para a introdução no locus do gene SED1 foi obtido.

Como a levedura na qual a construção de DNA descrita acima para a recombinação homóloga é introduzido, a cepa SW092-7D (genótipo: MATa ura3 leu2 trp1 his3 ADE2 LYS2), que foi obtida pelo acoplamento da cepa NBRC10505(LYS2) preparada no Exemplo 5 com a cepa NBRC10506(ADE2)
15 preparada no Exemplo de Referência 1 e separação por anatomização dos ascos resultantes com um micromanipulador, foi empregada.

A cepa SW092-7D foi transformada com a construção de DNA descrito acima para a recombinação homóloga e cultivada em um meio livre de histidina para a seleção para obter uma levedura transformada introduzida com
20 o gene D-LDH Lp. no locus do gene SED1. A levedura transformada assim obtida é denominada doravante no presente documento como "cepa SW092-7D (Δ SED1::Lp. D-LDH-HIS3)".

INTRODUÇÃO DO GENE PDC5 DO TIPO MUTANTE SENSÍVEL À TEMPERATURA

(PDC5TS-9)

25 Como a levedura introduzida com o gene PDC5 do tipo mutante sensível à temperatura, a cepa SW015 de levedura que tem o gene PDC5 do tipo mutante sensível à temperatura (pdc5ts-9), que é descrito em JP 2008-048726A, foi empregada. Através do acoplamento da cepa SW015 com a cepa

SW087-2C e separação por anatomização dos ascos resultantes com um micromanipulador, a cepa SW095-4B (genótipo: MAT α ura3 LEU2 trp1 his3 ADE2 lys2 pdc5ts-9 Δ pdc1::TRP1) foi obtida. Adicionalmente, através do acoplamento da cepa SW095-4B com a cepa SW092-2D e separação por anatomização dos ascos resultantes com um micromanipulador, a cepa SW098-21B (genótipo: MAT α ura3 LEU2 trp1 his3 ADE2 LYS2 pdc5ts-9) foi obtida.

INTRODUÇÃO DO GENE D-LDH NOS LOCI DOS GENES PDC1, TDH3 E SED1 E

INTRODUÇÃO DO GENE PDC5 DO TIPO MUTANTE SENSÍVEL À TEMPERATURA

10

(PDC5TS-9)

Usando a cepa SW092-2D (Δ PDC1::Lp. D-LDH1-TRP1), cepa SW087-2C (Δ TDH3::Lp. D-LDH1-URA3), cepa SW092-7D (Δ TDH3::Lp. D-LDH1-HIS3) e cepa SW098-21B assim preparadas, o acoplamento diploide e produção de tétrades foram repetidos para obter a cepa SU042 que contém o gene D-LDH Lp. nos loci dos genes PDC1, TDH3 e SED1 e o PDC5 do tipo mutante sensível à temperatura (pdc5ts-9), sendo a cepa SU042 diploide e não auxotrófica para adenina, leucina e lisina. Os procedimentos para a preparação da cepa SU042 são mostrados na Figura 1.

15

EXEMPLO 9

20

TESTE DE PRODUÇÃO 4 DE ÁCIDO D-LÁCTICO

Usando a cepa SU042 preparada conforme descrito no Exemplo 8, a produtividade do ácido D-lático foi testada pela cultura em batelada. Como o meio, o meio de SC3 mostrado na Tabela 1 ou um meio de açúcar bruto (100 g/l de "Yutosei" (fabricado por Muso Co., Ltd.), 1,5 g/l de sulfato de amônio) foi empregado. Primeiramente, a cepa SU042 foi cultivada de um dia para o outro com agitação em 5 ml de meio de SC3 ou meio de açúcar bruto em um tubo de teste (pré-pré-cultura). Em um frasco Sakaguchi de 500 ml, o meio de pré-pré-cultura resultante foi inoculado em 50 ml de meio de SC3 fresco ou meio de

25

açúcar bruto e cultivado durante 24 horas com agitação (pré-cultura). A um fermentador de mini-jarra (fabricado por Able Co., Ltd., 2 L), 1 l de meio de SC3 ou meio de açúcar bruto foi adicionado, e a temperatura foi ajustada (32°C) e o pH foi controlado (pH 5, 5N de hidróxido de cálcio). A cultura foi executada com
 5 aeração e agitação (em 200 ml/min e 400 rpm, respectivamente). Como resultado, a cultura no meio de SC3 foi finalizada em 30 horas e o rendimento em relação ao sacarídeo foi de 63%. Adicionalmente, a cultura no meio de açúcar bruto foi finalizada em 50 horas e o rendimento em relação ao sacarídeo foi de 70%. A partir desses resultados, foi confirmado que o
 10 desempenho da fermentação de ácido D-lático foi aprimorado pela introdução do gene D-LDH Lp. nos loci do gene PDC1, TDH3 e SED1 e introdução da mutação sensível à temperatura no gene PDC5.

EXEMPLO 10

TESTE DE PRODUTIVIDADE DE ÁCIDO D-LÁTICO POR CULTURA CONTÍNUA

15 Uma cultura contínua da cepa SU042 que usa a membrana de separação descrita em WO2007/097260 foi examinada. Como o meio, um meio de açúcar bruto (75 g/l de "Yutosei" (fabricado por Muso Co., Ltd.), 1,5 g/l de sulfato de amônio) foi empregado.

As condições de cultura são mostradas abaixo:

20 Capacidade de vaso de fermentação: 2 (L)

Volume de meio de cultura: 1,5 (L)

Membrana de separação usada: filtro de membrana PVDF
 (descrito no Exemplo de Referência 2 de WO2007/097260)

Área de filtração efetiva do elemento de separação de membrana:

25 120 cm²

Ajuste de temperatura: 32 (°C)

Volume de aeração no vaso de reação de fermentação: ar 0,02
 (L/min), gás de nitrogênio 0,18 (L/min)

Taxa de agitação no vaso de reação de fermentação: 800 (rpm)

Ajuste de pH: ajustado para pH 5 com 5N de hidróxido de cálcio

Esterilização: os vasos de cultura que incluem o elemento de membrana de separação e meio usado foram todos autoclavados em 121°C durante 20 minutos.

Primeiramente, a cepa SU042 foi cultivada a 30°C de um dia para o outro com agitação em 10 ml do meio de açúcar bruto em um tubo de teste (pré-pré-pré-cultura). A quantidade total do meio de cultura assim obtido foi inoculada em 100 ml de meio de açúcar bruto fresco e cultivada em um frasco Sakaguchi de 500 ml durante 24 horas a 30°C com agitação (pré-pré-cultura). O meio de pré-pré-cultura resultante foi inoculado em 1,5 l do meio de açúcar bruto carregado em um vaso de cultura contínua do tipo integrado à membrana (o aparelho mostrado na Figura 2 de WO2007/097260). A remoção do meio de cultura por uma bomba peristáltica (200 ml/h) foi iniciada 50 horas após a iniciação da cultura, e a cultura foi continuada até 400 horas para medir a concentração de ácido láctico, que é a substância produzida, e a taxa de produção de ácido láctico.

Os resultados são mostrados na Figura 2. É notado aqui que a taxa de produção de ácido láctico durante a cultura contínua foi calculada usando a Equação 1 abaixo.

EQUAÇÃO 1

Taxa de produção de ácido láctico (g/l·h) = concentração do produto em líquido removido (g/l) × taxa de remoção de fermentação de meio de cultura (L/h) ÷ volume de líquido operacional de aparelho (L)

Como resultado da cultura contínua usando a membrana de separação, foi confirmado que o rendimento de ácido D-lático em relação ao sacarídeo foi aprimorado adicionalmente em cerca de 85% e que a taxa de produção de ácido D-lático foi aprimorada para 7,5 g/l·h.

EXEMPLO 11

INTRODUÇÃO DO D-LDH DE *LIMULUS POLYPHEMUS* EM *CANDIDA UTILIS*

A seguir, usando *Candida utilis*, que é uma levedura Crabtree-negativa, o ácido D-lático foi examinado.

- 5 (a) Preparação de um vetor para a introdução do gene D-LDH de *Limulus polyphemus*

Primeiramente, um vetor foi construído pela introdução do gene D-LDH originado a partir de *Limulus polyphemus* no locus do gene PDC1 no cromossomo de *Candida utilis*. A cepa NBRC0988 de *Candida utilis* (doravante
10 no presente documento, denominada como "NBRC0988") foi inoculada em meio de YPD (1% de Extrato de Levedura Bacto, 2% de Bacto-peptona, 2% de glicose) e cultivada de um dia para o outro a 30°C. A partir das células de levedura assim obtidas, o DNA genômico foi extraído de acordo com um método convencional e usado como modelo na PCR subsequente.
15 Primeiramente, usando os oligos de DNA mostrados nas SEQ ID NOs:40 e 41 como conjunto de iniciadores, um fragmento contendo a região de terminador do gene PDC1 foi amplificado. É notado aqui que, exceto onde especificado em contrário, KOD-plus- (fabricado por Toyobo Co., Ltd.) foi usado como DNA polimerase de acordo com o protocolo em anexo. Após a digestão do
20 fragmento assim obtido de cerca de 1kb com uma enzima de restrição BssHI e purificação do mesmo, o resultante foi ligado a pBluescriptII SK(+) que foi anteriormente digerido com a enzima de restrição BssHI no mesmo modo. O plasmídeo assim obtido é denominado doravante no presente documento como "pKS01".

- 25 A seguir, no mesmo modo, usando o DNA genômico de NBRC0988 como modelo e os oligos de DNA mostrados nas SEQ ID NOs:42 e 43 como conjunto de iniciadores, a PCR foi realizada para ampliar um fragmento contendo o promotor PGK. O fragmento assim obtido de cerca de 1

kb foi purificado e usado nos experimentos subsequentes. Então, usando o plasmídeo pLC1-hph que tem o gene hph capaz de conferir resistência contra higromicina B que é um tipo de substância antibiótica como modelo e os oligos de DNA mostrados nas SEQ ID NOs:44 e 45 como conjunto de iniciadores, a

5 PCR foi realizada para ampliar um fragmento contendo o gene hph, que foi, então, purificado para obter um fragmento de cerca de 1,1 kb. Adicionalmente, usando o DNA genômico de NBRC0988 como modelo e os oligos de DNA mostrados nas SEQ ID NOs:46 e 47 como conjunto de iniciadores, a PCR foi realizada para ampliar um fragmento contendo o terminador GAP, que foi,

10 então, purificado para obter um fragmento de cerca de 500 bp.

O fragmento contendo o promotor PGK, o fragmento contendo o gene hph e o fragmento contendo o terminador GAP que foram obtidos no modo descrito acima foram misturados, e usando os oligos de DNA mostrados nas SEQ ID NOs:48 e 49 como conjunto de iniciadores, a PCR foi realizada

15 para ampliar um fragmento no qual o promotor PGK, gene hph e terminador GAP foram ligados. Após a fosforilação da extremidade do fragmento assim obtido de cerca de 2,6 kb, o fragmento foi ligado ao pUC118 que foi digerido com HincII e desfosforilado. O plasmídeo assim obtido é denominado doravante no presente documento como "pKS02".

20 A seguir, no mesmo modo, usando o DNA genômico de NBRC0988 como modelo e os oligos de DNA mostrados nas SEQ ID NOs:50 e 51 como conjunto de iniciadores, a PCR foi realizada para ampliar um fragmento contendo o terminador PGK, que foi, então, purificado para obter um fragmento de cerca de 500 bp. Adicionalmente, usando o pKS02 obtido no

25 modo descrito acima como modelo e os oligos de DNA mostrados nas SEQ ID NOs:52 e 53 como conjunto de iniciadores, a PCR foi realizada para ampliar um fragmento no qual o promotor PGK, gene hph e terminador GAP foram ligados, que foi, então, purificado para obter um fragmento de cerca de 2,6 kb.

O fragmento contendo o terminador PGK e o fragmento no qual o promotor PGK, gene hph e terminador GAP foram ligados, cujos fragmentos foram obtidos no modo descrito acima, foram misturados, e usando os oligos de DNA mostrados nas SEQ ID NOs:50 e 53 como conjunto de iniciadores, a PCR foi realizada para ampliar um fragmento no qual o terminador PGK, promotor PGK, gene hph e terminador GAP foram ligados. Após a digestão do fragmento assim obtido de cerca de 3 kb com enzimas de restrição BamHI e ClaI e purificação do mesmo, o resultante foi ligado ao pKS02 que foi anteriormente digerido com enzimas de restrição BamHI e ClaI no mesmo modo. O plasmídeo assim obtido é denominado doravante no presente documento como "pKS03".

A seguir, no mesmo modo, usando o DNA genômico de NBRC0988 como modelo e os oligos de DNA mostrados nas SEQ ID NOs:54 e 55 como conjunto de iniciadores, a PCR foi realizada para ampliar um fragmento contendo a região do promotor PDC1, que foi, então, purificado para obter um fragmento de cerca de 2,1 kb. Adicionalmente, usando o pTRS205 preparado no Exemplo 2 como modelo e os oligos de DNA mostrados nas SEQ ID NOs:56 e 57 como conjunto de iniciadores, a PCR foi realizada para ampliar um fragmento contendo o gene D-LDH originado a partir de *Limulus polyphemus*, que foi, então, purificado para obter um fragmento de cerca de 1 kb.

O fragmento contendo a região do promotor PDC1 e o fragmento contendo o gene D-LDH originado a partir de *Limulus polyphemus* que foram obtidos no modo descrito acima foram misturados, e usando os oligos de DNA mostrados nas SEQ ID NOs:54 e 57 como conjunto de iniciadores, a PCR foi realizada para ampliar um fragmento no qual o fragmento contendo a região do promotor PDC1 e o fragmento contendo o gene D-LDH originado a partir de *Limulus polyphemus* foram ligados. Após a digestão do fragmento assim obtido de cerca de 3,1 kb com enzimas de restrição NotI e BglII e purificação do

mesmo, o resultante foi ligado ao pKS03 que foi anteriormente digerido com enzimas de restrição NotI e BamHI no mesmo modo. O plasmídeo assim obtido é denominado doravante no presente documento como "pKS04".

(b) Introdução do gene D-LDH de *Limulus polyphemus* no locus
5 do gene PDC1

O pKS04 obtido no modo descrito acima foi digerido com enzima de restrição BglII e introduzido em NBRC0988 por método de eletroporação. Uma pequena quantidade das células foi inoculada no meio de YPD e cultivada de um dia para o outro a 30°C. Após a centrifugação da cultura para descartar
10 o sobrenadante, as células foram lavadas com água esterilizada e 1M de sorbitol e, eventualmente, suspensas em 1M de sorbitol.

Então, após a mistura das células e do pKS04 digerido com enzima de restrição BglII e após deixar a mistura resultante no gelo por 5 minutos, a mistura foi transferida para uma cuveta de eletroporação e
15 submetida à eletroporação em uma capacitância de 25 μ F, tensão de 0,75 kV e resistência de 800 Ω .

Consequentemente, a mistura foi transferida para o meio de YPD contendo 1M de sorbitol e cultivada a 30°C durante cerca de 4 horas e, então, aplicada no meio de YPD suplementado com 600 μ g/l de higromicina B.

20 A partir da cepa resistente à higromicina B resultante, o genoma da mesma foi extraído, e verificando que fragmentos de cerca de 3 kb e 2 kb foram, cada um, ampliados por PCR usando os oligos de DNA mostrados nas SEQ ID NOs:54 e 57 e SEQ ID NOs:56 e 51 como conjuntos de iniciadores respectivos, foi confirmado que uma levedura transformada na qual o gene D-
25 LDH originado a partir de *Limulus polyphemus* foi introduzido no locus do gene PDC1 foi obtida.

A levedura transformada assim obtida é doravante no presente documento denominada como "cepa CuLpLDH".

EXEMPLO COMPARATIVO 2

INTRODUÇÃO DE D-LDH ORIGINADO A PARTIR DE UMA BACTÉRIA DE ÁCIDO LÁTICO

EM *CANDIDA UTILIS*

No mesmo modo como no Exemplo 11, o gene D-LDH originado a
5 partir de uma bactéria de ácido láctico, *Leuconostoc mesenteroides*, foi
introduzido. É notado aqui, todavia, que o oligo de DNA mostrado na SEQ ID
NO:58 foi empregado no lugar de um mostrado na SEQ ID NO:55 usada no
Exemplo 11. Em adição, o pTRS207 obtido no Exemplo Comparativo 1 foi
usado como modelo no lugar do pTRS205 obtido no Exemplo 2 e os oligos de
10 DNA mostrados nas SEQ ID NOs:59 e 60 foram usados no lugar daqueles
mostrados nas SEQ ID NOs:56 e 57. O plasmídeo assim obtido é doravante no
presente documento denominado como "pKS05".

O plasmídeo obtido no modo descrito acima foi introduzido na
cepa NBRC0988 no mesmo modo como no Exemplo 11. A cepa assim obtida
15 na qual o gene D-LDH originado a partir de uma bactéria de ácido láctico,
Leuconostoc mesenteroides, foi introduzido no locus do gene PDC1 é
doravante no presente documento denominada como "cepa CuLmLDH".

EXEMPLO 12

EXEMPLO COMPARATIVO 3

TESTE DE PRODUTIVIDADE DE D-LÁTICO EM *CANDIDA UTILIS*

20 Com o uso da cepa CuLpLDH e da cepa CuLmLDH preparadas
no Exemplo 11 e no Exemplo Comparativo 2, respectivamente, sua
produtividade de ácido D-lático foi avaliada. O meio de YPD foi adicionado em
uma quantidade de 50 ml em um frasco Sakaguchi de 500 ml, e as cepas
25 CuLpLDH e CuLmLDH foram inoculadas no mesmo em pequenas quantidades
e cultivadas a 30°C de um dia para o outro com agitação (pré-cultura). Após a
coleta do meio de cultura e lavagem da mesma com meio de YPD fresco, o
meio de cultura foi colocado e cultivado em um fermentador de mini-jarra no

qual 1 litro de meio de YPD10 (contendo 10% de glicose) foi adicionado. As condições de cultura são mostradas abaixo:

Quantidade de inoculação inicial: inoculado a $OD_{600} = 10$

pH: pH 6

5 Aeração: 100 ml/min

Agitação: 120 rpm

Neutralizador: 1N de hidróxido de cálcio

Temperatura de cultura: 35°C.

A cultura foi executada por 40 horas e a concentração de ácido
10 láctico e a concentração de glicose do meio de cultura em 40 horas foram analisadas. A glicose foi completamente consumida. Em adição, conforme mostrado na Tabela 4, a partir dos resultados de análise da produtividade por consumo de glicose (rendimento em relação ao sacarídeo) e a pureza óptica de ácido D-láctico, verificou-se que a levedura (*Candida utilis*) introduzida com o
15 gene D-LDH foi capaz de produzir de forma fermentativa o ácido D-láctico e a cepa CuLpLDH introduzida com o gene D-LDH originado a partir de *Limulus polyphemus* teve um rendimento superior.

EXEMPLO 13

EXEMPLO COMPARATIVO 4

ESTE DE PRODUTIVIDADE 2 DE D-LÁCTICO EM *CANDIDA UTILIS*

A seguir, com o uso da cepa CuLpLDH e da cepa CuLmLDH, sua
produtividade de ácido D-láctico com o uso de xilose, que é uma pentose, como
fonte de açúcar foi avaliada. O meio de YPD foi adicionado em uma quantidade
de 50 ml em um frasco Sakaguchi de 500 ml, e as cepas de CuLpLDH e
25 CuLmLDH foram inoculadas no mesmo em pequenas quantidades e cultivadas
a 30°C de um dia para o outro com agitação (pré-cultura). Após coleta do meio
de cultura e lavagem da mesma com meio de YPD fresco, o meio de cultura foi
colocado e cultivado em um fermentador de mini-jarra no qual 1 litro de meio de

YPX10 (1% de extrato de levedura, 2% de Bacto-peptona, 4% de xilose) foi adicionado. As condições de cultura são mostradas abaixo:

Quantidade de inoculação inicial: inoculada a $OD_{600} = 10$

pH: pH6

5 Aeração: 100 ml/min

Agitação: 120 rpm

Neutralizador: 1N de hidróxido de cálcio

Temperatura de cultura: 30°C.

A cultura foi executada por 60 horas e a concentração de ácido
 10 láctico e a concentração de xilose do meio de cultura em 60 horas foram analisadas. A xilose foi completamente consumida. Em adição, conforme mostrado na Tabela 4, dos resultados de análise da produtividade por consumo de xilose (rendimento em relação ao sacarídeo) e a pureza óptica do ácido D-láctico, verificou-se que a levedura (*Candida utilis*) introduzida com o gene D-
 15 LDH foi capaz de produzir de forma fermentativa o ácido D-láctico com o uso de xilose como o material de partida e a cepa CuLpLDH introduzida com o gene D-LDH originado a partir de *Limulus polyphemus* teve um rendimento superior.

TABELA 4

	Exemplo 12	Exemplo 13	Exemplo Comparativo 3	Exemplo Comparativo 4
Nome da cepa	CuLpLDH	CuLpLDH	CuLmLDH	CuLmLDH
Fonte de açúcar	glicose	xilose	glicose	xilose
Rendimento do ácido D-láctico em relação ao sacarídeo (%)	29	23	22	17
Pureza óptica do ácido D-láctico (% e.e.)	99,9	99,9	99,9	99,9

APLICABILIDADE INDUSTRIAL

Através da presente invenção, é possível produzir, de forma estável ácido D-lático em um baixo custo, e já que o ácido D-lático produzido tem uma alta pureza óptica, o mesmo é preferencialmente usado como uma

5 matéria prima para polímeros.

REIVINDICAÇÕES

1. POLIPEPTÍDEO, caracterizado pelo fato de que é qualquer um dentre os seguintes (A) a (C):

5 (A) polipeptídeo que tem a sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO:1 ou 2;

(B) polipeptídeo que tem a mesma sequência de aminoácidos conforme mostrado na SEQ ID NO:1 ou 2, exceto por um ou diversos aminoácidos que são substituídos, excluídos, inseridos e/ou adicionados, em que o polipeptídeo tem uma atividade de D-lactato desidrogenase; e

10 (C) polipeptídeo que tem uma sequência de aminoácidos que tem uma identidade de sequência de não menos que 80% em relação à sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO:1 ou 2, em que o polipeptídeo tem uma atividade de D-lactato desidrogenase.

2. POLINUCLEOTÍDEO, caracterizado pelo fato de que é qualquer um dentre os seguintes (a) a (e):

15 (a) polinucleotídeo que tem a sequência de nucleotídeos mostrada na SEQ ID NO:3 ou 4;

(b) polinucleotídeo que tem a mesma sequência de nucleotídeos conforme mostrado na SEQ ID NO:3 ou 4 exceto por um ou diversos nucleotídeos que são substituídos, excluídos, inseridos e/ou adicionados, sendo que o polinucleotídeo codifica um polipeptídeo que tem uma atividade de D-lactato desidrogenase;

20 (c) polinucleotídeo que hibridiza sob condições severas com a totalidade ou uma parte do polinucleotídeo que tem a sequência de nucleotídeos mostrada na SEQ ID NO:3 ou 4 ou uma fita complementar dos mesmos, sendo que o polinucleotídeo codifica um polipeptídeo que tem uma atividade D-LDH;

(d) polinucleotídeo que tem a sequência de nucleotídeos que tem

uma identidade de sequência não menor que 80% em relação à sequência de nucleotídeos mostrada na SEQ ID NO:3 ou 4, sendo que o polinucleotídeo codifica um polipeptídeo que tem uma atividade de D-lactato desidrogenase; e

(e) polinucleotídeo que codifica o polipeptídeo conforme descrito na reivindicação 1.

3. CONSTRUÇÃO DE DNA, caracterizada pelo fato de que o polinucleotídeo, conforme descrito na reivindicação 2, e um promotor capaz de expressar o dito polinucleotídeo, estão ligados.

4. CONSTRUÇÃO DE DNA, de acordo com a reivindicação 3, caracterizada pelo fato de que o dito promotor é um promotor de gene de piruvato descarboxilase 1 (gene PDC1), gene de supressão de defeito exponencial 1 (gene SED1) ou gene de gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase 3 (gene TDH3).

5. CONSTRUÇÃO DE DNA, de acordo com a reivindicação 3 ou 4, caracterizada pelo fato de que o dito promotor é selecionado a partir de qualquer um dentre os seguintes (I) a (III):

(I) um promotor que tem a sequência de nucleotídeos mostrada em qualquer uma das SEQ ID NOs:5 a 7;

(II) um promotor que tem a sequência de nucleotídeos que hibridiza sob condições severas com a sequência de nucleotídeos mostrada em qualquer uma das SEQ ID NOs:5 a 7 ou a sequência de nucleotídeos que compreende uma parte da mesma; e

(III) um promotor que tem a mesma sequência de nucleotídeos, conforme mostrado em qualquer uma das SEQ ID NOs:5 a 7, exceto um ou diversos nucleotídeos que são excluídos, substituídos e/ou adicionados.

6. TRANSFORMANTE, caracterizado pelo fato de que o polinucleotídeo, conforme descrito na reivindicação 2, ou a construção de DNA, conforme descrita em uma das reivindicações de 3 a 5, é introduzido.

7. LEVEDURA TRANSFORMADA, caracterizada pelo fato de que o polinucleotídeo, conforme descrito na reivindicação 2, ou a construção de DNA, conforme descrita em uma das reivindicações de 3 a 5, é introduzido.

8. LEVEDURA TRANSFORMADA, de acordo com a
5 reivindicação 7, caracterizada pelo fato de que pelo menos um dentre o gene de piruvato descarboxilase 1 (gene PDC1), o gene de supressão de defeito exponencial 1 (gene SED1) e o gene de gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase 3 (gene TDH3) da dita levedura transformada é substituído pelo polinucleotídeo, conforme descrito na reivindicação 2, ou a construção de DNA,
10 conforme descrita em uma das reivindicações de 3 a 5.

9. LEVEDURA TRANSFORMADA, de acordo com a reivindicação 8, caracterizada pelo fato de que pelo menos um dos ditos genes é o gene PDC1.

10. MÉTODO DE PRODUÇÃO DE ÁCIDO D-LÁTICO,
15 caracterizado pelo fato de que compreende a etapa de cultura do transformante, conforme descrito na reivindicação 6, ou da levedura transformada, conforme descrita em uma das reivindicações de 7 a 9.

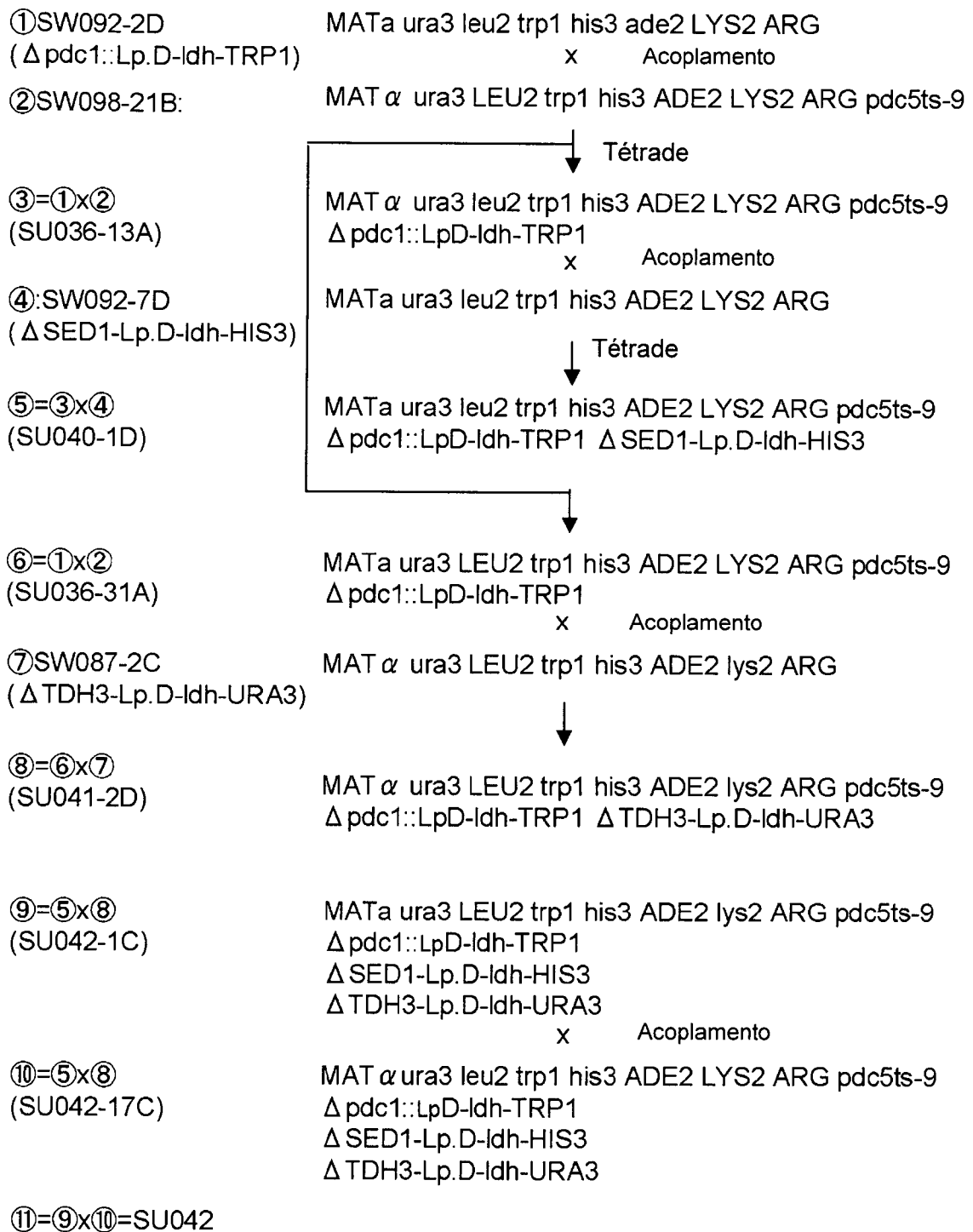
11. TRANSFORMANTE, caracterizado pelo fato de que um polinucleotídeo que codifica D-lactato desidrogenase originado a partir da
20 família Limulidae ou a construção de DNA na qual o dito polinucleotídeo e um promotor capaz de expressar o dito polinucleotídeo estão ligados, é introduzido.

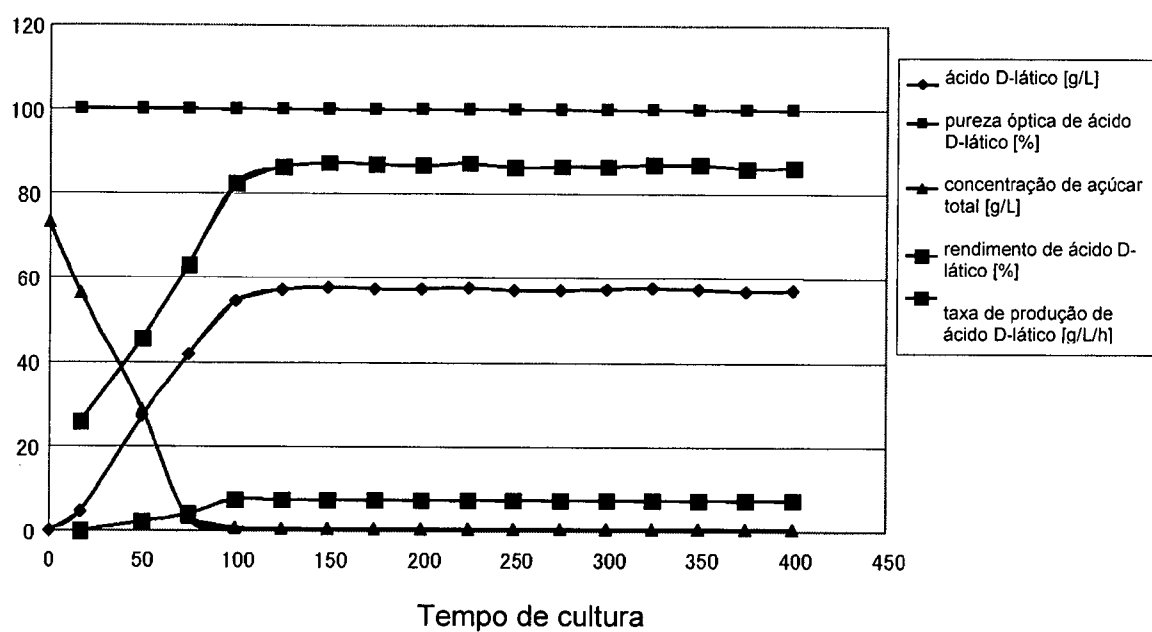
12. LEVEDURA TRANSFORMADA, caracterizada pelo fato de que um polinucleotídeo que codifica D-lactato desidrogenase originado a partir
25 da família Limulidae ou uma construção de DNA na qual o dito polinucleotídeo e um promotor capaz de expressar o dito polinucleotídeo estão ligados, é introduzido.

13. LEVEDURA TRANSFORMADA, de acordo com a

reivindicação 12, caracterizada pelo fato de que pelo menos um dentre gene de piruvato descarboxilase 1 (gene PDC1), gene de supressão de defeito exponencial 1 (gene SED1) e gene de gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase 3 (gene TDH3) da dita levedura transformada é substituído pelo dito
5 polinucleotídeo que codifica o dito D-lactato desidrogenase originado a partir da família Limulidae ou a dita construção de DNA na qual o dito polinucleotídeo e um promotor capaz de expressar o dito polinucleotídeo estão ligados é introduzido.

14. MÉTODO DE PRODUÇÃO DO ÁCIDO D-LÁTICO,
10 caracterizado pelo fato de que compreende a etapa de cultura do transformante, conforme descrito na reivindicação 11, ou a levedura transformada, conforme descrita na reivindicação 12 ou 13.

**Fig. 1**

**Fig. 2**

RESUMO**“POLIPEPTÍDEO, POLINUCLEOTÍDEO, CONSTRUÇÃO DE DNA,
TRANSFORMANTES, LEVEDURAS TRANSFORMADAS E MÉTODOS DE
PRODUÇÃO DE ÁCIDO D-LÁTICO”**

5 A presente invenção trata sobre a fermentação de ácido D-lático
altamente produtiva é alcançada através do uso de um transformante obtido
pela introdução, em uma célula hospedeira, de um polinucleotídeo que codifica
um polipeptídeo conforme definido em qualquer um dentre os seguintes (A) a
(C) de tal modo que o polipeptídeo seja expresso, sendo que o polipeptídeo
10 tem uma atividade de D-lactato desidrogenase superior àquela de
polipeptídeos convencionais: (A) um polipeptídeo que tem a sequência de
aminoácidos mostrada na SEQ ID NO:1 ou 2; (B) um polipeptídeo que tem a
mesma sequência de aminoácidos conforme mostrado na SEQ ID NO:1 ou 2
exceto que um ou diversos aminoácidos são substituídos, deletados, inseridos
15 e/ou adicionados, sendo que o polipeptídeo tem um atividade de D-lactato
desidrogenase; e (C) um polipeptídeo que tem uma sequência de aminoácidos
que tem uma identidade de sequência não menor que 80% em relação à
sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO:1 ou 2, sendo que o
polipeptídeo tem uma atividade de D-lactato desidrogenase.