

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 374 617**

51 Int. Cl.:

C12N 1/04 (2006.01)

C12N 9/96 (2006.01)

C12N 9/78 (2006.01)

C12N 9/88 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03815074 .4**

96 Fecha de presentación: **24.12.2003**

97 Número de publicación de la solicitud: **1583822**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **12.10.2005**

54 Título: **MÉTODO PARA LA CONSERVACIÓN Y/O ALMACENAMIENTO DE CÉLULAS CON ACTIVIDAD DE NITRILASA O NITRILOHIDRATASA.**

30 Prioridad:
08.01.2003 DE 10300500

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
20.02.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
20.02.2012

73 Titular/es:
BASF SE
67056 Ludwigshafen, DE

72 Inventor/es:
ZELINSKI, Thomas;
KESSELER, Maria y
HAUER, Bernhard

74 Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

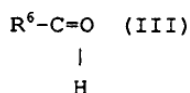
ES 2 374 617 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método para la conservación y/o almacenamiento de células con actividad de nitrilasa o nitrilohidratasa

- 5 La invención se refiere a un método para la conservación y/o almacenamiento de microorganismos que exhiben por lo menos una actividad enzimática de nitrilasa, donde la conservación y/o almacenamiento ocurre en un medio acuoso, el cual incluye por lo menos un aldehído, donde la concentración total de aldehído está en un rango de 0,1 a 100 mM/l y donde el aldehído es descrito por la fórmula general III:



donde R⁶ puede ser un radical alquilo C₁-C₁₀ sustituido o no sustituido, ramificado o no ramificado, alqueno C₂-C₁₀ sustituido o no sustituido, ramificado o no ramificado, arilo o hetarilo sustituido o no sustituido.

- 10 Las enzimas producidas por microorganismos encuentran creciente aplicación como biocatalizadores en métodos de producción química. En particular la hidrólisis enzimática de nitrilos para dar amidas, ácidos carboxílicos o ácidos α-hidroxicarboxílicos es un método de alta importancia económica. Las enzimas que hidrolizan nitrilos se subdividen en las familias de nitrilohidratatas y las nitrilasas. Las nitrilohidratatas y nitrilasas poseen en el centro activo una molécula de cisteína que es esencial para la catálisis (Levy-Schil (1995) Gene 161:15-20). Las nitrilohidratatas catalizan la adición de un equivalente molar de agua a la correspondiente amida. Las nitrilasas catalizan la adición de dos equivalentes molares de agua al correspondiente ácido carboxílico. Por regla general las enzimas en cuestión causan una hidratación ópticamente selectiva o bien hidrólisis, que conducen a productos ópticamente activos (quirales). Los ácidos carboxílicos quirales son productos buscados para la síntesis química orgánica. Ellos son productos de partida para una multiplicidad de principios activos farmacéuticos o principios activos para el cuidado de las plantas. Los ácidos carboxílicos quirales pueden ser empleados para la escisión clásica de racematos por sales de diastereoisómeros. De este modo por ejemplo se emplea ácido R(-)- o S(-)-mandélico para la escisión de racemato de aminas racémicas. Además se usa ácido R(-)-mandélico como producto intermedio en la síntesis.

- 25 Comúnmente, para las transformaciones enzimáticas se emplean enzimas purificadas o parcialmente purificadas o también microorganismos con las correspondientes actividades enzimáticas. Las enzimas pueden ser de origen natural o recombinante. Por regla general la producción (expresión) de la enzima ocurre en una etapa anterior a la transformación. En ello es deseable producir grandes cantidades de enzima y, dependiendo de la necesidad, incorporarlas en el proceso catalítico. Sin embargo, esto hace necesario un almacenamiento para obtener la actividad enzimática. En ello, el enfriamiento y/o congelación son métodos estándar. Sin embargo, la mayoría de las veces el congelamiento exige métodos complejos de congelación/descongelación y se acompaña por regla general con una pérdida grave de actividad enzimática. El enfriamiento en general está ligado a costos logísticos y costos de energía.

- 35 EP-A1 O 666 320 describe un método para la producción de ácidos α-hidroxicarboxílicos/amidas a partir de los correspondientes nitrilos, donde antes de la reacción se incuban los microorganismos empleados, en presencia de sulfito de sodio (1 M) y tampón de fosfato (50 mM). Además, durante la reacción puede estabilizarse adicionalmente la actividad enzimática mediante adición de fosfito o hipofosfito, donde dicha adición causa una complejación de aldehído libre inhibidor de enzima. La EP-A1 O 610 048 describe un método microbiano para la producción de α-hidroxiácidos, donde se estabiliza la actividad enzimática durante la reacción mediante adición de sulfito de sodio, lo cual causa asimismo una complejación de aldehído libre que inhibe enzima. En dicho método se permite la adición uniforme durante la transformación del nitrilo. No se manifiestan métodos para la estabilización antes del uso en la reacción.

Los métodos típicos de obtención de actividades dependientes de cisteína son un empleo de ditiotretol y/o mercaptoetanol y/o ácido etilendiaminotetraacético (ejemplo: Nitrilase de *Rhodococcus rhodochrous* J1; Kobayashi M (1989) Eur J Biochem 182: 349-356).

- 45 La estabilización de nitrilasa de *Rhodococcus* sp. ATCC 39484 fue lograda mediante la adición de sustrato (benzonitrilo) (Stevenson DE (1992) Biotechnol Appl Biochem 15:283-302). Para la velocidad de estabilización de nitrilasa de *Rhodococcus rhodochrous* NCIB 11216 son responsables aparte de la concentración de sustrato, un pH básico, la temperatura y la concentración de enzima (Harper BH (1976) Biochem Soc Trans 4:502-504; Harper BH (1977) Biochem J 165:309-319). Aquí es una desventaja que el estabilizante es transformado por la enzima y de este modo pierde con el tiempo su efecto.

Para la estabilización de la actividad enzimática de la nitrilasa de *Rhodococcus rhodochrous* J1 se describió la adición de sales inorgánicas (entre otras hasta 20% (NH₄)₂SO₄) y alcoholes (hasta 50% de glicerina, 10% de etanol) (Nagasawa T (2000) Eur J Biochem 267:138-144).

5 Para la estabilización de la actividad enzimática de nitrilasa de *Alcaligenes faecalis* JM3 se describió la adición de 60% de sulfato de amonio, NaCl 2M o 30% de propanodiol (Nagasawa T (1990) Eur J Biochem 194:765-772).

EP-A1 0 707 061 describe métodos para la estabilización de células que contienen nitrilasa mediante la adición de sales inorgánicas (fosfatos, boratos, sulfatos, sulfitos, clorhidratos) para el tampón de almacenamiento con una concentración de por lo menos 100 mM hasta el límite de saturación.

10 US 4,931,391, EP-A1 0 243 967 y US 4,900,672 describe la estabilización de una actividad de nitrilohidratasa mediante la adición a la suspensión celular de amidas o ácidos carboxílicos (o una combinación de las sustancias).

US 4,343,900 describe un método para la producción de acrilamida a partir de acrilonitrilo, donde se añaden carbonatos de metales alcalinos a la mezcla de reacción, para evitar la pérdida de actividad por hinchamiento de las células fijas empleadas.

15 US 6,251,646 y US 6,368,804 describen métodos para la estabilización de microorganismos que portan actividad de nitrilasa mediante la adición de (hidrogeno)carbonatos de amonio, sodio o potasio en concentraciones de por lo menos 0,1 M hasta la concentración de saturación.

20 Debido a los grupos aldehído reactivos, los aldehídos son clasificados como sustancias inhibitoras de las enzimas. Su efecto inhibitor de nitrilasas durante el proceso de producción es enfatizado en numerosas publicaciones (EP-B1 0 773 297 B1, p. 4 párrafos [0013] y [0025]; EP-B1 0 707 061 B1, p.2 párrafo [0005]; EP-B 1 0 666 320, p. 2 párrafo [0004] y citas de literatura allí planteadas; EP-A2 0 486 289 p. 2 fila 30 y citas de literatura allí planteadas; Yamamoto (1992) J Ferm Technol 73:425-430, en particular p. 429 del último párrafo).

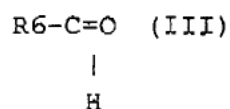
25 La reducción de la actividad nitrilasa / nitrilohidratasa en el almacenamiento es un factor esencial de costos en el aprovechamiento industrial de la mencionada enzima. Por ejemplo la actividad a 4 °C y pH 6,0 por un período de tiempo de 6,6 días cae a 36 %, lo cual significa una pérdida de actividad de 5,5 % por día (ver Fig. 1; ensayo de comparación en el ejemplo 3). Una pérdida de actividad en nitrilasas puede consistir por ejemplo en una desintegración del multímero de la enzima en sus monómeros, los cuales no poseen ninguna actividad de nitrilasa (Nagasawa T (1990) Eur J Biochem 194:765-772). Los métodos descritos son capaces de solucionar este problema sólo de modo muy limitado. Además dicho método emplea elevadas concentraciones de aditivos para la estabilización de los biocatalizadores, los cuales además después del empleo del biocatalizador tienen que ser separados y dispuestos de manera costosa.

30

De acuerdo con esto, el objetivo en el que se basaba la invención consistió en poner a disposición un método que hiciera posible una estabilización tan perdurable como fuera posible de una actividad de nitrilasa sin que se contaminara la mezcla de reacción con indeseadas sustancias colaterales.

Este objetivo fue logrado mediante el método acorde con la invención.

35 Una primera etapa de la invención se refiere a un método para la conservación y/o almacenamiento de microorganismos, que exhiben por lo menos una actividad enzimática de nitrilasa, donde la conservación y/o almacenamiento ocurre en un medio acuoso en el cual incluye por lo menos un aldehído, donde la concentración total de aldehído está en un rango de 0,1 a 100 mM/l, donde el aldehído es descrito mediante la fórmula general III:

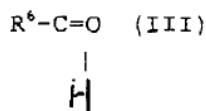


40 donde R⁶ puede ser alquilo C₁-C₁₀ sustituido o no sustituido, ramificado o no ramificado, alquenilo C₂-C₁₀ sustituido o no sustituido, ramificado o no ramificado, arilo o hetarilo sustituido o no sustituido.

45 Dicha etapa de conservación es ejecutada preferiblemente antes de añadir a las células un reactivo, cuya reacción es catalizada por las células. En una forma preferida de operar, el medio acuoso incluye una concentración total de compuesto de cianuro elegido de entre el grupo consistente en nitrilos, ácido cianhídrico y sales de cianuro, la cual asciende a máximo 10 % molar de la concentración total de aldehído. En una forma particularmente preferida de

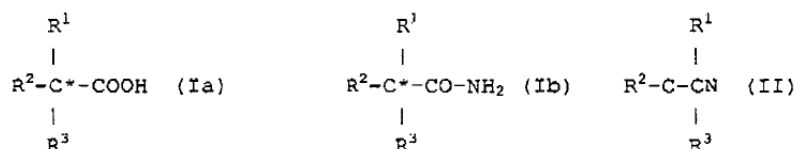
operar, el medio acuoso adecuado para la conservación y/o almacenamiento no contiene ninguna adición de dichos compuestos de cianuro.

El concepto "aldehído" es amplio de entender e incluye tanto aldehídos alifáticos como también aromáticos. De acuerdo con la invención, en lo que sigue en relación con el objetivo acorde con la invención se entienden bajo el concepto "aldehído" compuesto de la fórmula general III:



donde R⁶ puede ser alquilo C₁-C₁₀ sustituido o no sustituido, ramificado o no ramificado, alquenilo C₂-C₁₀ sustituido o no sustituido, ramificado o no ramificado, arilo o hetarilo sustituido o no sustituido. Se prefieren particularmente los aldehídos aromáticos, se prefieren muy particularmente benzaldehído no sustituido y benzaldehídos sustituidos, como por ejemplo o-clorobenzaldehído, m-clorobenzaldehído, p-clorobenzaldehído, o-bromobenzaldehído, m-bromobenzaldehído, p-bromobenzaldehído, o-metilbenzaldehído, m-metilbenzaldehído, p-metilbenzaldehído.

Los microorganismos conservados /almacenados pueden ser empleados por ejemplo para la transformación de nitrilos racémicos de la fórmula general (II) hasta ácidos carboxílicos quirales de la fórmula general (Ia) o amidas quirales de la fórmula general (Ib):



*un centro ópticamente activo

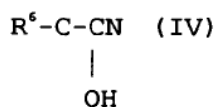
R¹, R², R³ independientemente uno de otro hidrógeno, alquilo C₁-C₁₀ sustituido o no sustituido, ramificado o no ramificado, alquenilo C₂-C₁₀ sustituido o no sustituido, ramificado o no ramificado, arilo o hetarilo sustituido o no sustituido, OR⁴ o NR⁴R⁵ y donde los radicales R¹, R² y R³ siempre son diferentes,

R⁴ hidrógeno, alquilo C₁-C₁₀ sustituido o no sustituido, ramificado o no ramificado, alquenilo C₂-C₁₀ sustituido o no sustituido, ramificado o no ramificado, alquilcarbonilo C₁-C₁₀, alquenilcarbonilo C₂-C₁₀, arilo, arilcarbonilo, hetarilo o hetarilcarbonilo,

R⁵ hidrógeno, alquilo C₁-C₁₀ sustituido o no sustituido, ramificado o no ramificado, alquenilo C₂-C₁₀ sustituido o no sustituido, ramificado o no ramificado, arilo o hetarilo.

Como nitrilos se prefieren al máximo mandelonitrilo, o-cloromandelonitrilo, p-cloromandelonitrilo, m-cloromandelonitrilo, o-bromomandelonitrilo, p-bromomandelonitrilo, m-bromomandelonitrilo, o-metilmandelonitrilo, p-metilmandelonitrilo o m-metilmandelonitrilo. Como ácidos carboxílicos quirales se prefieren al máximo ácido R-mandélico, ácido S-mandélico, ácido R-p-cloromandélico, ácido m-metilmandélico. Como ácidos carboxílicos quirales se prefieren al máximo ácido R-mandélico, ácido S-mandélico, ácido R-p-cloromandélico, ácido S-p-cloromandélico, ácido R-m-cloromandélico, ácido S-m-cloromandélico, ácido R-o-cloromandélico, ácido S-o-cloromandélico, ácido S-o-bromomandélico, ácido S-p-bromomandélico, ácido S-m-bromomandélico, ácido S-o-metilmandélico, ácido S-p-metilmandélico, ácido S-m-metilmandélico, ácido R-o-bromomandélico, ácido R-p-bromomandélico, ácido R-m-bromomandélico, ácido R-o-metilmandélico, ácido R-p-metilmandélico o R-m-metilmandélico.

Si como reactivos para la reacción esperada catalizada por nitrilasa se emplean α-hidroxinitrilos de la fórmula general (IV) (donde para R⁶ vale la misma definición que en la fórmula general III),



entonces el aldehído empleado para la conservación/almacenamiento es preferiblemente el mismo aldehído, el cual mediante reacción con ácido cianhídrico o cianuro produce dicho α -hidroxinitrilo, es decir en las fórmulas generales III y IV se elige preferiblemente un radical R⁶ idéntico.

5 La concentración total de aldehídos en el medio acuoso adecuado para la conservación y/o almacenamiento es de 0,1 a 100 mM/l, preferiblemente 0,2 a 50 mM/l, particularmente preferido 0,5 a 10 mM/l, muy particularmente preferido 0,3 a 5 mM/l, preferido al máximo 0,4 a 2 mM/l.

10 El medio acuoso puede tener un valor de pH neutro, débilmente básico o débilmente ácido. De modo correspondiente el pH está en un rango de pH 6 a 8, preferiblemente pH 6,5 a 7, 5. La temperatura de conservación está preferiblemente en un rango de 0 a 40°C, particularmente preferido 1 a 10°C, muy particularmente preferido 2 a 5°C.

El método acorde con la invención probó ser extraordinariamente adecuado tanto en condiciones de laboratorio como también bajo condiciones de producción para garantizar una actividad enzimática perdurable. El biocatalizador no mostró desactivación dentro de los 37 días observados.

En el marco de esta invención, "microorganismos" significa bacterias gram-positivas o gram-negativas.

15 Se prefieren todas las clases y géneros de las Enterobacteriaceae o familias y del orden Actinomycetales, muy particularmente preferido en las clases de Enterobacteriaceae Escherichia, Serratia, Proteus, Enterobacter, Klebsiella, Salmonella, Shigella, Edwardsiella, Citrobacter, Morganella, Providencia y Yersinia.

20 Además se prefieren las clases Pseudomonas, Burkholderia, Nocardia, Acetobacter, Gluconobacter, Corynebacterium, Brevibacterium, Bacillus, Clostridium, Cyanobacter, Staphylococcus, Aerobacter, Alcaligenes, Rhodococcus y Penicillium.

Las más preferidas son las clases Escherichia, en particular Escherichia coli.

25 Durante el método acorde con la invención, el microorganismo puede estar presente en un estado de crecimiento, de reposo, inmovilizado o macerado. Se entiende por células maceradas por ejemplo células que mediante un tratamiento con por ejemplo solventes han sido convertidas en porosas, o células que fueron rotas por un tratamiento enzimático, por un tratamiento mecánico (por ejemplo prensa francesa o ultrasonido) o por otro método. Los extractos crudos así obtenidos son ventajosamente adecuados para el método acorde con la invención. También pueden emplearse para el método preparaciones enzimáticas total o parcialmente purificadas. Así mismo son adecuados microorganismos o enzimas inmovilizados, que pueden encontrar aplicación ventajosa en la reacción. La inmovilización puede ser realizada por ejemplo mediante adición de uno o varios acrilmonómeros (como 30 por ejemplo acrilamida, ácido acrílico, metacrilamida, ácido metacrílico, N,N-dimetilacrilamida, N,N-dietilacrilamida, acrilato de dimetilaminopropilo, metacrilato de dimetilaminopropilo, dimetilaminopropilacrilamida, dimetilaminopropilmetacrilamida, dietilaminopropilacrilamida o dietilaminopropilmetacrilamida) así como dado el caso uno o varios agentes entrelazantes (como por ejemplo metilénbisacrilamida, metilénbismetacrilamida, 1,2-dihidroxietilénbisacrilamida o ácido bisacrilamidoacético), a la preparación celular o enzimática y subsiguiente 35 polimerización por radicales (iniciada por ejemplo mediante persulfato de amonio).

Para impedir un ataque con bacterias extrañas u hongos pueden añadirse a la solución de conservación /almacenamiento dado el caso principios activos adecuados con efecto antibacterial o fungicida, u otras sales como por ejemplo ácido etilendiaminotetraacético.

40 Los microorganismos que se usan en el método acorde con la invención pueden ser cultivados -antes de la conservación/almacenamiento- en un medio que hace posible el crecimiento de estos organismos. Este medio puede ser un medio sintético o natural. Dependiendo del organismo, se emplean medios conocidos por los expertos. Para el crecimiento de los microorganismos, los medios empleados contienen una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno, sales inorgánicas y dado el caso pequeñas cantidades de vitaminas y elementos traza.

45 Por ejemplo son fuentes ventajosas de carbono los polioles como glicerina, azúcares como mono-, di- o polisacáridos como glucosa, fructosa, manosa, xilosa, galactosa, ribosa, sorbosa, ribulosa, lactosa, maltosa, sacarosa, rafinosa, almidón o celulosa, fuentes complejas de azúcar como melaza, fosfatos de azúcar como fructosa-1,6-bisfosfato, alcoholes de azúcar como manitol, alcoholes como metanol, etanol, ácidos carboxílicos como ácido cítrico, ácido láctico o ácido acético, grasas como aceite de soya o aceite de colza, aminoácidos como una mezcla de aminoácidos por ejemplo el denominado ácido Casamino (Difco) o aminoácidos individuales como glicina, 50 o ácido asparagínico o aminoazúcares, los últimos mencionados pueden ser empleados también simultáneamente como fuente de nitrógeno. Se prefieren particularmente polioles, en particular glicerina.

5 Son fuentes ventajosas de nitrógeno los compuestos orgánicos o inorgánicos de nitrógeno o materiales que contienen estos compuestos. Son ejemplos las sales de amonio como NH_4Cl o $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, nitrato de urea, o fuentes complejas de nitrógeno como licor de maíz fermentado, autolisado de levadura de cerveza, harina de granos de soya, gluten de maíz, extracto de levadura, peptona, extracto de carne, hidrolizado de caseína, levadura o proteínas de patata, que frecuentemente pueden servir también simultáneamente como fuente de nitrógeno.

Son ejemplos de sales inorgánicas las sales de calcio, magnesio, sodio, cobalto, molibdeno, manganeso, potasio, zinc, hierro y cobre. Como anión de estas sales se mencionan particularmente los iones cloro, sulfato y fosfato. Un factor importante para la modulación de la productividad del método acorde con la invención es el control de la concentración de iones Fe^{2+} o Fe^{3+} en el medio de producción.

10 Dado el caso se añaden al medio nutritivo otros factores de crecimiento, como por ejemplo vitaminas o promotores de crecimiento como biotina, 2-KLG, tiamina, ácido fólico, ácido nicotínico, pantotenato o piridoxina, aminoácidos, alanina, cisteína, prolina, ácido asparagínico, glutamina, serina, fenilalanina, ornitina o valina, ácidos carboxílicos, ácido cítrico, ácido fórmico, ácido pimélico o ácido láctico, o sustancias como ditiotreitol.

15 La relación de mezcla de las mencionadas sustancias nutritivas depende del tipo de fermentación y es determinada en el caso individual. Los componentes del medio pueden estar presentes todos al comienzo de la fermentación, después de que ellos en caso de ser necesario fueron esterilizados por separado o conjuntamente, o dependiendo de la necesidad son añadidos posteriormente durante la fermentación en forma continua o discontinua.

20 Las condiciones de cultivo son determinadas de manera que los organismos crecen de modo que se alcanza el mejor rendimiento posible (para determinar por ejemplo mediante la cantidad de actividad de la proteína recombinante expresada). Las temperaturas preferidas de cultivo están en 15°C a 40°C . Son particularmente ventajosas las temperaturas entre 25°C y 37°C . Preferiblemente se mantiene valor de pH en un rango de 3 a 9. Son particularmente ventajosos valores de pH entre 5 y 8. En general es suficiente una duración de incubación inferior a horas hasta unos días, preferiblemente de 8 horas hasta 21 días, particularmente preferido de 4 horas hasta 14 días.

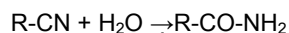
25 Como medios que pueden optimizarse ventajosamente, los expertos pueden tomar por ejemplo del libro de texto Applied Microbiol Physiology, "A Practical Approach" (Eds. PM Rhodes, PF Stanbury, IRL-Press, 1997, p. 53-73, ISBN 0 19 963577 3).

El aldehído puede ser añadido para la conservación/almacenamiento antes, durante o después del cultivo del organismo. Así es posible por ejemplo alcanzar una obtención máxima de actividad, en lo cual el aldehído es añadido a la carga de fermentación sin mayor separación de los microorganismos.

30 Sin embargo, así mismo es posible separar los microorganismos o células microbianas así cultivadas del medio de cultivo, por ejemplo mediante centrifugación del medio de cultivo, de modo opcional lavar una o varias veces con un tampón adecuado (como por ejemplo tampón de borato o fosfato) y a continuación incorporar o bien resuspender para el almacenamiento /conservación en la solución acuosa que incluye por lo menos un aldehído. La concentración de los microorganismos puede ser elegida en dicha solución acuosa discrecionalmente incluyendo por lo menos un aldehído.

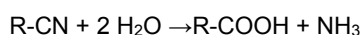
Los microorganismos que se usan en el marco de la invención exhiben por lo menos actividad de nitrilasa.

Actividad de "nitrilohidratasa" significa en general la propiedad de catalizar la adición de un equivalente molar de agua a un nitrilo hasta dar la correspondiente amida:



40 Las nitrilohidratasas incluyen preferiblemente enzimas de la clase EC 4.2.1.84 (nitrilohidratasas).

Actividad de "nitrilasa" significa en general la propiedad de catalizar la adición de dos equivalentes molares de agua a un nitrilo hasta dar el correspondiente ácido carboxílico:



45 Las nitrilasa incluyen preferiblemente enzimas de la clase EC 3.5.5.1 (nitrilasas), 3.5.5.2 (ricininnitrilasas), 3.5.5.4 (cianoalaninnitrilasas), 3.5.5.5 (arilacetonnitrilasas), 3.5.5.6 (bromoxinilnitrilasas), 3.5.5.7 (nitrilasas alifáticas).

La actividad de nitrilasa de las células de dichos microorganismos puede ser natural o de origen recombinante.

ES 2 374 617 T3

5 En ello, "origen natural" significa que el microorganismo exhibe como tal - sin un cambio genético causado por manipulación humana - una correspondiente actividad de nitrilasa. Muchos de tales microorganismos son conocidos por los expertos. Se prefieren en particular microorganismos de los géneros *Rhodococcus* y *Gordona*, como por ejemplo *Rhodococcus* sp. HT40-6 (FERM BP-5231), *Rhodococcus rhodochrous* ATCC 33278, *Rhodococcus rhodochrous* J-1 (FERM BP-1478), *Gordona terrae* MA-1 (FERM BP-4535) (JP-A-4-222591, JP-B-6-55148, EP-A1 0 707 061).

10 En ello, "origen recombinante" significa que se aísla de un microorganismo la secuencia de ADN que codifica para una enzima con actividad de nitrilasa y se expresa en un microorganismo de otro tipo. Los expertos conocen muchas secuencias que codifican para una actividad enzimática de nitrilasa y/o nitrilohidratasa. Son de mencionar como ejemplo aunque sin ser limitantes:

1. Nitrilasa de *Acidovorax facilis* 72W (Gavagan JE et al. (1999) *Appl Microbiol Biotechnol* 52:654-659)
2. Nitrilasa de *Acinetobacter* sp. AK 226 (Yamamoto K y Komatsu K (1991) *Agric Biol Chem* 55(6):1459-1466)
3. Nitrilasa de *Acinetobacter* sp. RFB1 (Finnegan I et al. (1991) *Appl Microbiol Biotechnol* 36:142-144)
- 15 4. Nitrilasa de *Alcaligenes faecalis* ATCC 8750 (Yamamoto K et al. (1991) *Appl Environ Microbiol* 57(10):3028-3032)
5. Nitrilasa de *Alcaligenes faecalis* JM3 (Nagasawa T et al. (1990) *Eur J Biochem* 194:765-772)
6. Nitrilasas (NIT1/NIT2/NIT3) de *Arabidopsis thaliana* (Vorwerk S et al. (2001) *Planta* 212:508-516)
7. Nitrilasa de *Arthrobactersp.* J-1 (BandyopadhyayAKetal. (1986) *Appl Environ Microbiol* 51(2):302-306)
- 20 8. Nitrilasa de *Bacillus pallidus* Dac521 (Cramp R et al. (1997) *Microbiology* 143:2313-2320)
9. Nitrilasa de *Comamonas* sp. NI1 (Cerbelaud E et al. (1996) *Ind Chem Libr* 8:189-200)
10. Nitrilasa de *Comamonas testosteroni* sp. (Levy-Schil S et al. (1995) *Gene* 161:15-20)
11. Nitrilasa de *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* (Goldlust A y Bohak Z (1989) *Biotechnol Appl Biochem* 11: 581-601)
- 25 12. Nitrilasa de *Fusarium solani* (Harper BH (1977) *Biochem J* 167:685-692)
13. Nitrilasa de *Klebsiella ozaenae* (McBride KE et al. (1986) *Appl Environ Microbiol* 52(2):325-330)
14. Nitrilasa de *Pseudomonas fluorescenz* DSM 7155 (Layh N et al. (1998) *J Mol Catal B: Enzym* 5:467-474)
15. Nitrilasa de *Pseudomonas* sp. (Layh N et al. (1992) *Arch Microbiol* 158:405-411)
- 30 16. Nitrilasa de *Pseudomonas* sp. (S1) (Dhillon J et al. (1999) *Can J Microbiol* 45: 811-815)
17. Nitrilasa de *Pseudomonas* sp. 13 (Yanase H et al. (1982) *Agric Biol Chem* 46:2925)
18. Nitrilasa de *Rhodococcus rhodochrous* J1 (Kobayashi M et al. (1989) *Eur J Biochem* 182:349-356)
19. Nitrilasa de *Rhodococcus rhodochrous* K22 (Kobayashi M et al. (1990) *J Bacteriol* 172(9):4807-4815)
20. Nitrilasa de *Rhodococcus rhodochrous* NCIB11215 (Harper BH (1985) *Int J Biochem* 17(6):677-683)
- 35 21. Nitrilasa de *Rhodococcus rhodochrous* NCIB11216 (Harper BH (1977) *Biochem J* 165:309-319)
22. Nitrilasa de *Rhodococcus rhodochrous* PA34 (Bhalla TC et al. (1992) *Appl Microbiol Biotechnol* 37:184-190)

23. Nitrilasa de *Rhodococcus* sp. ATCC 39484 (Stevenson DE et al. (1992) *Biotechnol Appl Biochem* 15:283-302)

En una forma preferida de operar se describe la nitrilasa mediante una secuencia de aminoácidos, que es codificada por una secuencia de ácidos nucleicos elegida de entre el grupo de

- 5 a) una secuencia de ácidos nucleicos con la secuencia representada en SEQ ID NO: 1,
- b) secuencias de ácidos nucleicos que se derivan como resultado del código genético degenerado de la secuencia de ácidos nucleicos representada en SEQ ID NO: 1,
- 10 c) derivados de la secuencia de ácidos nucleicos representada en SEQ ID NO: 1, que codifica para polipéptidos con la secuencia de aminoácidos representada en SEQ ID NO: 2 y exhibe una homología de por lo menos 35% al nivel de aminoácidos y que son capaces de transformar por lo menos un nitrilo hasta el correspondiente ácido carboxílico.

La expresión de nitrilasas/nitrilohidratasas recombinantes puede ser realizada por ejemplo por medio de un fragmento adecuado de ADN introducido en el microorganismo. Preferiblemente el fragmento de ADN es un vector. Los vectores pueden ser por ejemplo plásmidos, cósmidos o fagos. Preferiblemente el vector es un plásmido circular, que incluye en forma recombinante la secuencia de ácido nucleico que va a ser expresada y que es capaz de dar replicación autónoma en la célula huésped procariótica. Como ejemplos de vectores se mencionan:

- 15 a) en *E.coli* se prefieren pQE70, pQE60 y pQE-9 (QIAGEN, Inc.); vectores pBluescript, vectores Phagescript, pNH8A, pNH16a, pNH18A, pNH46A (Stratagene Cloning Systems, Inc.); ptrc99a, pKK223-3, pKK233-3, pDR540, pRIT5 (Pharmacia Biotech, Inc.); pLG338, pACYC184, pBR322, pUC18, pUC19, pKC30, pRep4, pHS1, pHS2, pPLc236, pMBL24, pLG200, pUR290, pIN-III113-B1, λ gt11 o pBdCl,
- 20 b) en *Streptomyces* se prefieren pIJ101, pIJ364, pIJ702 o pIJ361,
- c) en *Bacillus* se prefieren pUB110, pC194 o pBD214,
- d) en *Corynebacterium* pSA77 o pAJ667,

25 o derivados de los plásmidos antes mencionados. Los plásmidos mencionados representan una pequeña selección de los plásmidos posibles. Otros plásmidos son bien conocidos por los expertos y pueden ser tomados por ejemplo del libro *Cloning Vektors* (Eds. Pouwels P. H. et al. Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, 1985, ISBN 0 444 904018).

30 El fragmento de ADN incluye por lo menos una secuencia de ácidos nucleicos que va a ser expresada, que codifica para una enzima con actividad de nitrilasa en unión funcional con un promotor funcional en el respectivo microorganismo empleado.

Los expertos conocen numerosos promotores funcionales de microorganismos: como ejemplos se mencionan promotores como *cos-*, *tac-*, *trp-*, *tet-*, *lpp-*, *lac-*, *lacIq-*, *T7-*, *T5-*, *T3-*, *gal-*, *trc-*, *ara-*, *rha-*, *SP6-*, λ -PR - o λ -PL. Se prefiere particularmente el promotor del operón de ramnosa (promotor *rha*) de *E.coli*, el cual puede ser inducido mediante adición de ramnosa.

35 Se entiende por una unión funcional en general un arreglo en el cual una secuencia genética de control (por ejemplo un promotor) puede ejercer su función en relación con la secuencia de ácido nucleico que va a ser expresada. En ello, función puede significar por ejemplo el control de la expresión, es decir transcripción y/o traducción de la secuencia de ácidos nucleicos. Control incluye en ello por ejemplo la iniciación, modulación, elevación o supresión de la expresión, es decir transcripción y dado el caso traducción. Se entiende por unión funcional por ejemplo el

40 arreglo secuencial de un promotor de la secuencia de ácidos nucleicos que va a ser expresada y dado el caso de otros elementos reguladores como por ejemplo un terminador, de modo que todos los elementos reguladores pueden satisfacer su función en la expresión de la secuencia de ácido nucleico. Los expertos conocen diferentes vías para alcanzar uno de los fragmentos de ADN acordes con la invención. La producción puede ser efectuada por medio de técnicas corrientes de recombinación y clonación como se describen por ejemplo en T Maniatis, EF Fritsch y J Sambrook, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989) así como en TJ Silhavy, ML Berman y LW Enquist, *Experiments with Gene Fusions*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1984) y en Ausubel, FM et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience (1987).

45

5 Dicho fragmento de ADN puede contener otros elementos funcionales. Es de entender el concepto de elemento funcional ampliamente y que significa todas aquellas secuencias que tienen una influencia en la realización, la multiplicación o función del fragmento de ADN u organismos acordes con la invención. Los elementos funcionales garantizan, fortalecen, regulan o modifican por ejemplo la transcripción y dado el caso traducción en el correspondiente organismo huésped.

10 Por ejemplo los elementos funcionales son descritos por "Goeddel; Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990) " o "Gruber and Crosby, en: Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology, CRC Press, Boca Raton, Florida, eds.: Glick and Thompson, capítulo 7, 89-108" así como en las citas allí mostradas. Dependiendo del organismo huésped u organismo de partida descrito en más detalle abajo, el cual es transformado en un organismo transgénico o genéticamente modificado mediante la incorporación de cintas de expresión o vectores, son adecuadas diferentes secuencias de control.

Las "secuencias genéticas de control" incluyen por ejemplo la región 5' no traducida o la región 3' que no codifica de los genes. "Secuencias genéticas de control " significa además secuencias que codifican para la proteína de fusión que está compuesta por una secuencia de señal de péptidos.

15 Como ejemplos son de mencionar pero no son limitantes:

20 a) marcadores de selección: los marcadores de selección son necesarios por regla general, para seleccionar exitosamente células transformadas e impedir la pérdida del fragmento de ADN de la célula huésped a lo largo del tiempo y la fragmentación celular. Tal pérdida puede ocurrir en particular entonces cuando la proteína recombinante codificada por la secuencia de ácidos nucleicos que va a ser expresada tiene un efecto tóxico sobre el organismo procariótico. Los marcadores seleccionables incorporados con el fragmento de expresión otorgan a las células exitosamente transformadas una resistencia frente a un biocida (por ejemplo un antibiótico como por ejemplo ampicilina, canamicina o higromicina). Como ejemplos de marcadores de selección se mencionan:

- Amp (resistencia a la ampicilina; b-Lactamasa)

25 - Cab (resistencia a la carbenicilina)

- Cam (resistencia al cloramfenicol)

- Kan (resistencia a la canamicina)

- Rif (resistencia a la rifampicina)

- Tet (resistencia a la tetraciclina)

30 - Zeo (resistencia a la zeocina)

- Spec (espectinomycin)

Se mantiene la presión de selección mediante las correspondientes cantidades de antibiótico. Se mencionan por ejemplo: ampicilina 100 mg/l, carbenicilina 100 mg/l, cloramfenicol 35 mg/l, canamicina 30 mg/l, rifampicina 200 mg/l, tetraciclina 12,5 mg/l, espectinomycin 50 mg/l.

35 Los marcadores de selección incluyen además aquellos genes y productos de gen que por ejemplo por complementación de una deficiencia genética en la síntesis de aminoácidos con nucleótidos, hacen posible una selección de una correspondiente célula huésped transformada. Para ello se emplean por ejemplo medios que no contienen dichos aminoácidos o dichos elementos de nucleótido. Tales diferentes sistemas son conocidos por los expertos. Por ejemplo se mencionan las deficiencias en la biosíntesis de triptofano (por ejemplo trpC), leucina (por ejemplo leuB), histidina (por ejemplo hisB), como están presentes por ejemplo en la cepa E.coli KC8 (Clontech). Estas deficiencias pueden ser complementadas entre otros mediante los marcadores seleccionables TRP1, Leu2 y HIS3.

40 b) terminadores de transcripción: el terminador de transcripción disminuye una transcripción indeseada y eleva la estabilidad del plásmido y del mRNA.

45 c) secuencias Shine-Dalgarno: una secuencia Shine-Dalgarno (SD) es necesaria para el inicio de la traducción y es complementaria al extremo 3' del ARN 16S ribosomal. La eficiencia de inicio de la traducción en el codón de inicio depende de la verdadera secuencia. Una secuencia adecuada de consenso

para E.coli es por ejemplo: 5'-TAAGGAGG-3'. Ella está localizada aproximadamente 4 a 14 nucleótidos corriente arriba del codón de inicio, donde el óptimo está en 8 nucleótidos. Para evitar la formación de estructuras secundarias (las cuales pueden reducir la expresión), esta región debería ser preferiblemente rica en nucleótidos A/T.

- 5 d) Codón de inicio: el codón de inicio es el punto de inicio de la traducción. En E. coli la mayoría de las veces el codón de inicio usado es ATG; de modo alternativo, puede usarse también GTG.
- 10 e) "Tags" y proteínas de fusión: pueden ser ventajosas funciones terminales en N o C de la proteína recombinante que va ser expresada, con péptidos cortos ("Tags") u otras proteínas (asociados de fusión). Ellos pueden hacer posible por ejemplo una mejor expresión, solubilidad, purificación y capacidad de ser detectados. Preferiblemente se combinan tales fusiones con secuencias de escisión de proteasa (por ejemplo para trombina o factor X), lo cual hace posible una eliminación del "Tags" o bien del asociado de fusión después de la expresión y purificación.
- f) regiones múltiples de clonación (*Multiple cloning site*; MCS) permiten y facilitan la inserción de una o varias secuencias de ácido nucleico.
- 15 g) codón de inicio/terminadores de traducción: de los tres posibles codones de inicio se prefiere TAA, puesto que por TAG y TGA tal vez puede haber una "lectura" ("*Read-Through*") sin interrupción de la traducción. Como consecuencia, pueden emplearse también varios codones de parada para garantizar una terminación confiable.
- 20 h) Genes de reporte: los genes de reporte codifican para una proteína fácilmente cuantificable, que por color propio o actividad enzimática hacen posible una valoración de la β -glucuronidasa, "Green Fluorescence Protein", acetil-, fosfo- o adeniltransferasas (ver también Schenborn E, Groskreutz D (1999) *Mol Biotechnol* 13(1):29-44).

25 La producción de un microorganismo transformado requiere que el correspondiente ADN (por ejemplo una de las cintas de expresión o vectores acordes con la invención) sea incorporado en la correspondiente célula huésped. Para este procedimiento, que se define como transformación, está disponible una multiplicidad de métodos (ver también Keown et al. (1990) *Methods in Enzymology* 185:527-537). De este modo por ejemplo el ADN puede ser introducido directamente mediante microinyección, electroevaporación o mediante bombardeo con micropartículas recubiertas con ADN (método biolístico con el cañón de genes "bombardeo con partículas"). También pueden ser permeabilizadas las células por vía química, por ejemplo con polietilenglicol, de modo que el ADN pueda llegar a la

30 célula mediante difusión. El ADN puede resultar también por fusión con otras unidades que contienen ADN como minicélulas, células, lisosomas o liposomas. La electroevaporación es otro método adecuado para la introducción de ADN, en el cual las células son permeabilizadas de modo reversible mediante un impulso eléctrico. Son de mencionar como métodos generales preferidos la transformación promovida por fosfato de calcio, transformación promovida por DEAE-dextran, transformación catiónica promovida por lípidos, electroevaporación, transducción, infección. Tales métodos son familiares para los expertos y descritos por ejemplo (Davis et al.(1986) *Basic Methods In Molecular Biology*; Sambrook J et al. (1989) *Molecular cloning: A laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Ausubel FM et al. (1994) *Current protocols in molecular biology*, John Wiley and Sons; Glover DM et al. (1995) *ADN Cloning Vol.1*, IRL Press ISBN 019-963476-9).

40 Las células transformadas, es decir aquellas que contienen incorporado ADN, pueden ser seleccionadas de las no transformadas, cuando un marcador seleccionable es componente del ADN introducido. Arriba se describen diferentes marcadores de selección.

La preparación de microorganismos justamente descrita, que exhibe por lo menos una actividad enzimática de nitrilasa, incluye por ejemplo

- a) por lo menos un aldehído con una concentración total de aldehído en un rango de 0,1 a 100 mM/l, y
- 45 b) compuestos de cianuro elegidos de entre el grupo consistente en nitrilos, ácido cianhídrico y sales de cianuro, en una concentración total que es máximo 10 % molar de la concentración total de aldehído.

En una forma particularmente preferida de operar, la preparación no contiene adiciones de dichos compuestos de cianuro.

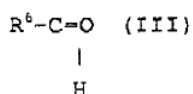
50 La preparación de microorganismos puede ser empleada para la producción de alimentos o forraje, farmacéuticos o sustancias químicas finas. Sustancias químicas finas significa proteínas, enzimas, vitaminas, aminoácidos, azúcares, ácidos grasos, colorantes, saborizantes, odorizantes naturales y sintéticos preferidos.

En métodos para la producción de proteínas recombinantes, enzimas (preferiblemente enzimas con actividad de nitrilasa) u otras sustancias químicas finas como por ejemplo amidas o ácidos carboxílicos (preferiblemente ácidos carboxílicos y amidas quirales) puede emplearse la preparación de microorganismos o una preparación de los mismos.

5 Un objetivo preferido se refiere a un método para la producción de ácidos carboxílicos y/o amidas (preferiblemente ácidos carboxílicos/amidas quirales), que incluye las siguientes etapas:

a) cultivo de un microorganismo que exhibe por lo menos una actividad enzimática de nitrilasa,

10 b) adición de un por lo menos un aldehído donde la concentración total de éste está en un rango de 0,1 a 100 mM/l, y donde se añade el aldehído durante o después del cultivo, donde el aldehído es descrito mediante la fórmula general III:



donde R⁶ puede ser alquilo C₁-C₁₀ sustituido o no sustituido, ramificado o no ramificado, alquenilo C₂-C₁₀ sustituido o no sustituido, ramificado o no ramificado, arilo o heteroarilo sustituido o no sustituido.

15 c) puesta en contacto de la preparación de dicho microorganismo añadida con aldehído, con por lo menos un nitrilo y reacción de dicho nitrilo hasta dar un ácido carboxílico y/o una amida.

20 En una forma preferida de operar, la preparación del microorganismo con la adición del aldehído incluye compuestos de cianuro elegidos de entre el grupo consistente en nitrilos, ácido cianhídrico y sales de cianuro, en una concentración que contribuye en máximo 10 % molar de la concentración total de aldehído. En una forma particularmente preferida de operar, dicha preparación no contiene adiciones de dichos compuestos de cianuro. En una forma más preferida de operar, la preparación puede ser almacenada después de la adición del aldehído (etapa b) hasta el uso en la etapa de reacción c). El método puede ser ejecutado de modo continuo o discontinuo en lote o en lote alimentado. En ello puede alimentarse de nuevo como sustrato tanto la preparación del microorganismo como también el nitrilo racémico.

25 Por ejemplo, en WO 00/23577 se describen en detalle particularidades de la ejecución de las reacciones o bien de la purificación del producto, etc. Se hace referencia expresa a los reactivos, productos y parámetros del método allí descritos.

En otra forma de operar puede combinarse el método con otros métodos para la estabilización, conservación y/o almacenamiento de las enzimas, en particular nitrilasas. Tales métodos pueden incluir como ejemplo, aunque sin ser limitantes:

30 a) adición de por lo menos una sal inorgánica (preferiblemente elegida de entre el grupo consistente en fosfatos, boratos, sulfatos, sulfitos y clorhidratos) en una concentración de por lo menos 100 mM, preferiblemente 300 a 700 mM.

b) adición de sales metálicas, cuyo catión metálico actúa como grupo prostético de las nitrilasas (por ejemplo cloruro de cobalto o sulfato de hierro).

35 c) adición de nitrilos (por ejemplo benzonitrilo, isobutironitrilo, succinonitrilo) y/o amidas (s-caprolactama, isobutilamida, propionamida).

Ilustraciones

Fig.1: estabilidad al almacenamiento de una nitrilasa para la producción de ácido (R)-mandélico.

40 Se despliega por ejemplo la reducción de la actividad (A; en % de la actividad inicial) de tres preparaciones independientes de una E.coli que expresa nitrilasa sin adición de aldehído (ensayo de comparación) por un periodo de tiempo de hasta ...

Ilustraciones

Fig.1: estabilidad al almacenamiento de una nitrilasa para la producción de ácido (R)-mandélico. Se despliega como ejemplo la reducción de actividad (A; en % de la actividad inicial) de tres preparaciones independientes de una nitrilasa expresada en E.coli sin adición de aldehído (prueba de comparación) por un periodo de tiempo de hasta 20 días (d).

5 Fig.2: estabilidad al almacenamiento de una nitrilasa para la producción de ácido (R)-mandélico. Se despliega la reducción de actividad (A; en % de la actividad inicial) de preparaciones de una nitrilasa que expresa E.coli sin adición de 2-clorobenzaldehído (círculos abiertos) en comparación con una por otro lado idéntica preparación con adición de 2-clorobenzaldehído (círculos cerrados). Se despliega un periodo de tiempo (t) de hasta 32 días (d).

10 **Ejemplos**

15 Cuando no se diga otra cosa, los métodos generales de ácidos nucleicos como por ejemplo clonación, escisión de restricciones, electroforesis en gel de agarosa, unión de fragmentos de ADN, transformación de microorganismos, cultivo de bacterias y análisis de secuencia de ADN recombinante, fueron ejecutados como se describe por Sambrook et al. (1989) (Cold Spring Harbor Laboratory Press: ISBN 0-87969-309-6). La determinación de secuencia de moléculas de ADN recombinante ocurrió con un equipo secuenciador de ADN por láser de fluorescencia de la compañía ABI según el método de Sanger (Sanger et al. (1977) Proc Natl Acad Sci USA 74:5463-5467). Se determinó la secuencia de los fragmentos resultantes de una reacción en cadena de polimerasa y se la comprobó, para evitar los errores de polimerasa en fragmentos que van a ser expresados.

Ejemplo 1: producción de células con actividad de nitrilasa:

20 La fermentación de Escherichia coli (TG10 pDHE1650 pAgro4 pHSG575) ocurrió en el bioreactor de 20 L. Se inoculó el reactor con un volumen de trabajo de 10 l, con 200 ml de cultivo previo de matraz de agitación. El medio de cultivo previo corresponde al medio de cultivo principal.

Medio:

- 40 g de glicerina 99,5 %
- 25 15 g de triptona
- 13,3 g de hidrogenofosfato de potasio
- 5 g de extracto de levadura
- 4 g de hidrogenofosfato de di-amonio
- 1,7g de ácido cítrico
- 30 1,1 g de sulfato de magnesio heptahidratado
- 1 ml de elementos traza SL Korz 1000 C
- 0,1 ml de agente antiespumante Tego KS 911
- 0,062 g de sulfato de hierro (II) heptahidratado
- 10 mg de clorhidrato de tiamina
- 35 hasta 1 l con agua totalmente desmineralizada

Se estabiliza el medio por 30 min a 121°C. A continuación se añaden 0,1 g de ampicilina estéril.

Solución de elementos traza

Ácido cítrico*H₂O 20 g

ES 2 374 617 T3

	Cloruro de cobalto (II) hexacloruro	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	2,5 g
	Cloruro de manganeso (II) tetracloruro	$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	3,0 g
	Cloruro de cobre (II) dihidrato	$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,3 g
	Ácido bórico	H_3BO_3	0,6 g
5	Molibdato de sodio dihidrato	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,5 g
	Acetato de zinc dihidrato $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ hasta 1L H_2O		
	agua totalmente desmineralizada	* $2\text{H}_2\text{O}$	2,6 g

Solución de alimentación de glicerina

	2 L	agua totalmente desmineralizada
10	211 g	sulfato de sodio
	13,6 g	sulfato de hierro (II) heptahidrato
	8,8 kg	glicerina 99,5 %
	220 mL	solución de elementos traza

Solución de alimentación de ramnosa

15	703 g	agua totalmente desmineralizada
	297 g	mono hidrato de ramnosa

20 La fermentación ocurre a una temperatura de 37°C. Se regula la aplicación de gas entre 8-30 L/min, el número de revoluciones del agitador en 400-15001/min para no tener una pO_2 inferior a 20 %. Después de un tiempo de fermentación de 1h se induce el cultivo con IPTG (0, 15 mM). A continuación se añaden 18.5 g de solución de alimentación de ramnosa. Después de haberse consumido la cantidad de glicerina presente se añade de modo suplementario glicerina continuamente. Después de una duración de fermentación de 44 h se obtienen suspensiones celulares de 50 g BTM/l y 50 a 60 kU/l. Se enfrían las células para 4°C.

Ejemplo 2: prueba de actividad

25 [0081] A 880 μl de tampón de fosfato de sodio-potasio (10mM) se añaden con pipeta 50 μl de suspensión celular y se atempera a 30°C. Se inicia la reacción mediante adición de 20 μl de solución metanólica de mandelonitrilo (12 %). Después de 10 min se detiene en la reacción enzimática mediante adición de 50 μl de HCX 1M. Se separa por centrifugación la masa celular y se mide la concentración de ácido mandélico en el sobrenadante mediante HPLC (ODS Hypersil 100*2,0 mm, fase móvil: H_3PO_4 75% (14,8 mM) / metanol 25%; tasa de flujo: 0,5 ml/min; volumen de inyección: 2 μl ; temperatura de la columna: 40°C; detección: 210 nm; tiempo de retención del ácido mandélico: 0,9 min).

Ejemplo 3: almacenamiento con benzaldehído:

14 h después de haber terminado la fermentación, se ajustó el valor de pH de la suspensión celular a 6,0, 6,6 o bien 7,2 con NaOH o bien H_2SO_4 y a continuación se añadió benzaldehído. Se almacenaron las muestras a 4°C y 22°C. Se determinó la actividad enzimática 0,6, 3,6 y 6,6 días después de terminada la fermentación.

ES 2 374 617 T3

Almacenamiento a 22°C:

	Valor de pH	Tiempo de almacenamiento		
		0,6 d	3,6 d	6,6 d
		Actividad en kU/L		
Sin adición	7,2	51,0	49,0	48,7
Benzaldehído 1 mM	7,2	55,8	50,4	48,7
Benzaldehído 5 mM	7,2	47,1	51,7	52,9
Benzaldehído 10 mM	7,2	53,8	52,7	51,3
Sin adición	6,6	51,5	50,5	50,9
Benzaldehído 1 mM	6,6	53,2	53,0	53,1
Benzaldehído 5 mM	6,6	47,1	54,3	58,0
Benzaldehído 10 mM	6,6	51,3	49,4	55,4
Sin adición	6,0	54,8	45,6	44,5
Benzaldehído 1 mM	6,0	55,1	50,6	51,0
Benzaldehído 5 mM	6,0	51,8	51,5	54,9
Benzaldehído 10 mM	6,0	51,3	53,0	49,2

Almacenamiento a 4°C:

	Valor de pH	Tiempo de almacenamiento		
		0,6 d	3,6 d	6,6 d
		Actividad en kU/L		
Sin adición	7,2	51,0	48,6	47,8
Benzaldehído 1 mM	7,2	55,8	46,8	47,5
Benzaldehído 5 mM	7,2	47,1	48,3	50,7
Benzaldehído 10 mM	7,2	53,8	51,2	49,2

(continuación)

	Valor de pH	Tiempo de almacenamiento		
		0,6 d	3,6 d	6,6 d
		Actividad en kU/L		
Sin adición	6,6	51,5	49,5	45,3
Benzaldehído 1 mM	6,6	53,2	52,3	52,5
Benzaldehído 5 mM	6,6	47,1	52,0	55,7
Benzaldehído 10 mM	6,6	51,3	55,5	51,9
Sin adición	6,0	54,8	42,8	34,9
Benzaldehído 1 mM	6,0	55,1	49,9	48,3
Benzaldehído 5 mM	6,0	51,8	52,3	53,0
Benzaldehído 10 mM	6,0	51,3	51,5	50,2

Ejemplo 4: almacenamiento con CBA:

5 14 h después de haber terminado la fermentación, se ajustó el valor de pH de la suspensión celular a 6,0, 6,6 o bien 7,2 con NaOH o bien H₂SO₄ y a continuación se añadió 2-clorobenzaldehído. Se almacenaron las muestras a 4°C y 22°C. Se determinó la actividad enzimática 0,6, 3,6 y 6,6 días después de terminada la fermentación.

Almacenamiento a 22°C:

	Valor de pH	Tiempo de almacenamiento		
		0,6 d	3,6 d	6,6 d
		Actividad en kU/L		
Sin adición	7,2	51,0	49,0	48,7
2-clorobenzaldehído 1 mM	7,2	51,3	52,8	53,2
2-clorobenzaldehído 5 mM	7,2	53,3	51,4	50,1
2-clorobenzaldehído 10 mM	7,2	48,3	52,9	54,0
Sin adición	6,6	51,5	50,5	50,9
2-clorobenzaldehído 1 mM	6,6	48,8	55,0	57,2

ES 2 374 617 T3

(continuación)

	Valor de pH	Tiempo de almacenamiento		
		0,6 d	3,6 d	6,6 d
		Actividad en kU/L		
2-clorobenzaldehído 5 mM	6,6	50,6	56,7	55,5
2-clorobenzaldehído 10 mM	6,6	47,4	56,2	58,6
Sin adición	6,0	54,8	45,6	44,5
2-clorobenzaldehído 1 mM	6,0	52,4	53,8	54,5
2-clorobenzaldehído 5 mM	6,0	52,5	55,0	59,1
2-clorobenzaldehído 10 mM	6,0	53,5	55,7	52,4

Almacenamiento a 4°C:

	Valor de pH	Tiempo de almacenamiento		
		0,6 d	3,6 d	0,6 d
		Actividad en kU/L		
Sin adición	7,2	51,0	48,6	47,8
2-clorobenzaldehído 1 mM	7,2	51,3	48,3	45,2
2-clorobenzaldehído 5 mM	7,2	53,3	51,2	48,1
2-clorobenzaldehído 10 mM	7,2	48,3	51,0	49,9
Sin adición	6,6	51,5	49,5	45,3
2-clorobenzaldehído 1 mM	6,6	48,8	55,1	54,7
2-clorobenzaldehído 5 mM	6,6	50,6	56,3	53,6
2-clorobenzaldehído 10 mM	6,6	47,4	55,0	58,5
Sin adición	6,0	54,8	42,8	34,9
2-clorobenzaldehído 1 mM	6,0	52,4	53,5	56,9

(continuación)

	Valor de pH	Tiempo de almacenamiento		
		0,6 d	3,6 d	0,6 d
		Actividad en kU/L		
2-clorobenzaldehído 5 mM	6,0	52,5	55,6	53,8
2-clorobenzaldehído 10 mM	6,0	53,5	55,7	47,6

Ejemplo 5: Almacenamiento de largo plazo:

5 Se ajustó el pH de la suspensión celular a 6,6 y se añadió a continuación 2-clorobenzaldehído 1,35 mM y se almacenó a 4°C. El curso de la actividad es desplegado en Fig. 2.

PROCOLO DE DETERMINACIÓN DE LA SEQUENCIA

<110> BASF S.A

<120> Método para la conservación y/o almacenamiento de células con actividad de nitrilasa o nitrilohidratasa

<130> AE20020980

10 <140>

<141>

<160> 2

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

15 <211> 1071

<212> ADN

<213> Alcaligenes faecalis

<220>

<221> CDS

20 <222> (1)..(1068)

<223> coding for nitrilasa

<400> 1

ES 2 374 617 T3

```

atg cag aca aga aaa atc gtc cgg gca gcc gcc gta cag gcc gcc tct 48
Met Gln Thr Arg Lys Ile Val Arg Ala Ala Ala Val Gln Ala Ala Ser
  1           5           10           15
ccc aac tac gat ctg gca acg ggt gtt gat aaa acc att gag ctg gct 96
Pro Asn Tyr Asp Leu Ala Thr Gly Val Asp Lys Thr Ile Glu Leu Ala
          20           25           30
cgt cag gcc cgc gat gag ggc tgt gac ctg atc gtg ttt ggt gaa acc 144
Arg Gln Ala Arg Asp Glu Gly Cys Asp Leu Ile Val Phe Gly Glu Thr
          35           40           45
tgg ctg ccc gga tat ccc ttc cac gtc tgg ctg gcc gca ccg gcc tgg 192
Trp Leu Pro Gly Tyr Pro Phe His Val Trp Leu Gly Ala Pro Ala Trp
          50           55           60
tcg ctg aaa tac agt gcc cgc tac tat gcc aac tcg ctc tcg ctg gac 240
Ser Leu Lys Tyr Ser Ala Arg Tyr Tyr Ala Asn Ser Leu Ser Leu Asp
          65           70           75           80
agt gca gag ttt caa cgc att gcc cag gcc gca cgg acc ttg ggt att 288
Ser Ala Glu Phe Gln Arg Ile Ala Gln Ala Ala Arg Thr Leu Gly Ile
          85           90           95
ttc atc gca ctg ggt tat agc gag cgc agc ggc ggc agc ctt tac ctg 336
Phe Ile Ala Leu Gly Tyr Ser Glu Arg Ser Gly Gly Ser Leu Tyr Leu
          100           105           110
ggc caa tgc ctg atc gac gac aag ggc gag atg ctg tgg tcg cgt cgc 384
Gly Gln Cys Leu Ile Asp Asp Lys Gly Glu Met Leu Trp Ser Arg Arg
          115           120           125
aaa ctc aaa ccc acg cat gta gag cgc acc gta ttt ggt gaa ggt tat 432
Lys Leu Lys Pro Thr His Val Glu Arg Thr Val Phe Gly Glu Gly Tyr
          130           135           140
gcc cgt gat ctg att gtg tcc gac aca gaa ctg gga cgc gtc ggt gct 480
Ala Arg Asp Leu Ile Val Ser Asp Thr Glu Leu Gly Arg Val Gly Ala
          145           150           155           160
cta tgc tgc tgg gag cat ttg tcg ccc ttg agc aag tac gcg ctg tac 528
Leu Cys Cys Trp Glu His Leu Ser Pro Leu Ser Lys Tyr Ala Leu Tyr
          165           170           175

```

ES 2 374 617 T3

```

tcc cag cat gaa gcc att cac att gct gcc tgg ccg tcg ttt tcg cta 576
Ser Gln His Glu Ala Ile His Ile Ala Ala Trp Pro Ser Phe Ser Leu
      180                185                190

tac agc gaa cag gcc cac gcc ctc agt gcc aag gtg aac atg gct gcc 624
Tyr Ser Glu Gln Ala His Ala Leu Ser Ala Lys Val Asn Met Ala Ala
      195                200                205

tcg caa atc tat tcg gtt gaa ggc cag tgc ttt acc atc gcc gcc agc 672
Ser Gln Ile Tyr Ser Val Glu Gly Gln Cys Phe Thr Ile Ala Ala Ser
      210                215                220

agt gtg gtc acc caa gag acg cta gac atg ctg gaa gtg ggt gaa cac 720
Ser Val Val Thr Gln Glu Thr Leu Asp Met Leu Glu Val Gly Glu His
      225                230                235                240

aac gcc ccc ttg ctg aaa gtg ggc gcc ggc agt tcc atg att ttt gcg 768
Asn Ala Pro Leu Leu Lys Val Gly Gly Gly Ser Ser Met Ile Phe Ala
      245                250                255

ccg gac gga cgc aca ctg gct ccc tac ctg cct cac gat gcc gag ggc 816
Pro Asp Gly Arg Thr Leu Ala Pro Tyr Leu Pro His Asp Ala Glu Gly
      260                265                270

ttg atc att gcc gat ctg aat atg gag gag att gcc ttc gcc aaa gcg 864
Leu Ile Ile Ala Asp Leu Asn Met Glu Glu Ile Ala Phe Ala Lys Ala
      275                280                285

atc aat gac ccc gta ggc cac tat tcc aaa ccc gag gcc acc cgt ctg 912
Ile Asn Asp Pro Val Gly His Tyr Ser Lys Pro Glu Ala Thr Arg Leu
      290                295                300

gtg ctg gac ttg ggg cac cga gac ccc atg act cgg gtg cac tcc aaa 960
Val Leu Asp Leu Gly His Arg Asp Pro Met Thr Arg Val His Ser Lys
      305                310                315                320

agc gtg acc agg gaa gag gct ccc gag caa ggt gtg caa agc aag att 1008
Ser Val Thr Arg Glu Glu Ala Pro Glu Gln Gly Val Gln Ser Lys Ile
      325                330                335

gcc tca gtc gct atc agc cat cca cag gac tcg gac aca ctg cta gtg 1056
Ala Ser Val Ala Ile Ser His Pro Gln Asp Ser Asp Thr Leu Leu Val
      340                345                350

caa gag ccg tct tga 1071
Gln Glu Pro Ser
      355

```

<210> 2

<211> 356

<212> PRT

5 <213> *Alcaligenes faecalis*

<400> 2

```

Met Gln Thr Arg Lys Ile Val Arg Ala Ala Ala Val Gln Ala Ala Ser
  1                5                10                15
Pro Asn Tyr Asp Leu Ala Thr Gly Val Asp Lys Thr Ile Glu Leu Ala
  20                25                30
Arg Gln Ala Arg Asp Glu Gly Cys Asp Leu Ile Val Phe Gly Glu Thr
  35                40                45
Trp Leu Pro Gly Tyr Pro Phe His Val Trp Leu Gly Ala Pro Ala Trp
  50                55                60
Ser Leu Lys Tyr Ser Ala Arg Tyr Tyr Ala Asn Ser Leu Ser Leu Asp
  65                70                75                80

```

ES 2 374 617 T3

Ser Ala Glu Phe Gln Arg Ile Ala Gln Ala Ala Arg Thr Leu Gly Ile
85 90 95

Phe Ile Ala Leu Gly Tyr Ser Glu Arg Ser Gly Gly Ser Leu Tyr Leu
100 105 110

Gly Gln Cys Leu Ile Asp Asp Lys Gly Glu Met Leu Trp Ser Arg Arg
115 120 125

Lys Leu Lys Pro Thr His Val Glu Arg Thr Val Phe Gly Glu Gly Tyr
130 135 140

Ala Arg Asp Leu Ile Val Ser Asp Thr Glu Leu Gly Arg Val Gly Ala
145 150 155 160

Leu Cys Cys Trp Glu His Leu Ser Pro Leu Ser Lys Tyr Ala Leu Tyr
165 170 175

Ser Gln His Glu Ala Ile His Ile Ala Ala Trp Pro Ser Phe Ser Leu
180 185 190

Tyr Ser Glu Gln Ala His Ala Leu Ser Ala Lys Val Asn Met Ala Ala
195 200 205

Ser Gln Ile Tyr Ser Val Glu Gly Gln Cys Phe Thr Ile Ala Ala Ser
210 215 220

Ser Val Val Thr Gln Glu Thr Leu Asp Met Leu Glu Val Gly Glu His
225 230 235 240

Asn Ala Pro Leu Leu Lys Val Gly Gly Gly Ser Ser Met Ile Phe Ala
245 250 255

Pro Asp Gly Arg Thr Leu Ala Pro Tyr Leu Pro His Asp Ala Glu Gly
260 265 270

Leu Ile Ile Ala Asp Leu Asn Met Glu Glu Ile Ala Phe Ala Lys Ala
275 280 285

Ile Asn Asp Pro Val Gly His Tyr Ser Lys Pro Glu Ala Thr Arg Leu
290 295 300

Val Leu Asp Leu Gly His Arg Asp Pro Met Thr Arg Val His Ser Lys
305 310 315 320

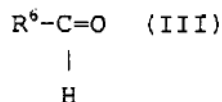
Ser Val Thr Arg Glu Glu Ala Pro Glu Gln Gly Val Gln Ser Lys Ile
325 330 335

Ala Ser Val Ala Ile Ser His Pro Gln Asp Ser Asp Thr Leu Leu Val
340 345 350

Gln Glu Pro Ser
355

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método para la conservación y/o almacenamiento de microorganismos que exhiben por lo menos una actividad enzimática de nitrilasa, donde la conservación y/o almacenamiento ocurren en un medio acuoso el cual incluye por lo menos un aldehído, donde la concentración total de aldehído está en un rango de 0,1 a 100 mM/l, donde el aldehído es descrito por la fórmula general III:



donde R⁶ puede ser alquilo C₁-C₁₀ sustituido o no sustituido, ramificado o no ramificado, alquenilo C₂-C₁₀ sustituido o no sustituido, ramificado o no ramificado, arilo o hetarilo sustituido o no sustituido.

- 10 2. Método según la reivindicación 1, donde la etapa de conservación es ejecutada antes de añadir a las células un reactivo cuya reacción va a ser catalizada por las células.

3. Método según una de las reivindicaciones 1 o 2, donde el medio acuoso contiene una concentración total en compuestos de cianuro, elegidos de entre el grupo consistente en nitrilos, ácido cianhídrico y sales de cianuro, que son máximo 10 % molar de la concentración total de aldehído o donde el medio acuoso no contiene adición de dichos compuestos de cianuro.

- 15 4. Método para la conservación y/o almacenamiento de microorganismos que exhiben por lo menos una actividad de nitrilasa, donde la conservación y/o almacenamiento ocurre en un medio acuoso que incluye por lo menos un aldehído, donde el aldehído es elegido de entre el grupo que incluye benzaldehído no sustituido y benzaldehídos sustituidos y donde la concentración total de aldehído está en un rango de 0,1 a 100 mM/l.

- 20 5. Método según una de las reivindicaciones 1 a 4, donde el microorganismo es elegido de entre las clases de las familias Enterobacteriaceae o Nocardiaceae.

6. Método según una de las reivindicaciones 1 a 5, donde el microorganismo es elegido de entre el grupo de los tipos Pseudomonas, Burkholderia, Nocardia, Acetobacter, Gluconobacter, Corynebacterium, Brevibacterium, Bacillus, Clostridium, Cyanobacter, Staphylococcus, Aerobacter, Alcaligenes, Rhodococcus y Penicillium.

- 25 7. Método según una de las reivindicaciones 1 a 6, donde se combina el método con por lo menos otro método para la estabilización, conservación y/o almacenamiento de enzimas, donde dichos métodos son elegidos de entre el grupo compuesto por:

- a) adición de por lo menos una sal inorgánica en una concentración de por lo menos 100 mM;
- b) adición de sales metálicas cuyo catión metálico actúa como grupo prostético de la nitrilasa;
- c) adición de nitrilos y/o amidas.

30

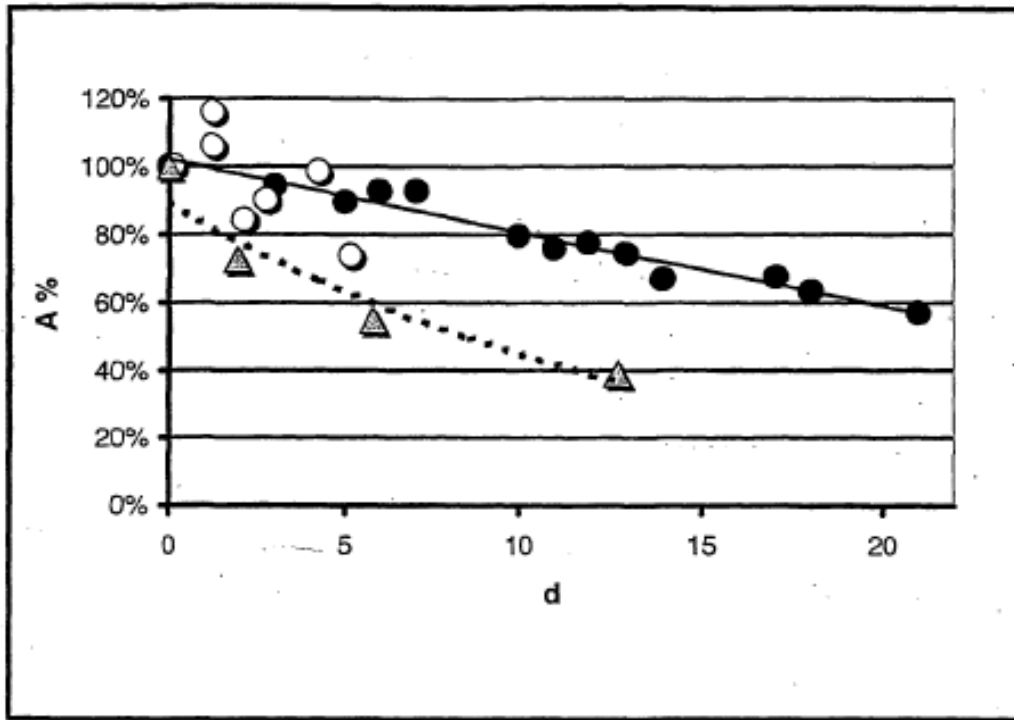


Fig. 1

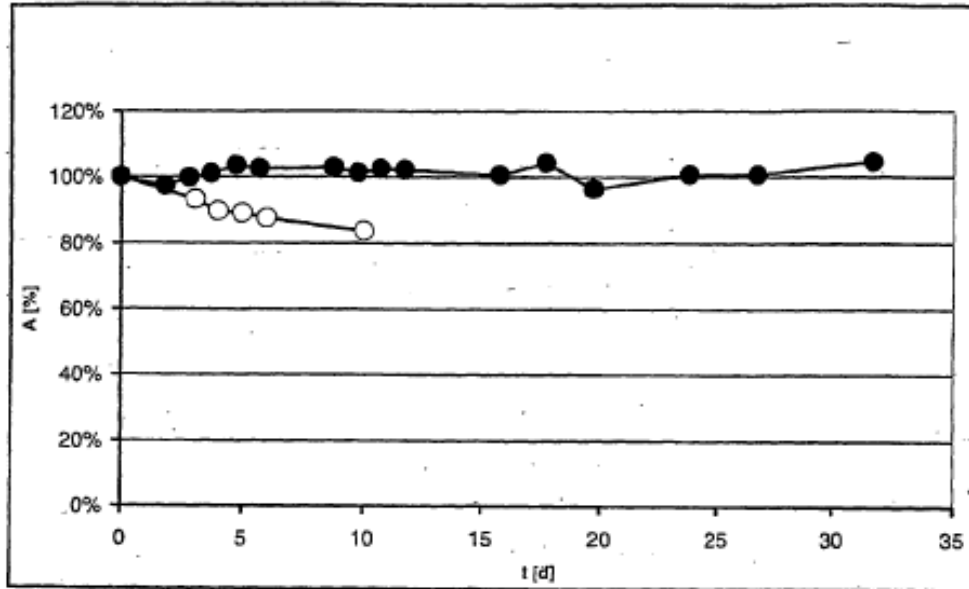


Fig. 2