

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 382 335**

51 Int. Cl.:  
**C07K 14/21** (2006.01)  
**C12P 13/02** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **05716033 .5**  
96 Fecha de presentación: **14.03.2005**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1730177**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **13.12.2006**

54 Título: **Nitrilo hidratadas tolerantes al cianuro**

30 Prioridad:  
**20.03.2004 DE 102004013847**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**07.06.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**07.06.2012**

73 Titular/es:  
**Evonik Degussa GmbH  
Rellinghauser Strasse 1-11  
45128 Essen, DE**

72 Inventor/es:  
**OSSWALD, Steffen;  
WECKBECKER, Christoph;  
HUTHMACHER, Klaus;  
GERASIMOVA, Tatijana;  
NOVIKOV, Andrey;  
RYABCHENKO, Ludmila;  
YANENKO, Alexander y  
EGOROVA, Ksenia**

74 Agente/Representante:  
**Lehmann Novo, Isabel**

ES 2 382 335 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

Nitrilo hidratatasas tolerantes al cianuro.

5 El invento se refiere a nitrilo hidratatasas tolerantes al cianuro, que proceden en particular de cepas de *Pseudomonas putida* o *Pseudomonas marginalis*, y que tienen una tolerancia aumentada al cianuro, a su utilización para la preparación de amidas a partir de nitrilos en presencia de cianuros y a unas secuencias de polinucleótidos que codifican esta enzima.

10 La reacción de  $\alpha$ -hidroxinitrilos (cianhidrinas) y de  $\alpha$ -aminonitrilos para dar las correspondientes amidas mediante nitrilo hidratatasas abre una nueva variante de síntesis para dar  $\alpha$ -hidroxiácidos y  $\alpha$ -aminoácidos, puesto que las  $\alpha$ -hidroxi- y  $\alpha$ -amino-amidas pueden ser saponificadas de un modo sencillo (Process and catalysts for the production of methionine [Procedimiento y catalizadores para la producción de metionina]. Ponceblanc, Herve; Rossi, Jean-Christophe; Laval, Philip; Gros, Georges. (Rhone-Poulenc Animal Nutrition SA, Fr.), (documento de solicitud de patente internacional WO 2001060789). Alternativamente, las  $\alpha$ -hidroxiamidas pueden ser hechas reaccionar también con hidróxidos de metales alcalinos o alcalino-térreos para dar las correspondientes sales de los hidroxiácidos. En este contexto se prefiere especialmente la reacción de la 4-metiltio- $\alpha$ -hidroxibutiramida (amida de MHA) con el hidróxido de calcio, puesto que la sal de calcio de MHA se puede emplear como aditivo para piensos directamente como una forma alternativa de producto con respecto a la metionina o el MHA.

20 No obstante, los  $\alpha$ -hidroxinitrilos y  $\alpha$ -aminonitrilos se descomponen fácilmente para dar aldehídos y ácido cianhídrico o respectivamente aldehídos, ácido cianhídrico y amoníaco. El ácido cianhídrico resultante es un fuerte agente inhibidor para casi todas las nitrilo hidratatasas conocidas, con la excepción de la nitrilo hidratatasa precedente de *Rhodococcus equi* XL-1, que en el caso de una concentración 20 mM de cianuro muestra la más pequeña pérdida de actividad que se conoce hasta ahora. (Production of amides from nitriles by *Rhodococcus equi* cells having a cyanide resistant-nitrile hydratase. [Producción de amidas a partir de nitrilos por células de *Rhodococcus equi* que tienen una nitrilo hidratatasa resistente al cianuro] Nagasawa, Tohru; Matsuyama, Akinobu. (Daicel Chemical Industries, Ltd., Japón), (documento de solicitud de patente europea EP 1 266 962 A).

25 La pequeña productividad del producto, de aproximadamente 8 g de la amida por g de biomasa seca de las células en reposo, el largo período de tiempo de reacción de 43 horas, y la concentración relativamente pequeña del producto de 75 g/l conducen a la búsqueda de unas nitrilo hidratatasas mejoradas.

30 El objetivo del invento aquí descrito consiste, por lo tanto, en poner a disposición un biocatalizador, que no esté sujeto a estas limitaciones. Además de esto, es ventajosa una tolerancia todavía más alta del biocatalizador frente al cianuro, puesto que los  $\alpha$ -hidroxinitrilos y los  $\alpha$ -aminonitrilos se preparan, para garantizar una conversión química rápida y completa del aldehído, de manera preferida con un exceso de 1-3 % del ácido cianhídrico, que permanece parcialmente en el producto. Por consiguiente, durante la biotransformación pueden aparecer unas concentraciones del cianuro que sobrepasan los 20 mM. Los productos secundarios y los reactivos, tales como unas aminas empleadas como bases auxiliares, no deben de inhibir tampoco a la actividad de la nitrilo hidratatasa.

35 La misión del invento consiste en poner a disposición unas nitrilo hidratatasas, que tengan una estabilidad aumentada frente a los iones de cianuro presentes en la solución de reacción al realizar la conversión química de nitrilos en amidas.

40 Son objeto del invento unos polinucleótidos aislados, procedentes de microorganismos del género *Pseudomonas*, que codifican unos polipéptidos con las secuencias de aminoácidos, que son idénticas en un 97 % hasta un 100 % a las secuencias de aminoácidos que están contenidas en las secuencias SEQ ID NO:2 o 3, poseyendo los polipéptidos, que contienen las secuencias SEQ ID NO:2 o 3, en común en cada caso la actividad de una nitrilo hidratatasa tolerante al cianuro, o respectivamente formando ellos esta nitrilo hidratatasa.

Los polinucleótidos proceden de *Pseudomonas marginalis*.

45 Además, constituyen un objeto del invento unos polinucleótidos, que se escogen entre el conjunto que se compone de

- a) unos polinucleótidos, que contienen la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO:1 o unas secuencias de nucleótidos complementarias con ella,
- b) unos polinucleótidos, que contienen unas secuencias de nucleótidos, que corresponden a las secuencias procedentes de a) dentro del marco de la degeneración del código genético,
- 50 c) unos polinucleótidos, que contienen unas secuencias de nucleótidos de acuerdo con a), que contienen unas mutaciones con sentido neutras en su función,
- d) unos polinucleótidos, que se hibridan en condiciones rigurosas con las secuencias complementarias procedentes de a) o c),

codificando los polinucleótidos una nitrilo hidratatasa tolerante al cianuro.

- Asimismo, son objeto del invento los polipéptidos codificados por estos polinucleótidos con las secuencias SEQ ID NO:2 o 3, que tienen la actividad de unas nitrilo hidratatasas tolerantes al cianuro, procedentes de microorganismos del género *Pseudomonas*, que tanto se pueden enriquecer en los microorganismos o se pueden presentar en una forma aislada. La SEQ ID NO:2 codifica la subunidad alfa de la nitrilo hidratasa, la SEQ ID NO:3 codifica la subunidad beta de la nitrilo hidratasa, y las SEQ ID NO:5 y 10 codifican unas proteínas activadoras, cuya expresión concomitante es esencial para la actividad de las nitrilo hidratatasas (Nojiri y colaboradores, 1999, *Journal of Biochemistry*, 125:696-704).
- Conforme al invento, se utilizan unas células anfitrionas, que habían sido transformadas o transfectadas por medio de los polinucleótidos conformes al invento.
- Las células anfitrionas pueden contarse entre los eucariotas o procariotas, para los que se conoce un sistema estable de expresión, en particular
- Como organismo anfitrión sirven de manera preferida los microorganismos, para los que existen sistemas de expresión, tales como p.ej. *Pseudomonas*, *Pichia*, diversas levaduras, *Saccharomyces*, *Aspergillus*, o de la familia de *Streptomyces*, en particular *E. coli*. Asimismo se adecuan unos microorganismos del género *Rhodococcus*.
- El ADN de vector se puede introducir en células eucarióticas o procarióticas mediante unas técnicas conocidas de transformación o transfección.
- Los 'conceptos de "transformación", "transfección", "conjugación" y "transducción" se refieren a unas medidas técnicas conocidas a partir del estado de la técnica, con el fin de introducir un ADN ajeno.
- Son objeto de la descripción asimismo unos polinucleótidos, que se componen en lo esencial de una secuencia de polinucleótidos, y que son obtenibles por escrutinio mediante una hibridación de un correspondiente banco genómico de *Pseudomonas marginalis*, que contiene el gen completo o partes de éste, con una sonda, que contiene las secuencias de los polinucleótidos conformes al invento procedentes de las SEQ ID NO:1, 4 o 6, 9, o unos fragmentos de éstas, y el aislamiento de la mencionada secuencia de polinucleótidos.
- Los polinucleótidos, que contienen las secuencias de acuerdo con la descripción, son adecuados como sondas de hibridación para un ARN, un ADNc (cromosomal) y un ADN, con el fin de aislar unos ácidos nucleicos o respectivamente unos polinucleótidos o unos genes en su plena longitud, que codifican las proteínas conformes al invento, o con el fin de aislar aquellos ácidos nucleicos o respectivamente polinucleótidos o genes, que tienen una alta similitud de las secuencias con las de los genes conformes al invento. Ellos se pueden aplicar asimismo como una sonda sobre unos denominados conjuntos (en inglés "arrays"), micro conjuntos (en inglés "micro arrays") o chips de ADN (en inglés "DNA chips"), con el fin de detectar y determinar los correspondientes polinucleótidos o unas secuencias derivadas de éstos, tales como p.ej. un ARN o un ADNc.
- Los polinucleótidos, que contienen las secuencias de acuerdo con la descripción, son adecuados además como cebadores, con cuya ayuda, por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR acrónimo de Polymerase Chain Reaction) se puede producir un ADN de genes, que codifican las proteínas conformes al invento.
- Aquellos oligonucleótidos, que sirven como sondas o cebadores, contienen por lo menos 25 ó 30, de manera preferida por lo menos 20, de manera muy especialmente preferida por lo menos 15 nucleótidos consecutivos. Asimismo, se adecuan unos oligonucleótidos con una longitud de por lo menos 40 ó 50 nucleótidos. Eventualmente también se adecuan unos oligonucleótidos con una longitud de por lo menos 100, 150, 200, 250 ó 300 nucleótidos.
- El concepto de "aislado" significa separado a partir de su entorno natural.
- El concepto de "polinucleótido" se refiere por lo general a unos polirribonucleótidos y polidesoxirribonucleótidos, pudiendo tratarse de ARN o ADN no modificados o de ARN o ADN modificados.
- Los polinucleótidos conformes al invento incluyen unos polinucleótidos de acuerdo con la SEQ ID NO:1 y también aquellos, que son idénticos por lo menos en un 90 %, 93 %, 95 %, 97 % o 99 % con los polinucleótidos de acuerdo con la SEQ ID NO:1.
- Por el concepto de "polipéptidos" se entienden unos péptidos o unas proteínas, que contienen dos o más aminoácidos unidos a través de enlaces peptídicos.
- Los polipéptidos de acuerdo con el invento comprenden unos polipéptidos de acuerdo con las secuencias SEQ ID NO:2 y 3, y también aquellos, que son idénticos por lo menos en un 97 % o 99 % a los polipéptidos de acuerdo con las secuencias SEQ ID NO:2 y 3.
- Las secuencias de ADN obtenidas a partir del deseado banco genómico se pueden investigar entonces con unos algoritmos o respectivamente con unos programas de análisis de secuencias conocidos, tales como p.ej. el de Staden (*Nucleic Acids Research* 14, 217-232 (1986)), el de Marck (*Nucleic Acids Research* 16, 1829-1836 (1988)) o el programa GCG de Butler (*Methods of Biochemical Analysis* 39, 74-97 (1998)).

Las secuencias codificadoras de ADN, que se establecen a partir de las secuencias contenidas en la SEQ ID NO:1 a través de la degeneración del código genético, son asimismo una parte componente del invento. De igual manera son una componente del invento unas secuencias de ADN, que se hibridan con estas secuencias o con partes de ellas en condiciones rigurosas. En el mundo especializado se conocen además unos intercambios conservativos de aminoácidos tales como p.ej. el intercambio de glicina por alanina o el de ácido aspártico por ácido glutámico en proteínas como "mutaciones con sentido" (en inglés "sense mutations"), que no conducen a ninguna modificación fundamental de la actividad de la proteína, es decir que son neutras en su función. Además es conocido el hecho de que unas modificaciones realizadas junto al extremo terminal de N y/o C de una proteína no perjudican esencialmente a la función de ésta, o incluso pueden estabilizarla. Unos datos respecto a esto los encuentra un experto en la especialidad, entre otros lugares, en las citas de Ben-Bassat y colaboradores (Journal of Bacteriology 169:751-757 (1987)), de O'Regan y colaboradores (Gene 77:237-251 (1989)), de Sahin-Toth y colaboradores (Protein Sciences 3:240-247 (1994)), de Hochuli y colaboradores (Bio/Technology 6:1321-1325 (1988)) y en conocidos manuales de la genética y la biología molecular.

Finalmente, constituyen una parte componente de la descripción unas secuencias de ADN, que se producen por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) mediando utilización de unos cebadores, que se establecen a partir de las SEQ ID NO: 1, 4, 6 y 9. Tales oligonucleótidos tienen típicamente una longitud de por lo menos 15 nucleótidos consecutivos, en particular de 20, 30 o 40 de ellos.

Unas instrucciones para la identificación de secuencias de ADN mediante hibridación, las encuentra un experto en la especialidad, entre otros lugares, en el manual "The DIG System Users Guide for Filter Hybridization (Guía para los usuarios del sistema DIG para la hibridación en filtro)" de la entidad Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim, Alemania, 1993) y en la cita de Liebl y colaboradores (International Journal of Systematic Bacteriology [revista internacional de bacteriología sistemática] 41: 255-260 (1991)). La hibridación tiene lugar en condiciones rigurosas, es decir que se forman solamente unos híbridos, en los que la sonda y la secuencia diana, es decir los polinucleótidos tratados con la sonda, son idénticas/os en por lo menos un 90 %. Es conocido que la rigurosidad de la hibridación, inclusive las etapas de lavado, es (son) influida(s) o respectivamente determinada(s) por variación de la composición de los tampones, de la temperatura y de la concentración de sales. La reacción de hibridación se lleva a cabo por lo general con una rigurosidad relativamente baja en comparación con la de las etapas de lavado (Hybaid Hybridisation Guide, Hybaid Limited, Teddington, Reino Unido, 1996).

Para la reacción de hibridación se puede emplear, por ejemplo, un tampón 5x SSC a una temperatura de aproximadamente 50°C - 68°C. En este caso, unas sondas se pueden hibridar también con unos polinucleótidos, que tienen una identidad de menos que un 70 % con la secuencia de la sonda. Tales híbridos son menos estables y se eliminan mediante lavado en condiciones rigurosas. Esto se puede conseguir, por ejemplo, mediante una disminución de la concentración de sales a 2x SSC y eventualmente a continuación a 0,5x SSC (The DIG System User's Guide for Filter Hybridisation, Boehringer Mannheim, Mannheim, Alemania, 1995), ajustándose una temperatura de aproximadamente 50°C - 68°C. Es conforme al invento el hecho de disminuir la concentración de las sales hasta una concentración correspondiente a 0,1x SSC. Mediante un aumento escalonado de la temperatura de hibridación, en escalones de aproximadamente 1 - 2°C desde 50°C hasta 68°C, se pueden aislar unos fragmentos de polinucleótidos, que poseen por ejemplo una identidad de por lo menos un 90 % hasta un 95 % con respecto a la secuencia de la sonda empleada. Otras instrucciones adicionales para la hibridación son obtenibles en el comercio en forma de los denominados estuches (p.ej. el DIG Easy Hyb de la entidad Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania, n° de catálogo 1603558).

Unas instrucciones para la amplificación de secuencias de ADN con ayuda de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) las encuentra un experto en la especialidad, entre otros lugares, en el manual de Gait: Oligonukleotide synthesis: A Practical Approach (Síntesis de oligonucleótidos: Un enfoque práctico) (IRL Press, Oxford, UK, 1984) y en la cita de Newton y Graham: PCR (Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Alemania, 1994).

Por lo general, se procede de tal manera que se clona un gen bien expresable en un vector con un bajo número de copias, y los genes que tienen un rendimiento de expresión más débil se clonan en un vector con un número más alto de copias y/o con un promotor fuerte. Las células anfitrionas son transformadas con estos vectores de tal manera que, en comparación con el organismo de partida, ellas contengan por lo menos en cada caso una copia adicional de las secuencias de nucleótidos que codifican la formación de la nitrilo hidratasa.

Los microorganismos transformados o recombinantes, producidos de esta manera, en particular los del género Pseudomonas, son asimismo una parte constituyente del invento.

Se encontró que el refuerzo de los genes, que codifican la nitrilo hidratasa conforme al invento y la proteína auxiliar P47K en microorganismos, conducen a una producción aumentada de la nitrilo hidratasa o también a una actividad aumentada de la nitrilo hidratasa.

El concepto de "refuerzo" describe en este contexto el aumento de la actividad intracelular en un microorganismo de una o varias enzimas, que es (son) codificada(s) por el correspondiente ADN, mediante el recurso de que, por ejemplo, se aumenta el número de copias del gen o respectivamente de los genes, de que se utiliza un promotor

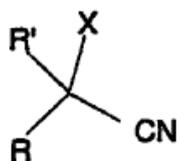
fuerte o de que se utiliza un gen, que codifica una correspondiente enzima con una alta actividad, y eventualmente se combinan estas medidas técnicas, en comparación con el organismo de partida no recombinado.

5 Para la consecución de una sobreexpresión se puede mutar la región de promotor y de regulación o el sitio de fijación a ribosomas, que se encuentra situado secuencia arriba del gen estructural. De igual manera, actúan unos casetes de expresión, que son incorporados secuencia arriba del gen estructural. Por medio de unos promotores inducibles es adicionalmente posible aumentar la expresión en el transcurso de la producción de aminoácidos por fermentación. Mediante unas medidas técnicas destinadas a la prolongación de la duración de vida útil del ARN-m (mensajero) se mejora asimismo la expresión.

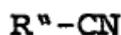
10 Además, mediante evitación de la degradación de la proteína enzimática se refuerza asimismo la actividad enzimática. Los genes o las construcciones artificiales de genes o bien pueden presentarse en plásmidos con diferentes números de copias, o se pueden integrar y amplificar en el cromosoma. Alternativamente, se puede conseguir además una sobreexpresión de los correspondientes genes mediante una modificación de la composición de los medios y mediante una realización de la cultivación.

Asimismo son un objeto del invento

- 15 1) un procedimiento para la preparación enzimática de amidas a partir de nitrilos, que comprende las siguientes etapas:
- a) reacción de un compuesto, que contiene un(os) grupo(s) nitrilo, con una enzima microbiana, que tiene actividad de una nitrilo hidratasa y
- b) separación de la amida formada, realizándose que
- 20 c) para la conversión química del nitrilo en la amida se emplea una nitrilo hidratasa conforme al invento. La actividad restante de ésta, después de la conversión química de metacrilonitrilo en presencia de 20 mM (mM = mmol/l) de iones de cianuro a 20°C después de 30 min, es por lo menos de un 90 % de la actividad restante de la misma enzima, cuando ésta se había empleado para la reacción en ausencia de iones de cianuro, en unas condiciones por lo demás idénticas.
- 25 2) un procedimiento de acuerdo con 1), caracterizado porque la actividad restante después de la reacción en presencia de 50 mM de iones de cianuro es de por lo menos 60 %,
- 3) un procedimiento de acuerdo con 1) o 2), caracterizado porque se emplean unos microorganismos que producen y contienen la enzima, o un material lisado de éstos.
- 30 4) un procedimiento de acuerdo con 3), caracterizado porque se emplean células en reposo del microorganismo,
- 5) un procedimiento de acuerdo con 1) o 2), caracterizado porque se emplea la enzima purificada,
- 6) un procedimiento de acuerdo con 1) hasta 5), caracterizado porque la enzima procede de microorganismos de la especie *Pseudomonas putida* o *Pseudomonas marginalis*.
- 35 7) un procedimiento de acuerdo con 6, caracterizado porque la enzima procede de microorganismos del género *Pseudomonas*, presentado bajo los números DSM 16275 y DSM 16276, y tiene las secuencias de aminoácidos con las secuencias SEQ ID NO:2 y 3,
- 8) un procedimiento de acuerdo con uno o varios de los puntos 1) hasta 7), caracterizado porque se hacen reaccionar unos compuestos de las fórmulas generales



(I)



(II)

en las que significan:

**X:** OH, H, alquilo con 1 hasta 4 átomos de C, NH<sub>2</sub>

**R:** H, un radical alquilo saturado con 1 a 12 átomos de C, ramificado o sin ramificar, eventualmente sustituido con NH<sub>2</sub>,

5 radicales alquilo insaturados, con un enlace doble y con 1 a 12 átomos de C, ramificados o sin ramificar, grupos cicloalquilo con 3 a 6 átomos de C,

radicales alquilenos sustituidos con grupos alquiltio, correspondiendo el alquilo en este caso a un radical de C<sub>1</sub> a C<sub>3</sub> y el alquilenos a un radical divalente de C<sub>3</sub> a C<sub>8</sub>,

**R':** H, cuando **R** no signifique H, alquilo con 1 a 3 átomos de C,

10 **R'':** un anillo insaturado de uno o dos núcleos, con 6 a 12 átomos de C, eventualmente sustituido con uno o dos grupos alquilo de C<sub>1</sub> - C<sub>3</sub>, Cl, Br o F,

un radical alquil-nitrilo monovalente con 1 a 6 átomos de C

para dar las correspondientes amidas,

15 9) un procedimiento de acuerdo con 8), caracterizado porque se hace reaccionar un compuesto de la fórmula general (I) en presencia de ácido cianhídrico o de una sal del ácido cianhídrico,

10) un procedimiento de acuerdo con 9), caracterizado porque la reacción se lleva a cabo en presencia de 0,1 % en moles hasta 3 % en moles de cianuro, referido al nitrilo empleado, de manera preferida de > 2 hasta 3 % en moles. Esto corresponde en el caso de una concentración final de 1 mol con 3 % en moles a 30 mMol de cianuro,

20 11) un procedimiento de acuerdo con uno o varios de los puntos 1) hasta 10) caracterizado porque como nitrilo se emplea el nitrilo de metionina,

12) un procedimiento de acuerdo con uno o varios de los puntos 1) hasta 10), caracterizado porque como nitrilo se emplea el 2-hidroxi-4-metiltio-butironitrilo.

25 De manera preferida se emplea una mezcla de reacción, como la que se obtiene cuando se hacen reaccionar de acuerdo con el estado de la técnica el ácido cianhídrico y el 3-metiltio-propionaldehído en presencia de una base auxiliar tal como p.ej. trietilamina.

Ésta se puede emplear ventajosamente sin ninguna purificación.

Esto apunta a la estabilidad adicional de las enzimas conformes al invento frente a aldehídos y aminas.

30 13) Un procedimiento, en el que como compuesto precursor para la metacrilamida se emplea el 2-hidroxi-2-metil-propionitrilo.

14) El invento está orientado asimismo a microorganismos aislados y purificados del género *Pseudomonas*, presentados bajo los números DSM 16275 (MA32, *Pseudomonas marginalis*) y DSM 16276 (MA113, *Pseudomonas putida*), y

35 15) Nitrilo hidratasa tolerantes al cianuro, aisladas a partir de las cepas del género *Pseudomonas*, en particular a partir de las cepas presentadas bajo los números DSM 16275 y DSM 16276 de *Pseudomonas putida* y *Pseudomonas marginalis*,

La presentación se efectuó el 09.03.2004 en la DSMZ, Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (Colección alemana de microorganismos y cultivos celulares) en Braunschweig, Alemania, según el Convenio de Budapest.

40 Estas cepas son especialmente adecuadas para producir las enzimas conformes al invento.

El concepto de "microorganismos aislados y purificados" se refiere a unos microorganismos, que se presentan en una concentración más alta que de un modo natural.

Asimismo, es un objeto de la descripción un procedimiento para la preparación de la nitrilo hidratasa tolerante al cianuro antes descrita, en cuyo caso

45 a) se fermenta un microorganismo que produce esta nitrilo hidratasa, en particular del género *Pseudomonas marginalis* o *Pseudomonas putida*, en unas condiciones, en las que la enzima se forma en el microorganismo, y

b) como muy pronto después de haber pasado por la fase de crecimiento logarítmico, se cosechan las células.

A continuación se emplea

a) o bien el microorganismo, que contiene la enzima, como en forma de células en reposo, eventualmente después de haber aumentado la permeabilidad de la membrana celular, o

5 b) el material lisado de las células, o

c) la enzima aislada a partir de las células del microorganismo con unas medidas técnicas conocidas para la transformación conforme al invento de nitrilos en amidas.

En el caso de la nitrilo hidratasa se puede tratar tanto de una enzima producida con microorganismos no recombinantes como también de una enzima producida de un modo recombinante.

10 Son un objeto de la descripción además, unos procedimientos para la producción recombinante de los polipéptidos conformes al invento, cultivándose un microorganismo que produce estos polipéptidos, induciéndose eventualmente la expresión de los respectivos polinucleótidos y aislándose las enzimas eventualmente a partir del cultivo.

Por lo general se trata de un procedimiento, en el que

15 a) se fermentan unos microorganismos, en particular del género *Pseudomonas marginalis* o *Pseudomonas putida*, en los que se refuerzan, en particular se sobreexpresan por medios recombinantes, unos polinucleótidos aislados a partir de microorganismos de la familia *Pseudomonas*, que codifican unos polipéptidos con las secuencias de aminoácidos, que son idénticas en un 90 hasta 100 % a las secuencias de aminoácidos que están contenidas en las secuencias SEQ ID NO:2, 3 y 5, o 7, 8 y 10, poseyendo los polipéptidos en cada caso en común la actividad de una nitrilo hidratasa tolerante al cianuro,

20 b) a partir de estos microorganismos se aísla eventualmente la enzima con la actividad de nitrilo hidratasa o se produce una fracción proteínica, que contiene esta enzima, y

c) se transfiere el microorganismo de acuerdo con a) o la enzima de acuerdo con la fracción b), o que contiene a ésta, a un medio, que contiene un compuesto que contiene grupos nitrilo, de las fórmulas generales (I) y (II).

25 El medio de cultivo que se debe de utilizar para la fermentación tiene que satisfacer de un modo adecuado los requisitos de las respectivas cepas. Unas descripciones de medios de cultivo para diferentes microorganismos están contenidas en el manual "Manual of Methods for General Bacteriology" (Manual de métodos de bacteriología general) de la American Society for Bacteriology (Washington D.C., USA, 1981).

30 Como fuente de carbono se pueden utilizar azúcares e hidratos de carbono tales como p.ej. glucosa, sacarosa, lactosa, fructosa, maltosa, una melaza, un almidón y una celulosa, aceites y grasas tales como p.ej. aceite de soja, aceite de girasol, aceite de cacahuete y grasa de coco, ácidos grasos tales como p.ej. ácido palmítico, ácido esteárico y ácido linoleico, alcoholes tales como p.ej. glicerol y etanol, y ácidos orgánicos tales como p.ej. ácido acético. Estas sustancias se pueden utilizar individualmente o como una mezcla.

35 Como fuente de nitrógeno se pueden utilizar ventajosamente nitrilos orgánicos o amidas de ácidos tales como acetónitrilo, acetamida, metacrilonitrilos, metacrilamida, isobutironitrilo, isobutiramida o urea, también en combinación con otros compuestos que contienen nitrógeno, tales como peptonas, un extracto de levadura, un extracto de carne, un extracto de malta, agua de maceración de maíz, harina de soja, y/u otros compuestos inorgánicos tales como sulfato de amonio, cloruro de amonio, fosfato de amonio, carbonato de amonio y nitrato de amonio. Las fuentes de nitrógeno se pueden utilizar individualmente o como una mezcla.

40 Como fuente de fósforo se pueden utilizar ácido fosfórico, dihidrógeno-fosfato de potasio o hidrógeno-fosfato de dipotasio, o las correspondientes sales que contienen sodio. El medio de cultivo debe de contener además unas sales de metales, tales como p.ej. sulfato de magnesio o sulfato de hierro, que son necesarias para el crecimiento. Finalmente, se pueden emplear unas sustancias esenciales para el crecimiento tales como aminoácidos y vitaminas, adicionalmente a las sustancias arriba mencionadas. Las sustancias de partida mencionadas se pueden añadir al cultivo en forma de una tanda única o se pueden administrar como alimento de una manera adecuada durante la cultivación.

45 Para realizar el control del valor del pH del cultivo se emplean de un modo adecuado unos compuestos de carácter básico tales como hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, amoniaco o respectivamente agua amoniacal, o unos compuestos de carácter ácido tales como ácido fosfórico o ácido sulfúrico. Para realizar la represión del desarrollo de espuma se pueden emplear agentes antiespumantes tales como p.ej. ésteres de poliglicoles con ácidos grasos. Con el fin de mantener unas condiciones aerobias, se introduce(n) en el cultivo oxígeno o unas mezclas gaseosas que contienen oxígeno, tales como p.ej. aire. La temperatura del cultivo se sitúa normalmente en 10°C hasta 40°C y de manera preferida en 10°C hasta 30°C. Se prosigue el cultivo hasta que él haya sobrepasado la fase de

- crecimiento logarítmico. Este objetivo se alcanza normalmente en el transcurso de 10 horas hasta 70 horas. A continuación de esto, de manera preferida las células se cosechan, se lavan y se recogen en un tampón como una suspensión a un valor del pH de 6-9, en particular de 6,8 a 7,9. La concentración de las células es de 1 - 25 %, en particular de 1,5 a 15 % (peso en húmedo/volumen). La permeabilidad se puede aumentar con métodos físicos o químicos, p.ej. con tolueno, tal como se describe en la cita de Wilms y colaboradores, J. Biotechnol., tomo 86 (2001), 19-30, de tal manera que el nitrilo que debe de ser transformado pueda atravesar la pared celular y la amida pueda salir.
- 5 Se hacen reaccionar de manera preferida los siguientes nitrilos:
- mononitrilos saturados:
- 10 acetonitrilo, propionitrilo, butironitrilo, isobutironitrilo, valerionitrilo, isovaleronitrilo, capronitrilo
- dinitrilos saturados:
- malononitrilo, succinonitrilo, glutaronitrilo, adiponitrilo
- mono- y dinitrilos aromáticos, sin sustituir y sustituidos:
- benzonitrilo, 2,6-difluoro-benzonitrilo, ftalonitrilo, isoftalonitrilo, tereftalonitrilo,
- 15  $\alpha$ -amino-nitrilos:
- $\alpha$ -amino-propionitrilo,  $\alpha$ -aminometiltio-butironitrilo,  $\alpha$ -amino-butironitrilo, amino-acetonitrilo, todos los nitrilos que se derivan de aminoácidos naturales,  $\alpha$ -amino-3,3-dimetil-propionitrilo,  $\alpha$ -amino-2,3-dimetil-propionitrilo
- nitrilos con grupos carboxilo:
- ácido cianoacético
- 20  $\beta$ -amino-nitrilos:
- amino-3-propionitrilo
- nitrilos insaturados:
- acrilonitrilo, metacrilonitrilo, cianuro de alilo, crotononitrilo
- $\alpha$ -hidroxi-nitrilos:
- 25  $\alpha$ -hidroxi-n-propionitrilo,  $\alpha$ -hidroxi-n-butironitrilo,  $\alpha$ -hidroxi-isobutironitrilo,  $\alpha$ -hidroxi-n-hexanonitrilo,  $\alpha$ -hidroxi-n-heptanonitrilo,  $\alpha$ -hidroxi-n-octanonitrilo,  $\alpha,\gamma$ -dihidroxi- $\beta,\beta$ -dimetil-butironitrilo, la cianhidrina de acroleína, la cianhidrina de metacrilaldehído, 3-cloro-lactonitrilo, 4-metiltio- $\alpha$ -hidroxibutironitrilo y  $\alpha$ -hidroxifenil-propionitrilo.
- La concentración de los nitrilos que deben ser hechos reaccionar en la solución de reacción no está restringida a determinados intervalos.
- 30 Con el fin de evitar una inhibición de la actividad enzimática por medio del sustrato, la concentración del nitrilo se mantiene por lo general en 0,02 hasta 10 p/p% (= % en peso/peso), en particular en 0,1 hasta 2 p/p%, referida a la cantidad del biocatalizador como masa celular seca. El sustrato se puede añadir al comienzo de la reacción en su totalidad o en el transcurso de la reacción de una manera continua o discontinua.
- La determinación del peso en seco se efectúa con el equipo Moisture Analyser MA 45 (de Sartorius).
- 35 Cuando la solubilidad del compuesto de nitrilo en el sistema acuoso de reacción sea demasiado pequeña, se puede añadir un agente solubilizante.
- Sin embargo, la reacción se puede llevar a cabo alternativamente también en un sistema bifásico de agua y un disolvente orgánico.
- 40 En el caso de la utilización de células del microorganismo como un material activo enzimáticamente, la cantidad de las células empleadas en relación con la cantidad del sustrato es de manera preferida de 0,02 a 10 p/p% como masa celular secada.
- También es posible inmovilizar la enzima aislada según unas técnicas conocidas por lo general y emplearla entonces en esta forma.
- 45 La reacción se lleva a cabo por lo general a unas temperaturas de -5°C a 50°C, en particular de 0°C a 30°C, y durante un período de tiempo de 0,1 a 100 horas.

El valor del pH que debe de ser respetado de la mezcla de reacción no está restringido a determinados valores mientras tanto que la actividad enzimática no sea perjudicada. Después de la reacción, la amida formada se puede separar y purificar desde la solución de reacción, tal como es conocido.

- 5 Asimismo, es objeto del invento un procedimiento, en el que la amida o respectivamente la solución que contiene la amida, se separa, por ejemplo, con respecto de la biomasa, y la amida o bien se saponifica para dar el correspondiente ácido, o se hace reaccionar mediando adición de hidróxidos de metales alcalinos o alcalino-térreos, para dar las correspondientes sales de los ácidos. De manera preferida, la amida de MHA se saponifica con hidróxido de calcio y se aísla la correspondiente sal de calcio.

### Ejemplos

#### 10 Ejemplo 1

Condiciones de cultivación

Los cultivos previos se cultivaron en tubitos de vidrio en el transcurso de 24 h mediando sacudimiento a 30°C en un volumen de 5 ml. Se inocularon 100 ml del cultivo principal con 1 ml del cultivo previo y se sacudió durante 42 h a 25°C en un matraz de Erlenmeyer con un volumen total de 1.000 ml.

Medio para el cultivo previo (pH 7,0)	
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	7 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3 g
Citrato de Na	0,5 g
Glicerol	2 g
FeSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O	0,004 g
MgSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O	0,1 g
Acetamida	2 g
Solución de sales de elementos traza	0,1 ml
Agua desmineralizada	hasta 1.000 ml

15

Medio para el cultivo principal (pH 7,0)	
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	7 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3 g
Citrato de Na	0,5 g
Glicerol	2 g
FeSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O	0,004 g
MgSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O	0,1 g
Acetamida	10 g
Solución de sales de elementos traza	0,1 ml
Agua desmineralizada	hasta 1.000 ml

Solución de sales de elementos traza	
EDTA, Na <sub>2</sub> * 2 H <sub>2</sub> O	158 mg
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> * 2 H <sub>2</sub> O	4,7 mg

ZnSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O	70 mg
MnSO <sub>4</sub> * 4 H <sub>2</sub> O	18 mg
FeSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O	16 mg
CuSO <sub>4</sub> * 5 H <sub>2</sub> O	4,7 mg
CoSO <sub>4</sub> * 6 H <sub>2</sub> O	5,2 mg
Agua desmineralizada	hasta 1.000 ml

**Ejemplo 2**

Aislamiento e identificación de los microorganismos

5 Las dos cepas MA32 y MA113 se seleccionaron mediante determinación de la actividad de nitrilo hidratasa de las células en reposo en presencia de cianuro de potasio 2 mM.

Propiedades de MA32:

	forma de las células	bastoncillos
	anchura	0,6 - 0,8 µm
	longitud	1,5 - 3,0 µm
10	movilidad	+
	flagelos	polares > 1
	reacción gram	-
	lisis mediante KOH al 3 %	+
	aminopeptidasa (de Cerny)	+
15	oxidasa	+
	catalasa	+
	crecimiento a 41°C	-
	aprovechamiento del sustrato	
	adipato	-
20	citrato	+
	malato	+
	fenil-acetato	-
	D-glucosa	+
	maltosa	-
25	manitol	+
	arabinosa	+
	manosa	+
	trehalosa	+
	sorbitol	+
30	eritrol	+
	citraconato	+

	inositol	+
	ADH	+
	ureasa	-
	hidrólisis de gelatina	+
5	hidrolisis de esculina	+
	levano a partir de sacarosa	+
	desnitrificación	+
	lecitinasa	+
	fluorescencia	+
10	piocianina	-

El perfil de los ácidos grasos celulares es típico para el conjunto I de las Pseudomonadas

El análisis de un segmento con una longitud de 484 pb (pares de bases) del ARNr 16S estableció una coincidencia del 100 % con la secuencia de *Pseudomonas marginalis*

Tomando en cuenta todos los datos, el MA32 pudo ser identificado como *Pseudomonas marginalis*.

15 Propiedades de MA113:

	forma de las células	bastoncillos
	anchura	0,6 - 0,8 $\mu\text{m}$
	longitud	1,5 - 3,0 $\mu\text{m}$
	movilidad	+
20	flagelos	polares > 1
	reacción gram	-
	lisis mediante KOH al 3 %	+
	aminopeptidasa (de Cerny)	+
	oxidasa	+
25	catalasa	+
	crecimiento a 41°C	-
	aprovechamiento del sustrato	
	adipato	-
	citrate	+
30	malato	+
	fenil-acetato	+
	D-glucosa	+
	maltosa	-
	manitol	-
35	arabinosa	-
	manosa	-
	trehalosa	-

	inositol	-
	β-alanina	+
	α-cetoglutarato	+
	bencilamina	+
5	hipurato	+
	azelato	+
	D-mandelato	+
	ADH	+
	ureasa	-
10	hidrólisis de gelatina	-
	hidrolisis de esculina	-
	levano a partir de sacarosa	-
	desnitrificación	-
	lecitinasas	-
15	fluorescencia	+
	piocianina	-

El perfil de los ácidos grasos celulares es típico para el conjunto I de las Pseudomonadas

El análisis de un segmento con una longitud de 476 pb del ARNr 16S estableció una coincidencia del 100 % con la secuencia de Pseudomonas putida

20 Tomando en cuenta todos los datos, el MA113 pudo ser identificado como Pseudomonas putida.

### Ejemplo 3

Determinación de la actividad enzimática

25 Las células se cultivaron tal como se ha descrito en el Ejemplo 1, se separaron mediante centrifugación con respecto del medio de cultivo y se resuspendieron en el tampón clásico (un tampón de fosfato de potasio 50 mM, de pH 7,5). 50 µl de esta suspensión de células se añadieron a 700 µl del tampón clásico y, para la iniciación de la reacción, se mezclaron con 250 µl de una solución 200 mM del nitrilo en el tampón clásico. La concentración de las células en la suspensión celular se había de dimensionar en este caso de tal manera que, después de 10 min a 20°C, el nitrilo hubiese sido convertido químicamente en un 5-30 %. Después de 10 min a 20°C, se interrumpió la reacción mediante adición de 20 µl de un ácido fosfórico semiconcentrado y las células se separaron mediante centrifugación.

Analítica por HPLC

Columna	Intersil ODS-3V (de GL Sciences Inc.)
Fase móvil	una mezcla de un tampón de fosfato de potasio 10 mM, de pH 2,3, y de acetonitrilo en la relación de 85:15 para el nitrilo de metionina, el nitrilo de MHA y la cianhidrina de acetona, o respectivamente de 99:1 para todos los otros substratos
Caudal	1 ml/min
Detección	por UV a 200 nm

30 La actividad de una U (unidad) se define como la cantidad de la enzima, que convierte químicamente a 1 µmol de metacrilonitrilo en un minuto para dar la amida. Si junto a la amida se formó también el ácido, entonces una U se define como la cantidad de la enzima que convierte químicamente a 1 µmol de metacrilonitrilo en un minuto para dar la amida y el ácido.

En la Figura 1 y en la Figura 2 se representan las actividades relativas de las cepas MA32 y MA113.

#### Ejemplo 4

Influencia del cianuro sobre la actividad de la nitrilo hidratasa

5 50 µl de una suspensión celular producida de una manera análoga a la del Ejemplo 3 se añadieron a 700 µl del tampón clásico, que contenía 0; 21,4; 53,6 y 107,1 mM de cianuro de potasio (concentración final 0, 20, 50, 100 mM de cianuro). Para la iniciación de la reacción se añadieron 200 µl de una solución 200 mM del nitrilo en el tampón clásico, que tenía en cada caso la misma concentración de cianuro que la solución de reacción restante. La concentración de las células en la suspensión celular se había de dimensionar en este caso de tal manera que el nitrilo se hubiese convertido químicamente en un 16 % en la tanda sin cianuro, después de 10 min a 20°C. Después

10 de 10 min a 20°C, la reacción se interrumpió mediante adición de 20 µl de ácido fosfórico semiconcentrado y se determinó el grado de conversión de una manera análoga a la del Ejemplo 2.

En la Figura 3 y en la Figura 4 se representan las actividades relativas para la conversión química de metacrilonitrilo en dependencia de la concentración de cianuro.

#### Ejemplo 5

15 Reacción de la cianhidrina de acetona con células en reposo de *Pseudomonas marginalis* MA32

Unas células de *Pseudomonas marginalis* MA32 se cultivaron tal como se ha descrito en el Ejemplo 1 y se separaron por centrifugación. Una cantidad de las células tal que contenía 1,16 g de la biomasa seca, se diluyó con un tampón de fosfato de potasio 50 mM de pH 8,0 hasta llegar a un volumen final de 50 ml. Adicionalmente, a la mezcla de reacción se le añadieron 0,02 mM de ácido 2-metil-1-propano-borónico. La cianhidrina de acetona recién destilada se añadió a 4°C mediando agitación energética de una manera continua, con una velocidad tal que la concentración durante la reacción no sobrepasase en ningún momento los 5 g/l. El valor del pH se mantuvo constante en 7,5. La vigilancia de la reacción se llevó a cabo mediante una HPLC (cromatografía en fase líquida de alto rendimiento) tal como se ha descrito en el Ejemplo 3. Después de 140 min habían reaccionado totalmente 10,0 g del nitrilo para dar 10,7 g de la amida y 1,4 g del ácido.

20

25 En la Figura 5 se representa el transcurso cronológico de la reacción que se consiguió con la cepa MA113.

#### Ejemplo 6

Reacción del nitrilo de MHA en bruto con células en reposo de *Pseudomonas marginalis* MA32

Unas células de *Pseudomonas marginalis* MA32 se cultivaron tal como se ha descrito en el Ejemplo 1 y se separaron por centrifugación. Una cantidad de las células tal que contenía 0,34 g de la biomasa seca, se diluyó con un tampón de fosfato de potasio 50 mM de pH 8,0 hasta llegar a un volumen final de 70 ml. Adicionalmente, a la mezcla de reacción se le añadieron 0,02 mM de ácido 2-metil-1-propano-borónico. El nitrilo de MHA en bruto se añadió a 4 °C mediando agitación energética de manera continua con una velocidad tal que la concentración durante la reacción no sobrepasase en ningún momento los 10 g/l. El valor del pH se mantuvo constante en 8,0. La vigilancia de la reacción se llevó a cabo mediante una HPLC tal como se ha descrito en el Ejemplo 2. Después de 510 min habían reaccionado totalmente 10,05 g del nitrilo para dar 11,13 g de la amida y 0,31 g del ácido. Esto corresponde a una concentración final de 139 g de la amida por litro.

30

35

El nitrilo de MHA había sido preparado directamente a partir de 3-metil-2-propionaldehído y de un ligero exceso de ácido cianhídrico. Una solución 50 mM de este nitrilo de MHA en agua contenía 0,5 mM de cianuro (Spektroquant<sup>®</sup>, de Merck).

40 En la Figura 6 se representa el transcurso cronológico de la reacción, que se consiguió con la cepa MA32.

#### Ejemplo 7

Clonación del racimo de genes para la nitrilo hidratasa de *Pseudomonas marginalis* MA32 y construcción de un vector de expresión

El racimo de genes para la nitrilo hidratasa, que contiene una subunidad  $\alpha$ , una subunidad  $\beta$  y una proteína activadora de la nitrilo hidratasa, cuya expresión concomitante es esencial para la actividad de la nitrilo hidratasa (Nojiri y colaboradores, 1999, Journal of Biochemistry, 125:696-704), se amplificó por una PCR con los cebadores 1F y 1R, que introdujeron unos sitios de corte para las enzimas de restricción NdeI y HindIII. El producto de PCR así obtenido se ligó en un vector cortado con NdeI y HindIII, en el que los genes introducidos están bajo el control del promotor de ramnosa. El vector de expresión que se formó de esta manera, se denomina pKE31.

45

50 El mapa de restricción se encuentra en la Figura 7 y la secuencia está dentro de la SEQ ID NO:1.

## ES 2 382 335 T3

El plásmido de expresión fue transformado en el seno de la cepa de *E. coli* DSM 14459, que había sido presentada en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) el día 22.08.2001.

Cebador:

1F	5´-CTC CAC CAT ATG AGT ACA GCT ACT TCA ACG -3´
1R	5´-CTT CAT AAG CTT CTA TCT CGG ATC AAA TGG-3´

5 1F: SEQ ID NO:11

1R: SEQ ID NO:12

Los genes se encuentran en los segmentos de la SEQ ID NO:1: (nt = nucleótidos)

gen para la subunidad  $\alpha$ :            nt        25-609

gen para la subunidad  $\beta$ :            nt        650-1.312

10 gen para la proteína activadora:    nt        1.309-2.577

### Ejemplo 8

Clonación del racimo de genes para la nitrilo hidratasa de *Pseudomonas putida* MA113

15 El racimo de genes para la nitrilo hidratasa, que se compone de una subunidad  $\alpha$ , una subunidad  $\beta$  y una proteína activadora de la nitrilo hidratasa, cuya expresión conjunta es esencial para la actividad de la nitrilo hidratasa (Nojiri y colaboradores, 1999, Journal of Biochemistry, 125:696-704), se amplificó por una PCR con los cebadores 1F y 1R.

La secuencia se encuentra dentro de la SEQ ID NO:6.

Cebador:

2F	5´-ATG ACG GCA ACT TCA ACC CCT GGT G-3´
2R	5´-TCA GCT CCT GTC GGC AGT CG-3´

2F: SEQ ID NO:13

20 2R: SEQ ID NO:14

Los genes se encuentran en los segmentos de la SEQ ID NO:5:

gen para la subunidad  $\alpha$ :            nt        1-582

gen para la subunidad  $\beta$ :            nt        624-1.286

gen para la proteína activadora:    nt        1.283-2.360

### 25 Ejemplo 9

Expresión heteróloga de las nitrilo hidratasas procedentes de *Pseudomonas marginalis* MA32 en *E. coli* DSM 14459

*E. coli* DSM 14459 fue presentada en conexión con el documento de patente alemana DE 101 55 928.

30 Las células transformadas con el pKE31 se cultivaron en un medio LB (LB Bouillon según Miller, VWR), que contenía 2 mM de citrato de hierro(III) y 100 µg/ml de ampicilina, mediando sacudimiento a 37°C. Después de 12 - 16 horas se sobreinoculó una cantidad del cultivo previo en un cultivo principal tal que éste tuviese una OD600 (densidad óptica a 600 nm) de 0,1. El medio de cultivación del cultivo principal correspondía al del cultivo previo, pero contenía adicionalmente 2 g/l de L-ramnosa. La cosecha de las células se efectuó después de una cultivación durante 22 horas a 30°C.

**Ejemplo 10**

Determinación de las actividades enzimáticas

La cultivación de la células y la determinación de la actividad se llevaron a cabo tal como se ha descrito en el Ejemplo 9 y en el Ejemplo 3.

- 5 Las células transformadas con el plásmido pKE31 de la cepa E. coli DSM 14459 tenían una actividad específica de 17 U/mg de BTM.

**Ejemplo 11**

Determinación de las actividades enzimáticas en presencia de 100 mM de cianuro de potasio

- 10 La cultivación de las células y la determinación de las actividades se llevó a cabo en presencia de cianuro de potasio 100 mM, tal como se ha descrito en el Ejemplo 9 y en el Ejemplo 4.

Las células transformadas con el plásmido pKE31 de la cepa E. coli DSM 14459 tenían una actividad específica de 11 U/mg de BTM.

CONVENIO DE BUDAPEST SOBRE EL RECONOCIMIENTO INTERNACIONAL DE LA PRESENTACIÓN DE MICROORGANISMOS PARA LAS FINALIDADES DE TRAMITACIÓN DE PATENTES

FORMULARIO INTERNACIONAL

Degussa AG

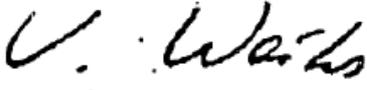
Projekthaus Biotechnologie

Rodenbacher Chaussee

63457 Hanau

ACUSE DE RECIBO EN EL CASO DE LA PRIMERA PRESENTACIÓN expedido según la regla 7.1 por el LUGAR DE PRESENTACIÓN INTERNACIONAL abajo indicado

I. CARACTERIZACIÓN DEL MICROORGANISMO	
Lista de referencia asignada por el PRESENTADOR: JM109 (deltarhaB)	NÚMERO DE ENTRADA asignado por el LUGAR DE PRESENTACIÓN INTERNACIONAL: DSM 14459
II. DESCRIPCIÓN CIENTÍFICA Y/O DESIGNACIÓN TAXONÓMICA PROPUESTA	
<p>Con el microorganismo designado bajo I. se entregó</p> <p>( ) una descripción científica</p> <p>(x) una designación taxonómica propuesta</p> <p>(marcar con una cruz lo que sea correcto),</p>	
III. ENTRADA Y ACEPTACIÓN	
Este lugar de presentación internacional acepta al microorganismo designado bajo I, que fue presentado allí el 2001-08-22 (fecha de la primera presentación).	

IV. ENTRADA DE LA SOLICITUD DE TRANSFORMACIÓN	
El microorganismo designado bajo I fue presentado en este Lugar de Presentación Internacional el (fecha de la primera presentación) y se entregó un encago de transformación de esta primera presentación en una presentación según el Convenio de Budapest (fecha de la entrega de la solicitud de transformación)	
V. LUGAR DE PRESENTACIÓN INTERNACIONAL	
Nombre: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Dirección: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig	Firma(s) de la(s) persona(s) autorizada(s) para la representación del lugar de presentación internacional o del (de los) empleado(s) encargado(s) por ella(s)  Fecha: 2001 -08-24

<sup>1</sup>En caso de que sea correcta la regla 6.4 letra d, éste es el momento, en el que se había adquirido el estado de un lugar de presentación internacional.

Hoja de formulario DSMZ-BP/ (página única) 0196

CONVENIO DE BUDAPEST SOBRE EL RECONOCIMIENTO INTERNACIONAL DE LA PRESENTACIÓN DE MICROORGANISMOS PARA LAS FINALIDADES DE TRAMITACIÓN DE PATENTES

FORMULARIO INTERNACIONAL

Degussa AG

Projekthaus Biotechnologie

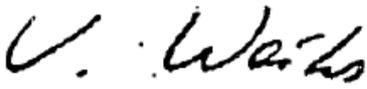
Rodenbacher Chaussee

63457 Hanau

CERTIFICADO DE LA CAPACIDAD DE VIVIR

expedido según la regla 10.2 por el LUGAR DE PRESENTACIÓN INTERNACIONAL abajo indicado

I. PRESENTADOR	II. CARACTERIZACIÓN DEL MICROORGANISMO
Nombre: Degussa AG Projekthaus Biotechnologie Dirección: Rodenbacher Chaussee 63457 Hanau	NÚMERO DE ENTRADA asignado por el LUGAR DE PRESENTACIÓN INTERNACIONAL: DSM 14459 Fecha de la presentación o de la transmisión <sup>1</sup> : 2001-08-22
III. CERTIFICADO DE LA CAPACIDAD DE VIVIR	

<p>La capacidad de vivir del microorganismo mencionado bajo II se ensayó el 2001-08-22<sup>2</sup>.</p> <p>En ese momento, el microorganismo</p> <p>(X)<sup>3</sup> era capaz de vivir</p> <p>( )<sup>3</sup> ya no era capaz de vivir</p>	
<p>IV. CONDICIONES EN LAS QUE SE LLEVÓ A CABO EL ENSAYO DE LA CAPACIDAD DE VIVIR<sup>4</sup></p>	
<p>V. LUGAR DE PRESENTACIÓN INTERNACIONAL</p>	
<p>Nombre: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH</p> <p>Dirección: Mascheroder Weg 1b</p> <p>D-38124 Braunschweig</p>	<p>Firma(s) de la(s) persona(s) autorizada(s) para la representación del lugar de presentación internacional o del (de los) empleado(s) encargado(s) por ella(s)</p>  <p>Fecha: 2001 -08-24</p>

<sup>1</sup> Indicación de la fecha de la primera presentación. Cuando se haya llevado a cabo una nueva presentación o una transmisión, se ha de indicar la fecha de la respectivamente última presentación o transmisión renovada.

5 <sup>2</sup> En los casos previstos en la regla 10.2 letra a cifras ii e iii, indicación del último ensayo de la capacidad de vivir.

<sup>3</sup> Marcar con una cruz lo que sea correcto.

<sup>4</sup> Rellenar cuando se hayan solicitado los datos y cuando los resultados del ensayo hayan sido negativos.

Hoja de formulario DSMZ-BP/9 (página única) 0196

10

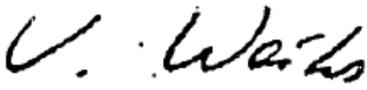
CONVENIO DE BUDAPEST SOBRE EL RECONOCIMIENTO INTERNACIONAL DE LA PRESENTACIÓN DE MICROORGANISMOS PARA LAS FINALIDADES DE TRAMITACIÓN DE PATENTES

FORMULARIO INTERNACIONAL

Degussa AG  
 Service Center Biokatalyse  
 Rodenbacher Chaussee 4  
 63457 Hanau

ACUSE DE RECIBO EN EL CASO DE LA PRIMERA PRESENTACIÓN expedido según la regla 7.1 por el LUGAR DE PRESENTACIÓN INTERNACIONAL abajo

indicado

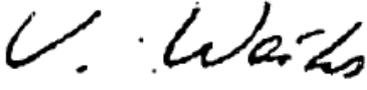
I. CARACTERIZACIÓN DEL MICROORGANISMO	
Lista de referencia asignada por el PRESENTADOR:  MA32	NÚMERO DE ENTRADA asignado por el LUGAR DE PRESENTACIÓN INTERNACIONAL  DSM 16275
II. DESCRIPCIÓN CIENTÍFICA Y/O DESIGNACIÓN TAXONÓMICA PROPUESTA	
<p>Con el microorganismo designado bajo I. se entregó</p> <p>( ) una descripción científica</p> <p>(x) una designación taxonómica propuesta</p> <p>(marcar con una cruz lo que sea correcto).</p>	
III. ENTRADA Y ACEPTACIÓN	
Este lugar de presentación internacional acepta al microorganismo designado bajo I, que fue entregado allí el 2004-03-04 (fecha de la primera presentación) <sup>1</sup> .	
IV. ENTRADA DE LA SOLICITUD DE TRANSFORMACIÓN	
El microorganismo designado bajo I fue entregado en este Lugar de Presentación Internacional el _____ (fecha de la primera presentación) y se entregó una solicitud de transformación de esta primera presentación en una presentación según el Convenio de Budapest _____ (fecha de la presentación de la solicitud de transformación).	
V. LUGAR DE PRESENTACIÓN INTERNACIONAL	
Nombre: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH  Dirección: Mascheroder Weg 1b  D-38124 Braunschweig	Firma(s) de la(s) persona(s) autorizada(s) para la representación del lugar de presentación internacional o del (de los) empleado(s) encargado(s) por ella(s)    Fecha: 2004 -03-09

<sup>1</sup> En caso de que sea correcta la regla 6.4 letra d, éste es el momento, en el que se había adquirido el estado de un lugar de presentación internacional.

FORMULARIO INTERNACIONAL

Degussa AG  
 Service Center Biokatalyse  
 Rodenbacher Chaussee 4  
 63457 Hanau

CERTIFICADO DE LA CAPACIDAD DE VIVIR  
 expedido según la regla 10.2 por el LUGAR DE  
 PRESENTACIÓN INTERNACIONAL abajo indicado

I. PRESENTADOR	II. CARACTERIZACIÓN DEL MICROORGANISMO
Nombre: Degussa AG Service Center Biokatalyse Dirección: Rodenbacher Chaussee 4 63457 Hanau	NÚMERO DE ENTRADA asignado por el LUGAR DE PRESENTACIÓN INTERNACIONAL:  DSM 16275  Fecha de la presentación o de la transmisión <sup>1</sup> :  2004-03-04
III. CERTIFICADO DE LA CAPACIDAD DE VIVIR	
La capacidad de vivir del microorganismo mencionado bajo II se comprobó el 2004-03-08 <sup>2</sup> . En ese momento, el microorganismo (X) <sup>3</sup> era capaz de vivir ( ) <sup>3</sup> ya no era capaz de vivir	
IV. CONDICIONES EN LAS QUE SE LLEVÓ A CABO EL ENSAYO DE LA CAPACIDAD DE VIVIR <sup>4</sup>	
V. LUGAR DE PRESENTACIÓN INTERNACIONAL	
Nombre: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH  Dirección: Mascheroder Weg 1b  D-38124 Braunschweig	Firma(s) de la(s) persona(s) autorizada(s) para la representación del lugar de presentación internacional o del (de los) empleado(s) encargado(s) por ella(s)    Fecha: 2004 -03-09

<sup>1</sup> Indicación de la fecha de la primera presentación. Cuando se haya llevado a cabo una nueva presentación o una transmisión, se ha de indicar la fecha de la respectivamente última presentación o transmisión renovada.

- 2 En los casos previstos en la regla 10.2 letra a cifras ii e iii, indicación del último ensayo de la capacidad de vivir.
- 3 Marcar con una cruz lo que sea correcto.
- 4 Rellenar cuando se hayan solicitado los datos y cuando los resultados del ensayo hayan sido negativos.

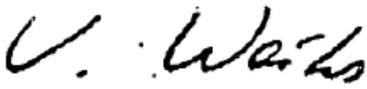
CONVENIO DE BUDAPEST SOBRE EL RECONOCIMIENTO INTERNACIONAL DE LA PRESENTACIÓN DE MICROORGANISMOS PARA LAS FINALIDADES DE TRAMITACIÓN DE PATENTES

FORMULARIO INTERNACIONAL

Degussa AG  
 Service Center Biokatalyse  
 Rodenbacher Chaussee 4  
 63457 Hanau

ACUSE DE RECIBO EN EL CASO DE LA PRIMERA PRESENTACIÓN expedido según la regla 7.1 por el LUGAR DE PRESENTACIÓN INTERNACIONAL abajo indicado

I. CARACTERIZACIÓN DEL MICROORGANISMO	
Lista de referencia asignada por el PRESENTADOR:  MA113	NÚMERO DE ENTRADA asignado por el LUGAR DE PRESENTACIÓN INTERNACIONAL:  DSM 16276
II. DESCRIPCIÓN CIENTÍFICA Y/O DESIGNACIÓN TAXONÓMICA PROPUESTA	
<p>Con el microorganismo designado bajo I. se entregó</p> <p>( ) una descripción científica</p> <p>(x) una designación taxonómica propuesta</p> <p>(marcar con una cruz lo que sea correcto).</p>	
III. ENTRADA Y ACEPTACIÓN	
Este lugar de presentación internacional acepta al microorganismo designado bajo I, que fue entregado allí el 2004-03-04 (fecha de la primera presentación) <sup>1</sup> .	
IV. ENTRADA DE LA SOLICITUD DE TRANSFORMACIÓN	
El microorganismo designado bajo I fue entregado en este Lugar de Presentación Internacional el _____ (fecha de la primera presentación) y se entregó una solicitud de transformación de esta primera presentación en una presentación según el Convenio de Budapest _____ (fecha de la presentación de la solicitud de transformación).	
V. LUGAR DE PRESENTACIÓN INTERNACIONAL	

<p>Nombre: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH</p> <p>Dirección: Mascheroder Weg 1b</p> <p>D-38124 Braunschweig</p>	<p>Firma(s) de la(s) persona(s) autorizada(s) para la representación del lugar de presentación internacional o del (de los) empleado(s) encargado(s) por ella(s)</p>  <p>Fecha: 2004 -03-09</p>
--	---

<sup>1</sup> En caso de que sea correcta la regla 6.4 letra d, éste es el momento, en el que se había adquirido el estado de un sitio de presentación internacional.

CONVENIO DE BUDAPEST SOBRE EL RECONOCIMIENTO INTERNACIONAL DE LA PRESENTACIÓN DE MICROORGANISMOS PARA LAS FINALIDADES DE TRAMITACIÓN DE PATENTES

FORMULARIO INTERNACIONAL

Degussa AG

Service Center Biokatalyse

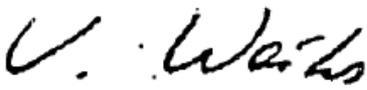
Rodenbacher Chaussee 4

63457 Hanau

CERTIFICADO DE LA CAPACIDAD DE VIVIR

expedido según la regla 10.2 por el LUGAR DE PRESENTACIÓN INTERNACIONAL abajo indicado

<p>I. PRESENTADOR</p> <p>Nombre: Degussa AG</p> <p>Service Center Biokatalyse</p> <p>Dirección: Rodenbacher Chaussee 4</p> <p>63457 Hanau</p>	<p>II. CARACTERIZACIÓN DEL MICROORGANISMO</p> <p>NÚMERO DE ENTRADA asignado por el LUGAR DE PRESENTACIÓN INTERNACIONAL:</p> <p>DSM 16276</p> <p>Fecha de la presentación o de la transmisión<sup>1</sup>:</p> <p>2004-03-04</p>
<p>III. CERTIFICADO DE LA CAPACIDAD DE VIVIR</p> <p>La capacidad de vivir del microorganismo mencionado bajo II se comprobó el 2004-03-08 <sup>2</sup>.</p> <p>En ese momento, el microorganismo</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> <sup>3</sup> era capaz de vivir</p> <p><input type="checkbox"/> <sup>3</sup> ya no era capaz de vivir</p>	
<p>IV. CONDICIONES EN LAS QUE SE LLEVÓ A CABO EL ENSAYO DE LA CAPACIDAD DE VIVIR<sup>4</sup></p>	

V. LUGAR DE PRESENTACIÓN INTERNACIONAL	
Nombre: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH  Dirección: Mascheroder Weg 1b  D-38124 Braunschweig	Firma(s) de la(s) persona(s) autorizada(s) para la representación del lugar de presentación internacional o del (de los) empleado(s) encargado(s) por ella(s)    Fecha: 2004 -03-09

<sup>1</sup> Indicación de la fecha de la primera presentación. Cuando se haya llevado a cabo una nueva presentación o una transmisión, se ha de indicar la fecha de la respectivamente última presentación o transmisión renovada.

5 <sup>2</sup> En los casos previstos en la regla 10.2 letra a cifras ii e iii, indicación del último ensayo de la capacidad de vivir.

<sup>3</sup> Marcar con una cruz lo que sea correcto.

<sup>4</sup> Rellenar cuando se hayan solicitado los datos y cuando los resultados del ensayo hayan sido negativos.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 10 <110> Degussa AG  
 <120> Nitrilo hidratasa tolerantes al cianuro  
 <130> 040061  
 <160> 14  
 <170> PatentIn version 3.3
- 15 <210> 1  
 <211> 6828  
 <212> ADN  
 <213> Pseudomonas marginalis  
 <220>
- 20 <221> CDS  
 <222> (25) .. (609)  
 <223> Gen de la región codificadora de la subunidad alfa  
 <220>  
 <221> CDS
- 25 <222> (650) .. (1312)  
 <223> Gen de la región codificadora de la subunidad beta  
 <220>  
 <221> Genes

ES 2 382 335 T3

<222> (1309) .. (2577)

<223> Gen para la proteína activadora

<400> 1

```

aattcttaag aaggagatat acat atg agt aca gct act tca acg ccc ggc      51
                Met Ser Thr Ala Thr Ser Thr Pro Gly
                1                5

gaa aga gcc tgg gca ttg ttt caa gtc ctc aag agc aag gaa ctc atc      99
Glu Arg Ala Trp Ala Leu Phe Gln Val Leu Lys Ser Lys Glu Leu Ile
10                15                20                25

ccg gag ggc tat gtc gag cag ctc acg caa ttg atg gag cac ggc tgg      147
Pro Glu Gly Tyr Val Glu Gln Leu Thr Gln Leu Met Glu His Gly Trp
                30                35                40

agc ccc gag aac ggc gcc cgt gtg gtg gcc aag gcg tgg gtc gat ccg      195
Ser Pro Glu Asn Gly Ala Arg Val Val Ala Lys Ala Trp Val Asp Pro
                45                50                55

cag ttc cgg gca ctg ttg ctc aag gac ggc acc gcg gcc tgc gcc cag      243
Gln Phe Arg Ala Leu Leu Leu Lys Asp Gly Thr Ala Ala Cys Ala Gln
                60                65                70

ttc ggc tac acc ggc ccc cag ggc gaa tac atc gtt gcc ctg gag gat      291
Phe Gly Tyr Thr Gly Pro Gln Gly Glu Tyr Ile Val Ala Leu Glu Asp
                75                80                85

acg ccg acg ctg aag aac gtg att gtc tgc agc ctg tgc tcc tgc acc      339
Thr Pro Thr Leu Lys Asn Val Ile Val Cys Ser Leu Cys Ser Cys Thr
90                95                100                105

```

5

aac tgg ccg gtc ctc ggc ctg cca ccg gag tgg tac aag ggt ttc gag	387
Asn Trp Pro Val Leu Gly Leu Pro Pro Glu Trp Tyr Lys Gly Phe Glu	
110 115 120	
ttc cgc gca cgc ctg gtc cgg gag ggg cgc acg gta ctg cgc gag ctg	435
Phe Arg Ala Arg Leu Val Arg Glu Gly Arg Thr Val Leu Arg Glu Leu	
125 130 135	
ggg acg gag ttg ccc cgg gac atg gtg gtc aag gtc tgg gac acc agc	483
Gly Thr Glu Leu Pro Arg Asp Met Val Val Lys Val Trp Asp Thr Ser	
140 145 150	
gcc gaa agc cgc tac ctg gtg ctg ccg gtc agg ccg gaa ggc tca gaa	531
Ala Glu Ser Arg Tyr Leu Val Leu Pro Val Arg Pro Glu Gly Ser Glu	
155 160 165	
cac atg agc gaa gag cag ctt caa gcg ctg gtg acc aaa gac gtg ctg	579
His Met Ser Glu Glu Gln Leu Gln Ala Leu Val Thr Lys Asp Val Leu	
170 175 180 185	
atc ggc gtc gcc ctg ccc cgc gtg ggc tga gaacaacacc tcatcatcgt	629
Ile Gly Val Ala Leu Pro Arg Val Gly	
190	
tcaactcccg agttttgatt atg gat ggc ttt cac gat ctc ggc ggt ttc caa	682
Met Asp Gly Phe His Asp Leu Gly Gly Phe Gln	
195 200 205	
ggc ttt gga aaa gtc cct cac acc atc aac agc ctg agc tac aaa cag	730
Gly Phe Gly Lys Val Pro His Thr Ile Asn Ser Leu Ser Tyr Lys Gln	
210 215 220	
gtg ttc aag cag gac tgg gag cat ctg gcc tac agc ttg atg ttc atc	778
Val Phe Lys Gln Asp Trp Glu His Leu Ala Tyr Ser Leu Met Phe Ile	
225 230 235	
ggt gcc gac cac ttg aaa aag ttc agc gtg gac gaa gtg cgt cac gcc	826
Gly Ala Asp His Leu Lys Lys Phe Ser Val Asp Glu Val Arg His Ala	
240 245 250	
gtc gaa cgc ctg gat gtg cgc cag cat gtc ggc acc cag tac tac gaa	874
Val Glu Arg Leu Asp Val Arg Gln His Val Gly Thr Gln Tyr Tyr Glu	
255 260 265	
cgc tac gtc atc gcg acc gcc acc ctg ctg gtc gaa acc ggc gtg atc	922
Arg Tyr Val Ile Ala Thr Ala Thr Leu Leu Val Glu Thr Gly Val Ile	
270 275 280 285	
acc cag gcg gag ctt gat cag gcc ttg ggc tcc cac ttc aag ctg gcg	970
Thr Gln Ala Glu Leu Asp Gln Ala Leu Gly Ser His Phe Lys Leu Ala	
290 295 300	
aat ccc gcc cat gcc gag ggc cgc ccg gcg att acg ggg cgg ccg ccc	1018
Asn Pro Ala His Ala Glu Gly Arg Pro Ala Ile Thr Gly Arg Pro Pro	
305 310 315	
ttc gag gtg ggg gat cgg gtg gtg gtg cga gac gaa tat gtg gct gga	1066
Phe Glu Val Gly Asp Arg Val Val Val Arg Asp Glu Tyr Val Ala Gly	
320 325 330	

ES 2 382 335 T3

cac atc cgc atg ccc gcc tac gtg cgc ggc aag gaa ggc gtg gtc ctg	1114
His Ile Arg Met Pro Ala Tyr Val Arg Gly Lys Glu Gly Val Val Leu	
335 340 345	
cac cgc acg tca gag aaa tgg ccg ttc ccc gac gca atc ggg cat ggc	1162
His Arg Thr Ser Glu Lys Trp Pro Phe Pro Asp Ala Ile Gly His Gly	
350 355 360 365	
gat gta agc gca gcc cat caa ccc acc tac cac gtc gag ttc gcc gtg	1210
Asp Val Ser Ala Ala His Gln Pro Thr Tyr His Val Glu Phe Ala Val	
370 375 380	
aag gac ctg tgg gga gat gcc gcc gat gag ggt ttt gtg gtg gtc gac	1258
Lys Asp Leu Trp Gly Asp Ala Ala Asp Glu Gly Phe Val Val Val Asp	
385 390 395	
ctg ttc gaa agc tac ctg gac aag gcc gcc ggc gcg cgc gcg gtg aac	1306
Leu Phe Glu Ser Tyr Leu Asp Lys Ala Ala Gly Ala Arg Ala Val Asn	
400 405 410	
cca tga cagacggcgc ccaggcaagc cgactgcggg tgacggctoct ttccgggcttc	1362
Pro	
ctccggcgccg gcaagaccac cctgctcaac cacatcctgc gcaatcgca aggccctgcgc	1422
gtggccgtca tcgtcaatga catgagcgaa gtcaatatcg atgcogaaga ggtgcagcgc	1482
gatgtcgcgc tgcaccgtgg tcgcgatgag ctgatcgaga tgagcaacgg gtgcatctgc	1542
tgcaccctgc gcgccgattt gctcgagcag atcagcatgc tcgcacgcca acagcgtttc	1602
gattacctgc tgattgaatc cacgggggatc tccgagccga tgccggctgc ggagacgttc	1662
gccttccttg acgctgatgg cttcagcctc agcgaactgg cgcgcctgga caccttggtg	1722
acggtggctg atggcagtcg ttccaggaa ctgctcgaat cgcgcacac cgttgaccag	1782
gatgacgcca cgcagacgc acccaagcgc cacctggccg atctgctgat cgaacaggtg	1842
gagtacgcca acgtcattct cgtcaataag ctggatctga tcgatgcagc gcagtatcag	1902
gccgtgcagg cgatcctcac aggccttaac ccgacggcgc ggatcatgcc gatggcccac	1962
ggtaacatcc catcagccag cctgctcggc acccatctgt ttgatttacc cagcctcgcg	2022
gcgtcgccgg gctggatgcg gaaaatggag gcggcagacg cgcggcctc cgagtgggac	2082
acctatggcg tgacgtcctg ggtgtaccgt gagcgcgcac cttccacc ccaacggttg	2142
ctcgactttc tccagcagcc ctggtgcaac gggcggttgc tgcgcagcaa aggttacttc	2202
tggtttgcca gccgccacct ggaaccggc ctgctgggtc aaagcggcaa gcggttccag	2262
tgggactatg tcgggcgctg gtggaacttc atcgagccgt cgcgatggcc ccgggacgaa	2322
taccggctgc agggcatcag ggccaaatgg gacagcgtgg tcggcgactg ccggcaggag	2382
ttggtgttta tcggccaggc cctcgacacc gacgcgttac agcgcgagct cgaccactgc	2442
ctgctgagcg ccaggaat cgcgcggcgc ccaactggcct ggcaagcgt gccaggggcg	2502

ES 2 382 335 T3

accgcctttg accgacagac ccttgccocgc cccccacaca gcccatggcg attgccccca 2562  
 tttgatccga gatagaagct tctgttttgg cggatgagag aagattttca gcctgataca 2622  
 gattaaatca gaacgcagaa ggggtctgat aaaacagaat ttgcctggcg gcagtagcgc 2682  
 ggtgggtccca cctgacccca tgccgaactc agaagtgaaa cgccgtagcg ccgatggtag 2742  
 tgtgggggtct ccccatgcga gagtagggaa ctgccaggca tcaaataaaa cgaaaggctc 2802  
 agtcgaaaga ctgggccttt cgttttatct gttgtttgtc ggtgaacgct ctctgagta 2862  
 ggacaaatcc gccgggagcg gatttgaacg ttgcgaagca acggccccga ggggtggcggg 2922  
 caggacgccc gccataaact gccaggcadc aaattaagca gaaggccadc ctgacgggatg 2982  
 gcctttttgc gtttctacaa actcttttgt ttatttttct aaatacattc aaatatgtat 3042  
 ccgctcatga gacaataacc ctgataaatg cttcaataat attgaaaaag gaagagtatg 3102  
 agtattcaac atttcogtgt cgccttatt cecttttttg cggcattttg ccttctgtt 3162  
 tttgctcacc cagaaacgct ggtgaaagta aaagatgctg aagatcagtt ggggtgcacga 3222  
 gtgggttaca tcgaactgga tctcaacagc ggtaagatcc ttgagagttt tcgccccgaa 3282  
 gaacgttttc caatgatgag cactttttaa gttctgctat gtggcgcggt attatocctg 3342  
 gttgacgccg ggcaagagca actcggtcgc cgcatacact attctcagaa tgacttggtt 3402  
 gagtactcac cagtcacaga aaagcatctt acggatggca tgacagtaag agaattatgc 3462  
 agtgetgcca taaccatgag tgataaactc ggggccaact tacttctgac aacgatcgga 3522  
 ggaccgaagg agctaaccgc ttttttgcac aacatggggg atcatgtaac tcgccttgat 3582  
 cgttgggaac cggagctgaa tgaagccata ccaaacgacg agcgtgacac cacgatgcct 3642  
 gtagcaatgg caacaacggt gcgcaaaacta ttaactggcg aactacttac tctagcttcc 3702  
 cggcaacaat taatagactg gatggaggcg gataaagttg caggaccact tctgcgctcg 3762  
 gcccttcogg ctggctggtt tattgctgat aaatctggag ccggtgagcg tgggtctcgc 3822  
 ggtatcattg cagcactggg gccagatggt aagccctccc gtatcgtagt tatctacacg 3882  
 acggggagtc aggcaactat ggatgaacga aatagacaga tcgctgagat aggtgcctca 3942  
 ctgattaagc attggtaact gtcagaccaa gtttactcat atatacttta gattgattta 4002  
 aaacttcatt ttaatttaa aaggatctag gtgaagatcc tttttgataa totcatgacc 4062  
 aaaatccctt aacgtgagtt ttcgttccac tgagcgtcag accccgtaga aaagatcaaa 4122  
 ggatcttctt gagatccttt tttctgcgc gtaatctgct gcttgcaaac aaaaaacca 4182  
 ccgctaccag cgggtggtttg tttgccgat caagagctac caactctttt tccgaaggta 4242  
 actggcttca gcagagcgca gataccaaat actgtccttc tagtgtagcc gtagttaggc 4302  
 caccacttca agaactctgt agcaccgcct acatacctcg ctctgctaact cctgttacca 4362

gtggctgctg ccagtgggcga taagtcgtgt cttacogggg tggactcaag acgatagtta 4422  
 coggataagg cgcagcggtc gggctgaacg gggggttcgt gcacacagcc cagcttgag 4482  
 cgaacgacct acaccgaact gagataccta cagcgtgagc tatgagaaag cgcacagctt 4542  
 cccgaagggg gaaagggcga caggtatccg gtaagcggca gggtcggaac aggagagcgc 4602  
 acgaggggagc ttccaggggg aaacgcctgg tatctttata gtccctgctgg gtttcgccac 4662  
 ctctgacttg agcgtcgatt tttgtgatgc tcgtcagggg ggcggagcct atggaaaaac 4722  
 gccagcaacg cggccttttt acggttcttg gccttttctt ggccttttgc tcacatgttc 4782  
 tttcctgcgt tatccoctga ttctgtggat aaccgtatta cgccttttga gtgagctgat 4842  
 accgctcgcc gcagccgaac gaccgagcgc agcgagtcag tgagcggaga agcgggaagag 4902  
 cgctgatgc ggtattttct ccttacgcat ctgtgcggta tttcacaccg catatatggt 4962  
 gcactctcag tacaatctgc tctgatgccg catagttaag ccagtataca ctccgctatc 5022  
 gctaogtgac tgggtcatgg ctgcgccccg acacccgcca acaccgctg acgcgcctg 5082  
 acgggcttgt ctgctccgg catccgctta cagacaagct gtgaccgtct cggggagctg 5142  
 catgtgtcag aggttttcaac cgtcatcacc gaaacgcgcg aggcagctgc ggtaaagctc 5202  
 atcagcgtgg tcgtgaagcg attcacagat gtctgcctgt tcatccgctt ccagctcgtt 5262  
 gagtttctcc agaagcgta atgtctggct tctgataaag cgggccatgt taagggcggt 5322  
 ttttctctgt ttggtcactt gatgctccg tgtaaggggg aatttctgtt catgggggta 5382  
 atgataccga tgaacgaga gaggatgctc acgatacggg ttactgatga tgaacatgcc 5442  
 cggttactgg aacgttgtga gggtaacaa ctggcggtat ggatgcggcg ggaccagaga 5502  
 aaaatcactc agggtcfaat ccagccttc gttaatacag atgtaggtgt tccacaggg 5562  
 agccagcagc atcctgcgat gcagatccgg aacataatgg tgcagggcgc tgacttccgc 5622  
 gtttcagac tttacgaaac acggaaaccg aagaccatc atgttgttgc tcaggtegca 5682  
 gacgttttgc agcagcagtc gttcacggt cgctcgcgta tcgggtgatc attctgctaa 5742  
 ccagtaaggc aaccccgcca gcctagccgg gtcccaacg acaggagcac gatcatgcgc 5802  
 acccgtggcc aggacccaac gctgcctcag atgcgcccgc tgcggctgct ggagatggcg 5862  
 gacgcgatgg atatgttctg ccaagggttg gtttgcgcat tcacagttct ccgcaagaat 5922  
 tgattggctc caattcttgg agtgggtgaat ccgttagcga ggtgccgcgc gottccatc 5982  
 aggtcgaggt ggcccggctc catgcaccgc gacgcaacgc ggggagggcag acaaggtata 6042  
 gggcggcgcg octacaatcc atgccaaacc gttccatgtg ctgcgcgagg cggcataaat 6102  
 cgcctgacg atcagcggtc cagtgatcga agttaggtg gtaagagccg cgagcgtacc 6162  
 ttgaagctgt cctgatggg cgtcatctac ctgcctggac agcatggcct gcaacgcggg 6222

ES 2 382 335 T3

catcccgatg ccgccggaag cgagaagaat cataatgggg aaggccatcc agcctcgcgt 6282  
 cgccaacgcc agcaagacgt agcccagcgc gtcggccgcc atgccggcga taatggcctg 6342  
 cttctcgcgg aaacgtttgg tggcgggacc agtgacgaag gcttgagcga gggcgtgcaa 6402  
 gattccgaat accgcaagcg acaggccgat catcgtcgcg ctccagcga agcggtcctc 6462  
 gccgaaaatg acccagagcg ctgccggcac ctgtcctacg agttgcatga taaagaagac 6522  
 agtcataagt gcggcgacga tagtcatgcc ccgcgcccac cggaaggagc tgactggggt 6582  
 gaaggtcttc aagggcatcg gtcgacgctc tcccttatgc gactcctgca ttaggaagca 6642  
 gccagtagt aggttgaggc cgttgagcac cgcgcgcgca aggaatgggtg catgcatcga 6702  
 tcaccacaat tcagcaaatt gtgaacatca tcacgttcat ctttccttgg ttgccaatgg 6762  
 cccattttcc tgtcagfaac gagaaggctcg cgaattcagg cgcttttttag actggtcgta 6822  
 atgaac 6828

<210> 2

<211> 194

<212> PRT

5 <213> Pseudomonas marginalis

<400> 2

Met Ser Thr Ala Thr Ser Thr Pro Gly Glu Arg Ala Trp Ala Leu Phe  
 1 5 10 15  
 Gln Val Leu Lys Ser Lys Glu Leu Ile Pro Glu Gly Tyr Val Glu Gln  
 20 25 30  
 Leu Thr Gln Leu Met Glu His Gly Trp Ser Pro Glu Asn Gly Ala Arg  
 35 40 45  
 Val Val Ala Lys Ala Trp Val Asp Pro Gln Phe Arg Ala Leu Leu Leu  
 50 55 60  
 Lys Asp Gly Thr Ala Ala Cys Ala Gln Phe Gly Tyr Thr Gly Pro Gln  
 65 70 75 80  
 Gly Glu Tyr Ile Val Ala Leu Glu Asp Thr Pro Thr Leu Lys Asn Val  
 85 90 95  
 Ile Val Cys Ser Leu Cys Ser Cys Thr Asn Trp Pro Val Leu Gly Leu  
 100 105 110  
 Pro Pro Glu Trp Tyr Lys Gly Phe Glu Phe Arg Ala Arg Leu Val Arg  
 115 120 125

ES 2 382 335 T3

Glu Gly Arg Thr Val Leu Arg Glu Leu Gly Thr Glu Leu Pro Arg Asp  
 130 135 140

Met Val Val Lys Val Trp Asp Thr Ser Ala Glu Ser Arg Tyr Leu Val  
 145 150 155 160

Leu Pro Val Arg Pro Glu Gly Ser Glu His Met Ser Glu Glu Gln Leu  
 165 170 175

Gln Ala Leu Val Thr Lys Asp Val Leu Ile Gly Val Ala Leu Pro Arg  
 180 185 190

Val Gly

<210> 3

<211> 220

<212> PRT

5 <213> Pseudomonas marginalis

<400> 3

Met Asp Gly Phe His Asp Leu Gly Gly Phe Gln Gly Phe Gly Lys Val  
 1 5 10 15

Pro His Thr Ile Asn Ser Leu Ser Tyr Lys Gln Val Phe Lys Gln Asp  
 20 25 30

Trp Glu His Leu Ala Tyr Ser Leu Met Phe Ile Gly Ala Asp His Leu  
 35 40 45

Lys Lys Phe Ser Val Asp Glu Val Arg His Ala Val Glu Arg Leu Asp  
 50 55 60

Val Arg Gln His Val Gly Thr Gln Tyr Tyr Glu Arg Tyr Val Ile Ala  
 65 70 75 80

Thr Ala Thr Leu Leu Val Glu Thr Gly Val Ile Thr Gln Ala Glu Leu  
 85 90 95

Asp Gln Ala Leu Gly Ser His Phe Lys Leu Ala Asn Pro Ala His Ala  
 100 105 110

Glu Gly Arg Pro Ala Ile Thr Gly Arg Pro Pro Phe Glu Val Gly Asp  
 115 120 125

Arg Val Val Val Arg Asp Glu Tyr Val Ala Gly His Ile Arg Met Pro  
 130 135 140

ES 2 382 335 T3

Ala Tyr Val Arg Gly Lys Glu Gly Val Val Leu His Arg Thr Ser Glu  
145 150 155 160

Lys Trp Pro Phe Pro Asp Ala Ile Gly His Gly Asp Val Ser Ala Ala  
165 170 175

His Gln Pro Thr Tyr His Val Glu Phe Ala Val Lys Asp Leu Trp Gly  
180 185 190

Asp Ala Ala Asp Glu Gly Phe Val Val Val Asp Leu Phe Glu Ser Tyr  
195 200 205

Leu Asp Lys Ala Ala Gly Ala Arg Ala Val Asn Pro  
210 215 220

<210> 4

<211> 1269

<212> ADN

5 <213> Pseudomonas marginalis

<220>

<221> CDS

<222> (1) .. (1269)

<223> Gen de la región codificadora de la proteína activadora

10 <400> 4

ES 2 382 335 T3

atg	aca	gac	ggc	gcc	cag	gca	agc	cga	ctg	ccg	gtg	acg	gtc	ctt	tcg	48
Met	Thr	Asp	Gly	Ala	Gln	Ala	Ser	Arg	Leu	Pro	Val	Thr	Val	Leu	Ser	
1			5						10					15		
ggc	ttc	ctc	ggc	gcc	ggc	aag	acc	acc	ctg	ctc	aac	cac	atc	ctg	cgc	96
Gly	Phe	Leu	Gly	Ala	Gly	Lys	Thr	Thr	Leu	Leu	Asn	His	Ile	Leu	Arg	
		20						25					30			
aat	cgc	gaa	ggc	ctg	cgc	gtg	gcc	gtc	atc	gtc	aat	gac	atg	agc	gaa	144
Asn	Arg	Glu	Gly	Leu	Arg	Val	Ala	Val	Ile	Val	Asn	Asp	Met	Ser	Glu	
		35					40					45				
gtc	aat	atc	gat	gcc	gaa	gag	gtg	cag	cgc	gat	gtc	gcg	ctg	cac	cgt	192
Val	Asn	Ile	Asp	Ala	Glu	Glu	Val	Gln	Arg	Asp	Val	Ala	Leu	His	Arg	
	50					55					60					
ggc	cgc	gat	gag	ctg	atc	gag	atg	agc	aac	ggg	tgc	atc	tgc	tgc	acc	240
Gly	Arg	Asp	Glu	Leu	Ile	Glu	Met	Ser	Asn	Gly	Cys	Ile	Cys	Cys	Thr	
65				70						75					80	
ctg	cgc	gcc	gat	ttg	ctc	gag	cag	atc	agc	atg	ctc	gca	cgc	caa	cag	288
Leu	Arg	Ala	Asp	Leu	Leu	Glu	Gln	Ile	Ser	Met	Leu	Ala	Arg	Gln	Gln	
				85					90					95		
cgt	ttc	gat	tac	ctg	ctg	att	gaa	tcc	acg	ggg	atc	tcc	gag	ccg	atg	336
Arg	Phe	Asp	Tyr	Leu	Leu	Ile	Glu	Ser	Thr	Gly	Ile	Ser	Glu	Pro	Met	
			100					105					110			

ES 2 382 335 T3

cgc gtc gcg gag acg ttc gcc ttc ctt gac gct gat ggc ttc agc ctc	384
Pro Val Ala Glu Thr Phe Ala Phe Leu Asp Ala Asp Gly Phe Ser Leu	
115 120 125	
agc gaa ctg gcg cgc ctg gac acc ttg gtg acg gtg gtc gat ggc agt	432
Ser Glu Leu Ala Arg Leu Asp Thr Leu Val Thr Val Val Asp Gly Ser	
130 135 140	
cgt ttc cag gaa ctg ctc gaa tcg ccg cac acc gtt gac cag gat gac	480
Arg Phe Gln Glu Leu Leu Glu Ser Pro His Thr Val Asp Gln Asp Asp	
145 150 155 160	
gcc acg cca gac gca ccc aag cgc cac ctg gcc gat ctg ctg atc gaa	528
Ala Thr Pro Asp Ala Pro Lys Arg His Leu Ala Asp Leu Leu Ile Glu	
165 170 175	
cag gtg gag tac gcc aac gtc att ctc gtc aat aag ctg gat ctg atc	576
Gln Val Glu Tyr Ala Asn Val Ile Leu Val Asn Lys Leu Asp Leu Ile	
180 185 190	
gat gca gcg cag tat cag gcc gtg cag gcg atc ctc aca ggc ctt aac	624
Asp Ala Ala Gln Tyr Gln Ala Val Gln Ala Ile Leu Thr Gly Leu Asn	
195 200 205	
ccg acg gcg cgg atc atg ccg atg gcc cac ggt aac atc cca tca gcc	672
Pro Thr Ala Arg Ile Met Pro Met Ala His Gly Asn Ile Pro Ser Ala	
210 215 220	
agc ctg ctc ggc acc cat ctg ttt gat tta ccc agc ctc gcg gcg tcg	720
Ser Leu Leu Gly Thr His Leu Phe Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Ser	
225 230 235 240	
ccg gcc tgg atg cgg aaa atg gag gcg gca gac gcg ccg gcc tcc gag	768
Pro Gly Trp Met Arg Lys Met Glu Ala Ala Asp Ala Pro Ala Ser Glu	
245 250 255	
tcg gac acc tat ggc gtg acg tcc tgg gtg tac cgt gag cgc gca cct	816
Ser Asp Thr Tyr Gly Val Thr Ser Trp Val Tyr Arg Glu Arg Ala Pro	
260 265 270	
ttc cac ccg caa cgg ttg ctc gac ttt ctc cag cag ccc tgg tgc aac	864
Phe His Pro Gln Arg Leu Leu Asp Phe Leu Gln Gln Pro Trp Cys Asn	
275 280 285	
ggg cgg ttg ctg cgc agc aaa ggt tac ttc tgg ctt gcc agc cgc cac	912
Gly Arg Leu Leu Arg Ser Lys Gly Tyr Phe Trp Leu Ala Ser Arg His	
290 295 300	
ctg gaa acc ggc ctg ctg gtg caa agc gcc aag cgg ttc cag tgg gac	960
Leu Glu Thr Gly Leu Leu Val Gln Ser Gly Lys Arg Phe Gln Trp Asp	
305 310 315 320	
tat gtc ggg cgc tgg tgg aac ttc atc gag ccg tcg caa tgg ccc cgg	1008
Tyr Val Gly Arg Trp Trp Asn Phe Ile Glu Pro Ser Gln Trp Pro Arg	
325 330 335	
gac gaa tac cgg ctg cag gcc atc agg gcc aaa tgg gac agc gtg gtc	1056
Asp Glu Tyr Arg Leu Gln Gly Ile Arg Ala Lys Trp Asp Ser Val Val	
340 345 350	

ES 2 382 335 T3

```

ggc gac tgc cgg cag gag ttg gtg ttt atc ggc cag ggc ctc gac acc      1104
Gly Asp Cys Arg Gln Glu Leu Val Phe Ile Gly Gln Gly Leu Asp Thr
      355                                360                                365

gac gcg tta cag cgc gag ctc gac cac tgc ctg ctg agc gcc cag gaa      1152
Asp Ala Leu Gln Arg Glu Leu Asp His Cys Leu Leu Ser Ala Gln Glu
      370                                375                                380

atc gcc gcc ggc cca ctg gcc tgg caa gcg ctg cca ggg gcg acc gcc      1200
Ile Ala Ala Gly Pro Leu Ala Trp Gln Ala Leu Pro Gly Ala Thr Ala
      385                                390                                395                                400

ttt gac cga cag acc ctt gcc cgc ccc cca cac agc cca tgg cga ttg      1248
Phe Asp Arg Gln Thr Leu Ala Arg Pro Pro His Ser Pro Trp Arg Leu
      405                                410                                415

ccc cca ttt gat ccg aga tag                                          1269
Pro Pro Phe Asp Pro Arg
      420

```

<210> 5

<211> 422

<212> PRT

5 <213> Pseudomonas marginalis

<400> 5

```

Met Thr Asp Gly Ala Gln Ala Ser Arg Leu Pro Val Thr Val Leu Ser
1                                5                                10                                15

Gly Phe Leu Gly Ala Gly Lys Thr Thr Leu Leu Asn His Ile Leu Arg
20                                25                                30

Asn Arg Glu Gly Leu Arg Val Ala Val Ile Val Asn Asp Met Ser Glu
35                                40                                45

Val Asn Ile Asp Ala Glu Glu Val Gln Arg Asp Val Ala Leu His Arg
50                                55                                60

Gly Arg Asp Glu Leu Ile Glu Met Ser Asn Gly Cys Ile Cys Cys Thr
65                                70                                75                                80

Leu Arg Ala Asp Leu Leu Glu Gln Ile Ser Met Leu Ala Arg Gln Gln
85                                90                                95

Arg Phe Asp Tyr Leu Leu Ile Glu Ser Thr Gly Ile Ser Glu Pro Met
100                               105                               110

Pro Val Ala Glu Thr Phe Ala Phe Leu Asp Ala Asp Gly Phe Ser Leu
115                               120                               125

```

ES 2 382 335 T3

Ser Glu Leu Ala Arg Leu Asp Thr Leu Val Thr Val Val Asp Gly Ser  
 130 135 140

Arg Phe Gln Glu Leu Leu Glu Ser Pro His Thr Val Asp Gln Asp Asp  
 145 150 155 160

Ala Thr Pro Asp Ala Pro Lys Arg His Leu Ala Asp Leu Leu Ile Glu  
 165 170 175

Gln Val Glu Tyr Ala Asn Val Ile Leu Val Asn Lys Leu Asp Leu Ile  
 180 185 190

Asp Ala Ala Gln Tyr Gln Ala Val Gln Ala Ile Leu Thr Gly Leu Asn  
 195 200 205

Pro Thr Ala Arg Ile Met Pro Met Ala His Gly Asn Ile Pro Ser Ala  
 210 215 220

Ser Leu Leu Gly Thr His Leu Phe Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Ser  
 225 230 235 240

Pro Gly Trp Met Arg Lys Met Glu Ala Ala Asp Ala Pro Ala Ser Glu  
 245 250 255

Ser Asp Thr Tyr Gly Val Thr Ser Trp Val Tyr Arg Glu Arg Ala Pro  
 260 265 270

Phe His Pro Gln Arg Leu Leu Asp Phe Leu Gln Gln Pro Trp Cys Asn  
 275 280 285

Gly Arg Leu Leu Arg Ser Lys Gly Tyr Phe Trp Leu Ala Ser Arg His  
 290 295 300

Leu Glu Thr Gly Leu Leu Val Gln Ser Gly Lys Arg Phe Gln Trp Asp  
 305 310 315 320

Tyr Val Gly Arg Trp Trp Asn Phe Ile Glu Pro Ser Gln Trp Pro Arg  
 325 330 335

Asp Glu Tyr Arg Leu Gln Gly Ile Arg Ala Lys Trp Asp Ser Val Val  
 340 345 350

Gly Asp Cys Arg Gln Glu Leu Val Phe Ile Gly Gln Gly Leu Asp Thr  
 355 360 365

Asp Ala Leu Gln Arg Glu Leu Asp His Cys Leu Leu Ser Ala Gln Glu  
 370 375 380

# ES 2 382 335 T3

Ile Ala Ala Gly Pro Leu Ala Trp Gln Ala Leu Pro Gly Ala Thr Ala  
385 390 395 400

Phe Asp Arg Gln Thr Leu Ala Arg Pro Pro His Ser Pro Trp Arg Leu  
405 410 415

Pro Pro Phe Asp Pro Arg  
420

<210> 6

<211> 2371

<212> ADN

5 <213> Pseudomonas putida

<220>

<221> CDS

<222> (1) .. (582)

<223> Gen de la región codificadora de la subunidad alfa

10 <220>

<221> CDS

<222> (624) .. (1286)

<223> Gen de la región codificadora de la subunidad beta

<220>

15 <221> Genes

<222> (1283) .. (2371)

<223> Gen para la proteína activadora

<400> 6

ES 2 382 335 T3

atg acg gca act tca acc cct ggt gag cgg gca cgc gca ttg ttt gca	48
Met Thr Ala Thr Ser Thr Pro Gly Glu Arg Ala Arg Ala Leu Phe Ala	
1 5 10 15	
gtg ctc aag cgc aaa gac ctc atc ccc gag ggc tac atc gaa cag ctc	96
Val Leu Lys Arg Lys Asp Leu Ile Pro Glu Gly Tyr Ile Glu Gln Leu	
20 25 30	
acc cag ctg atg gaa cac ggc tgg agc ccg gaa aac ggc gcg cgc atc	144
Thr Gln Leu Met Glu His Gly Trp Ser Pro Glu Asn Gly Ala Arg Ile	
35 40 45	
gtc gcc aag gcc tgg gtc gat ccg cag ttt cgc gag ctg ctg ctc aag	192
Val Ala Lys Ala Trp Val Asp Pro Gln Phe Arg Glu Leu Leu Leu Lys	
50 55 60	
gac ggt acg gcc gcc tgc gcc cag ttc ggc ttc acc ggc cca caa ggc	240
Asp Gly Thr Ala Ala Cys Ala Gln Phe Gly Phe Thr Gly Pro Gln Gly	
65 70 75 80	
gaa tac atc gtc gcc ctg gaa gac acc ccg cag ttg aaa aac gtg atc	288
Glu Tyr Ile Val Ala Leu Glu Asp Thr Pro Gln Leu Lys Asn Val Ile	
85 90 95	
gtc tgt agc ctg tgc tcc tgc acg aac tgg ccg gtg ctg ggc ctg cca	336
Val Cys Ser Leu Cys Ser Cys Thr Asn Trp Pro Val Leu Gly Leu Pro	
100 105 110	

ES 2 382 335 T3

cct gag tgg tac aag ggc ttc gag ttc cgt gcg cgg ttg gtc cgg gag Pro Glu Trp Tyr Lys Gly Phe Glu Phe Arg Ala Arg Leu Val Arg Glu 115 120 125	384
ggg cgc acg gta ttg cgc gag ctg ggc acc gag ttg ccc ggc gac atg Gly Arg Thr Val Leu Arg Glu Leu Gly Thr Glu Leu Pro Gly Asp Met 130 135 140	432
gtg gtc aag gtc tgg gac acc agc gct gaa agc cgc tac ctg gtg ctg Val Val Lys Val Trp Asp Thr Ser Ala Glu Ser Arg Tyr Leu Val Leu 145 150 155 160	480
ccg caa cga cca gcg ggc tca gag cat atg agc gaa gag cag ttg cgg Pro Gln Arg Pro Ala Gly Ser Glu His Met Ser Glu Glu Gln Leu Arg 165 170 175	528
caa ctg gtc acc aag gac gtg ctg atc ggc gtc gcc ctg ccc cgc gtt Gln Leu Val Thr Lys Asp Val Leu Ile Gly Val Ala Leu Pro Arg Val 180 185 190	576
ggc tga gcaaggcgc ccaaccccat tcaacttcog gagtggtcaa t atg gat ggc Gly Met Asp Gly 195	632
ttt cac gat ctc ggc ggt ttc cag ggc ttt ggc aaa gtg ccc cac cgc Phe His Asp Leu Gly Gly Phe Gln Gly Phe Gly Lys Val Pro His Arg 200 205 210	680
atc aac agc ctg agc tac aag cag gtg ttc aag cag gac tgg gaa cac Ile Asn Ser Leu Ser Tyr Lys Gln Val Phe Lys Gln Asp Trp Glu His 215 220 225	728
ctg gcc tac agc ctg atg ttc atc ggc gtc gac cac ctg aac aag ttc Leu Ala Tyr Ser Leu Met Phe Ile Gly Val Asp His Leu Asn Lys Phe 230 235 240	776
agc gtc gac gaa ata cgt cat gcc gtc gaa cgc att gac gtg cgc cag Ser Val Asp Glu Ile Arg His Ala Val Glu Arg Ile Asp Val Arg Gln 245 250 255 260	824
cac gtc ggc acc gaa tac tac gaa cgt tat gtg atc gcc act gcc acg His Val Gly Thr Glu Tyr Tyr Glu Arg Tyr Val Ile Ala Thr Ala Thr 265 270 275	872
ctg ctg gtc gaa aca ggc gtc atc acc cag gcc gaa ctg gat gaa gca Leu Leu Val Glu Thr Gly Val Ile Thr Gln Ala Glu Leu Asp Glu Ala 280 285 290	920
ctc ggc tcg cac ttc aag ctg gcc aac ccc gcc cat gcg caa ggg cgt Leu Gly Ser His Phe Lys Leu Ala Asn Pro Ala His Ala Gln Gly Arg 295 300 305	968
gct gca att atc ggg cga gcg cct ttt gaa gtg ggc gat cgg gtc atc Ala Ala Ile Ile Gly Arg Ala Pro Phe Glu Val Gly Asp Arg Val Ile 310 315 320	1016
gta cgc gat gaa tac gtg gcc ggg cat gtg cgc atg cct gca tac gtg Val Arg Asp Glu Tyr Val Ala Gly His Val Arg Met Pro Ala Tyr Val 325 330 335 340	1064

ES 2 382 335 T3

cgc ggc aag caa ggc gta gtg ctg cac cgg acc act gaa cag tgg ccg 1112  
 Arg Gly Lys Gln Gly Val Val Leu His Arg Thr Thr Glu Gln Trp Pro  
 345 350 355  
 ttt ccg gac gcg att ggc cat ggc gac cag agc gct gcg cat caa ccg 1160  
 Phe Pro Asp Ala Ile Gly His Gly Asp Gln Ser Ala Ala His Gln Pro  
 360 365 370  
 acc tac cat gtc gag ttc cgc gtg cgg gac ctg tgg ggc gat gcc gca 1208  
 Thr Tyr His Val Glu Phe Arg Val Arg Asp Leu Trp Gly Asp Ala Ala  
 375 380 385  
 gac gac ggc ctg gtg gtg gta gac ctg ttc gaa agc tat ctg gac agg 1256  
 Asp Asp Gly Leu Val Val Val Asp Leu Phe Glu Ser Tyr Leu Asp Arg  
 390 395 400  
 gtc gaa agc ccg cga gtg gtg cgc gca tga gtgccggcgc ccaggcaggc 1306  
 Val Glu Ser Pro Arg Val Val Arg Ala  
 405 410  
 cggctgccgg tgacggctct ttcaggcttc ctccggcgcag gcaagaccac cctgctcaac 1366  
 cacatcctgc gcaaccgccca gggcctgaag gtggcggtta tcgtcaatga catgagcgag 1426  
 gtcaacatcg atgccgccca ggtccagcgc gacgttgccg tgtatcgtgg ccaggatgaa 1486  
 ttgatagaga tgagcaacgg ctgtatctgc tgcacctgc gcgccgacct gcttgagcag 1546  
 atcagcgcgc tggcgcgccca gcagcgtttc gattacctgt tgatcgagtc caccgggatt 1606  
 tccgagccga tgccagtcgc cgagacctt gcctttctcg acgccaacgg tttcagcctc 1666  
 agcgaactgg cggcggctgga tacgctgggtg acggtggtcg atgccagcca gttcatggcc 1726  
 atgctcgact ctcccgaac cgtcgcgcgg gccgacgtca ccacggatga cagcaggcgc 1786  
 ccgctggccg atctgctgat cgagcaggtc gagtatgcc atgtgattct ggtcaacaaa 1846  
 cgcgacctgg tcgacgaggc gcagtaccag gcctgcagg cagttctcgc cgggctcaat 1906  
 ccaggcgcac agatcctgcc gatggtggcc ggcaacgtcg cctgtcagag cgtccttggg 1966  
 acccagctgt tcgatttgcc cagccttgcc gcagcgcgcc gctggatgaa acagatggac 2026  
 gcgcacgaca ccccgccgg cgagtcgcag acctatggcg tgacgtcatg ggtgtaccga 2086  
 gcgcgcgccc cgttccatcc gcaacgcttg cttgatttcc tcgcccggcc ctggcgcgac 2146  
 ggccgtcttc tgccgagcaa aggttatttc tggcttgcca gccgccaccg cgaaatcggc 2206  
 ttgctggtac acagcggcca gcagtttcaa tgggactatg ttggccattg gtggaacttc 2266  
 atcgacacgt cacagtggcc acaggacaag tatcgtctgc agggcatcat ggccaagtgg 2326  
 gacagcatcg tggcgactg ccgacaggag ctgaaaagct tatga 2371

<210> 7

<211> 193

<212> PRT

5 <213> Pseudomonas putida

<400> 7

Met Thr Ala Thr Ser Thr Pro Gly Glu Arg Ala Arg Ala Leu Phe Ala  
1 5 10 15

Val Leu Lys Arg Lys Asp Leu Ile Pro Glu Gly Tyr Ile Glu Gln Leu  
20 25 30

Thr Gln Leu Met Glu His Gly Trp Ser Pro Glu Asn Gly Ala Arg Ile  
35 40 45

Val Ala Lys Ala Trp Val Asp Pro Gln Phe Arg Glu Leu Leu Leu Lys  
50 55 60

Asp Gly Thr Ala Ala Cys Ala Gln Phe Gly Phe Thr Gly Pro Gln Gly  
65 70 75 80

Glu Tyr Ile Val Ala Leu Glu Asp Thr Pro Gln Leu Lys Asn Val Ile  
85 90 95

Val Cys Ser Leu Cys Ser Cys Thr Asn Trp Pro Val Leu Gly Leu Pro  
100 105 110

Pro Glu Trp Tyr Lys Gly Phe Glu Phe Arg Ala Arg Leu Val Arg Glu  
115 120 125

Gly Arg Thr Val Leu Arg Glu Leu Gly Thr Glu Leu Pro Gly Asp Met  
130 135 140

Val Val Lys Val Trp Asp Thr Ser Ala Glu Ser Arg Tyr Leu Val Leu  
145 150 155 160

Pro Gln Arg Pro Ala Gly Ser Glu His Met Ser Glu Glu Gln Leu Arg  
165 170 175

Gln Leu Val Thr Lys Asp Val Leu Ile Gly Val Ala Leu Pro Arg Val  
180 185 190

Gly

<210> 8

<211> 220

<212> PRT

5 <213> Pseudomonas putida

<400> 8

ES 2 382 335 T3

Met Asp Gly Phe His Asp Leu Gly Gly Phe Gln Gly Phe Gly Lys Val  
 1 5 10 15

Pro His Arg Ile Asn Ser Leu Ser Tyr Lys Gln Val Phe Lys Gln Asp  
 20 25 30

Trp Glu His Leu Ala Tyr Ser Leu Met Phe Ile Gly Val Asp His Leu  
 35 40 45

Asn Lys Phe Ser Val Asp Glu Ile Arg His Ala Val Glu Arg Ile Asp  
 50 55 60

Val Arg Gln His Val Gly Thr Glu Tyr Tyr Glu Arg Tyr Val Ile Ala  
 65 70 75 80

Thr Ala Thr Leu Leu Val Glu Thr Gly Val Ile Thr Gln Ala Glu Leu  
 85 90 95

Asp Glu Ala Leu Gly Ser His Phe Lys Leu Ala Asn Pro Ala His Ala  
 100 105 110

Gln Gly Arg Ala Ala Ile Ile Gly Arg Ala Pro Phe Glu Val Gly Asp  
 115 120 125

Arg Val Ile Val Arg Asp Glu Tyr Val Ala Gly His Val Arg Met Pro  
 130 135 140

Ala Tyr Val Arg Gly Lys Gln Gly Val Val Leu His Arg Thr Thr Glu  
 145 150 155 160

Gln Trp Pro Phe Pro Asp Ala Ile Gly His Gly Asp Gln Ser Ala Ala  
 165 170 175

His Gln Pro Thr Tyr His Val Glu Phe Arg Val Arg Asp Leu Trp Gly  
 180 185 190

Asp Ala Ala Asp Asp Gly Leu Val Val Val Asp Leu Phe Glu Ser Tyr  
 195 200 205

Leu Asp Arg Val Glu Ser Pro Arg Val Val Arg Ala  
 210 215 220

<210> 9

<211> 1089

<212> ADN

<213> Pseudomonas putida

<220>

<221> CDS

5 <222> (1) .. (1089)

<223> Gen para la proteína activadora

<400> 9

ES 2 382 335 T3

atg agt gcc ggc gcc cag gca ggc cgg ctg ccg gtg acg gtc ctt tca	48
Met Ser Ala Gly Ala Gln Ala Gly Arg Leu Pro Val Thr Val Leu Ser	
1 5 10 15	
ggc ttc ctc ggc gca ggc aag acc acc ctg ctc aac cac atc ctg cgc	96
Gly Phe Leu Gly Ala Gly Lys Thr Thr Leu Leu Asn His Ile Leu Arg	
20 25 30	
aac cgc cag ggc ctg aag gtg gcg gtt atc gtc aat gac atg agc gag	144
Asn Arg Gln Gly Leu Lys Val Ala Val Ile Val Asn Asp Met Ser Glu	
35 40 45	
gtc aac atc gat gcc gcc cag gtc cag cgc gac gtt gcg ctg tat cgt	192
Val Asn Ile Asp Ala Ala Gln Val Gln Arg Asp Val Ala Leu Tyr Arg	
50 55 60	
ggc cag gat gaa ttg ata gag atg agc aac ggc tgt atc tgc tgc acc	240
Gly Gln Asp Glu Leu Ile Glu Met Ser Asn Gly Cys Ile Cys Cys Thr	
65 70 75 80	
ctg cgc gcc gac ctg ctt gag cag atc agc gcg ctg gcg cgc cag cag	288
Leu Arg Ala Asp Leu Leu Glu Gln Ile Ser Ala Leu Ala Arg Gln Gln	
85 90 95	
cgt ttc gat tac ctg ttg atc gag tcc acc ggg att tcc gag ccg atg	336
Arg Phe Asp Tyr Leu Leu Ile Glu Ser Thr Gly Ile Ser Glu Pro Met	
100 105 110	
cca gtc gcc gag acc ttt gcc ttt ctc gac gcc aac ggt ttc agc ctc	384
Pro Val Ala Glu Thr Phe Ala Phe Leu Asp Ala Asn Gly Phe Ser Leu	
115 120 125	
agc gaa ctg gcg cgg ctg gat acg ctg gtg acg gtg gtc gat gcc agc	432
Ser Glu Leu Ala Arg Leu Asp Thr Leu Val Thr Val Val Asp Ala Ser	
130 135 140	
cag ttc atg gcc atg ctc gac tct ccc gaa acc gtc gcg cgg gcc gac	480
Gln Phe Met Ala Met Leu Asp Ser Pro Glu Thr Val Ala Arg Ala Asp	
145 150 155 160	
gtc acc acg gat gac agc agg cgc ccg ctg gcc gat ctg ctg atc gag	528
Val Thr Thr Asp Asp Ser Arg Arg Pro Leu Ala Asp Leu Leu Ile Glu	
165 170 175	
cag gtc gag tat gcc aat gtg att ctg gtc aac aaa cgc gac ctg gtc	576
Gln Val Glu Tyr Ala Asn Val Ile Leu Val Asn Lys Arg Asp Leu Val	
180 185 190	
gac gag gcg cag tac cag gcc ctg cag gca gtt ctc gcc ggg ctc aat	624
Asp Glu Ala Gln Tyr Gln Ala Leu Gln Ala Val Leu Ala Gly Leu Asn	
195 200 205	
cca ggc gca cag atc ctg ccg atg gtg gcc ggc aac gtc gcc ctg tcg	672
Pro Gly Ala Gln Ile Leu Pro Met Val Ala Gly Asn Val Ala Leu Ser	
210 215 220	

ES 2 382 335 T3

```

agc gtc ctt ggt acc cag ctg ttc gat ttg ccc agc ctt gcc gca gcg      720
Ser Val Leu Gly Thr Gln Leu Phe Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Ala
225                               230                               235                               240

ccc ggc tgg atg aaa cag atg gac gcg cac gac acc ccg gcc ggc gag      768
Pro Gly Trp Met Lys Gln Met Asp Ala His Asp Thr Pro Ala Gly Glu
                               245                               250                               255

tcg cag acc tat ggc gtg acg tca tgg gtg tac cga gcg cgc gcc ccg      816
Ser Gln Thr Tyr Gly Val Thr Ser Trp Val Tyr Arg Ala Arg Ala Pro
                               260                               265                               270

ttc cat ccg caa cgc ttg ctt gat ttt ctc gcc cgg ccc tgg cgc gac      864
Phe His Pro Gln Arg Leu Leu Asp Phe Leu Ala Arg Pro Trp Arg Asp
                               275                               280                               285

ggc cgt ctt ctg cgc agc aaa ggt tat ttc tgg ctt gcc agc cgc cac      912
Gly Arg Leu Leu Arg Ser Lys Gly Tyr Phe Trp Leu Ala Ser Arg His
                               290                               295                               300

cgc gaa atc ggc ttg ctg gta cac agc ggc cag cag ttt caa tgg gac      960
Arg Glu Ile Gly Leu Leu Val His Ser Gly Gln Gln Phe Gln Trp Asp
305                               310                               315                               320

tat gtt ggc cat tgg tgg aac ttc atc gac acg tca cag tgg cca cag      1008
Tyr Val Gly His Trp Trp Asn Phe Ile Asp Thr Ser Gln Trp Pro Gln
                               325                               330                               335

gac aag tat cgc ttg cag ggc atc atg gcc aag tgg gac agc atc gtc      1056
Asp Lys Tyr Arg Leu Gln Gly Ile Met Ala Lys Trp Asp Ser Ile Val
                               340                               345                               350

ggc gac tgc cga cag gag ctg aaa agc tta tga      1089
Gly Asp Cys Arg Gln Glu Leu Lys Ser Leu
                               355                               360

```

<210> 10

<211> 362

<212> PRT

5 <213> Pseudomonas putida

<400> 10

ES 2 382 335 T3

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

ES 2 382 335 T3

Leu Arg Ala Asp Leu Leu Glu Gln Ile Ser Ala Leu Ala Arg Gln Gln  
 85 90 95  
 Arg Phe Asp Tyr Leu Leu Ile Glu Ser Thr Gly Ile Ser Glu Pro Met  
 100 105 110  
 Pro Val Ala Glu Thr Phe Ala Phe Leu Asp Ala Asn Gly Phe Ser Leu  
 115 120 125  
 Ser Glu Leu Ala Arg Leu Asp Thr Leu Val Thr Val Val Asp Ala Ser  
 130 135 140  
 Gln Phe Met Ala Met Leu Asp Ser Pro Glu Thr Val Ala Arg Ala Asp  
 145 150 155 160  
 Val Thr Thr Asp Asp Ser Arg Arg Pro Leu Ala Asp Leu Leu Ile Glu  
 165 170 175  
 Gln Val Glu Tyr Ala Asn Val Ile Leu Val Asn Lys Arg Asp Leu Val  
 180 185 190  
 Asp Glu Ala Gln Tyr Gln Ala Leu Gln Ala Val Leu Ala Gly Leu Asn  
 195 200 205  
 Pro Gly Ala Gln Ile Leu Pro Met Val Ala Gly Asn Val Ala Leu Ser  
 210 215 220  
 Ser Val Leu Gly Thr Gln Leu Phe Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Ala  
 225 230 235 240  
 Pro Gly Trp Met Lys Gln Met Asp Ala His Asp Thr Pro Ala Gly Glu  
 245 250 255  
 Ser Gln Thr Tyr Gly Val Thr Ser Trp Val Tyr Arg Ala Arg Ala Pro  
 260 265 270  
 Phe His Pro Gln Arg Leu Leu Asp Phe Leu Ala Arg Pro Trp Arg Asp  
 275 280 285  
 Gly Arg Leu Leu Arg Ser Lys Gly Tyr Phe Trp Leu Ala Ser Arg His  
 290 295 300  
 Arg Glu Ile Gly Leu Leu Val His Ser Gly Gln Gln Phe Gln Trp Asp  
 305 310 315 320  
 Tyr Val Gly His Trp Trp Asn Phe Ile Asp Thr Ser Gln Trp Pro Gln  
 325 330 335

ES 2 382 335 T3

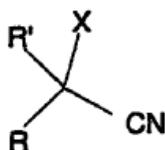
Asp Lys Tyr Arg Leu Gln Gly Ile Met Ala Lys Trp Asp Ser Ile Val  
 340 345 350

Gly Asp Cys Arg Gln Glu Leu Lys Ser Leu  
 355 360

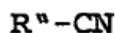
<210> 11  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 5 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Cebador 1F  
 <400> 11  
 ctccaccata tgagtacagc tacttcaacg 30  
 10 <210> 12  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 15 <223> Cebador 1R  
 <400> 12  
 cttcataagc ttctatctcg gatcaaatgg 30  
 <210> 13  
 <211> 25  
 20 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Cebador 2F  
 <400> 13  
 25 atgacggcaa ctcaacccc tgggtg 25  
 <210> 14  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 30 <220>  
 <223> Cebador 2R  
 <400> 14  
 tcagctcctg tcggcagtcg 20

## REIVINDICACIONES

1. Polinucleótidos aislados, que codifican unos polipéptidos con las secuencias de aminoácidos, que son idénticas en un 97 hasta un 100 % a las secuencias de aminoácidos, que están contenidas en las secuencias SEQ ID NO:2 o 3, poseyendo los polipéptidos la actividad de una nitrilo hidratasa tolerante al cianuro.
- 5 2. Polinucleótidos de acuerdo con la reivindicación 1, escogidos entre el conjunto que se compone de:
- unos polinucleótidos, que contienen la SEQ ID NO:1 o unas secuencias de nucleótidos complementarias con ella,
  - unos polinucleótidos, que contienen unas secuencias de nucleótidos, que corresponden a las secuencias procedentes de a) dentro del marco de la degeneración del código genético,
- 10 c) unos polinucleótidos, que contienen unas secuencias de nucleótidos de acuerdo con a), que contienen mutaciones con sentido neutras en su función,
- unos polinucleótidos, que se hibridan con las secuencias complementarias procedentes de a) en condiciones rigurosas, entendiéndose por el concepto de "condiciones rigurosas" el lavado en 0,1x SSC a una temperatura de 50 a 68°C,
- 15 codificando los polinucleótidos una nitrilo hidratasa tolerante al cianuro.
3. Polipéptidos, que contienen unas secuencias de aminoácidos, que son idénticas en un 97 % hasta un 100 % a las secuencias SEQ ID NO:2 o 3.
4. Polipéptidos con la actividad de una nitrilo hidratasa tolerante al cianuro de acuerdo con la reivindicación 3, cuya actividad restante después de la conversión química de metacrilonitrilo en presencia de 20 mM (mM = mmol/l) de iones de cianuro a 20°C, después de 30 min, es de por lo menos un 90 % de la actividad restante de la misma enzima, cuando ésta se había empleado para la reacción en unas condiciones por lo demás idénticas en ausencia de iones de cianuro.
- 20 5. Vectores, que contienen un polinucleótido, que se escoge entre los de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2.
6. Célula anfitriona, transformada o transfectada mediante la introducción de un polinucleótido de acuerdo con una o varias de las reivindicaciones 1 ó 2.
- 25 7. Célula anfitriona, transformada mediante la introducción de un vector de acuerdo con la reivindicación 6.
8. Procedimiento para la preparación enzimática de amidas a partir de nitrilos, que tiene las siguientes etapas:
- conversión química de un compuesto que contiene grupos nitrilo con una enzima microbiana (un polipéptido) de acuerdo con la reivindicación 4, que tiene la actividad de una nitrilo hidratasa y
- 30 b) separación de la amida formada,
- realizándose que para la conversión química del nitrilo en la amida se emplea una nitrilo hidratasa tolerante al cianuro de acuerdo con la reivindicación 3 ó 4.
9. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 8, caracterizado porque se emplean unos microorganismos, que producen y contienen la mencionada enzima, de acuerdo con la reivindicación 6 ó 7 o un material lisado de éstos.
- 35 10. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 9, caracterizado porque se emplean células en reposo del microorganismo.
11. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 8, caracterizado porque se emplea una nitrilo hidratasa purificada.
- 40 12. Procedimiento de acuerdo con una o varias de las reivindicaciones 8 hasta 11, caracterizado porque la enzima procede de unos microorganismos de la especie *Pseudomonas marginalis*.
13. Procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 8 hasta 11, caracterizado porque la enzima procede de unos microorganismos empleados de la especie *Pseudomonas marginalis*.
14. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 13, caracterizado porque los microorganismos empleados se han presentado bajo el número DSM 16276.
- 45 15. Procedimiento de acuerdo con una o varias de las reivindicaciones 8 hasta 14, caracterizado porque se hacen reaccionar los compuestos de las fórmulas generales



(I)



(II)

en las que significan:

X: OH, H, alquilo, NH<sub>2</sub>;

R: H, un radical alquilo saturado con 1 a 12 átomos de C, ramificado o sin ramificar, eventualmente sustituido con NH<sub>2</sub>,

radicales alquilo insaturados, que tienen un enlace doble y 1 a 12 átomos de C, ramificados o sin ramificar, grupos cicloalquilo con 3 a 6 átomos de C,

radicales alquileo sustituidos con grupos alquiltio, correspondiendo en este caso el alquilo a un radical de C<sub>1</sub> a C<sub>3</sub> y el alquileo a un radical divalente de C<sub>3</sub> a C<sub>8</sub>,

R': H, alquilo con 1 a 3 átomos de C,

R'': un anillo insaturado de uno o dos núcleos con 6 a 12 átomos de C, eventualmente sustituido con uno o dos grupos alquilo de C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>, Cl, Br o F,

un radical alquil-nitrilo con 1 a 6 átomos de C

para formar las correspondientes amidas.

15 16. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 15, caracterizado porque se hace reaccionar un compuesto de la fórmula general (I) en presencia de ácido cianhídrico o de una sal del ácido cianhídrico.

17. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 16, caracterizado porque la reacción se lleva a cabo en presencia de una concentración inicial de desde más que 0,5 % en moles de cianuro hasta de 3 % en moles de cianuro, referida al nitrilo empleado.

20 18. Procedimiento de acuerdo con una o varias de las reivindicaciones 8 hasta 17, caracterizado porque como nitrilo se emplea el 2-amino-4-metiltio-butironitrilo.

19. Procedimiento de acuerdo con una o varias de las reivindicaciones 8 hasta 17, caracterizado porque como nitrilo se emplea el 2-hidroxi-4-metiltio-butironitrilo, que eventualmente está contenido en la mezcla de reacción procedente de la preparación de este nitrilo.

25 20. Procedimiento de acuerdo con una o varias de las reivindicaciones 8 hasta 17, caracterizado porque como nitrilo se emplea el 2-hidroxi-2-metil-propionitrilo.

21. Microorganismos del género Pseudomonas, presentados bajo el número DSM 16276.

22. Nitrilo hidratadas tolerantes al cianuro, aisladas a partir de las cepas del género Pseudomonas, presentadas bajo el número DSM 16276.

30

Figura 1

MA32

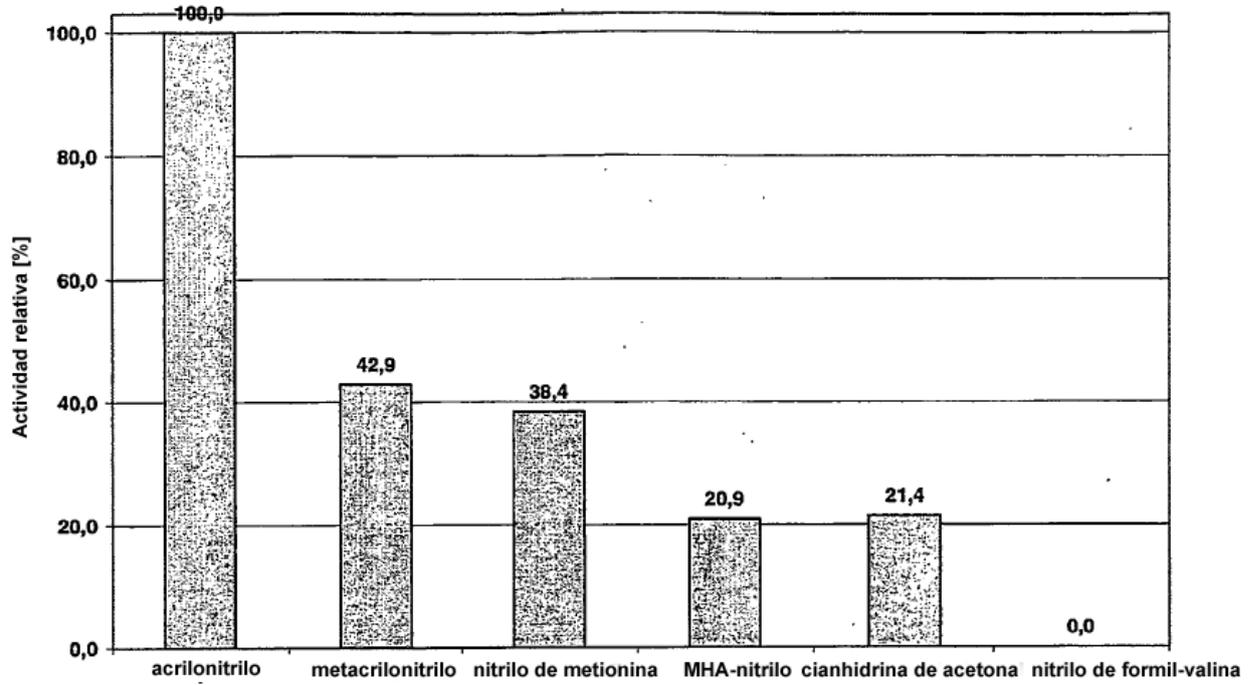


Figura 2

MA113

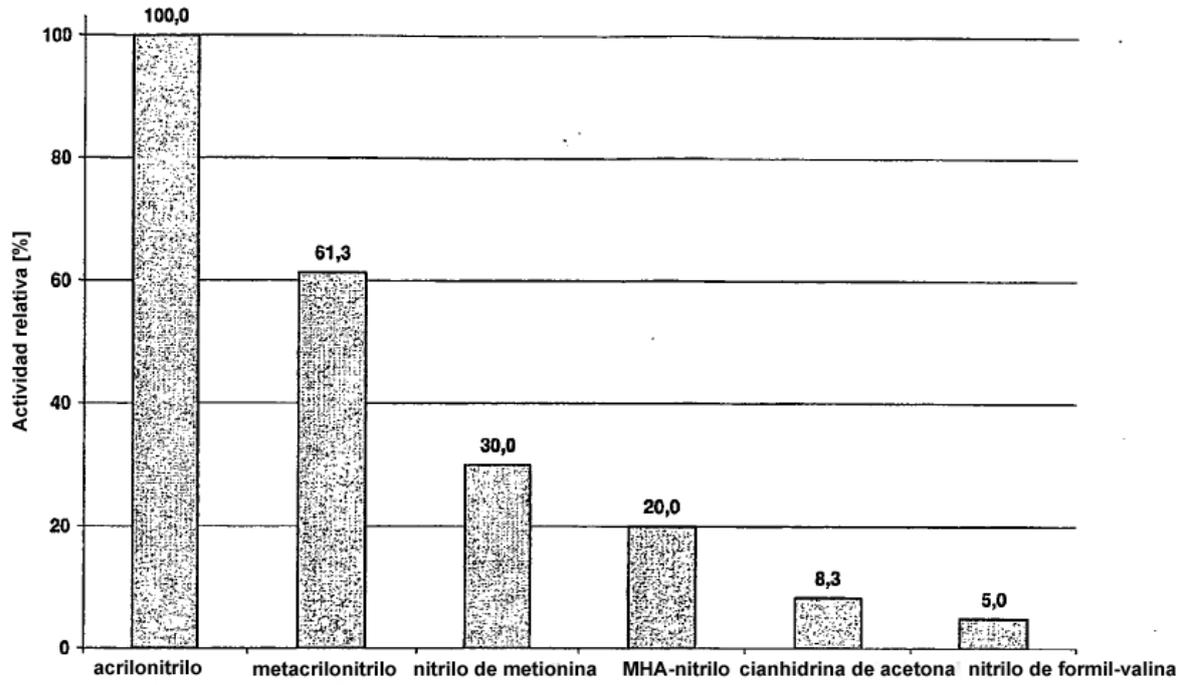


Figura 3

MA31

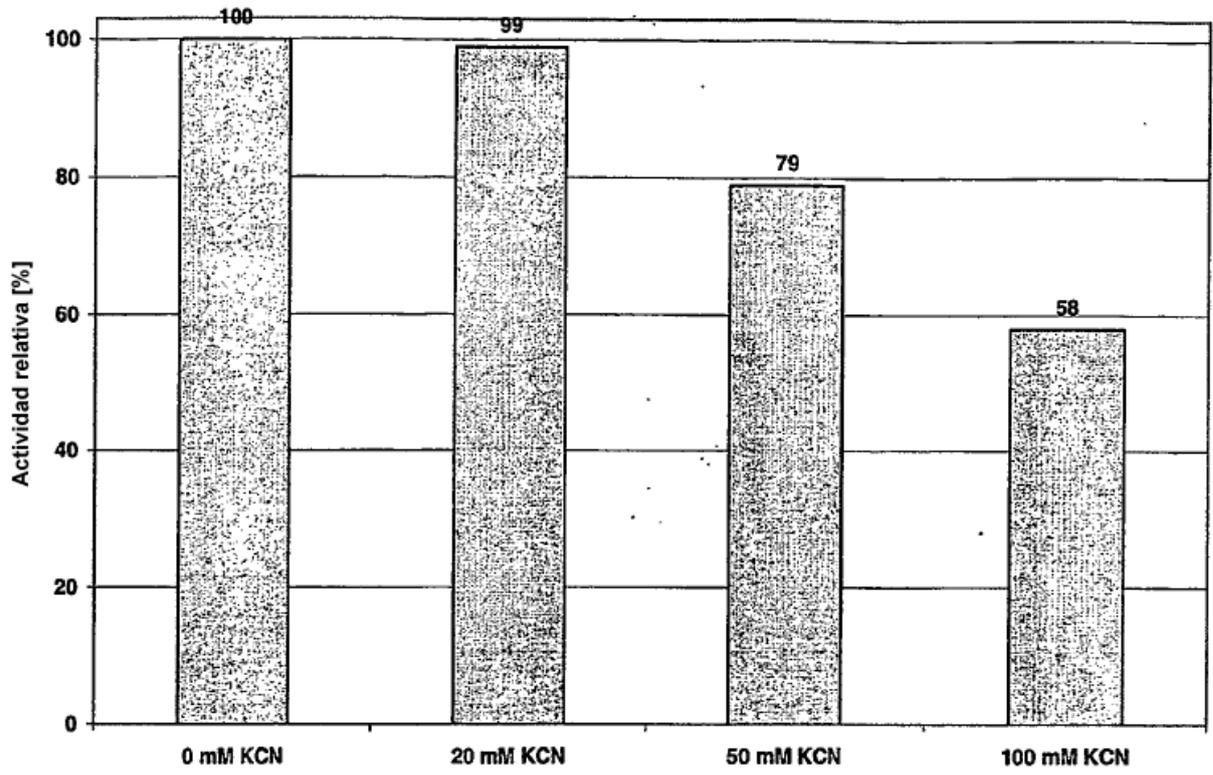


Figura 4

MA113

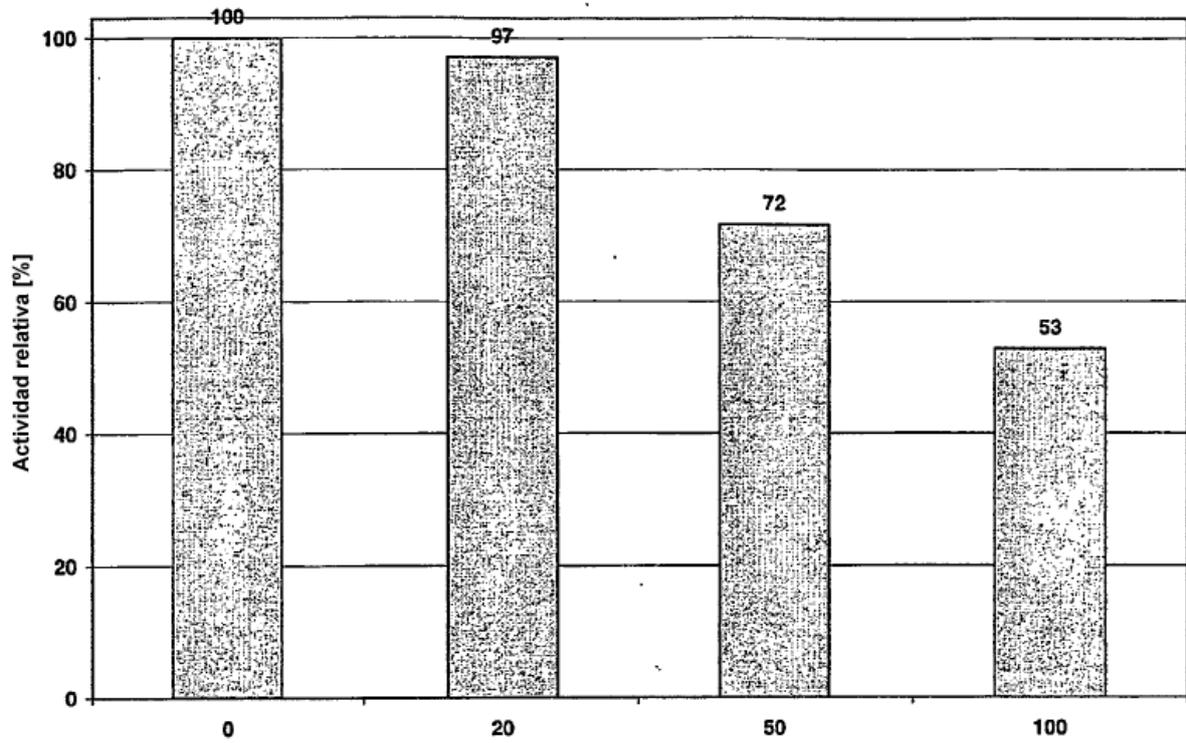


Figura 5

MA113

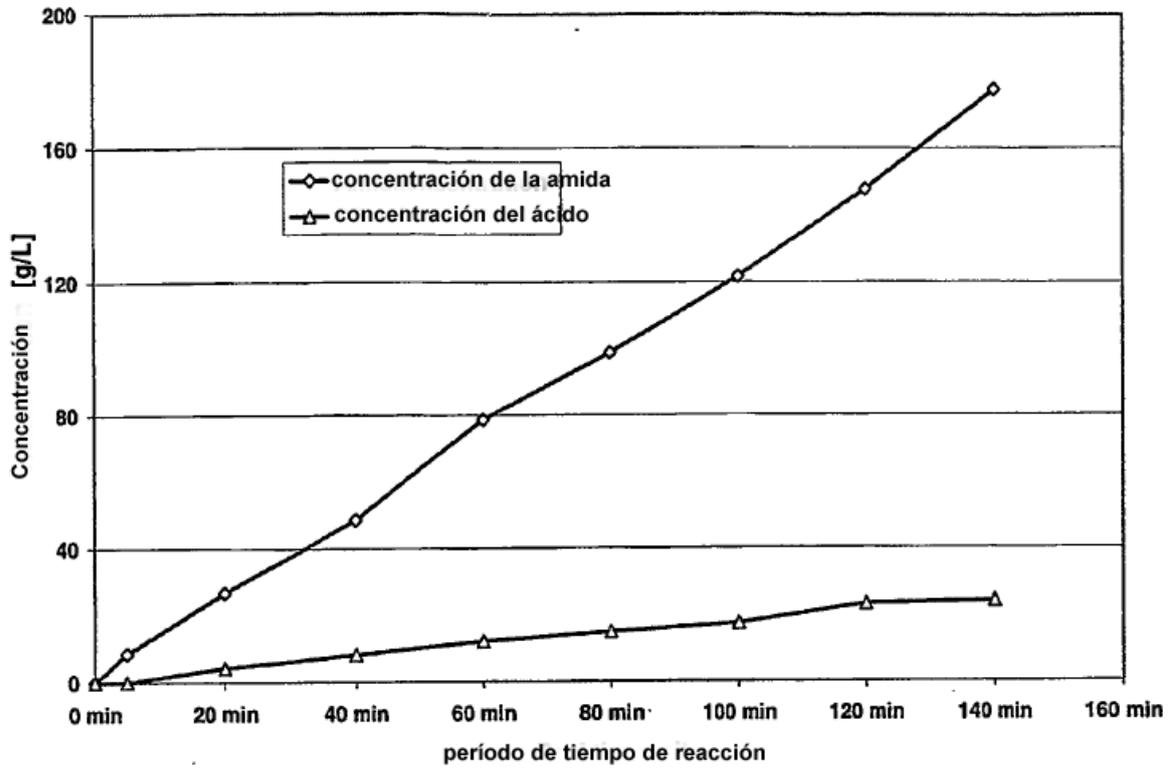


Figura 6

MA32

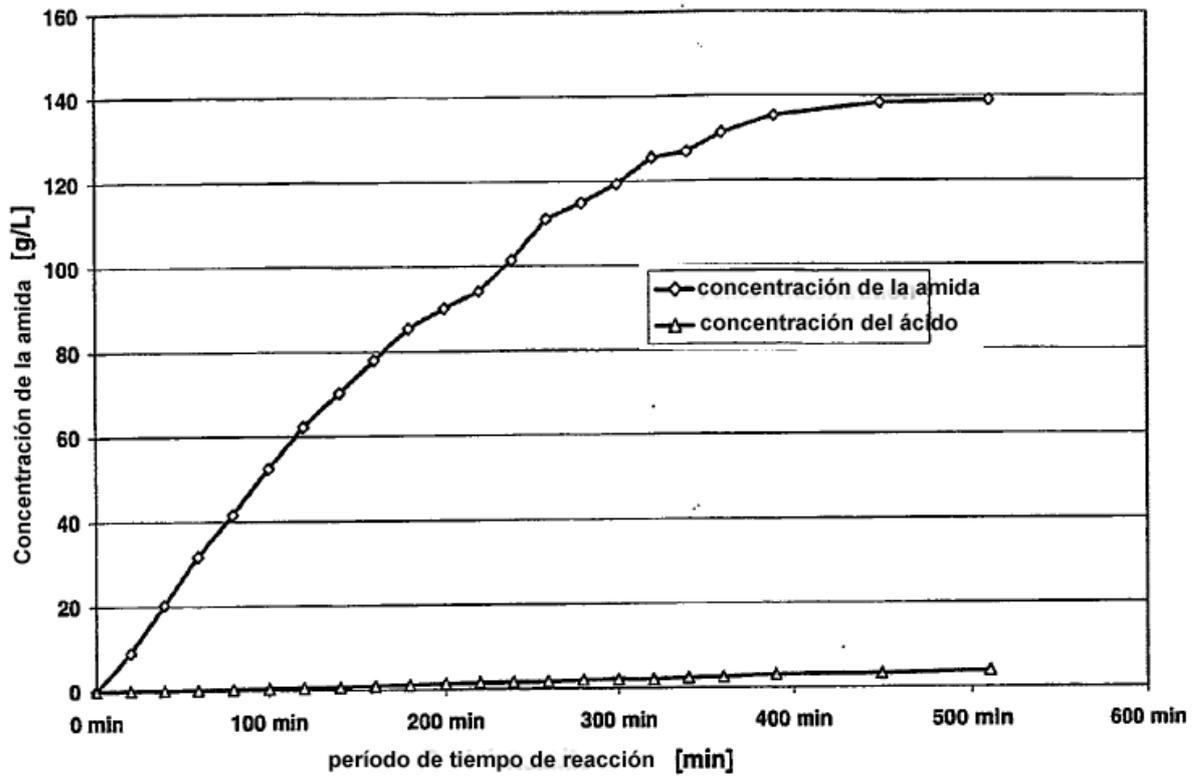


Figura 7

