

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 393 018**

51 Int. Cl.:

A01N 63/00 (2006.01)

A01P 21/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **08732869 .6**

96 Fecha de presentación: **26.03.2008**

97 Número de publicación de la solicitud: **2144508**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **20.01.2010**

54

Título: **Catalizador de base biológica para retardar procesos de desarrollo de plantas**

30

Prioridad:

02.04.2007 US 695377

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:

17.12.2012

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:

17.12.2012

73

Titular/es:

**GEORGIA STATE UNIVERSITY RESEARCH
FOUNDATION, INC. (100.0%)
P.O. BOX 3999
ATLANTA, GA 30302-3999, US**

72

Inventor/es:

**PIERCE, GEORGE E.;
GANGULY, SANGEETA y
DRAGO, GENE K.**

74

Agente/Representante:

DURÁN MOYA, Luis Alfonso

ES 2 393 018 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

Catalizador de base biológica para retardar procesos de desarrollo de plantas

5 SECTOR DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a métodos para retardar el desarrollo de una planta que comprende exponer a una planta o parte de una planta a una o más bacterias o enzimas. Se dan a conocer, además, aparatos para retardar un proceso de desarrollo de una planta.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La producción de etileno en plantas y partes de una planta es inducida por diversos factores y estresantes externos, incluyendo la realización de incisiones, la aplicación de hormonas (por ejemplo, auxina), condiciones anaeróbicas, refrigeración, calor, sequía, e infección por patógenos. También se observa una mayor producción de etileno durante diversos procesos de desarrollo de una planta, incluyendo maduración de frutas o verduras, germinación de semillas, abscisión de hojas y senescencia floral.

15

La biosíntesis de etileno en plantas se representa habitualmente como una combinación enzimática que implica tres enzimas, tradicionalmente denominada como el "Ciclo de Yang", en el que la S-adenosil-L-metionina (SAM) sintasa cataliza la conversión de metionina en S-adenosil-L-metionina (AdoMet); el ácido 1-aminociclopropan-1-carboxílico (ACC) sintasa cataliza la conversión de AdoMet en ACC; y la ACC oxidasa cataliza la conversión de ACC en etileno y los subproductos dióxido de carbono y cianuro de hidrógeno, véase, por ejemplo, el documento Srivastava (2001) Plant Growth and Development: Hormones and Environment [Crecimiento y desarrollo de una planta: hormonas y medio ambiente] (Academic Press, Nueva York) para una descripción general de la biosíntesis de etileno en plantas y procesos de desarrollo de una planta regulados por etileno.

20

25

Investigaciones anteriores han establecido que en frutas climatéricas se desencadena maduración, como mínimo en parte, mediante un súbito y significativo aumento de la biosíntesis de etileno. Aunque un súbito incremento de producción de etileno está implicado en el proceso de maduración de frutas de frutas climatéricas, el mecanismo exacto, particularmente en frutas no climatéricas, no se entiende completamente. Aunque no hay ningún incremento súbito de la producción de etileno en una fruta no climatérica, la fruta no climatérica responderá al etileno. Además, frutas, verduras y otros productos vegetales varían en la cantidad de etileno sintetizado y también en la sensibilidad del producto particular al etileno. Por ejemplo, las manzanas exhiben un alto nivel de producción de etileno y sensibilidad al etileno, mientras que las alcachofas muestran un nivel bajo de biosíntesis de etileno y sensibilidad al etileno. Véase, por ejemplo, el documento Cantwell (2001) "Properties and Recommended Conditions for Storage of Fresh Fruits and Vegetables" [Propiedades y condiciones recomendadas para el almacenamiento de frutas y verduras frescas] en postharvest.ucdavis.edu/Produce/Storage/index.shtml (última visita el 6 de marzo de 2007), que se incorpora en el presente documento como referencia en su totalidad. La maduración de frutas habitualmente da como resultado un cambio de color, ablandamiento del pericarpio y cambios del contenido de azúcar y del sabor de la fruta. Aunque la maduración inicialmente hace a la fruta más comestible y atractiva para comerla, el proceso conduce finalmente a la degradación y el deterioro de la calidad de la fruta, haciéndola inaceptable para el consumo, conduciendo a pérdidas monetarias comerciales significativas. El control del proceso de maduración es deseable para mejorar el periodo de conservación y prolongar el tiempo disponible para el transporte, almacenamiento y venta de la fruta y otros productos agrícolas sujetos a maduración.

30

35

40

45

Además de un súbito aumento de la biosíntesis de etileno en frutas climatéricas, los cambios relacionados con la maduración también están asociados con un aumento de la tasa de respiración. Se produce calor como consecuencia de la respiración en frutas, verduras y otros productos vegetales y, como consecuencia, afecta al periodo de conservación y las condiciones de almacenamiento requeridas (por ejemplo, refrigeración) para estos productos. Los productos vegetales con tasas de respiración más elevadas (por ejemplo, alcachofas, flores cortadas, espárragos, brócoli, espinacas, etc.) muestran periodos de conservación más cortos que aquellos con tasas de respiración más bajas (por ejemplo, nueces, dátiles, manzanas, frutas cítricas, uvas, etc.). La respiración resulta afectada por una serie de factores medioambientales incluyendo temperatura, composición atmosférica, estrés físico, luz, estrés químico, radiación, estrés hídrico, reguladores del crecimiento y ataque de patógenos. En particular, la temperatura desempeña un papel significativo en la tasa de respiración. Para una descripción general del metabolismo respiratorio y las condiciones atmosféricas controladas recomendadas para frutas, verduras y otros productos vegetales véase, por ejemplo, los documentos Kader (2001) Postharvest Horticulture Series No. 22A: 29-70 (Universidad de California - Davis); Saltveit (Universidad de California - Davis) "Respiratory Metabolism" [Metabolismo respiratorio] en usna.usda.gov/hb66/019respiration.pdf (última vista el 6 de marzo de 2007); y Cantwell (2001) "Properties and Recommended Conditions for Storage of Fresh Fruits and Vegetables" ("Características y condiciones recomendadas para almacenamiento de frutas y verduras frescas") en postharvest.ucdavis.edu/Produce/Storage/index.shtml (última vista el 6 de marzo de 2007), todas las cuales se incorporan en el presente documento como referencia en su totalidad.

50

55

60

65

Los métodos y composiciones para retardar el proceso de maduración de frutas incluyen, por ejemplo, la aplicación de sales de plata (por ejemplo, tiosulfato de plata), 2,5-norbornadieno, permanganato potásico, 1-metilciclopropeno (1-MCP), ciclopropeno (CP) y sus derivados. Estos compuestos tienen desventajas significativas, tales como la presencia de metales pesados, malos olores y propiedades explosivas cuando se comprimen, lo que les hace inaceptables de aplicabilidad limitada para su utilización en la industria alimentaria. Las estrategias transgénicas para controlar la producción de etileno para retardar procesos de desarrollo de una planta (por ejemplo, maduración de frutas) introduciendo secuencias de ácido nucleico que limiten la producción de etileno, particularmente reduciendo la expresión de las enzimas ACC sintasa o ACC oxidasa, también están siendo investigadas. La respuesta del público a productos agrícolas modificados genéticamente, sin embargo, no ha sido totalmente favorable.

Por consiguiente, sigue habiendo una necesidad significativa en la técnica de métodos y aparatos seguros para retardar procesos de desarrollo de una planta. Dichos métodos y aparatos podrían proporcionar un mejor control de la maduración de frutas, la maduración de verduras, la senescencia floral, la abscisión de hojas y la germinación de semillas y prolongar el periodo de conservación de diversos productos agrícolas (por ejemplo, frutas, verduras y flores cortadas), permitiendo de este modo el transporte a mayor distancia de estos productos sin necesidad de refrigeración, aumentando el atractivo del producto para los consumidores, y reduciendo los costes monetarios asociados con la pérdida de productos debida a maduración y senescencia inoportunas.

20 CARACTERÍSTICAS DE LA INVENCION

Se dan a conocer métodos para retardar un proceso de desarrollo de una planta, incluyendo aunque sin limitación maduración de frutas, maduración de verduras, senescencia floral y abscisión de hojas. Los métodos de la presente invención generalmente comprenden exponer a una planta o parte de una planta a una o más bacterias en una cantidad suficiente para retardar el proceso de desarrollo de una planta de interés. En algunos aspectos de la presente invención, las bacterias se seleccionan entre el grupo que comprende *Rhodococcus spp.*, *Pseudomonas chloroaphis*, *Brevibacterium ketoglutamicum*, y sus mezclas. Las bacterias utilizadas en la puesta en práctica de los presentes métodos pueden ser tratadas, además, con un agente inductor, que incluye por ejemplo asparagina, glutamina, cobalto, urea, y sus mezclas, para inducir la capacidad de las bacterias de retardar un proceso de desarrollo de una planta de interés.

La presente invención da a conocer, además, aparatos para retardar un proceso de desarrollo de una planta que comprende un catalizador que comprende una o más de bacterias, particularmente *Rhodococcus spp.*, *Pseudomonas chloroaphis*, *Brevibacterium ketoglutamicum*, o una mezcla de las mismas. Cualquier aparato que permita la exposición de una planta o parte de una planta al catalizador y retarde el proceso de desarrollo de una planta de interés queda comprendido en la presente invención. Los aparatos, a título de ejemplo, incluyen aquellos en los que el catalizador está inmovilizado en una matriz y se colocan encima, sobre, o se fijan de otra manera a cualquier estructura física. Diversas configuraciones de los aparatos dados a conocer están previstas y se describen con más detalle más adelante en el presente documento. Los métodos y aparatos de la presente invención para retardar un proceso de desarrollo de una planta son particularmente útiles para aumentar el periodo de conservación y facilitar el transporte a mayor distancia de productos vegetales tales como frutas, verduras y flores, mejorando la satisfacción del consumidor con el producto y reduciendo las pérdidas de productos que resultan de maduración o senescencia inoportunas.

45 BREVE DESCRIPCION DE LOS DIBUJOS

Habiendo descrito de este modo la presente invención en términos generales, a continuación se hará referencia a los dibujos adjuntos, que no están necesariamente dibujados a escala, y en los que:

50 La figura 1 muestra una representación no limitativa de un aparato de tres capas para retardar la maduración de frutas. Las capas externas (denominadas A y B) proporcionan integridad estructural al aparato. La capa de catalizador, tal como se define a continuación en el presente documento, comprende una o más de las enzimas de la presente invención y está situada entre las capas externas.

55 La figura 2A-C proporciona representaciones no limitativas de diversos aparatos para retardar la maduración de frutas: Estos aparatos comprenden una capa de catalizador, una o más capas que proporcionarán integridad estructural, y una o más capas que serán retiradas antes de la utilización del aparato. La retirada de una o más de estas capas puede, por ejemplo, dejar expuesto un adhesivo para la fijación del aparato a otra estructura física.

60 Las figuras 3A-3B muestran una representación no limitativa de un aparato para retardar la maduración de frutas. El aparato comprende un catalizador inmovilizado sobre una capa de película y fijado a una estructura física (por ejemplo, una caja adecuada para almacenamiento/transporte de frutas).

65 La figura 4 proporciona una representación no limitativa de un aparato para retardar la maduración de frutas. El aparato comprende una estructura de cámara ranurada que permite la inserción y sustitución de uno o más

elementos modulares de catalizador, tal como se definen más adelante. Las capas externas de la estructura física pueden estar compuestas por un material que permite que el aire fluya al interior del catalizador.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

5 La presente invención se describirá a continuación de forma más completa en el presente documento en referencia a realizaciones específicas de la presente invención y, particularmente, a los diversos dibujos que se dan a conocer con el presente documento. De hecho, la presente invención puede realizarse de muchas formas diferentes y no deben considerarse limitada a las realizaciones descritas en el presente documento; en su lugar, estas realizaciones se dan a conocer para que esta descripción cumpla los requisitos legales aplicables. Tal como se utiliza en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular “un”, “uno/a”, “el/la”, incluyen referencias en plural, a no ser que el contexto indique claramente lo contrario.

15 En toda la memoria descriptiva, se entenderá que la expresión “que comprende”, o variaciones gramaticales de la misma, implica la inclusión de un elemento, número entero o etapa, o grupo de elementos, números enteros o etapas indicadas, pero no la exclusión de ningún otro elemento, número entero o etapa, o grupo de elementos, números enteros o etapas.

20 La presente invención da a conocer métodos para retardar un proceso de desarrollo de una planta de interés que comprende exponer a una planta o parte de una planta a una o más bacterias. En realizaciones particulares, los métodos se proporcionan para retardar un proceso de desarrollo de una planta que comprende exponer a una planta o parte de una planta a una o más bacterias seleccionadas entre el grupo que comprende *Rhodococcus spp.*, *Pseudomonas chloroaphis*, *Brevibacterium ketoglutamicum*, y sus mezclas, en el que las una o más bacterias se exponen a la planta o parte de la planta en una cantidad suficiente para retardar el proceso de desarrollo de una planta. Se dan a conocer, además, aparatos para retardar un proceso de desarrollo de una planta de interés y para poner en práctica los métodos descritos en el presente documento. Los métodos de la invención y los aparatos de la presente invención pueden utilizarse, por ejemplo, para retardar la maduración de frutas/verduras o la senescencia floral y para aumentar el periodo de conservación de frutas, verduras o flores, facilitando de este modo el transporte, la distribución y la comercialización de dichos productos vegetales.

30 Tal como se utilizan en el presente documento, “planta” o “parte de una planta” se define de forma amplia para incluir plantas intactas y cualquier parte de una planta, incluyendo aunque sin limitación frutas, verduras, flores, semillas, hojas, nueces, embriones, polen, óvulos, ramas, granos, espigas, mazorcas, cáscaras, tallos, raíces, ápices radiculares, anteras, y similares. En realizaciones particulares, la parte de la planta es una fruta, verdura o flor. En algunos aspectos de la presente invención, la parte de la planta es una fruta, más particularmente una fruta climatérica, tal como se describe con más detalle más adelante.

40 Los métodos y aparatos de la presente invención pretenden retardar un proceso de desarrollo de una planta, tal como un proceso de desarrollo de una planta asociado generalmente con una mayor biosíntesis de etileno. “Proceso de desarrollo de una planta” pretende significar cualquier proceso de crecimiento o desarrollo de una planta o parte de una planta, incluyendo aunque sin limitación maduración de frutas, maduración de verduras, senescencia floral, abscisión de hojas, germinación de semillas y similares. En realizaciones particulares, el proceso de desarrollo de una planta de interés es maduración de frutas o verduras, senescencia floral o abscisión de hojas, más particularmente maduración de frutas o verduras. Tal como se define en el presente documento, “retardar un proceso de desarrollo de una planta”, y variantes gramaticales del mismo, se refiere a cualquier ralentización, interrupción, supresión o inhibición del proceso de desarrollo de una planta de interés o los cambios fenotípicos o genotípicos de la planta o parte de la planta habitualmente asociados con el proceso de desarrollo de una planta específico. Por ejemplo, cuando el proceso de desarrollo de una planta de interés es la maduración de frutas, un retardo de la maduración de frutas puede incluir inhibición de los cambios asociados generalmente con el proceso de maduración (por ejemplo, cambio de color, ablandamiento del pericarpio (es decir, pared del ovario), aumentos del contenido de azúcar, cambios de sabor, degradación/deterioro general de la fruta, y eventuales reducciones del atractivo de la fruta para los consumidores, tal como se ha descrito anteriormente). Un experto en la materia apreciará que la cantidad de tiempo requerida para que se produzca la maduración de frutas variará dependiendo, por ejemplo, del tipo de fruta y las condiciones de almacenamiento específicas utilizadas (por ejemplo, temperatura, humedad, flujo de aire, etc.). Por consiguiente, “retardar la maduración de frutas” puede constituir un retardo de 1 a 90 días, particularmente de 1 a 30 días, más particularmente de 5 a 30 días. Los métodos para evaluar un retardo en un proceso de desarrollo de una planta tal como maduración de frutas, maduración de verduras, senescencia floral y abscisión de hojas están perfectamente dentro de las capacidades rutinarias de los expertos en la materia y pueden basarse, por ejemplo, en la comparación con procesos de desarrollo en plantas o partes de plantas no tratadas. En algunos aspectos de la presente invención, los retardos en un proceso de desarrollo de una planta que resultan de la puesta en práctica de los presentes métodos pueden evaluarse con respecto a plantas o partes de plantas no tratadas o a plantas o partes de plantas que han sido tratadas con uno o más agentes que se sabe que retardan el proceso de desarrollo de una planta de interés. Por ejemplo, un retardo de la maduración de frutas resultante de la realización de un método de la presente invención puede compararse con los tiempos de maduración de frutas de una fruta no tratada o una fruta que ha sido tratada con un agente anti-maduración, tal como aquellos que se han descrito anteriormente en el presente documento.

Los métodos de la presente invención para retardar un proceso de desarrollo de una planta habitualmente comprenden exponer a una planta o parte de una planta a una o más de las siguientes bacterias: *Rhodococcus spp.*, *Pseudomonas chloroaphis*, *Brevibacterium ketoglutamicum*, o una mezcla que contiene cualquier combinación de estas bacterias. En algunas realizaciones, la una o más bacterias incluyen *Rhodococcus spp.*, más particularmente la cepa de *Rhodococcus rhodochrous* DAP 96253, la cepa de *Rhodococcus sp.* DAP 96622, *Rhodococcus erythropolis*, o sus mezclas. Tal como se utiliza en el presente documento, exponer a una planta o parte de una planta a una o más de las anteriores bacterias incluye, por ejemplo, exposición a células bacterianas intactas, lisados de células bacterianas, y extractos bacterianos que poseen actividad enzimática (es decir, “extractos enzimáticos”). Los métodos para preparar lisados y extractos enzimáticos a partir de células, incluyendo células bacterianas, son rutinarios en la técnica. La una o más bacterias utilizadas en los métodos y aparatos de la presente invención puede denominarse, a veces, de forma más general como el “catalizador”.

Según los métodos de la presente invención, la una o más bacterias se exponen a la planta o parte de la planta en una cantidad suficiente para retardar el proceso de desarrollo de una planta. “Exponer” una planta o parte de una planta a una o más de las bacterias de la presente invención incluye cualquier método para presentar una bacteria a la planta o parte de la planta. Métodos indirectos de exposición incluyen, por ejemplo, colocar a la bacteria o mezcla de bacterias en la proximidad general de la planta o parte de la planta (es decir, exposición indirecta). En otras realizaciones, las bacterias pueden exponerse a la planta o parte de la planta mediante un contacto más cercano o directo. Además, tal como se define en el presente documento, una cantidad “suficiente” de la una o más bacterias de la presente invención dependerá de diversos factores, incluyendo aunque sin limitación, las bacterias particulares utilizadas en el método, la forma en las que las bacterias se exponen a la planta o parte de la planta (por ejemplo, como células bacterianas intactas, lisados celulares o extractos enzimáticos, tal como se ha descrito anteriormente), el medio mediante el cual las bacterias se exponen a la planta o parte de la planta y la cantidad de tiempo de exposición. Sería un asunto de experimentación rutinaria para el experto en la materia determinar la cantidad “suficiente” de las una o más bacterias necesarias para retardar el proceso de desarrollo de una planta de interés.

Aunque en realizaciones particulares de la presente invención las una o más bacterias se seleccionan entre el grupo que comprende *Rhodococcus spp.*, *Pseudomonas chloroaphis*, *Brevibacterium ketoglutamicum*, puede utilizarse cualquier bacteria que retarde un proceso de desarrollo de una planta cuando se expone a una planta o parte de una planta en los presentes métodos y aparatos. Por ejemplo, bacterias pertenecientes al género *Nocardia* [véase la solicitud de patente japonesa No. 54-129190], *Rhodococcus* [véase la solicitud de patente japonesa No. 2-470], *Rhizobium* [véase la solicitud de patente japonesa No. 5-236977], *Klebsiella* [solicitud de patente japonesa No. 5-30982], *Aeromonas* [solicitud de patente japonesa No. 5-30983], *Agrobacterium* [solicitud de patente japonesa No. 8-154691], *Bacillus* [solicitud de patente japonesa No. 8-187092], *Pseudonocardia* [solicitud de patente japonesa No. 8-56684], *Pseudomonas* y *Mycobacterium* son ejemplos no limitativos de microorganismos que pueden utilizarse según la presente invención. No todas las especies en un género determinado pueden mostrar las mismas propiedades. Por lo tanto, es posible tener un género que se sabe en general que incluye cepas capaces de mostrar una actividad deseada (por ejemplo, la capacidad de retardar un proceso de desarrollo de una planta particular tal como, por ejemplo, maduración de frutas) pero que tiene una o más especies que no muestran en general la actividad deseada. A la luz de la descripción que se da a conocer en el presente documento y el conocimiento general en la técnica, sin embargo, sería un asunto de experimentación rutinaria para el experto en la materia llevar a cabo un ensayo para determinar si una especie particular poseía una o más de las actividades deseadas.

Además, ejemplos específicos de bacterias útiles según la presente invención incluyen, aunque sin limitación, *Nocardia sp.*, *Rhodococcus sp.*, *Rhodococcus rhodochrous*, *Klebsiella sp.*, *Aeromonas sp.*, *Citrobacter freundii*, *Agrobacterium rhizogenes*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Xanthobacter flavas*, *Erwinia nigrifluens*, *Enterobacter sp.*, *Streptomyces sp.*, *Rhizobium sp.*, *Rhizobium loti*, *Rhizobium leguminosarum*, *Rhizobium merioti*, *Candida guilliermondii*, *Pantoea agglomerans*, *Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae*, *Agrobacterium radiobacter*, *Bacillus smithii*, *Pseudonocardia thermophila*, *Pseudomonas chloroaphis*, *Pseudomonas erythropolis*, *Brevibacterium ketoglutamicum*, *Rhodococcus erythropolis*, *Nocardia farcinica*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Heliobacter pylori*. En realizaciones particulares, bacterias del género *Rhodococcus*, más específicamente la cepa de *Rhodococcus rhodochrous* DAP 96253 (No. de depósito en la ATCC 55899; depositada en la ATCC el 11 de diciembre de 1996), la cepa de *Rhodococcus sp.* DAP 96622 (No. de depósito en la ATCC 55898; depositada en la ATCC el 11 de diciembre de 1996), *Rhodococcus erythropolis*, o sus mezclas, se utilizan en los métodos y aparatos de la presente invención.

En algunos aspectos de la presente invención, la una o más bacterias son “inducidas” a mostrar una característica deseada (por ejemplo, la capacidad de retardar un proceso de desarrollo de una planta tal como maduración de frutas) mediante exposición a o tratamiento con un agente inductor adecuado. Los agentes inductores incluyen, aunque sin limitación, asparagina, glutamina, cobalto, urea, o cualquiera de sus mezclas. En realizaciones particulares, las bacterias se exponen a o se tratan con el agente inductor asparagina, más particularmente una mezcla de los agentes inductores que comprende asparagina, cobalto y urea. El agente inductor puede añadirse en cualquier momento durante el cultivo de las células deseadas. Por ejemplo, con respecto a bacterias, el medio de cultivo puede suplementarse con un agente inductor antes de comenzar el cultivo de las bacterias. Como alternativa, las bacterias podrían cultivarse en un medio durante una cantidad de tiempo predeterminada para cultivar las

bacterias y el agente inductor podría añadirse en uno o más momentos predeterminados para inducir la actividad enzimática deseada en las bacterias. Además, el agente inductor podría añadirse al medio de cultivo (o a una mezcla diferente que incluya las bacterias cultivadas previamente) para inducir la actividad deseada en las bacterias después de que el cultivo de las bacterias se haya completado.

Aunque sin pretender limitarse a un mecanismo particular, "inducir" a las bacterias de la presente invención puede dar como resultado la producción (o producción aumentada) de una o más enzimas, tales como una nitrilo hidratasa, amidasa, y/o asparaginasa, y la inducción de una o más de estas enzimas puede desempeñar un papel en el retardo de un proceso de desarrollo de una planta de interés. "Nitrilo hidratasa", "amidasa" y "asparaginasa" comprenden familias de enzimas presentes en células de diversos organismos, incluyendo aunque sin limitación, bacterias, hongos, plantas y animales. Dichas enzimas son bien conocidas por expertos en la materia, y cada clase de enzima posee actividades enzimáticas reconocidas. "Actividad enzimática", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere en general a la capacidad de una enzima para actuar como catalizador en un proceso, tal como la conversión de un compuesto en otro compuesto. En particular, la nitrilo hidratasa cataliza la hidrólisis de nitrilo (o cianohidrina) en la amida correspondiente (o hidroxiaácido). La amidasa cataliza la hidrólisis de una amida al ácido o hidroxiaácido correspondiente. Análogamente, una enzima asparaginasa, tal como asparaginasa I, cataliza la hidrólisis de asparagina a ácido aspártico.

En algunos aspectos de la presente invención, la actividad enzimática puede mencionarse en términos de "unidades" por masa de enzimas o células (habitualmente en base al peso seco de las células, por ejemplo, unidades/mg de psc). Una "unidad" generalmente se refiere a la capacidad de convertir una cantidad específica de un compuesto en un compuesto diferente en una serie definida de condiciones en función del tiempo. En realizaciones específicas, una "unidad" de actividad nitrilo hidratasa puede referirse a la capacidad de convertir un μmol de acrilonitrilo en su amida correspondiente por minuto, por miligramo de células (peso seco) a un pH de 7,0 y una temperatura de 30°C. Análogamente, una unidad de actividad amidasa puede referirse a la capacidad para convertir un μmol de acrilamida en su ácido correspondiente por minuto, por miligramo de células (peso seco) a un pH de 7,0 y una temperatura de 30°C. Además, una unidad de actividad asparaginasa puede referirse a la capacidad de convertir un μmol de asparagina en su ácido correspondiente por minuto, por miligramo de células (peso seco) a un pH de 7,0 y una temperatura de 30°C. Los ensayos para medir la actividad nitrilo hidratasa, amidasa o actividad asparaginasa se conocen en la técnica e incluyen, por ejemplo, la detección de amoniaco libre. Véase el documento Fawcett y Scott (1960) J. Clin. Pathol. 13: 156-159, que se incorpora en el presente documento como referencia en su totalidad.

Están comprendidos además en la presente invención, métodos de retardo de un proceso de desarrollo de una planta que comprenden exponer a una planta o parte de una planta a una o más enzimas seleccionadas entre el grupo que comprende nitrilo hidratasa, amidasa, asparaginasa, o una mezcla de las mismas, en los que la una o más enzimas son expuestas a la planta o parte de la planta en una cantidad o a un nivel de actividad enzimática suficiente para retardar el proceso de desarrollo de una planta. Por ejemplo, células completas que producen, son inducidas a producir, o son modificadas genéticamente para producir una o más de las enzimas anteriores (es decir, nitrilo hidratasa, amidasa y/o asparaginasa) pueden utilizarse en métodos para retardar un proceso de desarrollo de una planta. Como alternativa, la nitrilo hidratasa, amidasa y/o asparaginasa puede aislarse, purificarse o semi-purificarse a partir de cualquiera de las células anteriores y exponerse a la planta o parte de la planta en una forma más aislada. Véase, por ejemplo, los documentos Goda y otros (2001) J. Biol. Chem. 276: 23480-23485; Nagasawa y otros (2000) Eur. J. Biochem. 267: 138-144; Soong y otros (2000) Appl. Environ. Microbiol. 66: 1947-1952; Kato y otros (1999) Eur. J. Biochem. 263: 662-670, todos los cuales se incorporan en el presente documento como referencia en su totalidad. Un experto en la materia apreciará, además, que un único tipo celular puede ser capaz de producir (o ser inducido o modificado genéticamente para producir) más de una de las enzimas de la presente invención. Dichas células son adecuadas para su utilización en los métodos y aparatos que se dan a conocer.

Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos para varias nitrilo hidratasa, amidasa y asparaginasa de diversos organismos se dan a conocer en bases de datos de secuencias disponibles públicamente. Una lista no limitativa de nitrilo hidratasa y amidasa alifáticas representativas conocidas en la técnica se describe en las tablas 1 y 2 y en el listado de secuencia. El "valor proteico" mencionado en las tablas 1 y 2 da a conocer una visión general del porcentaje de intervalos de confianza (% del Intervalo de Confianza) de la identificación de las proteínas aisladas en base a datos de espectroscopía de masas.

Tabla 1: Información de la secuencia de aminoácidos para nitrilo hidratasa representativas

Organismo fuente	Nº de entrada	Identificador de secuencia	Valor proteico (% del intervalo de confianza)
<i>Rhodococcus sp.</i>	806580	SEC ID NO:1	100%
<i>Nocardia sp.</i>	27261874	SEC ID NO:2	100%
<i>Rhodococcus rhodochrous</i>	49058	SEC ID NO:3	100%
Bacteria no cultivada (BD2); subunidad beta de nitrilo hidratasa	27657379	SEC ID NO:4	100%
<i>Rhodococcus sp.</i>	806581	SEC ID NO:5	100%
<i>Rhodococcus rhodochrous</i>	581528	SEC ID NO:6	100%
Bacteria no cultivada (SP1); subunidad alfa de nitrilo hidratasa	7657369	SEC ID NO:7	100%

Tabla 2: Información de la secuencia de aminoácidos para amidasa alifáticas representativas

Organismo fuente	Nº de entrada	Identificador de secuencia	Valor proteico (% del intervalo de confianza)
<i>Rhodococcus rhodochrous</i>	62461692	SEC ID NO:8	100%
<i>Nocardia farcinica</i> IFM 10152	54022723	SEC ID NO:9	100%
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	15598562	SEC ID NO:10	98,3%
<i>Helicobacter pylori</i> J99	15611349	SEC ID NO:11	99,6%
<i>Helicobacter pylori</i> 26695	2313392	SEC ID NO:12	97,7%
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	150980	SEC ID NO:13	94%

5 Generalmente, cualquier célula bacteriana, fúngica, vegetal o animal capaz de producir o ser inducida a producir nitrilo hidratasa, amidasa, asparaginasa, o cualquier combinación de las mismas puede utilizarse en la puesta en práctica de la presente invención. Una nitrilo hidratasa, amidasa y/o asparaginasa puede producirse de forma constitutiva en una célula de un organismo particular (por ejemplo, una bacteria, hongo, célula vegetal o célula animal) o, como alternativa, una célula puede producir la enzima o enzimas deseadas, solamente después de la "inducción" con un agente inductor adecuado. "De forma constitutiva" pretende significar que, como mínimo, una enzima de la presente invención es producida o expresada de forma continua en un tipo celular particular. Otros tipos celulares, sin embargo, pueden necesitar ser "inducidos", tal como se ha descrito anteriormente, para expresar nitrilo hidratasa, amidasa y/o asparaginasa en una cantidad suficiente o nivel de actividad enzimática para retardar un proceso de desarrollo de una planta de interés. Es decir, una enzima de la presente invención puede producirse solamente (o producirse a niveles suficientes) después de la exposición a o tratamiento con un agente inductor adecuado. Dichos agentes inductores se conocen en la técnica y se han resumido anteriormente. Por ejemplo, en algunos aspectos de la presente invención, la una o más bacterias son tratadas con un agente inductor tal como asparagina, glutamina, cobalto, urea, o cualquiera de sus mezclas, más particularmente una mezcla de asparagina, cobalto y urea. Además, tal como se da a conocer en la solicitud estadounidense pendiente de tramitación No. 11/669.011, titulada "Induction and Stabilization of Enzymatic Activity in Microorganisms", [Inducción y estabilización de actividad enzimática en microorganismos] presentada el 30 de enero 2007, la actividad asparaginasa I puede inducirse en *Rhodococcus rhodochrous* DAP 96622 (Gram positiva) o *Rhodococcus sp.* DAP 96253 (Gram positiva), en medio suplementado con aminoácidos que contienen amida, o sus derivados. Otras cepas de *Rhodococcus* también pueden ser preferentemente inducidas de forma similar para mostrar actividad enzimática asparaginasa I utilizando aminoácidos que contienen amida, o sus derivados.

En otros aspectos de la presente invención, *P. chloroaphis* (No. de depósito en la ATCC 43051), que produce actividad asparaginasa I en presencia de asparagina, y *B. kletoglutamicum* (No. de depósito en la ATCC 21533), una bacteria Gram positiva que también ha demostrado producir actividad asparaginasa, se utilizan en los métodos dados a conocer. Células fúngicas, tales como aquellas del género *Fusarium*, células vegetales y células animales, que expresan una nitrilo hidratasa, amidasa y/o una asparaginasa, también pueden utilizarse en los métodos y aparatos que se dan a conocer en el presente documento, como células completas o como una fuente a partir de la cual aislar una o más de las enzimas anteriores.

En realizaciones adicionales, células huésped que han sido manipuladas genéticamente para expresar una nitrilo hidratasa, amidasa y/o asparaginasa pueden utilizarse expuestas a una planta o parte de una planta según los presentes métodos y aparatos para retardar un proceso de desarrollo de una planta. Específicamente, un polinucleótido que codifica una nitrilo hidratasa, amidasa o asparaginasa (o múltiples polinucleótidos cada uno de los cuales codifica una nitrilo hidratasa, amidasa o asparaginasa) puede introducirse mediante técnicas de biología molecular estándar en una célula huésped para producir una célula transgénica que expresa una o más de las enzimas de la presente invención. La utilización de las expresiones "polinucleótido", "construcción polinucleotídica", "nucleótido" o "construcción nucleotídica" no pretende limitar la presente invención a polinucleótidos o nucleótidos

que comprenden ADN. Los expertos en la materia reconocerán que los polinucleótidos y nucleótidos pueden comprender ribonucleótidos y combinaciones de ribonucleótidos y desoxirribonucleótidos. Dichos desoxirribonucleótidos y ribonucleótidos incluyen tanto moléculas de origen natural como análogos sintéticos. Los polinucleótidos de la presente invención también abarcan todas las formas de secuencias incluyendo, aunque sin limitación, formas de cadena sencilla, formas de cadena doble y similares.

También pueden utilizarse variantes y fragmentos de polinucleótidos que codifican polipéptidos que conservan la actividad enzimática deseada (es decir, actividad nitrilo hidratasa, amidasa o asparaginasa) en la práctica de la presente invención. Por "fragmento" se entiende una parte del polinucleótido y, por lo tanto, también codifica una parte de la proteína correspondiente. Los polinucleótidos que son fragmentos de una secuencia de nucleótidos de una enzima generalmente comprenden, como mínimo, 10, 15, 20, 50, 75, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 800, 900, 1.000, 1.100, 1.200, 1.300 ó 1.400 nucleótidos contiguos, o hasta el número de nucleótidos presentes en la secuencia de polinucleótidos de una enzima de longitud completa. Un fragmento de polinucleótido codificará un polipéptido con una actividad enzimática deseada y codificará generalmente, como mínimo, 15, 25, 30, 50, 100, 150, 200 ó 250 aminoácidos contiguos o hasta el número total de aminoácidos presentes en la secuencia de aminoácidos de una enzima de longitud completa de la presente invención. "Variante" pretende significar secuencias sustancialmente similares. Generalmente, las variantes de la secuencia de una enzima particular de la presente invención tendrán, como mínimo, aproximadamente el 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más de identidad de secuencia con la secuencia de la enzima de referencia, según lo determinado mediante programas de alineamiento de secuencias estándar. Los polinucleótidos variantes comprendidos en la presente invención codificarán polipéptidos con la actividad enzimática deseada.

Tal como se utiliza en el contexto de la producción de células transgénicas, el término "introducir" pretende significar presentar a una célula huésped, particularmente un microorganismo tal como *Escherichia coli*, con un polinucleótido que codifica una nitrilo hidratasa, amidasa y/o asparaginasa. En algunas realizaciones, el polinucleótido se presentará de tal manera que la secuencia pueda acceder al interior de una célula huésped, incluyendo su inserción potencial en el genoma de la célula huésped. Los métodos de la presente invención no dependen de un método particular para introducir una secuencia en una célula huésped, solamente de que el polinucleótido acceda al interior de, como mínimo, una célula huésped. Los métodos para introducir polinucleótidos en células huésped se conocen bien en la técnica incluyendo, aunque sin limitación, métodos de transfección estable, métodos de transfección transitoria, y métodos mediados por virus. "Transfección estable" pretende significar que la construcción polinucleotídica introducida en una célula huésped se integra en el genoma del huésped y es capaz de ser heredada por la progenie del mismo. "Transfección transitoria" o "expresión transitoria" pretende significar que un polinucleótido se introduce en la célula huésped pero no se integra en el genoma del huésped.

Además, la secuencia de nucleótidos de nitrilo hidratasa, amidasa o asparaginasa puede estar contenida en, por ejemplo, un plásmido para la introducción en la célula huésped. Los plásmidos típicos de interés incluyen vectores que tienen sitios de clonación definidos, orígenes de replicación y marcadores seleccionables. El plásmido puede incluir, además, secuencias de iniciación de transcripción y traducción y terminadores de transcripción y traducción. Los plásmidos también pueden incluir casetes de expresión génica que contienen, como mínimo, una secuencia terminadora independiente, secuencias que permiten la replicación de la casete en eucariotas, o procariotas o ambas, (por ejemplo, vectores transbordadores) y marcadores de selección para sistemas tanto procariotas como eucariotas. Los vectores son adecuados para replicación e integración en procariotas, eucariotas o de forma óptima ambos. Para descripciones generales de sistemas y métodos de clonación, empaquetado y expresión, véase los documentos Giliman y Smith (1979) *Gene* 8: 81-97; Roberts y otros (1987) *Nature* 328: 731-734; Berger y Kimmel (1989) *Guide to Molecular Cloning Techniques, Methods in Enzymology* [Guía para técnicas de clonación molecular, métodos en enzimología] Vol. 152 (Academic Press, Inc., San Diego, California); Sambrook y otros (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* [Clonación molecular: un manual de laboratorio] Vols. 1-3 (2d ed; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, Nueva York); y Ausubel y otros., eds. (1994) *Current Protocols in Molecular Biology, Current Protocols* [Protocolos actuales en biología molecular, protocolos actuales] (Greene Publishing Associates, Inc., y John Wiley & Sons, Inc., Nueva York; 1994 Suplemento). Pueden utilizarse células huésped transgénicas que expresan una o más de las enzimas de la presente invención en los métodos y aparatos dados a conocer como células completas o como una fuente biológica a partir de la cual pueden aislarse una o más enzimas de la presente invención.

Además se dan a conocer los aparatos para retardar un proceso de desarrollo de una planta y para realizar los métodos de la presente invención. En realizaciones particulares, un aparato para retardar un proceso de desarrollo de una planta, particularmente maduración de frutas, que comprende un catalizador que comprende una o más bacterias seleccionadas entre el grupo que comprende *Rhodococcus spp.*, *Pseudomonas chloroaphis*, *Brevibacterium ketoglutamicum*, y sus mezclas es abarcado por la presente invención. La cepa de *Rhodococcus rhodochromus* DAP 96253, la cepa de *Rhodococcus sp.* DAP 96622, *Rhodococcus erythropolis*, o sus mezclas pueden utilizarse en algunos aspectos de la presente invención. La una o más bacterias de un aparato de la presente invención se proporcionan en una cantidad suficiente para retardar un proceso de desarrollo de una planta de interés, tal como se ha definido en el presente documento anteriormente. En otros aspectos de la presente invención, el catalizador comprende una o más enzimas (es decir, nitrilo hidratasa, amidasa y/o asparaginasa) en

una cantidad o a un nivel de actividad enzimática suficiente para retardar un proceso de desarrollo de una planta. Fuentes de las enzimas deseadas para su utilización como catalizador en los aparatos de la presente invención también se han descrito en detalle anteriormente. Por ejemplo, el catalizador puede utilizarse en forma de células completas que producen (o son inducidas o modificadas genéticamente para producir) una o más de las enzimas de la presente invención o pueden comprender la propia enzima o enzimas en una forma aislada, purificada o semi-purificada.

Los aparatos para retardar un proceso de desarrollo de una planta según la presente invención se pueden suministrar en diversos formatos adecuados y pueden ser apropiados para utilización única o utilizaciones múltiples (por ejemplo, "recargable"). Además, los aparatos de la presente invención serán útiles en entornos tanto domésticos como comerciales. Por ejemplo, dichos aparatos pueden integrarse en refrigeradores domésticos o comerciales, incluyendo en trenes, camiones, etc., para transporte a larga distancia de frutas, verduras o flores, o utilizarse como cabinas autónomas para el almacenamiento o transporte de dichos productos vegetales. Aparatos a título de ejemplos no limitativos de la presente invención se describen más adelante en el presente documento y se representan en las figuras 1-4.

En realizaciones particulares, el catalizador se suministra en un formato inmovilizado. Puede utilizarse cualquier proceso o matriz para inmovilizar el catalizador, siempre que se conserve la capacidad de la una o más bacterias (o enzimas) para retardar un proceso de desarrollo de una planta. Por ejemplo, el catalizador puede inmovilizarse en una matriz que comprende alginato (por ejemplo, alginato cálcico), carragenanos, DEAE-celulosa o poliacrilamida. Otras de dichas matrices se conocen bien en la técnica y pueden estar, además, reticuladas con cualquier agente de reticulación apropiado, incluyendo aunque sin limitación glutaraldehído o polietilenimina, para aumentar la resistencia mecánica de la matriz de catalizador. En un aspecto de la presente invención, el catalizador se inmoviliza en una matriz de DEAE-celulosa reticulada con glutaraldehído. El catalizador, particularmente el catalizador en una forma inmovilizada, puede presentarse además como un "elemento modular de catalizador". Un elemento modular de catalizador comprende un catalizador, tal como un catalizador inmovilizado, dentro de una estructura adicional que, por ejemplo, reduce el contacto potencial con el catalizador, facilita la sustitución del catalizador o permite que el aire fluya por el catalizador.

En una realización, la matriz comprende alginato, o sus sales. El alginato es un copolímero lineal con bloques homopoliméricos de β -D-manuronato (M) enlazado en (1-4) y sus residuos de epímero de C-5 α -L-guluronato (G), respectivamente, enlazados juntos covalentemente en diferentes secuencias o bloques. Los monómeros pueden aparecer en bloques homopoliméricos de residuos G consecutivos (bloques G), residuos M consecutivos (bloques M), residuos M y G alternos (bloques MG), o bloques organizados aleatoriamente. En una realización, se utiliza alginato cálcico como sustrato, más particularmente alginato cálcico que ha sido reticulado, tal como con polietilenimina, para formar un sustrato de alginato cálcico endurecido. Una descripción adicional de dichas técnicas de inmovilización pueden encontrarse en el documento Bucke (1987) "Cell Immobilization in Calcium Alginate" [Inmovilización de células en alginato cálcico] en *Methods in Enzymology*, Vol. 135(B) (Academic Press, Inc., San Diego, California; Mosbach, ed.), que se incorpora en el presente documento como referencia. Un método de inmovilización, a título de ejemplo, utilizando alginato cálcico reticulado con polietilenimina también se describe más adelante en el ejemplo 5. En otra realización, la matriz comprende un polímero que contiene amida. Cualquier polímero que comprende uno o más grupos amida podría utilizarse según la presente invención. En una realización, el sustrato comprende un polímero de poliacrilamida.

Puede conseguirse resistencia mecánica aumentada de una matriz de catalizador inmovilizado mediante reticulación. Por ejemplo, las células pueden reticularse químicamente para formar aglutinaciones de células. En una realización, las células recogidas son reticuladas utilizando glutaraldehído. Por ejemplo, las células pueden suspenderse en una mezcla de agua desionizada y glutaraldehído seguido por adición de polietilenimina hasta que se alcanza la floculación máxima. Las células reticuladas (habitualmente en forma de partículas formadas por una serie de células) pueden recogerse mediante una simple filtración. Una descripción adicional de dichas técnicas se da a conocer en el documento Lopez-Gallego y otros. (2005) *J. Biotechnol.* 119: 70-75, que se incorpora por el presente como referencia en su totalidad. Un protocolo general para la inmovilización de células, particularmente células de *Rhodococcus spp.*, en DEAE-celulosa reticulada con glutaraldehído también se resume más adelante en el ejemplo 4.

En algunos aspectos de la presente invención, el catalizador inmovilizado o uno o más elementos modulares de catalizador se colocan en, se colocan sobre o se fijan a una "estructura física". La estructura física incluye, aunque sin limitación, una película, lámina, capa de recubrimiento, caja, bolsita, bolsa o cámara ranurada capaz de contener uno o más elementos modulares de catalizador. En algunas realizaciones, la estructura física comprende un recipiente adecuado para el transporte o almacenamiento de frutas, verduras o flores. La estructura física puede comprender, además, más de una estructura individual, con lo cual todas las estructuras individuales están conectadas a un catalizador o elemento modular de catalizador central. Una estructura física descrita en el presente documento anteriormente opcionalmente puede estar refrigerada mediante medios externos o comprender una unidad de refrigeración dentro de la propia estructura física.

Elementos para monitorizar la eficacia del catalizador para retardar un proceso de desarrollo de una planta de interés (por ejemplo, para evaluar cuándo debe ser sustituido el catalizador o módulo de catalizador) o para medir o controlar el flujo de aire, el contenido de humedad/la humedad y los niveles de dióxido de carbono puede incluirse en un aparato de la presente invención. Cualquier aparato para retardar un proceso de desarrollo de una planta puede comprender, además, uno o más elementos para permitir que el aire fluya hasta o a través del catalizador o el elemento modular de catalizador. El experto en la materia prevería fácilmente otras posibles modificaciones a los aparatos descritos en el presente documento para monitorizar y controlar las condiciones atmosféricas (por ejemplo, al flujo de aire, la humedad y los niveles de dióxido de carbono) del catalizador, el elemento modular de catalizador o la estructura física. Condiciones tales como temperatura, composición atmosférica por ejemplo, humedad relativa, niveles de O₂ y CO₂, estrés físico, luz, estrés químico, radiación, estrés hídrico, reguladores del crecimiento, y ataque de patógenos desempeñan un importante papel en las tasas de respiración y afectan significativamente al periodo de conservación de frutas, verduras, flores y otros productos relacionados con plantas. Aunque la temperatura y las condiciones atmosféricas para almacenamiento varían dependiendo de la fruta, verdura u otro producto vegetal de interés, las temperaturas de almacenamiento recomendadas están habitualmente en el intervalo de aproximadamente 0° hasta aproximadamente 20°C con los niveles de O₂ y CO₂ en los intervalos aproximados del 1-10% y 0-20%, respectivamente. Una humedad relativa de aproximadamente el 50% a aproximadamente el 100%, particularmente del 85% a aproximadamente el 95%, más particularmente de aproximadamente el 90% a aproximadamente el 95% se recomienda generalmente para el almacenamiento de frutas, verduras y productos vegetales relacionados. Dada la significativa correlación entre la tasa de respiración y el periodo de conservación de los productos vegetales, el control de los factores anteriores es importante para retardar el deterioro de dichos productos. Por consiguiente, se puede disponer un captador de dióxido de carbono en el aparato para reducir el contenido de dióxido de carbono.

En realizaciones particulares de la presente invención, se dan a conocer aparatos catalizadores permeables al aire para retardar un proceso de desarrollo de una planta que comprenden múltiples capas. Por ejemplo, tal como se muestra en la figura 1, un aparato de catalizador -10- puede incluir capas externas -12- y -14- y una capa de catalizador intermedia -16- situada entre las capas externas -12- y -14-. La capa de catalizador -16- comprende una o más bacterias (por ejemplo, *Rhodococcus spp.*, *Pseudomonas chloroaphis*, *Brevibacterium ketoglutamicum* y sus mezclas) o enzimas (una nitrilo hidratasa, amidasa, asparaginasa y sus mezclas), en la que la una o más bacterias o enzimas se proporcionan en una cantidad suficiente para retardar el proceso de desarrollo de una planta de interés, y una tercera capa. En esta realización, una o más de las capas externas -12- y -14- proporcionan integridad estructural al aparato catalizador -10-. Las capas externas -12- y -14- habitualmente permiten el flujo de aire a la capa de catalizador -16- aunque, en algunas realizaciones, puede ser ventajoso tener una capa externa que no es permeable al aire, por ejemplo, si el aparato forma el lateral de la caja y no se desea permitir que la capa más externa de la caja deje expuesta a la capa de catalizador al entorno. El aparato catalizador -10- puede proporcionarse en bolsas o bolsitas reutilizables o no reutilizables según la presente invención. En una realización, la capa de catalizador -16- comprende células de *Rhodococcus spp.*, particularmente la cepa de *Rhodococcus rhodochrous* DAP 96253, la cepa de *Rhodococcus sp.* DAP 96622, *Rhodococcus erythropolis* o sus mezclas. Las células bacterianas utilizadas como catalizador en un aparato de la presente invención pueden ser inducidas con uno o más agentes inductores (por ejemplo, asparagina, glutamina, cobalto, urea o una mezcla de las mismas), tal como se ha descrito en detalle anteriormente.

Las figuras 2A-2C ilustran aparatos alternativos según la presente invención para retardar un proceso de desarrollo de una planta. Estos aparatos comprenden múltiples capas, en las que una o más de las capas se pueden eliminar. Tal como se muestra en la figura 2A, el aparato puede incluir una capa estructural permeable al aire -22- y una capa de catalizador -24-. Las capas eliminables -26- y/o -28- pueden estar provistas a lo largo de la capa estructural -22- y/o la capa de catalizador -24- y habitualmente serán retiradas antes de utilizar o activar el catalizador. En algunos aspectos de la presente invención, la retirada de las capas eliminables -26- y -28- deja expuesto un adhesivo que facilita la colocación o fijación de la estructura del catalizador a una estructura física diferente. La figura 2B ilustra una realización alternativa en la que el aparato -30- incluye dos capas estructurales permeables al aire -32- y -34-, una capa de catalizador intermedia -36- y una capa eliminable -38-. La figura 2C ilustra otra realización más en la que el aparato -40- incluye dos capas estructurales permeables al aire -42- y -44-, una capa de catalizador intermedia -46- y dos capas eliminables -48- y -50-.

Las figuras 3A-3B ilustran una realización alternativa -60- en la que el catalizador está fijado al interior de un recipiente tal como una caja de cartón. Tal como se muestra en la figura 3A, un lado -62- del recipiente incluye una capa de catalizador -64- fijada a él mediante la utilización de una capa adhesiva -66-. Una película desprendible -68- puede disponerse adyacente a la capa de catalizador -64- para proteger a la capa de catalizador de exposición al medio ambiente. La película desprendible -68- puede retirarse para activar el catalizador en la capa de catalizador -64- exponiendo al catalizador a la parte de una planta provista en el recipiente para, de este modo, retardar un proceso de desarrollo de una planta no deseado.

La figura 3B ilustra una estructura de catalizador -70- antes de fijar la estructura de catalizador al interior de un recipiente de la manera mostrada en la figura 3A. Además de la capa de catalizador -64-, la capa adhesiva -66- y la película desprendible -68-, la estructura de catalizador -70- incluye una película desprendible adicional -72-. La película desprendible -72-, al igual que la película desprendible -68-, protege a la estructura de catalizador -70-

cuando es envasada, enviada o almacenada. La película desprendible -72- puede retirarse para dejar expuesta a la capa adhesiva -66- para permitir que la estructura de catalizador -70- se fije al interior del recipiente de la manera ilustrada en la figura 3A.

5 La figura 4 ilustra una estructura de catalizador -80- que incluye dos ranuras -82- y -84- para alojar una casete de catalizador (por ejemplo la casete -86-). La casete de catalizador -86- es permeable al aire y puede fácilmente insertarse en o retirarse de la ranura -84-. Por lo tanto, la casete de catalizador -86- puede sustituirse fácilmente si se desea una nueva casete de catalizador para su utilización en la estructura de catalizador -80-. La casete de catalizador -86- incluye un catalizador tal como se describe en el presente documento y que está inmovilizado en
10 una matriz. La estructura de catalizador -80- puede incluir superficies opuestas -88- y -90- permeables al aire tales como rejillas de malla para permitir el flujo de aire a través de la casete de catalizador -86-. La estructura de catalizador -80- puede incluir, en realizaciones alternativas, solamente una superficie permeable al aire, dos superficies permeables al aire no opuestas o más de dos superficies permeables al aire como entendería un experto en la materia. Aunque la figura 4 incluye dos ranuras -82- y -84- para alojar a una casete de catalizador (por ejemplo la casete -86-), un experto en la materia entendería que la estructura de catalizador -80- podría incluir una o más ranuras para alojar a una casete. La estructura de catalizador -80- puede estar dispuesta dentro de un recipiente utilizado para transportar la parte de una planta tal como fruta o flores o puede estar fijada a un recipiente, por ejemplo, mediante la utilización de una capa adhesiva tal como se describe en el presente documento.

20 Los presentes métodos y aparatos pueden utilizarse para retardar un proceso de desarrollo de una planta de cualquier planta o parte de una planta de interés. En realizaciones particulares, los métodos y aparatos de la presente invención pretenden retardar la maduración y la parte de la planta es una fruta (climatérica o no climatérica), verdura, u otra parte de la planta sujeta a maduración. Un experto en la materia reconocerá que las "frutas climatéricas" muestran un súbito incremento de la producción de etileno durante la maduración de la fruta,
25 mientras que generalmente no se cree que las "frutas no climatéricas" experimenten un aumento significativo de la biosíntesis de etileno durante el proceso de maduración. Las frutas, verduras y otros productos de la planta de interés, a título de ejemplo, incluyen aunque sin limitación: manzanas, albaricoques, biriba, fruta del pan, chirimoya, feijoa, higo, guayaba, yaca, kiwi, plátanos, melocotones, aguacates, manzanas, melones cantalupos, mangos, melones, nectarinas, caqui, zapote, guanábana, aceitunas, papaya, fruta de la pasión, peras, ciruelas, tomates, pimenteras, arándanos, cacao, cajú, pepinos, pomelo, limones, limas, pimientos, cerezas, naranjas, uvas, piñas tropicales, fresas, sandías, tamarillos y nueces.

En otros aspectos de la presente invención, se proporcionan los métodos y aparatos para retardar la senescencia floral, marchitamiento, abscisión o cierre de los pétalos. Puede utilizarse cualquier flor en la puesta en práctica de la presente invención. Las flores de interés, a título de ejemplo, incluyen, aunque sin limitación, rosas, claveles, orquídeas, verdolaga, malva y begonias. Las flores cortadas, más particularmente flores cortadas de importancia comercial tales como rosas y claveles, son de particular interés. En algunas realizaciones, se utilizan flores que son sensibles al etileno en la puesta en práctica de la presente invención. Las flores sensibles a etileno incluyen, aunque sin limitación, flores de los géneros *Alstroemeria*, *Aneomone*, *Anthurium*, *Antirrhinum*, *Aster*, *Astilbe*, *Cattleya*,
35 *Cymbidium*, *Dahlia*, *Dendrobium*, *Dianthus*, *Eustoma*, *Freesia*, *Gerbera*, *Gypsophila*, *Iris*, *Lathyrus*, *Lilium*, *Limonium*, *Nerine*, *Rosa*, *Syringa*, *Tulipa* y *Zinnia*. Las flores sensibles a etileno representativas también incluyen las de las familias *Amaryllidaceae*, *Alliaceae*, *Convallariaceae*, *Hemerocallidaceae*, *Hyacinthaceae*, *Liliaceae*, *Orchidaceae*, *Aizoaceae*, *Cactaceae*, *Campanulaceae*, *Caryophyllaceae*, *Crassulaceae*, *Gentianaceae*, *Malvaceae*, *Plumbaginaceae*, *Portulacaceae*, *Solanaceae*, *Agavaceae*, *Asphodelaceae*, *Asparagaceae*, *Begoniaceae*,
40 *Caprifoliaceae*, *Dipsacaceae*, *Euphorbiaceae*, *Fabaceae*, *Lamiaceae*, *Myrtaceae*, *Onagraceae*, *Saxifragaceae* y *Verbenaceae*. Véase, por ejemplo, los documentos Van Doorn (2002) *Annals of Botany* [Anales de botánica] 89: 375-383; Van Doorn (2002) *Annals of Botany* 89: 689-693; y Elgar (1998) "Cut Flowers and Foliage - Cooling Requirements and Temperature Management" [Flores y plantas decorativas cortadas - requisitos de refrigeración y gestión de la temperatura] en hortnet.co.nz/publications/horlfacts/hf305004.htm (última visita 20 de marzo de 2007), todos los cuales se incorporan en el presente documento como referencia en su totalidad. Los métodos y aparatos para retardar la abscisión de hojas también son abarcados por la presente invención. Existe un interés comercial significativo en las industrias de plantas, frutas, verduras y flores en métodos y aparatos para regular procesos de desarrollo de una planta tales como maduración, senescencia y abscisión.

55 El experto en la materia reconocerá, además, que cualquiera de los métodos o aparatos dados a conocer en el presente documento puede combinarse con otros métodos y aparatos conocidos para retardar un proceso de desarrollo de una planta, particularmente aquellos procesos asociados generalmente con una mayor biosíntesis de etileno (por ejemplo, maduración de frutas/verduras, senescencia floral y abscisión de hojas). Además, tal como se ha descrito anteriormente, la mayor producción de etileno también se ha observado durante el ataque a plantas o partes de una planta por organismos patógenos. Por consiguiente, los métodos y aparatos de la presente invención pueden ser útiles, además, en la mejora de la respuesta de la planta a patógenos.

Los siguientes ejemplos se ofrecen a modo de ilustración y no a modo de limitación:

EXPERIMENTOS

5 La presente invención se describirá a continuación en referencia específica a diversos ejemplos. Los siguientes ejemplos no pretenden ser limitativos de la presente invención y, en su lugar, se proporcionan como realizaciones a título de ejemplo.

Ejemplo 1: Maduración retardada de frutas después de la exposición a *Rhodococcus spp.*, inducida

10 Células de *Rhodococcus spp.*, inducidas con asparagina, acrilonitrilo o acetónitrilo se inmovilizaron en una matriz de DEAE-celulosa reticulada con glutaraldehído. Los métodos de inducción de células y preparación de la matriz anterior se describen más adelante en el presente documento con más detalle.

15 La matriz de catalizador de DEAE-celulosa reticulada se colocó en tres bolsas de papel diferentes (aproximadamente 1-2 gramos de peso húmedo compacto de células por bolsa), con cada bolsa conteniendo plátanos, melocotones o aguacates sin madurar. Como controles negativos, se colocaron las mismas frutas en bolsas de papel diferentes en ausencia de la matriz de catalizador. Las bolsas de papel se conservaron a temperatura ambiente, y el producto se observó a diario en busca de signos de maduración y degradación de la fruta.

20 Todos los productos expuestos a la matriz de catalizador mostraban retardos significativos en la maduración de la fruta. En particular, la firmeza y la integridad de la piel de los melocotones se conservaron durante más tiempo en presencia de la matriz de catalizador. Análogamente, con los plátanos, la aparición de manchas marrones se retardó y la firmeza se conservó durante más tiempo con respecto a los controles negativos.

Ejemplo 2: Protocolos generales de fermentación e inducción*Proceso de fermentación*

30 Los siguientes protocolos generales y medios de cultivo se utilizaron para la fermentación de las cepas de *Rhodococcus spp.*, *Rhodococcus sp.* DAP 96622 y *Rhodococcus rhodochrous* DAP 96523, para su utilización en otros experimentos:

35 Los recipientes de fermentación se configuraron con sondas para medir el oxígeno disuelto (DO) y el pH, así como con dispositivos de muestreo para medir la concentración de glucosa (fuera de línea). Se utilizaron orificios adicionales para añadir correctores (por ejemplo, ácido, base, o antiespuma), inductores, nutrientes y suplementos. Los recipientes limpiados previamente se esterilizaron en el sitio. Se utilizó un medio de base adecuado (1 ó 1,5X) R2A ó R3A. Los componentes específicos de estos medios de cultivo se describen más adelante. Se realizaron algunas sustituciones de los contenidos de los medios en algunos experimentos. Por ejemplo, Proflo[®] (Trader's Protein, Memphis, TN) se utilizó a veces en lugar de la proteosa peptona y/o la mezcla de aminoácidos *casamino acids*. Además, en algunos experimentos, Hy-Cotton 7803[®] (Quest International, Hoffman Estates, IL), hidrolizado de semilla de algodón, hidrolizado-ultrafiltrado hidrolizado de semilla de algodón (Marcor Development Corp., Carlstadt, NJ) se utilizó en lugar del Proflo[®] (Trader's Protein, Memphis, TN).

45 Se estableció un perfil de alimentación para la suplementación de nutrientes para sustituir gradualmente el medio de base R2A ó R3A por un medio más rico, concretamente 2X YEMEA, cuyos componentes también se describen en más detalle a continuación. Otros suplementos de nutrientes opcionales incluían maltosa al 50% (p/v) y dextrosa al 50% (p/v). A veces se utilizaron productos comerciales que contienen equivalentes de dextrosa (glucosa, maltosa y polisacáridos superiores) en lugar de maltosa y dextrosa.

50 Se prepararon inóculos a partir de cultivos de las cepas *Rhodococcus sp.* DAP 96622 y *Rhodococcus rhodochrous* DAP 96523 en un medio sólido adecuado y se incubaron a su temperatura apropiada (por ejemplo, 30°C). En realizaciones particulares, se cultivaron células en placas de agar YEMEA durante 4-14 días, preferentemente 7 días. Como alternativa, se prepararon inóculos a partir de concentrados de células congeladas de ciclos de fermentación previos. Los concentrados de células se prepararon habitualmente a una concentración de 20X respecto a la presente en el fermentador. Además, el inóculo se preparó a veces a partir de un medio bifásico adecuado (es decir, una combinación de medio líquido recubriendo a un medio sólido de la misma o de diferente composición). Cuando se utilizó un medio bifásico, el medio contenía generalmente YEMEA en las capas líquidas y sólidas.

60 Para la inducción de nitrilo hidratasa, a t = 0 horas, CoCl₂·6H₂O y urea estériles se añadieron hasta alcanzar concentraciones de 5-200 ppm de CoCl₂ y 750 mg/l - 10 g/l de urea, con 10-50 ppm de CoCl₂ y 7500 mg/l - 7,5 g/l de urea preferentes generalmente. En una realización particular, se añadieron urea y/o cobalto de nuevo durante la fermentación. Por ejemplo, un volumen equivalente de urea y 150 ppm de CoCl₂ se añadieron a 4 - 6 horas o a 24 - 30 horas. Además de la urea, una concentración final de 300 - 500 ppm de acrilonitrilo/acetónitrilo o asparagina 0,1 M - 0,2 M se añadieron por etapas o a una velocidad constante, comenzando en diversos momentos. Los ciclos de

65

fermentación se terminaron cuando la masa de células y las concentraciones de enzimas eran aceptables, habitualmente a 24-96 horas.

5 Las células se recogieron a continuación mediante cualquier método aceptable, incluyendo, aunque sin limitación, centrifugado, decantación o filtración por lotes o continuas. Las células recogidas se resuspendieron a un volumen concentrado 20X en un tampón adecuado tal como solución salina tamponada con fosfato 50 mM (PBS) suplementado con el inductor utilizado durante el proceso de fermentación. Los concentrados de células se congelaron a continuación, particularmente mediante congelación rápida. Las células congeladas se almacenaron a -20°C-80°C o en nitrógeno líquido para una utilización posterior.

10

Descripción de los medios de cultivo

Medio R2A (Véase el documento Reasoner y Geldreich (1985) *Appl. Environ. Microbiol.* 49: 1-7.)

Extracto de levadura	0,5 g
Proteosa Peptona #3	0,5 g
Casamino ácidos	0,5 g
Glucosa	0,5 g
Almidón soluble	0,5 g
K ₂ HPO ₄	0,3 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,05 g
Piruvato sódico	0,3 g
H ₂ O DI o destilada	1,0 litro

15

Medio R3A (Véase Reasoner y Geldreich, *supra*.)

Extracto de levadura	1,0 g
Proteosa peptona #3	1,0 g
Casamino ácidos	1,0 g
Glucosa	1,0 g
Almidón soluble	1,0 g
K ₂ HPO ₄	0,6 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,1 g
Piruvato sódico	0,5 g
H ₂ O DI o destilada	1,0 litro

20 Medio YEMEA

	1X	2X
Extracto de levadura	4,0 g	8,0 g
Extracto de malta	10,0 g	20,0 g
Glucosa	4,0 g	8,0 g
H ₂ O DI o destilada	1,0 litro	1,0 litro

Inducción

25 Se utilizó el siguiente protocolo general para la inducción de las cepas de *Rhodococcus spp.* *Rhodococcus sp.* DAP 96622 y *Rhodococcus rhodochrous* DAP 96523:

30 Se añadieron líquidos inductores volátiles (por ejemplo, acrilonitrilo/acetónitrilo) de forma volumétrica como inductores líquidos esterilizados por filtración en base a la densidad del inductor líquido particular. En el caso de inductores líquidos (por ejemplo, asparagina/glutamina), los sólidos se pesaron y se añadieron directamente al medio de cultivo. Los medios resultantes se esterilizaron en autoclave. Cuando se utilizaban inductores líquidos esterilizados por filtración, el medio de cultivo en solitario se esterilizó en autoclave y se enfrió a 40°C antes de que se añadiera el inductor líquido. Las concentraciones habituales para inductores de interés eran: 500 ppm de acrilonitrilo/acetónitrilo; 500 ppm de asparagina/glutamina; y 50 ppm de succinonitrilo. Las células se cultivaron a continuación en medios especificados y se analizaron adicionalmente en busca de actividades enzimáticas particulares y biomasa.

35

Ejemplo 3: Análisis de actividad nitrilo hidratasa, amidasa y asparaginasa y biomasa en células de *Rhodococcus spp.*, inducidas con asparagina

40

La actividad nitrilo hidratasa, amidasa y asparaginasa y la biomasa se evaluaron en células inducidas con asparagina de las cepas de *Rhodococcus spp.* *Rhodococcus sp.* DAP 96622 y *Rhodococcus rhodochrous* DAP 96523. Diversas modificaciones a los componentes de los medios de cultivo, los métodos, velocidades y

concentraciones de administración de asparagina provistas a las células, y la fuente de las células se analizaron con respecto a sus efectos sobre las actividades de las enzimas anteriores y sobre la biomasa. Las secciones A a G de este ejemplo describen los específicos de cada serie de condiciones de ensayo y proporcionan un resumen de las actividades enzimáticas y biomasa obtenidas en cada una de las condiciones especificadas.

5 A. Esencialmente tal como se ha descrito anteriormente en el ejemplo 2, un fermentador de 20 litros inoculado utilizando células de *Rhodococcus rhodochrous* DAP 96253 recogidas de medio sólido se suplementó de forma continua con el inductor asparagina (120 μ l/minuto de una solución 0,2 M). Se utilizó Hy-Cotton 7803® en lugar de la proteosa peptona #3 en el medio R3A descrito anteriormente. Al final del ciclo de fermentación, se midieron la actividad nitrilo hidratasa específica de acetonitrilo, actividad amidasa y biomasa según técnicas estándar conocidas en la técnica.

15 Los resultados para actividad nitrilo hidratasa, actividad amidasa y biomasa se proporcionan más adelante en la tabla 3, con actividades proporcionadas en unidades/mg de psc (peso seco de células). Una unidad de actividad de nitrilo hidratasa se refiere a la capacidad de convertir 1 μ mol de acrilonitrilo en su amida correspondiente por minuto, por miligramo de células (peso seco) a pH 7,0 y una temperatura de 30°C. Una unidad de actividad amidasa se refiere a la capacidad para convertir 1 μ mol de acrilamida en su ácido correspondiente por minuto, por miligramo de células (peso seco) pH de 7,0 y una temperatura de 30°C. La biomasa se describe como células empaquetadas en g/l de phc (peso húmedo de células).

20 *Tabla 3: Actividades enzimáticas y biomasa de células de Rhodococcus rhodochrous DAP 96523 después de la inducción con asparagina*

Actividad nitrilo hidratasa (Unidades/mg de psc)	Actividad amidasa (Unidades/mg de psc)	Biomasa (g/l de phc)
168	2	36

25 B. Esencialmente tal como se ha descrito anteriormente en el ejemplo 3A, con cambios del medio tal como se indica más adelante, se evaluaron las actividades enzimáticas y la biomasa con células de *Rhodococcus rhodochrous* DAP 96523. En particular, se añadió YEMEA, dextrosa o maltosa a un medio R3A modificado, que contenía además Hy-Cotton 7803® que sustituyó a la proteosa peptona #3. Una solución 0,2 M de asparagina se añadió a una velocidad continua de 120 μ l/minuto comenzando a t = 8 horas. Al final del ciclo de fermentación, se midieron la actividad nitrilo hidratasa específica de acrilonitrilo, actividad amidasa y biomasa. Los resultados se resumen en la tabla 4. Se observó un mayor rendimiento de biomasa con la adición de YEMEA, dextrosa o maltosa al medio.

30 *Tabla 4: Actividades enzimáticas y biomasa de células de Rhodococcus rhodochrous DAP 96523 después de inducción continua con asparagina*

Actividad nitrilo hidratasa (Unidades/mg de psc)	Actividad amidasa (Unidades/mg de psc)	Biomasa (g/l de phc)
155	6	52

35 C. Se utilizaron células de *Rhodococcus sp.* DAP 96622 de medio sólido como fuente del inóculo para un ciclo de fermentación de 20 litros (véase el ejemplo 2 para detalles del proceso de fermentación). Una solución 0,2 M de asparagina se añadió de forma semi-continua cada 6 horas, comenzando a t = 24 horas, durante 50-70 minutos a una velocidad de 2 ml/minuto. Se utilizó Hy-Cotton 7803® en lugar de la proteosa peptona #3 en un medio R3A modificado. Al final del ciclo de fermentación, se midieron la actividad nitrilo hidratasa específica de acrilonitrilo, la actividad amidasa y la biomasa. Los resultados se resumen en la tabla 5.

40 *Tabla 5: Actividades enzimáticas y biomasa de células de Rhodococcus sp. DAP 96622 después de inducción semi-continua con asparagina*

Actividad nitrilo hidratasa (Unidades/mg de psc)	Actividad amidasa (Unidades/mg de psc)	Biomasa (g/l de phc)
172	2	44

45 D. Se utilizaron células de *Rhodococcus sp.* DAP 96622 de medio sólido como fuente del inóculo para un ciclo fermentador de 20 litros. Una solución 0,2 M de asparagina se añadió de forma semi-continua cada 6 horas, comenzando a t = 12 horas, durante 12-85 minutos a una velocidad de 2,5 ml/minuto. Se utilizó hidrolizado de semilla de algodón en lugar de la proteosa peptona #3 en un medio R3A modificado. Al final del ciclo de fermentación, se midieron la actividad nitrilo hidratasa específica de acrilonitrilo, la actividad amidasa y la biomasa, y los resultados se resumen en la tabla 6.

50 *Tabla 6: Actividades enzimáticas y biomasa de células de Rhodococcus sp. DAP 96622 después de inducción semi-continua con asparagina*

Actividad nitrilo hidratasa (Unidades/mg de psc)	Actividad amidasa (Unidades/mg de psc)	Biomasa (g/l de phc)
165	2	57

E. Se utilizaron células de *Rhodococcus rhodochrous* DAP 96253 congeladas previamente como fuente del inóculo para un ciclo de fermentación de 20 litros. Se añadió YEMEA, dextrosa o maltosa a un medio R3A modificado que contenía además Hy-Cotton 7803® como sustituto de proteosa peptona #3. Una solución 0,15 M de asparagina se añadió a una velocidad continua de 120 µl/minuto comenzado a t = 8 horas. Al final del ciclo de fermentación, se midieron la actividad nitrilo hidratasa específica de acrilonitrilo, la actividad amidasa y la biomasa. Los resultados se resumen en la tabla 7.

Tabla 7: Actividades enzimáticas y biomasa de células de *Rhodococcus rhodochrous* DAP 96523 después de inducción continua con asparagina

Actividad nitrilo hidratasa (Unidades/mg de psc)	Actividad amidasa (Unidades/mg de psc)	Biomasa (g/l de phc)
171	4	74

F. Se utilizaron células de *Rhodococcus rhodochrous* DAP 96253 cultivadas en medio bifásico como fuente de inóculo para un ciclo de fermentación de 20 litros. Se utilizó un medio R3A modificado que se suplementó mediante la adición de un carbohidrato (es decir, YEMEA, dextrosa o maltosa) y que contenía, además, hidrolizado de semilla de algodón en lugar de proteosa peptona #3. Una solución 0,15 M de asparagina se añadió a una velocidad continua de 1000 µl/minuto comenzando a t = 10 horas. Al final del ciclo de fermentación, se midieron la actividad nitrilo hidratasa específica de acrilonitrilo, la actividad amidasa, la actividad asparaginasa I y la biomasa. Los resultados se resumen en la tabla 8.

Tabla 8: Actividades enzimáticas y biomasa de células de *Rhodococcus rhodochrous* DAP 96523 después de inducción continua con asparagina

Actividad nitrilo hidratasa (Unidades/mg de psc)	Actividad amidasa (Unidades/mg de psc)	Actividad asparaginasa I (Unidades/mg de psc)	Biomasa (g/l de phc)
159	22	16	16

G. Se utilizaron células de *Rhodococcus rhodochrous* DAP 96253 cultivadas en medio bifásico como fuente de inóculo para un ciclo de fermentación de 20 litros. Se utilizó un medio R3A modificado que contenía maltosa (en lugar de dextrosa) y Hy-Cotton 7803® como sustituto de proteosa peptona #3. Una solución 0,15 M de asparagina se añadió a una velocidad continua de 476 µl/minuto comenzando a t = 8 horas. Al final del ciclo de fermentación, se midieron la actividad nitrilo hidratasa específica de acrilonitrilo, la actividad amidasa y la biomasa, y los resultados se resumen en la tabla 9.

Tabla 9: Actividades enzimáticas y biomasa de células de *Rhodococcus rhodochrous* DAP 96523 después de inducción continua con asparagina

Actividad nitrilo hidratasa (Unidades/mg de psc)	Actividad amidasa (Unidades/mg de psc)	Biomasa (g/l de phc)
137	6	35

Ejemplo 4: Inmovilización de células de *Rhodococcus spp.*, en DEAE-celulosa reticulada con glutaraldehído

Se utiliza un proceso modificado derivado de los métodos descritos en la patente de Estados Unidos No. 4.229.536 y el documento Lopez-Gallego y otros (2005) J. Biotechnol. 119: 70-75 para inmovilizar células de *Rhodococcus spp.*, en una matriz que comprendía DEAE-celulosa reticulada con glutaraldehído.

Preparación de las células

Las células de *Rhodococcus* se cultivan en un medio de cultivo apropiado (por ejemplo, YEMEA-maltosa + inductores, cultivos bifásicos, etc.) y se recogieron mediante centrifugado a 8.000 rpm durante 10 minutos. El sedimento celular resultante se resuspende en 100 ml de tampón fosfato 50 mM (pH 7,2) y se centrifugó a 8.000 rpm durante 10 minutos. Este proceso de resuspender el sedimento celular y centrifugar a 8.000 rpm durante 10 minutos se repite dos veces. Se apunta el peso húmedo compacto (ph) de la muestra de células final. La actividad nitrilo hidratasa de una pequeña muestra de las células se realiza para evaluar la actividad enzimática de las células completas.

Inmovilización de las células

Una cantidad de DEAE-celulosa equivalente a la de las células de *Rhodococcus spp.*, recogidas se obtiene, y las células y la DEAE-celulosa se resuspenden en 100 ml de H₂O desionizada. Un volumen de una solución al 25% de glutaraldehído suficiente para conseguir una concentración final del 0,5% se añade con agitación a la mezcla de células/DEAE-celulosa. La mezcla se agita durante 1 hora, después de lo cual se añaden 400 ml de H₂O desionizada con mezclado adicional. Mientras se agita, se añade solución al 50% (en peso) de polietilimina (PEI);

PM 750.000). La agitación continúa hasta que se completa la floculación. La mezcla floculada se filtra y se extruye a través de una jeringa de tamaño apropiado. Las células inmovilizadas se rompen en pequeños pedazos, se secan durante una noche y se cortan en gránulos de aproximadamente 2-3 mm antes de utilizarlas.

5 Ejemplo 5: Inmovilización de células de *Rhodococcus spp.*, en alginato cálcico y endurecimiento de perlas de alginato cálcico

10 Se utiliza un proceso adaptado a partir del método descrito en el documento Bucke (1987) "Cell Immobilization in Calcium Alginate" en *Methods in Enzymology*, Vol. 135(B) (Academic Press, Inc., San Diego, California; Mosbach, ed.) para inmovilizar células de *Rhodococcus spp.*, en alginato cálcico.

Preparación de las células

15 Las células de *Rhodococcus spp.*, se preparan tal como se ha descrito anteriormente en el ejemplo 4.

Inmovilización de las células

20 Se producen 25 g de una solución al 4% de alginato sódico disolviendo 1 g de alginato sódico en 24 ml de Tris-HCl 50 mM (pH 7,2). Se añaden 25 mg de metaperyodato sódico a la solución de alginato y se agitan a 25°C durante 1 hora o hasta que el alginato está completamente disuelto. Las células preparadas tal como se ha descrito anteriormente se resuspenden hasta un volumen final de 50 ml en Tris-HCl 50 mM (pH 7,2) y a continuación se añaden a la solución de alginato sódico con agitación. Las perlas resultantes se extruyen a través de una aguja de calibre 27 en 500 ml de una solución 0,1 M de CaCl₂. La aguja se coloca generalmente aproximadamente dos pulgadas (5,08 cm) por encima de la solución para impedir la entrada de aire en las perlas y para impedir que las perlas se peguen. Las perlas se curan durante 1 hora en la solución de CaCl₂, y las perlas se aclaran a continuación con agua y se almacenan a 4°C en una solución 0,1 de M CaCl₂ antes de utilizarlas.

*Endurecimiento de perlas de alginato cálcico que comprenden células de *Rhodococcus spp.**

30 Las perlas de alginato cálcico preparadas tal como se ha resumido anteriormente pueden reforzarse adicionalmente mediante reticulación con PEI. Las perlas se incuban en 2 l de PEI al 0,5% en una solución 0,1 M de CaCl₂ (20 g de PEI al 50% en una solución 0,1 M de CaCl₂). El pH de la solución final se ajusta a 7,0 con HCl o NaOH, si fuera necesario, y las perlas se incuban durante 24 horas. Las perlas se aclaran a continuación con agua y se almacenan a 4°C en una solución 0,1 M de CaCl₂ antes de utilizarlas.

35 LISTA DE SECUENCIAS

<110> Georgia State University Research Foundation, Inc.

40 <120> CATALIZADOR DE BASE BIOLÓGICA PARA RETARDAR PROCESOS DE DESARROLLO DE UNA PLANTA

<130> 23339-004WO1

45 <150> US 11/695.377
<151> 02-04-2007

<160> 13

50 <170> FastSEQ para Windows Versión 4.0

<210> 1

<211> 229

<212> PRT

55 <213> *Rhodococcus sp.*

<400> 1

Met Asp Gly Ile His Asp Thr Gly Gly Met Thr Gly Tyr Gly Pro Val
 1 5 10 15
 Pro Tyr Gln Lys Asp Glu Pro Phe Phe His Tyr Glu Trp Glu Gly Arg
 20 25 30
 Thr Leu Ser Ile Leu Thr Trp Met His Leu Lys Gly Met Ser Trp Trp
 35 40 45
 Asp Lys Ser Arg Phe Phe Arg Glu Ser Met Gly Asn Glu Asn Tyr Val
 50 55 60
 Asn Glu Ile Arg Asn Ser Tyr Tyr Thr His Trp Leu Ser Ala Ala Glu
 65 70 75 80
 Arg Ile Leu Val Ala Asp Lys Ile Ile Thr Glu Glu Glu Arg Lys His
 85 90 95
 Arg Val Gln Glu Ile Leu Glu Gly Arg Tyr Thr Asp Arg Asn Pro Ser
 100 105 110
 Arg Lys Phe Asp Pro Ala Glu Ile Glu Lys Ala Ile Glu Arg Leu His
 115 120 125
 Glu Pro His Ser Leu Ala Leu Pro Gly Ala Glu Pro Ser Phe Ser Leu
 130 135 140
 Gly Asp Lys Val Lys Val Lys Asn Met Asn Pro Leu Gly His Thr Arg
 145 150 155 160
 Cys Pro Lys Tyr Val Arg Asn Lys Ile Gly Glu Ile Val Thr Ser His
 165 170 175
 Gly Cys Gln Ile Tyr Pro Glu Ser Ser Ser Ala Gly Leu Gly Asp Asp
 180 185 190
 Pro Arg Pro Leu Tyr Thr Val Ala Phe Ser Ala Gln Glu Leu Trp Gly
 195 200 205
 Asp Asp Gly Asn Gly Lys Asp Val Val Cys Val Asp Leu Trp Glu Pro
 210 215 220
 Tyr Leu Ile Ser Ala
 225

<210> 2
 <211> 229
 <212> PRT
 <213> Nocardia sp.

5

<400> 2

```

Met Asp Gly Ile His Asp Thr Gly Gly Met Thr Gly Tyr Gly Pro Val
 1   5   5   5   5   5   5   5   5   5   5   5   5   5   5
Pro Tyr Gln Lys Asp Glu Pro Phe Phe His Tyr Glu Trp Glu Gly Arg

          20          25          30
Thr Leu Ser Ile Leu Thr Trp Met His Leu Lys Gly Met Ser Trp Trp
 35          40          45
Asp Lys Ser Arg Phe Phe Arg Glu Ser Met Gly Asn Glu Asn Tyr Val
 50          55          60
Asn Glu Ile Arg Asn Ser Tyr Tyr Thr His Trp Leu Ser Ala Ala Glu
 65          70          75
Arg Ile Leu Val Ala Asp Lys Ile Ile Thr Glu Glu Glu Arg Lys His
 85          90          95
Arg Val Gln Glu Ile Leu Glu Gly Arg Tyr Thr Asp Arg Asn Pro Ser
100          105          110
Arg Lys Phe Asp Pro Ala Glu Ile Glu Lys Ala Ile Glu Arg Leu His
115          120          125
Glu Pro His Ser Leu Ala Leu Pro Gly Ala Glu Pro Ser Phe Ser Leu
130          135          140
Gly Asp Lys Val Lys Val Lys Asn Met Asn Pro Leu Gly His Thr Arg
145          150          155
Cys Pro Lys Tyr Val Arg Asn Lys Ile Gly Glu Ile Val Thr Ser His
165          170          175
Gly Cys Gln Ile Tyr Pro Glu Ser Ser Ser Ala Gly Leu Gly Asp Asp
180          185          190
Pro Arg Pro Leu Tyr Thr Val Ala Phe Ser Ala Gln Glu Leu Trp Gly
195          200          205
Asp Asp Gly Asn Gly Lys Asp Val Val Cys Val Asp Leu Trp Glu Pro
210          215          220
Tyr Leu Ile Ser Ala
225

```

- <210> 3
- 5 <211> 229
- <212> PRT
- <213> Rhodococcus rhodochrous

- <220>
- 10 <223> Bacteria no cultivada BD2

- <400> 3

Met	Asp	Gly	Ile	His	Asp	Thr	Gly	Gly	Met	Thr	Gly	Tyr	Gly	Pro	Val
1				5					10					15	
Pro	Tyr	Gln	Lys	Asp	Glu	Pro	Phe	Phe	His	Tyr	Glu	Trp	Glu	Gly	Arg
			20					25					30		
Thr	Leu	Ser	Ile	Leu	Thr	Trp	Met	His	Leu	Lys	Gly	Ile	Ser	Trp	Trp
		35					40					45			
Asp	Lys	Ser	Arg	Phe	Phe	Arg	Glu	Ser	Met	Gly	Asn	Glu	Asn	Tyr	Val
	50					55					60				
Asn	Glu	Ile	Arg	Asn	Ser	Tyr	Tyr	Thr	His	Trp	Leu	Ser	Ala	Ala	Glu
65					70					75					80
Arg	Ile	Leu	Val	Ala	Asp	Lys	Ile	Ile	Thr	Glu	Glu	Glu	Arg	Lys	His
				85					90					95	
Arg	Val	Gln	Glu	Ile	Leu	Glu	Gly	Arg	Tyr	Thr	Asp	Arg	Lys	Pro	Ser
			100					105					110		
Arg	Lys	Phe	Asp	Pro	Ala	Gln	Ile	Glu	Lys	Ala	Ile	Glu	Arg	Leu	His
		115					120					125			
Glu	Pro	His	Ser	Leu	Ala	Leu	Pro	Gly	Ala	Glu	Pro	Ser	Phe	Ser	Leu
	130					135					140				
Gly	Asp	Lys	Ile	Lys	Val	Lys	Ser	Met	Asn	Pro	Leu	Gly	His	Thr	Arg
145				150					155						160
Cys	Pro	Lys	Tyr	Val	Arg	Asn	Lys	Ile	Gly	Glu	Ile	Val	Ala	Tyr	His
				165					170					175	
Gly	Cys	Gln	Ile	Tyr	Pro	Glu	Ser	Ser	Ser	Ala	Gly	Leu	Gly	Asp	Asp
			180					185					190		
Pro	Arg	Pro	Leu	Tyr	Thr	Val	Ala	Phe	Ser	Ala	Gln	Glu	Leu	Trp	Gly
		195					200					205			
Asp	Asp	Gly	Asn	Gly	Lys	Asp	Val	Val	Cys	Val	Asp	Leu	Trp	Glu	Pro
				210					215					220	
				Tyr	Leu	Ile	Ser	Ala							
				225											

- <210> 4
- <211> 166
- 5 <212> PRT
- <213> Desconocido
- <220>
- 10 <223> Bacteria no cultivada BD2
- <220>
- <221> PÉPTIDO
- <222> (1)...(166)
- <223> Subunidad beta de nitrilo hidratasa
- 15 <400> 4

```

Met Asp Gly Ile His Asp Thr Gly Gly Met Thr Gly Tyr Gly Pro Val
 1          5          10          15
Pro Tyr Gln Lys Asp Glu Pro Phe Phe His Tyr Glu Trp Glu Gly Arg
          20          25          30
Thr Leu Ser Ile Leu Thr Trp Met His Leu Lys Gly Ile Ser Trp Trp
          35          40          45
Asp Lys Ser Arg Phe Phe Arg Glu Ser Met Gly Asn Glu Asn Tyr Val
          50          55          60
Asp Glu Ile Arg Asn Ser Tyr Tyr Thr His Trp Leu Ser Ala Ala Glu
65          70          75          80
Arg Ile Leu Val Ala Asp Lys Ile Ile Thr Glu Glu Glu Arg Lys His
          85          90          95
Arg Val Gln Glu Ile Leu Glu Gly Arg Tyr Thr Asp Arg Lys Pro Ser
          100          105          110
Arg Lys Phe Asp Pro Ala Gln Ile Glu Lys Ala Ile Glu Arg Leu His
          115          120          125
Glu Pro His Ser Leu Ala Leu Pro Gly Ala Glu Pro Ser Phe Ser Leu
130          135          140
Gly Asp Lys Asn Gln Ser Glu Glu Tyr Glu Pro Ala Gly Thr His Thr
145          150          155          160
Val Pro Glu Ile Cys Ala
          165

```

<210> 5
 <211> 203
 <212> PRT
 <213> Rhodococcus sp.

5

<400> 5

```

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

Val Val Ala Asp Pro Arg Gly Val Leu Lys Arg Asp Phe Gly Phe Asp
          130          135          140
Ile Pro Asp Glu Val Glu Val Arg Val Trp Asp Ser Ser Ser Glu Ile
145          150          155          160
Arg Tyr Ile Val Ile Pro Glu Arg Pro Ala Gly Thr Asp Gly Trp Ser
          165          170          175
Glu Asp Glu Leu Ala Lys Leu Val Ser Arg Asp Ser Met Ile Gly Val
          180          185          190
Ser Asn Ala Leu Thr Pro Gln Glu Val Ile Val
          195          200

```

<210> 6
 <211> 203
 <212> PRT
 <213> Rhodococcus rhodochrous

10

<400> 6

```

Met Ser Glu His Val Asn Lys Tyr Thr Glu Tyr Glu Ala Arg Thr Lys
 1           5           10           15
Ala Ile Glu Thr Leu Leu Tyr Glu Arg Gly Leu Ile Thr Pro Ala Ala
 20           25           30
Val Asp Arg Val Val Ser Tyr Tyr Glu Asn Glu Ile Gly Pro Met Gly
 35           40           45
Gly Ala Lys Val Val Ala Lys Ser Trp Val Asp Pro Glu Tyr Arg Lys
 50           55           60
Trp Leu Glu Glu Asp Ala Thr Ala Ala Met Ala Ser Leu Gly Tyr Ala
 65           70           75           80
Gly Glu Gln Ala His Gln Ile Ser Ala Val Phe Asn Asp Ser Gln Thr
 85           90           95
His His Val Val Val Cys Thr Leu Cys Ser Cys Tyr Pro Trp Pro Val
 100          105          110
Leu Gly Leu Pro Pro Ala Trp Tyr Lys Ser Met Glu Tyr Arg Ser Arg
 115          120          125
Val Val Ala Asp Pro Arg Gly Val Leu Lys Arg Asp Phe Gly Phe Asp
 130          135          140
Ile Pro Asp Glu Val Glu Val Arg Val Trp Asp Ser Ser Ser Glu Ile
 145          150          155          160
Arg Tyr Ile Val Ile Pro Glu Arg Pro Ala Gly Thr Asp Gly Trp Ser
 165          170          175
Glu Glu Glu Leu Thr Lys Leu Val Ser Arg Asp Ser Met Ile Gly Val
 180          185          190
Ser Asn Ala Leu Thr Pro Gln Glu Val Ile Val
 195          200

```

5 <210> 7
 <211> 180
 <212> PRT
 <213> Desconocido

10 <220>
 <223> Bacteria no cultivada SP1

<220<
 <221> PÉPTIDO
 15 <222> (1)...(180)
 <223> Subunidad alfa de nitrilo hidratasa

<400> 7

ES 2 393 018 T3

```

Met Ser Glu His Val Asn Lys Tyr Thr Glu Tyr Glu Ala Arg Thr Lys
 1          5          10          15
Ala Val Glu Thr Leu Leu Tyr Glu Arg Gly Leu Ile Thr Pro Ala Ala
 20          25          30
Val Asp Arg Val Val Ser Tyr Tyr Glu Asn Glu Ile Gly Pro Met Gly

          35          40          45
Gly Ala Lys Val Val Ala Lys Ser Trp Val Asp Pro Glu Tyr Arg Lys
 50          55          60
Trp Leu Glu Glu Asp Ala Thr Ala Ala Met Ala Ser Leu Gly Tyr Ala
 65          70          75          80
Gly Glu Gln Ala His His Val Val Val Cys Thr Leu Cys Ser Cys Tyr
 85          90          95
Pro Trp Pro Val Leu Gly Leu Pro Pro Ala Trp Tyr Lys Ser Met Glu
 100          105          110
Tyr Arg Ser Arg Val Val Ala Asp Pro Arg Gly Val Leu Lys Arg Asp
 115          120          125
Phe Gly Phe Asp Ile Pro Asp Glu Val Glu Val Arg Val Trp Asp Ser
 130          135          140
Ser Ser Glu Ile Arg Tyr Ile Val Ile Pro Glu Arg Pro Ala Gly Thr
 145          150          155          160
Asp Gly Trp Ser Glu Glu Glu Leu Thr Lys Leu Val Ser Arg Asp Ser
 165          170          175
Ile Ile Gly Val
 180

```

- 5
- <210> 8
 - <211> 345
 - <212> PRT
 - <213> Rhodococcus rhodochrous
 - <400> 8

```

Met Arg His Gly Asp Ile Ser Ser Ser Pro Asp Thr Val Gly Val Ala
1      5      10
Val Val Asn Tyr Lys Met Pro Arg Leu His Thr Lys Ala Asp Val Leu
20
Glu Asn Ala Arg Ala Ile Ala Lys Met Val Val Gly Met Lys Ala Gly
35      40
Leu Pro Gly Met Asp Leu Val Val Phe Pro Glu Tyr Ser Thr Met Gly
50      55      60
Ile Met Tyr Asp Asn Asp Glu Met Tyr Ala Thr Ala Ala Thr Ile Pro
65      70      75      80
Gly Asp Glu Thr Asp Ile Phe Ala Gln Ala Cys Arg Asp Ala Lys Thr
85      90      95
Trp Gly Val Phe Ser Ile Thr Gly Glu Arg His Glu Asp His Pro Asn
100      105      110
Lys Pro Pro Tyr Asn Thr Leu Val Leu Ile Asn Asp Gln Gly Glu Ile
115      120      125
Val Gln Lys Tyr Arg Lys Ile Leu Pro Trp Thr Pro Ile Glu Gly Trp
130      135      140
Tyr Pro Gly Gly Gln Thr Tyr Val Thr Asp Gly Pro Lys Gly Leu Lys
145      150      155      160
Ile Ser Leu Ile Ile Cys Asp Asp Gly Asn Tyr Pro Glu Ile Trp Arg
165      170      175
Asp Cys Ala Met Lys Gly Ala Glu Leu Ile Val Arg Pro Gln Gly Tyr
180      185      190
Met Tyr Pro Ser Lys Glu Gln Gln Val Leu Met Ala Lys Ala Met Ala
195      200      205
Trp Ala Asn Asn Cys Tyr Val Ala Val Ala Asn Ala Thr Gly Phe Asp
210      215      220
Gly Val Tyr Ser Tyr Phe Gly His Ser Ala Ile Gly Phe Asp Gly
225      230      235      240
Arg Thr Leu Gly Glu Cys Gly Glu Glu Asp Tyr Gly Val Gln Tyr Ala
245      250      255
Gln Leu Ser Leu Ser Thr Ile Arg Asp Ala Arg Ala Asn Asp Gln Ser
260      265      270
Gln Asn His Leu Phe Lys Leu Leu His Arg Gly Tyr Thr Gly Val Phe
275      280      285
Ala Gly Gly Asp Gly Asp Lys Gly Val Ala Asp Cys Pro Phe Asp Phe
290      295      300

Tyr Arg Asn Trp Val Asn Asp Ala Glu Ala Thr Gln Lys Ala Val Glu
305      310      315      320
Ala Ile Thr Arg Glu Thr Ile Gly Val Ala Asp Cys Pro Val Tyr Asp
325      330      335
Leu Pro Ser Glu Lys Thr Met Asp Ala
340      345

```

<210> 9
 <211> 345
 <212> PRT
 <213> Nocardia farcinica

 <400> 9

5

```

Met Arg His Gly Asp Ile Ser Ser Ser Pro Asp Thr Val Gly Val Ala
1      5      10
Val Val Asn Tyr Lys Met Pro Arg Leu His Thr Lys Ala Glu Val Leu
20      25      30
Asp Asn Cys Arg Arg Ile Ala Asp Met Leu Val Gly Met Lys Ser Gly
35      40      45
Leu Pro Gly Met Asp Leu Val Val Phe Pro Glu Tyr Ser Thr Gln Gly
50      55      60
Ile Met Tyr Asp Glu Gln Glu Met Tyr Asp Thr Ala Ala Thr Val Pro
65      70      75      80
Gly Glu Glu Thr Ala Ile Phe Ser Ala Ala Cys Arg Glu Ala Gly Val
85      90      95
Trp Gly Val Phe Ser Ile Thr Gly Glu Gln His Glu Asp His Pro Arg
100     105     110
Lys Pro Pro Tyr Asn Thr Leu Val Leu Ile Asp Asp His Gly Glu Ile
115     120     125
Val Gln Lys Tyr Arg Lys Ile Leu Pro Trp Cys Pro Ile Glu Gly Trp
130     135     140
Tyr Pro Gly Asp Thr Thr Tyr Val Thr Glu Gly Pro Lys Gly Leu Lys
145     150     155     160
Ile Ser Leu Ile Val Cys Asp Asp Gly Asn Tyr Pro Glu Ile Trp Arg
165     170     175
Asp Cys Ala Met Lys Gly Ala Glu Leu Ile Val Arg Cys Gln Gly Tyr
180     185     190
Met Tyr Pro Ser Lys Asp Gln Gln Val Leu Met Ala Lys Ala Met Ala
195     200     205
Trp Ala Asn Asn Cys Tyr Val Ala Val Ala Asn Ala Ala Gly Phe Asp
210     215     220
Gly Val Tyr Ser Tyr Phe Gly His Ser Ala Leu Ile Gly Phe Asp Gly
225     230     235     240
Arg Thr Leu Gly Glu Thr Gly Glu Glu Glu Tyr Gly Ile Gln Tyr Ala
245     250     255
Gln Leu Ser Ile Ser Ala Ile Arg Asp Ala Arg Ala His Asp Gln Ser
260     265     270
Gln Asn His Leu Phe Lys Leu Leu His Arg Gly Tyr Ser Gly Val His
275     280     285
Ala Ala Gly Asp Gly Asp Arg Gly Val Ala Asp Cys Pro Phe Glu Phe
290     295     300
Tyr Lys Leu Trp Val Thr Asp Ala Gln Gln Ala Arg Glu Arg Val Glu
305     310     315     320
Ala Ile Thr Arg Asp Thr Val Gly Val Ala Asp Cys Arg Val Gly Ser
325     330     335
Leu Pro Val Glu Gln Thr Leu Glu Ala
340     345

```

<210> 10
 <211> 346
 <212> PRT
 <213> Pseudomonas aeruginosa
 <400> 10

5


```

Met Arg His Gly Asp Ile Ser Ser Ser Asn Asp Thr Val Gly Val Ala
 1      5      10      15
Val Val Asn Tyr Lys Met Pro Arg Leu His Thr Ala Ala Glu Val Leu
 20      25      30
Asp Asn Ala Arg Lys Ile Ala Glu Met Ile Val Gly Met Lys Gln Gly
 35      40      45
Leu Pro Gly Met Asp Leu Val Val Phe Pro Glu Tyr Ser Leu Gln Gly
 50      55      60
Ile Met Tyr Asp Pro Ala Glu Met Met Glu Thr Ala Val Ala Ile Pro
 65      70      75      80
Gly Glu Glu Thr Glu Ile Phe Ser Arg Ala Cys Arg Lys Ala Asn Val
 85      90      95
Trp Gly Val Phe Ser Leu Thr Gly Glu Arg His Glu Glu His Pro Arg
 100     105     110
Lys Ala Pro Tyr Asn Thr Leu Val Leu Ile Asp Asn Asn Gly Glu Ile
 115     120     125
Val Gln Lys Tyr Arg Lys Ile Ile Pro Trp Cys Pro Ile Glu Gly Trp
 130     135     140
Tyr Pro Gly Gly Gln Thr Tyr Val Ser Glu Gly Pro Lys Gly Met Lys
 145     150     155     160
Ile Ser Leu Ile Ile Cys Asp Asp Gly Asn Tyr Pro Glu Ile Trp Arg
 165     170     175
Asp Cys Ala Met Lys Gly Ala Glu Leu Ile Val Arg Cys Gln Gly Tyr
 180     185     190
Met Tyr Pro Ala Lys Asp Gln Gln Val Met Met Ala Lys Ala Met Ala
 195     200     205
Trp Ala Asn Asn Cys Tyr Val Ala Val Ala Asn Ala Ala Gly Phe Asp
 210     215     220
Gly Val Tyr Ser Tyr Phe Gly His Ser Ala Ile Ile Gly Phe Asp Gly
 225     230     235     240
Arg Thr Leu Gly Glu Cys Gly Glu Glu Glu Met Gly Ile Gln Tyr Ala
 245     250     255
Gln Leu Ser Leu Ser Gln Ile Arg Asp Ala Arg Ala Asn Asp Gln Ser
 260     265     270
Gln Asn His Leu Phe Lys Ile Leu His Arg Gly Tyr Ser Gly Leu Gln
 275     280     285
Ala Ser Gly Asp Gly Asp Arg Gly Leu Ala Glu Cys Pro Phe Glu Phe
 290     295     300
Tyr Arg Thr Trp Val Thr Asp Ala Glu Lys Ala Arg Glu Asn Val Glu
 305     310     315     320
Arg Leu Thr Arg Ser Thr Thr Gly Val Ala Gln Cys Pro Val Gly Arg
 325     330     335
Leu Pro Tyr Glu Gly Leu Glu Lys Glu Ala
 340     345

```

<210> 11
 <211> 339
 <212> PRT
 <213> Helicobacter pylori

5

<400> 11

```

Met Arg His Gly Asp Ile Ser Ser Ser Pro Asp Thr Val Gly Val Ala
 1      5      10
Val Val Asn Tyr Lys Met Pro Arg Leu His Thr Lys Asn Glu Val Leu
 20
Glu Asn Cys Arg Asn Ile Ala Lys Val Ile Gly Gly Val Lys Gln Gly
 35      40      45
Leu Pro Gly Leu Asp Leu Ile Phe Pro Glu Tyr Ser Thr His Gly
 50      55      60
Ile Met Tyr Asp Arg Gln Glu Met Phe Asp Thr Ala Ala Ser Val Pro
 65      70      75      80
Gly Glu Glu Thr Ala Ile Leu Ala Glu Ala Cys Lys Lys Asn Lys Val
 85      90      95

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

Pro Thr Lys

```

<210> 12
 <211> 339
 <212> PRT
 <213> Helicobacter pylori
 <400> 12

5

Met Arg His Gly Asp Ile Ser Ser Ser Pro Asp Thr Val Gly Val Ala
 1 5 10 15
 Val Val Asn Tyr Lys Met Pro Arg Leu His Thr Lys Asn Glu Val Leu
 20 25 30
 Glu Asn Cys Arg Asn Ile Ala Lys Val Ile Gly Gly Val Lys Gln Gly
 35 40 45
 Leu Pro Gly Leu Asp Leu Ile Ile Phe Pro Glu Tyr Ser Thr His Gly
 50 55 60
 Ile Met Tyr Asp Arg Gln Glu Met Phe Asp Thr Ala Ala Ser Val Pro
 65 70 75 80
 Gly Glu Glu Thr Ala Ile Phe Ala Glu Ala Cys Lys Lys Asn Lys Val
 85 90 95
 Trp Gly Val Phe Ser Leu Thr Gly Glu Lys His Glu Gln Ala Lys Lys
 100 105 110
 Asn Pro Tyr Asn Thr Leu Ile Leu Val Asn Asp Lys Gly Glu Ile Val
 115 120 125
 Gln Lys Tyr Arg Lys Ile Leu Pro Trp Cys Pro Ile Glu Cys Trp Tyr
 130 135 140
 Pro Gly Asp Lys Thr Tyr Val Val Asp Gly Pro Lys Gly Leu Lys Val
 145 150 155 160
 Ser Leu Ile Ile Cys Asp Asp Gly Asn Tyr Pro Glu Ile Trp Arg Asp
 165 170 175
 Cys Ala Met Arg Gly Ala Glu Leu Ile Val Arg Cys Gln Gly Tyr Met
 180 185 190
 Tyr Pro Ala Lys Glu Gln Gln Ile Ala Ile Val Lys Ala Met Ala Trp

195 200 205
 Ala Asn Gln Cys Tyr Val Ala Val Ala Asn Ala Thr Gly Phe Asp Gly
 210 215 220
 Val Tyr Ser Tyr Phe Gly His Ser Ser Ile Ile Gly Phe Asp Gly His
 225 230 235 240
 Thr Leu Gly Glu Cys Gly Glu Glu Glu Asn Gly Leu Gln Tyr Ala Gln
 245 250 255
 Leu Ser Val Gln Gln Ile Arg Asp Ala Arg Lys Tyr Asp Gln Ser Gln
 260 265 270
 Asn Gln Leu Phe Lys Leu Leu His Arg Gly Tyr Ser Gly Val Phe Ala
 275 280 285
 Ser Gly Asp Gly Asp Lys Gly Val Ala Glu Cys Pro Phe Glu Phe Tyr
 290 295 300
 Lys Thr Trp Val Asn Asp Pro Lys Lys Ala Gln Glu Asn Val Glu Lys
 305 310 315 320
 Ile Thr Arg Pro Ser Val Gly Val Ala Ala Cys Pro Val Gly Asp Leu
 325 330 335
 Pro Thr Lys

<210> 13
 <211> 346
 <212> PRT
 <213> Pseudomonas aeruginosa

5

<400> 13

Met Arg His Gly Asp Ile Ser Ser Ser Asn Asp Thr Val Gly Val Ala
 1 5 10 15
 Val Val Asn Tyr Lys Met Pro Arg Leu His Thr Ala Ala Glu Val Leu
 20 25 30
 Asp Asn Ala Arg Lys Ile Ala Asp Met Ile Val Gly Met Lys Gln Gly
 35 40 45
 Leu Pro Gly Met Asp Leu Val Val Phe Pro Glu Tyr Ser Leu Gln Gly
 50 55 60
 Ile Met Tyr Asp Pro Ala Glu Met Met Glu Thr Ala Val Ala Ile Pro
 65 70 75 80
 Gly Glu Glu Thr Glu Ile Phe Ser Arg Ala Cys Arg Lys Ala Asn Val
 85 90 95
 Trp Gly Val Phe Ser Leu Thr Gly Glu Arg His Glu Glu His Pro Arg
 100 105 110
 Lys Ala Pro Tyr Asn Thr Leu Val Leu Ile Asp Asn Asn Gly Glu Ile
 115 120 125
 Val Gln Lys Tyr Arg Lys Ile Ile Pro Trp Cys Pro Ile Glu Gly Trp
 130 135 140
 Tyr Pro Gly Gly Gln Thr Tyr Val Ser Glu Gly Pro Lys Gly Met Lys
 145 150 155 160
 Ile Ser Leu Ile Ile Cys Asp Asp Pro Asn Tyr Pro Glu Ile Trp Arg
 165 170 175
 Asp Cys Ala Met Lys Gly Ala Glu Leu Ile Val Arg Cys Gln Gly Tyr
 180 185 190
 Met Tyr Pro Ala Lys Asp Gln Gln Val Met Met Ala Lys Ala Met Ala
 195 200 205
 Trp Ala Asn Asn Cys Tyr Val Ala Val Ala Asn Ala Ala Gly Phe Asp
 210 215 220
 Gly Val Tyr Ser Tyr Phe Gly His Ser Ala Ile Ile Gly Phe Asp Gly
 225 230 235 240
 Arg Thr Leu Gly Glu Cys Gly Glu Glu Glu Met Gly Ile Gln Tyr Ala
 245 250 255
 Gln Leu Ser Leu Ser Gln Ile Arg Asp Ala Arg Ala Asn Asp Gln Ser
 260 265 270
 Gln Asn His Leu Phe Lys Ile Leu His Arg Gly Tyr Ser Gly Leu Gln
 275 280 285
 Ala Ser Gly Asp Gly Asp Arg Gly Leu Ala Glu Cys Pro Phe Glu Phe
 290 295 300

 Tyr Arg Thr Trp Val Thr Asp Ala Glu Lys Ala Arg Asp Asn Val Glu
 305 310 315 320
 Arg Leu Thr Arg Ser Thr Thr Gly Val Ala Gln Cys Pro Val Gly Arg
 325 330 335
 Leu Pro Tyr Glu Gly Leu Glu Lys Glu Ala
 340 345

REIVINDICACIONES

1. Método para retardar un proceso de desarrollo de una planta que comprende exponer a una planta o parte de una planta a una o más bacterias, en el que la una o más bacterias se seleccionan entre el grupo que comprende *Rhodococcus spp.*, *Brevibacterium ketoglutamicum* y sus mezclas, y en la que la una o más bacterias se exponen a la planta o parte de la planta en una cantidad suficiente para retardar el proceso de desarrollo de una planta.
2. Método, según la reivindicación 1, en el que la una o más bacterias incluye *Rhodococcus spp.*, opcionalmente en el que el *Rhodococcus spp.*, incluye la cepa de *Rhodococcus rhodochrous* DAP 96253, la cepa de *Rhodococcus sp.* DAP 96622, *Rhodococcus erythropolis* o sus mezclas.
3. Método, según la reivindicación 1, en el que la una o más bacterias son inducidas mediante exposición a un agente inductor seleccionado entre el grupo que comprende asparagina, glutamina, cobalto, urea y sus mezclas.
4. Método, según la reivindicación 1, en el que la planta o parte de la planta es expuesta indirecta o directamente a dichas una o más bacterias.
5. Método, según la reivindicación 1, en el que el proceso de desarrollo de una planta es maduración de frutas, maduración de verduras o abscisión de hojas.
6. Método, según la reivindicación 1, en el que la parte de la planta es una fruta, una verdura o una flor; opcionalmente, en el que la fruta es una fruta climatérica, opcionalmente en el que la fruta climatérica se selecciona entre grupo que comprende plátanos, melocotones, ciruelas, nectarinas, manzanas, tomates, peras y aguacates.
7. Método, según la reivindicación 1, en el que la parte de la planta es una flor y el proceso de desarrollo de una planta es senescencia floral, marchitamiento, abscisión o cierre de los pétalos, opcionalmente en el que la flor es un clavel, rosa, orquídea, verdolaga, malva o begonia.
8. Método, según la reivindicación 1, en el que el retardo del proceso de desarrollo de una planta da como resultado un mayor periodo de conservación o facilita el transporte a mayor distancia de la planta o parte de la planta.
9. Método, según la reivindicación 1, en el que la una o más bacterias se inmovilizan y se colocan en, se colocan sobre o se fijan a una estructura física.
10. Aparato para retardar un proceso de desarrollo de una planta que comprende múltiples capas, en el que, como mínimo, una capa comprende un catalizador que comprende una o más bacterias seleccionadas entre el grupo que comprende *Rhodococcus spp.*, *Pseudomonas chloroaphis*, *Brevibacterium ketoglutamicum* y sus mezclas, en el que el catalizador se coloca en, se coloca sobre, o se fija a una estructura física, tal como una película, lámina, capa de recubrimiento, caja, bolsita, bolsa o cámara ranurada, y en el que la una o más bacterias se proporcionan en una cantidad suficiente para retardar el proceso de desarrollo de una planta.
11. Aparato, según la reivindicación 10, en el que la una o más bacterias se inmovilizan en una matriz que comprende DEAE-celulosa reticulada, una matriz que comprende alginato, una matriz que comprende carragenanos, una matriz que comprende poliacrilamida o perlas de alginato cálcico.
12. Aparato para retardar un proceso de desarrollo de una planta, según la reivindicación 10, en el que el aparato es un aparato catalizador permeable al aire para retardar un proceso de desarrollo de una planta y comprende:
una primera capa; y
una segunda capa que incluye un catalizador que comprende una o más bacterias seleccionadas entre el grupo que comprende *Rhodococcus spp.*, *Pseudomonas chloroaphis*, *Brevibacterium ketoglutamicum* y sus mezclas, en el que dichas una o más bacterias se proporcionan en una cantidad suficiente para retardar el proceso de desarrollo de una planta;
en el que la primera capa proporciona integridad estructural al aparato.
13. Método para retardar un proceso de desarrollo de una planta que comprende exponer a una planta o parte de una planta a una o más bacterias, en el que las una o más bacterias son *Pseudomonas chloroaphis* que han sido inducidas mediante exposición a un agente inductor seleccionado entre el grupo que comprende asparagina, glutamina, cobalto, urea y sus mezclas, y en el que las una o más bacterias se exponen a la planta o parte de la planta en una cantidad suficiente para retardar el proceso de desarrollo de una planta.
14. Método, según la reivindicación 1 ó 13, en el que exposición a o la provisión de las una o más bacterias incluye exposición a o provisión de células bacterianas intactas, lisados de células bacterianas o extractos bacterianos que poseen actividad enzimática.





