

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 400 360**

51 Int. Cl.:

C12P 13/02 (2006.01)

C12N 9/78 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.03.2005 E 05715626 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.12.2012 EP 1730291**

54 Título: **Nitrilo hidratasa procedente de rhodococcus**

30 Prioridad:

20.03.2004 DE 102004013824

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

09.04.2013

73 Titular/es:

**EVONIK DEGUSSA GMBH (100.0%)
Rellinghauser Strasse 1-11
45128 Essen, DE**

72 Inventor/es:

**OSSWALD, STEFFEN;
VERSECK, STEFAN;
DEITING, UTA;
WECKBECKER, CHRISTOPH;
HUTHMACHER, KLAUS;
BINDER, MICHAEL;
KULA, MARIA-REGINA y
ODENDAHL, KONRAD**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 400 360 T3

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

DESCRIPCIÓN

Nitrilo hidratasa procedente de *Rhodococcus*

5 El invento se refiere a un racimo de polinucleótidos procedente de *Rhodococcus*, que codifica unos polipéptidos con la actividad de una nitrilo hidratasa, a una proteína auxiliadora P15K, que activa a esta enzima, y a unas secuencias de nucleótidos, que codifican un transportador de cobalto, a unos microorganismos transformados con ellas, en los que las secuencias de nucleótidos que codifican estas proteínas se presentan de manera reforzada, y a la utilización de los microorganismos transformados para la preparación de amidas a partir de nitrilos.

10 Las nitrilo hidratatas ya se describieron en gran número en la bibliografía (Synthetic applications of nitrileconverting enzymes [Aplicaciones sintéticas de enzimas convertidoras de nitrilos]; Martinkova, Ludmila; Mylerova, Veronika; Current Organic Chemistry (2003), 7(13), 1279-1295). Ya desde 1983 se emplean nitrilo hidratatas para la preparación de acrilamida a la escala de varios miles de toneladas por año. Este procedimiento biocatalítico se ha acreditado como competitivo en comparación con los procedimientos químicos (Enzymic synthesis of acrylamide: a success story not yet over [Síntesis enzimática de acrilamida: una historia exitosa que no ha acabado todavía]; Kobayashi, Michihiko; Nagasawa, Toru; Yamada, Trends in Biotechnology (1992), 10(11), 402-8).

20 Junto a las nitrilo hidratatas, que se pueden emplear para la conversión química de acrilonitrilo, se describieron p.ej. también aquellas que son especialmente adecuadas para la conversión química de metacrilonitrilo (A nitrile hydratase of *Pseudonocardia thermophila* and the genes encoding and manufacture of the enzyme for conversion of nitriles to amides [Una nitrilo hidratasa de *Pseudonocardia thermophila* y los genes que la codifican, y la manipulación de la enzima para la conversión de nitrilos en amidas] (documento de patente europea EP 790310), de 3-cianopiridina (Process for producing amides with *Rhodococcus* nitrile hydratase [Un procedimiento para producir amidas con la nitrilo hidratasa de *Rhodococcus*], (documento de solicitud de patente internacional WO 2002055670) o de 2-hidroxinitrilos tales como el 2-hidroxi-4-metiltio-butironitrilo (A nitrile hydratase of *Rhodococcus* and its use in the manufacture of amides [Una nitrilo hidratasa de *Rhodococcus* y su uso en la preparación de amidas] (documento WO 2002070717) and Enzymic conversion of α -hydroxynitriles to the corresponding α -hydroxyamides, acids or acid salts [Y la conversión enzimática de α -hidroxinitrilos para dar las correspondientes α -hidroxiamidas, ácidos o sales de ácidos] (documento WO 9832872). En contraposición a esto, hasta ahora no se conoce en absoluto ninguna nitrilo hidratasa, con cuya ayuda se puedan convertir químicamente de una manera efectiva los 2-aminonitrilos. La nitrilo hidratasa procedente de *Rhodococcus* sp. Cr4 convierte químicamente p.ej. a los 2-hidroxinitrilos con una alta actividad, pero no en absoluto a un sencillo 2-aminonitrilo tal como el aminoacetónitrilo (documento WO 2002070717).

35 La conversión enzimática de aminonitrilos en las correspondientes amidas abre una atractiva ruta de síntesis para dar aminoácidos, puesto que las 2-aminoamidas pueden ser saponificadas de un modo sencillo (documento WO 2001060789). Este proceso transcurre en condiciones moderadas, con una selectividad muy alta y sin la formación de productos secundarios tales como unas sales, como las que resultan en el caso de la hidrólisis química.

40 Alternativamente, ciertas amidas se pueden hacer reaccionar también con hidróxidos de metales alcalinos o alcalino-térreos para dar las correspondientes sales de los ácidos. Se prefiere especialmente este modo de proceder en el caso del empleo del hidróxido de calcio para la conversión química de la 4-metiltio- α -hidroxibutiramida (amida de MHA); puesto que la sal de calcio del MHA se puede emplear directamente como una forma de producto alternativa a la metionina o al MHA como aditivo para piensos.

50 Para la preparación de un producto comercial, tal como p.ej. la DL-metionina, no es suficiente, sin embargo, poner a disposición un catalizador con una alta actividad. Para el aumento de la actividad se debe de establecer un sistema de expresión para los genes que deben de ser reforzados. Para esto se aconseja la expresión heteróloga p.ej. sobre todo en el seno de *Escherichia coli*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Pichia*, *Sacharomyces* o *Aspergillus*, puesto que estos microorganismos poseen un rápido crecimiento, alcanzan unas muy altas densidades celulares y están disponibles unas herramientas de biología molecular que permiten un muy alto nivel de expresión (Lee SY (1996) High cell-density culture of *Escherichia coli* [Cultivo con alta densidad celular de *Escherichia coli*] TIBTECH 14:98-105; Riesenber D, Guthke R (1999) High-cell-density cultivation of microorganisms [Cultivación con alta densidad celular de microorganismos]. Appl Microbiol Biotechnol 51:422-430).

60 Es conocido el hecho de que para la expresión heteróloga de unas nitrilo hidratatas deben de ser expresados concomitantemente por lo menos 3 genes. Junto a los dos genes estructurales, además de esto, debe de ser reforzada una correspondiente proteína auxiliadora tanto para las enzimas que dependen del hierro como también para las enzimas que dependen del cobalto (Nojiri M. y colaboradores, (1999) Functional expression of Nitrile hydratases in *Escherichia coli*: Requirement of a nitrile hydratase activator and a post-translational modification of a ligand cysteine [Expresión funcional de nitrilo hidratatas en *Escherichia coli*: Necesidad de un activador de la nitrilo hidratasa y modificación después de la traducción de un ligando de cisteína]. J. Biochem 125: 696-704, y Overproduction of stereoselective nitrile hydratase from *Pseudomonas putida* 5B in *Escherichia coli*: activity requires a novel downstream protein [Sobreproducción de una nitrilo hidratasa estereoselectiva procedente de

65

Pseudomonas putida 5B en *E. coli*: la actividad requiere una nueva proteína corriente abajo], Wu, S.; Fallon, R. D.; Payne, M. S. *Applied Microbiology and Biotechnology* (1997), 48(6), 704-708).

5 Adicionalmente a estos 3 genes, en *Rhodococcus rhodochrous* J1, en un racimo de genes, junto a los genes
estructurales y al gen de la proteína auxiliadora, se encontró otro gen que codifica un transportador de cobalto (A
novel transporter involved in cobalt uptake [Un nuevo transportador que participa en la absorción de cobalto],
Kameda, Hidenobu y colaboradores, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of
America* [Actas de la Academia Nacional de Ciencias de los Estados Unidos de América](1997), 94(1), 36-41). Tanto
10 la sobreexpresión en *Rhodococcus* como también la expresión concomitante en *E. coli* dan lugar a una absorción
aumentada de iones de Co^{2+} a partir del medio de cultivo. Además de esto, se pudo mostrar que en el caso de la
expresión concomitante del transportador de cobalto en común con las otras 3 proteínas se puede conseguir la
misma actividad de nitrilo hidratasa en el caso de una concentración más baja de Co en el medio, en comparación
15 con la expresión a solas de los genes estructurales y de la proteína auxiliadora. No obstante, este efecto aparece en
Rhodococcus, de acuerdo con Kameda y colaboradores, solamente en el caso de unas concentraciones situadas
por debajo de 42 μM .

A partir del documento EP 0 362 829 se conoce la fermentación de *Rhodococcus rhodochrous* en presencia de sales
de cobalto.

20 Es una misión del invento hacer accesibles unas nitrilo hidratasas con una alta actividad, que en particular
conviertan químicamente a los α -aminonitrilos en amidas.

El invento comprende los siguientes objetos:

25 1. Un racimo aislado de polinucleótidos procedentes de *Rhodococcus opacus*, que contiene cuatro secuencias de
nucleótidos, que codifican cuatro polipéptidos con unas secuencias de aminoácidos, que son idénticas en cada caso
en por lo menos un 90 % con las secuencias de aminoácidos contenidas en las secuencias SEQ ID NO:2 hasta SEQ
ID NO:4 y SEQ ID NO:6, poseyendo los polipéptidos las actividades de una nitrilo hidratasa, que se compone de
30 unas subunidades α y β , de la proteína auxiliadora P15K y de un transportador de cobalto.

2. Unos polinucleótidos de acuerdo con 1., escogidos entre el conjunto que se compone de

35 a) un polinucleótido, que se compone de las posiciones 1 hasta 708 de la secuencia de nucleótidos SEQ ID
NO:1 o de la secuencia de nucleótidos complementaria con ésta,

b) un polinucleótido con una secuencia de nucleótidos, que corresponde a la secuencia procedente de a)
dentro del marco de la degeneración del código genético,

40 c) un polinucleótido, que se hibrida en condiciones rigurosas con las secuencias complementarias a) o b),
abarcando las condiciones rigurosas el lavado en 0,1 x SSC a una temperatura de 50-68°C y

d) un polinucleótido con una secuencia de nucleótidos procedente de a), b) o c), que contiene unas
mutaciones con sentido neutras en su función,

45 codificando los polinucleótidos la subunidad β de la nitrilo hidratasa.

3. Unos polinucleótidos de acuerdo con 1., escogidos entre el conjunto que se compone de:

50 a) un polinucleótido, que se compone de las posiciones 710 hasta 1.327 de la secuencia de nucleótidos
SEQ ID NO:1 o de la secuencia de nucleótidos complementaria con ésta,

b) un polinucleótido con una secuencia de nucleótidos, que corresponde a la secuencia procedente de a)
dentro del marco de la degeneración del código genético,

55 c) un polinucleótido, que se hibrida en condiciones rigurosas con las secuencias complementarias a) o b),
abarcando las condiciones rigurosas el lavado en 0,1 x SSC a una temperatura de 50-68°C y

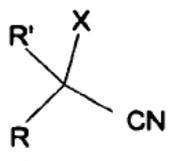
d) un polinucleótido con una secuencia de nucleótidos procedente de a), b) o c), que contiene unas
mutaciones con sentido neutras en su función,

60 codificando los polinucleótidos la subunidad α de la nitrilo hidratasa.

4. Un polipéptido de acuerdo con 1., que contiene las secuencias de aminoácidos, que son idénticas por lo menos
en un 90 % a las SEQ ID NO:2 y SEQ ID NO:3, teniendo el polipéptido la actividad de una nitrilo hidratasa.

65

5. Una sonda o un cebador, que contiene por lo menos 20 nucleótidos consecutivos dentro de las posiciones 1 hasta 1.327 de la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO:1 o de su forma complementaria.
6. Un polinucleótido aislado de acuerdo con 2), que se hibrida en condiciones rigurosas con el complemento que tiene las posiciones 1 hasta 708 de la SEQ ID NO:1, abarcando las condiciones rigurosas el lavado en 0,1 x SSC a una temperatura de 50 a 68°C.
7. Un polinucleótido aislado de acuerdo con 4), que se hibrida en condiciones rigurosas con el complemento que tiene las posiciones 710 hasta 1.327 de la SEQ ID NO:1, abarcando las condiciones rigurosas el lavado en 0,1 x SSC a una temperatura de 50 a 68°C.
8. Unos vectores que contienen un(os) polinucleótido(s) escogidos entre 1) hasta 3) y 6) hasta 7).
9. El vector pUD15, que se compone de la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO:24.
10. El vector pUD16, que se compone de la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO:25.
11. Una célula anfitriona, transformada o transfectada mediante la introducción de un polinucleótido de acuerdo con 1).
12. Una célula anfitriona, transformada mediante la introducción de un vector de acuerdo con 8) hasta 10).
13. Una célula anfitriona transformada de acuerdo con 11) o 12), siendo la célula anfitriona una bacteria de la familia de las Enterobacteriaceae, en particular Escherichia coli.
14. Un procedimiento para la preparación de amidas a partir de nitrilos con unas nitrilo hidratasa procedentes de Rhodococcus o de unos microorganismos que contienen esta enzima, en el que
- a) un microorganismo transformado, que contiene unos genes sobreexpresados con las secuencias de nucleótidos escogidas entre las de las reivindicaciones 1 hasta 3 y 6, 7, se fermenta en presencia de 0,15 a 4 mM de Co^{2+} , en unas condiciones, que dan lugar a la formación de la nitrilo hidratasa,
 - b) esta enzima se deja enriquecerse en el microorganismo, y
 - c) esta enzima se aísla a partir de las células, o
 - d) se cosechan los microorganismos y se obtienen unas células en reposo, que contienen la enzima, y
 - e) la enzima o los microorganismos que la contienen se hacen reaccionar con los compuestos de las fórmulas generales



(I)

40 y

R''-CN

(II)

45 en las que significan:

- X:** OH, H, alquilo con 1 hasta 4 átomos de C, en particular NH_2 ;
- R:** H, un radical alquilo saturado con 1 a 12 átomos de C, ramificado o sin ramificar, eventualmente sustituido con NH_2 , radicales alqueno con 1 a 12 átomos de C, ramificados o sin ramificar, o grupos cicloalquilo con 3 a 6 átomos de C,
- R':** H, alquilo con 1 a 3 átomos de C,
- R'':** un anillo insaturado de uno o dos núcleos, con 6 a 12 átomos de C, eventualmente sustituido con uno o dos grupos alquilo de $\text{C}_1 - \text{C}_3$, Cl, Br o F, un radical alquil-nitrilo monovalente con 1 a 6 átomos de C,
- 55 para dar las correspondientes amidas.

15. Un procedimiento de acuerdo con 14), caracterizado porque se emplean unas células anfitrionas de acuerdo con las reivindicaciones 11 hasta 13.

5 16. Una nitrilo hidratasa recombinante producida de acuerdo con 14) con el origen de *Rhodococcus opacus*, que convierte químicamente a α -aminonitrilos con una actividad específica de >50 U/mg de biomasa seca.

Un ADN de vector se puede introducir en células eucarióticas o procarióticas mediante unas conocidas técnicas de transformación o transfección.

10 Los conceptos de "transformación", "transfección", "conjugación" y "transducción" se refieren a unas medidas técnicas conocidas a partir del estado de la técnica, con el fin de introducir ADN ajenos.

15 Asimismo, son un objeto del invento unos polinucleótidos, que se componen esencialmente de una secuencia de polinucleótidos, y que son obtenibles por escrutinio mediante una hibridación de un correspondiente banco genómico de *Rhodococcus opacus*, que contiene el gen completo o partes de éste, con una sonda, que contiene las secuencias de los polinucleótidos conformes al invento procedentes de la SEQ ID NO:1 o unos fragmentos de ésta, y un aislamiento de la mencionada secuencia de polinucleótidos.

20 Los polinucleótidos, que contienen las secuencias de acuerdo con el invento, son adecuados como sondas de hibridación para un ARN, un ADNc (cromosomal) y un ADN, con el fin de aislar unos ácidos nucleicos o respectivamente polinucleótidos o unos genes en su plena longitud, que codifican las proteínas conformes al invento, o con el fin de aislar aquellos ácidos nucleicos o respectivamente polinucleótidos o genes, que tienen una alta similaridad de las secuencias con las de los genes conformes al invento. Ellos se pueden aplicar asimismo como una sonda sobre unos denominados conjuntos (en inglés "arrays"), micro conjuntos (en inglés "micro arrays") o chips de ADN (en inglés "DNA chips"), con el fin de detectar y determinar los correspondientes polinucleótidos o unas secuencias derivadas de éstos, tales como p.ej. un ARN o un ADNc.

30 Los polinucleótidos, que contienen las secuencias de acuerdo con el invento, son adecuados además como unos cebadores, con cuya ayuda, por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, acrónimo de Polymerase Chain Reaction) se puede producir unos ADN de genes, que codifican las proteínas conformes al invento.

35 Aquellos oligonucleótidos, que sirven como sondas o cebadores, contienen por lo menos 25 ó 30, de manera preferida por lo menos 20, de manera muy especialmente preferida por lo menos 15 nucleótidos consecutivos. Asimismo, son adecuados unos oligonucleótidos con una longitud de por lo menos 40 ó 50 nucleótidos. Eventualmente también se adecuan unos oligonucleótidos con una longitud de por lo menos 100, 150, 200, 250 ó 300 nucleótidos.

40 El concepto de "aislado" significa separado a partir de su entorno natural.

El concepto de "polinucleótido" se refiere por lo general a unos polirribonucleótidos y polidesoxirribonucleótidos, pudiendo tratarse de unos ARN o ADN no modificados o de unos ARN o ADN modificados.

45 Los polinucleótidos conformes al invento incluyen unos polinucleótidos de acuerdo con la SEQ ID NO:1 y también aquéllos, que son idénticos por lo menos en un 90 %, 93 %, 95 %, 97 % o 99 % con los polinucleótidos de acuerdo con la SEQ ID NO:1.

50 Por el concepto de "polipéptidos" se entienden unos péptidos o unas proteínas, que contienen dos o más aminoácidos unidos a través de enlaces peptídicos.

Los polipéptidos de acuerdo con el invento incluyen unos polipéptidos de acuerdo con las secuencias SEQ ID NO:2 hasta SEQ ID NO:4 y SEQ ID NO:6, y también aquéllos, que son idénticos por lo menos en un 90 %, y de manera especialmente preferida por lo menos en un 91 %, 95 %, 97 % o 99 % con los polipéptidos de acuerdo con las secuencias SEQ ID NO:2 hasta SEQ ID NO:4 y SEQ ID NO: 6.

55 El polinucleótido de la SEQ ID NO:1 contiene varias secuencias individuales, que codifican diferentes proteínas. Las secuencias para la subunidad α y para la proteína auxiliadora P15K se solapan.

60 Los genes, que codifican las subunidades α y β de la nitrilo hidratasa, deben de ser expresados en común, con el fin de obtener una proteína activa.

La SEQ ID NO:2 reproduce la secuencia de aminoácidos de la subunidad β y la SEQ ID NO:3 reproduce la de la subunidad α de la proteína, que muestra una actividad de nitrilo hidratasa.

65 La SEQ ID NO:2 se deriva de las posiciones 1 hasta 708 y la SEQ ID NO:3 se deriva de las posiciones 710 hasta 1.327 de la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO:1.

La secuencia de aminoácidos de la denominada proteína auxiliadora P15K se encuentra en la SEQ ID NO:6, correspondientemente a las posiciones 1.324 hasta 1.737 en la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO:1.

5 La proteína auxiliadora activa a la nitrilo hidratasa y debe de estar presente en común con esta enzima en el microorganismo que produce la nitrilo hidratasa.

La SEQ ID NO:4 representa la secuencia de aminoácidos del transportador de cobalto y se deriva de las posiciones 2.076 hasta 3.146 de la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO:1.

10 El codón iniciador ttg en la SEQ ID NO:4 es traducido por el programa PatentIN versión 3.1 como leucina, y el codón iniciador gtg en la SEQ ID NO:6 es traducido como valina. Correctamente debe quererse decir metionina.

15 Se encontró que mediante una expresión concomitante del transportador de cobalto, la actividad de la nitrilo hidratasa en *E. coli* es aumentada en un múltiplo. Esto es válido también cuando se utilizan unas altas concentraciones de cobalto en el medio, que están situadas en algunos órdenes de magnitud por encima de las concentraciones que se presentan en la naturaleza. Sorprendentemente, la expresión concomitante del transportador de cobalto no da lugar a una contaminación del organismo sino solamente a una sensibilidad ligeramente aumentada de las células frente a unas altas concentraciones de cobalto en el medio.

20 Para el aislamiento del racimo de genes conforme al invento se establece por lo general primeramente un banco genómico de este microorganismo en *Escherichia coli* (*E. coli*). El establecimiento de bancos genómicos se ha descrito en unos libros de texto y manuales generalmente conocidos. Como ejemplos de ellos se citarán el libro de texto de Winnacker: *Gene und Klone, Eine Einführung in die Gentechnologie* (Genes y clones, una introducción a la tecnología genética) (editorial Verlag Chemie, Weinheim, Alemania, 1990), o el manual de Sambrook y colaboradores: *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (Clonación molecular, un manual de laboratorio) (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989). Un banco genómico muy conocido es el de la cepa W3110 de *E. coli* K-12, que fue establecido por Kohara y colaboradores (*Cell* 50, 495-508 (1987) en vectores λ . Bathe y colaboradores (*Molecular and General Genetics* (Genética molecular y general), 252:255-265, 1996) describen un banco genómico de *C. glutamicum* ATCC13032, que se estableció con la ayuda del vector cosmídico SuperCos I (Wahl y colaboradores, 1987, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 84:2160-2164) en la cepa NM554de *E. coli* K-12 (Raleigh y colaboradores, 1988, *Nucleic Acids Research* 16: 1563-1575).

35 Para la producción de un banco genómico en *E. coli* se pueden utilizar también unos plásmidos tales como el pBR322 (Bolívar, *Life Sciences* [Ciencias de la vida], 25, 807-818 (1979)) o pUC9 (Vieira y colaboradores, 1982, *Gene* [Genes], 19:259-268). Como anfitriones se adecuan especialmente aquellas cepas de *E. coli*, que son defectuosas en la restricción y la recombinación. Un ejemplo de ellas es la cepa DH5 α mcr, que fue descrita por Grant y colaboradores (*Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 87 (1990) 4645-4649). Los fragmentos de ADN largos clonados con ayuda de cósmidos se pueden subclonar a continuación, por su parte, en unos vectores habituales, que son adecuados para la secuenciación, y seguidamente se pueden secuenciar, tal como se describe p.ej. en la cita de Sanger y colaboradores (*Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74:5463-5467, 1977).

45 Las secuencias de ADN obtenidas se pueden investigar entonces con unos algoritmos conocidos o respectivamente con unos programas de análisis de secuencias tales como p.ej. el de Staden (*Nucleic Acids Research* [Investigación de ácidos nucleicos] 14, 217-232(1986), el de Marck (*Nucleic Acids Research* 16, 1829-1836 (1988) o el programa GCG de Butler (*Methods of Biochemical Analysis* [Métodos de análisis bioquímicos] 39, 74-97 (1998)).

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

65 Finalmente, constituyen una parte componente del invento unas secuencias de ADN, que se producen por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) mediando utilización de unos cebadores, que se establecen a partir de la SEQ ID NO: 1. Tales oligonucleótidos tienen típicamente una longitud de por lo menos 15 nucleótidos.

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

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

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

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

Se ha acreditado como ventajoso expresar el gen que codifica el transportador de cobalto en menor extensión, por ejemplo, con un vector que tiene un número más bajo de copias - por lo menos una copia menos - que las secuencias de polinucleótidos que codifican las subunidades α y β y la proteína auxiliadora P15K. La diversa expresión de los mencionados genes se puede conseguir también mediante la utilización de unos promotores diversamente fuertes.

Los nucleótidos que codifican las subunidades α y β y la proteína auxiliadora se presentan de manera preferida en común en un vector, con un promotor común o con dos promotores separados.

Los microorganismos transformados o recombinantes, producidos de esta manera, son asimismo una parte constituyente del invento.

Se encontró que el refuerzo de los genes, que codifican la nitrilo hidratasa, la proteína auxiliadora P15K y el transportador de cobalto en microorganismos, conducen a una producción aumentada de la nitrilo hidratasa o también a una actividad aumentada de la nitrilo hidratasa.

El concepto de "refuerzo" describe en este contexto el aumento de la actividad intracelular en un microorganismo de una o varias enzimas, que es (son) codificada(s) por el correspondiente ADN, mediante el recurso de que, por ejemplo, se aumenta el número de copias del gen o respectivamente de los genes, de que se utiliza un promotor fuerte o de que se utiliza un gen, que codifica una correspondiente enzima con una alta actividad, y eventualmente se combinan estas medidas técnicas.

Para la consecución de una sobreexpresión se puede mutar la región de promotor y de regulación o el sitio de fijación a ribosomas, que se encuentra situada/o secuencia arriba del gen estructural. De igual manera, actúan unas casetes de expresión, que son incorporadas secuencia arriba del gen estructural. Por medio de unos promotores inducibles es adicionalmente posible aumentar la expresión en el transcurso de la producción de aminoácidos por

fermentación. Mediante unas medidas técnicas destinadas a la prolongación de la duración de vida útil del ARN-m (mensajero) se mejora asimismo la expresión.

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

10 Mediante las medidas técnicas de refuerzo, en particular una sobreexpresión, se aumenta la actividad o la concentración de la correspondiente proteína por lo general por lo menos en un 10 %, 25 %, 50 %, 75 %, 100 %, 150 %, 200 %, 300 %, 400 % o 500 %, como máximo hasta 1.000 % o 2.000 %, referido a la proteína de tipo silvestre o respectivamente a la actividad o la concentración de la proteína en unos microorganismos no transformados con las secuencias de nucleótidos conformes al invento.

15 Otro objeto del invento es la puesta a disposición de unos vectores replicables por lo general autónomamente en las cepas anfitrionas escogidas, los cuales son compatibles entre sí y contienen por lo menos unas secuencias de nucleótidos de acuerdo con las reivindicaciones 2, 3 y 4, o una secuencia de nucleótidos de acuerdo con la reivindicación 4.

20 Un vector de ADN se puede introducir en células eucarióticas o procarióticas mediante unas conocidas técnicas de transformación.

25 Como organismo anfitrión sirven de manera preferida unos microorganismos, para los que existen unos sistemas de expresión, tales como p.ej. Pseudomonas, Pichia, diferentes levaduras, Saccaromyces, Aspergillus o la familia de Streptomyces, en particular E coli. Los microorganismos del género Rhodococcus son asimismo adecuados.

30 Un objeto del invento es asimismo un procedimiento para la producción de la nitrilo hidratasa procedente de Rhodococcus, en particular de Rhodococcus opacus o de unos microorganismos que contienen esta enzima, en el que

35 a) se fermenta un microorganismo transformado, que contiene unos genes sobreexpresados con las secuencias de nucleótidos de acuerdo con las reivindicaciones 1 hasta 4, en presencia de 0,15 a 4 mM (mmol/l) de Co^{2+} , en particular de 0,3 a 4 mM, en unas condiciones, que dan lugar a la formación de la nitrilo hidratasa,

b) se deja enriquecerse esta enzima en el microorganismo, y

40 c) se aísla esta enzima a partir de las células, o

d) se cosechan los microorganismos y se obtienen como unas células en reposo que contienen la enzima.

45 La nitrilo hidratasa producida por medios recombinantes convierte químicamente a α -aminonitrilos con una actividad de > 50 U/mg de la biomasa seca.

De manera preferida, se fermenta en presencia de 0,5 a 3,5 mM de Co^{2+} , en particular de 0,7 a 3 mM, que se añade al caldo de fermentación de manera preferida como una sal soluble.

50 Los microorganismos utilizados conforme al invento se pueden cultivar de una manera continua o discontinua en el procedimiento batch (cultivación por tandas) o en el procedimiento fed batch (procedimiento de afluencia) o en el procedimiento fed batch repeated (procedimiento de afluencia repetida). Una recopilación acerca de métodos conocidos de cultivación se encuentra en el libro de texto de Chmiel (Bioprozeßtechnik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik [Técnica de bioprocesos 1. Introducción en la técnica de los bioprocesos] (editorial Gustav Fischer, Stuttgart, 1991)) o en el libro de texto de Storhas (Bioreaktoren und periphere Einrichtungen [Biorreactores y disposiciones periféricas] (editorial Vieweg, Braunschweig/Wiesbaden, 1994)).

55 El medio de cultivo que se ha de utilizar debe de satisfacer de un modo adecuado los respectivos requisitos establecidos por las respectivas cepas. Unas descripciones de medios de cultivo de diversos microorganismos están contenidas en el manual de métodos de bacteriología general "Manual of Methods for General Bacteriology" de la American Society for Bacteriology [Sociedad americana de bacteriología (Washington D. C., EE.UU., 1981).

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

5 Como fuente de nitrógeno se pueden utilizar unos compuestos que contienen nitrógeno, tales como peptonas, un extracto de levadura, un extracto de carne, un extracto de malta, agua de maceración de maíz, harina de soja y urea, y/u compuestos inorgánicos tales como sulfato de amonio, cloruro de amonio, fosfato de amonio, carbonato de amonio y nitrato de amonio. Las fuentes de nitrógeno se pueden utilizar individualmente o como una mezcla.

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

15 Para realizar el control del valor del pH del cultivo se emplean de un modo adecuado unos compuestos de carácter básico tales como hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, amoníaco o respectivamente agua amoniacal, o unos compuestos de carácter ácido tales como ácido fosfórico o ácido sulfúrico. Para realizar la represión del desarrollo de espuma se pueden emplear unos agentes antiespumantes tales como p.ej. ésteres de poliglicoles con ácidos grasos. Con el fin de mantener la estabilidad de los plásmidos, se pueden añadir al medio
20 unas adecuadas sustancias que actúan selectivamente tales como p.ej. antibióticos. Con el fin de mantener unas condiciones aerobias, se introduce(n) en el cultivo oxígeno o unas mezclas gaseosas que contienen oxígeno, tales como p.ej. aire. La temperatura del cultivo se sitúa normalmente en 10°C hasta 40°C y de manera preferida en 10°C hasta 30°C. Se prosigue el tratamiento del cultivo por lo menos durante tanto tiempo hasta que él haya sobrepasado la fase de crecimiento logarítmico. Este objetivo se alcanza normalmente en el transcurso de 10
25 horas hasta 70 horas.

Asimismo es objeto del invento un procedimiento para la producción enzimática de amidas a partir de nitrilos, que contiene las siguientes etapas:

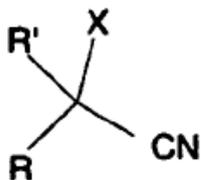
- 30 a) la reacción de un compuesto que contiene grupos nitrilo con una enzima procedente de Rhodococcus, en particular de Rhodococcus opacus, que tiene la actividad de nitrilo hidratasa, y
b) eventualmente la separación de la amida.

35 En una variante del procedimiento, las células se cosechan, se lavan y se recogen en un tampón como una suspensión a un valor del pH de 5-9, en particular de 6,8 a 7,9. La concentración celular de las células en reposo es por regla general de 1 - 25 %, en particular de 1,5 a 15 % (peso en húmedo/v). Ellas se pueden permeabilizar con métodos físicos o químicos, p.ej. con tolueno tal como se describe en la cita de Wilms y colaboradores, J. Biotechnol., tomo 86 (2001), 19 - 30, de tal manera que los compuestos de nitrilo que deben de ser transformados
40 atraviesen la pared celular y pueda salir la amida resultante.

El biocatalizador (catalizador de células enteras) muestra una sobresaliente estabilidad, de tal manera que se pueden alcanzar unas concentraciones del producto situadas por encima de 100 g/l.

45 También es posible separar la nitrilo hidratasa conforme al invento a partir de las células según unos métodos conocidos, eventualmente purificarla y emplearla para la conversión química de los nitrilos.

Objeto del invento es también un procedimiento, que está caracterizado porque se hacen reaccionar unos compuestos de las fórmulas generales



(I)

50 R"-CN (II)

en las que significan:

55 X: OH, H, alquilo con 1 a 4 átomos de C, en particular NH₂;

ES 2 400 360 T3

- R:** H, un radical alquilo saturado con 1 a 12 átomos de C, ramificado o sin ramificar, eventualmente sustituido con NH₂, radicales alqueno con 1 a 12 átomos de C, ramificados o sin ramificar, grupos cicloalquilo con 3 a 6 átomos de C, radicales alqueno sustituidos con grupos alquilo, correspondiendo el alquilo aquí a un radical de C₁ a C₃ y el alqueno a un radical divalente de C₃ a C₈,
- R':** H, alquilo con 1 a 3 átomos de C,
- R'':** un anillo aromático de uno o dos núcleos, con 6 a 12 átomos de C, eventualmente sustituido con uno o dos grupos alquilo de C₁ - C₃ ó Cl ó F, un radical alquil-nitrilo con 1 a 6 átomos de C.

para dar las correspondientes amidas.

Los siguientes nitrilos se hacen reaccionar de manera preferida:

mononitrilos saturados:

acetonitrilo, propionitrilo, butironitrilo, isobutironitrilo, valeronitrilo, isovaleronitrilo, capronitrilo

dinitrilos saturados:

malononitrilo, succinonitrilo, glutaronitrilo, adiponitrilo

mono- y dinitrilos aromáticos, sin sustituir y sustituidos:

benzonitrilo, 2,6-difluoro-benzonitrilo, ftalonitrilo, isoftalonitrilo, tereftalonitrilo,

α -amino-nitrilos:

α -amino-propionitrilo, α -aminometil-butironitrilo, α -amino-butironitrilo, amino-acetonitrilo, todos los nitrilos que se derivan de aminoácidos naturales, α -amino-3,3-dimetil-propionitrilo, α -amino-2,3-dimetil-propionitrilo

nitrilos con grupos carboxilo:

ácido cianoacético

β -amino-nitrilos:

3-amino-propionitrilo

nitrilos insaturados:

acrilonitrilo, metacrilonitrilo, cianuro de alilo, crotononitrilo

α -hidroxi-nitrilos:

α -hidroxi-n-propionitrilo, α -hidroxi-n-butironitrilo, α -hidroxi-isobutironitrilo, α -hidroxi-n-hexanonitrilo, α -hidroxi-n-heptanonitrilo, α -hidroxi-n-octanonitrilo, α,γ -dihidroxi- β,β -dimetil-butironitrilo, la cianhidrina de acroleína, la cianhidrina de metacrilaldehído, 3-cloro-lactonitrilo, 4-metiltio- α -hidroxibutironitrilo y α -hidroxifenil-propionitrilo.

La concentración de los nitrilos que deben ser convertidos químicamente en la solución de reacción no está restringida a determinados intervalos.

Con el fin de evitar una inhibición de la actividad enzimática por medio del sustrato, la concentración del nitrilo se mantiene por lo general en 0,001 hasta 10 p/p% (= % en peso/peso), en particular en 0,1 hasta 2 p/p%, referida a la cantidad del biocatalizador como masa celular secada. El sustrato se puede añadir al comienzo de la reacción en su totalidad o en el transcurso de la reacción de una manera continua o discontinua.

Cuando la solubilidad del compuesto de nitrilo en el sistema acuoso de reacción sea demasiado pequeña, se puede añadir un agente solubilizante.

Sin embargo, la reacción se puede llevar a cabo alternativamente también en un sistema bifásico de agua y un disolvente orgánico.

En el caso de la utilización de células del microorganismo como un material activo enzimáticamente, la cantidad de las células empleadas en relación con la cantidad del sustrato es de manera preferida de 0,001 a 8 p/p% como masa celular secada.

El peso en seco de la masa celular se determina con un Moisture Analyser MA45 (de Sartorius).

También es posible inmovilizar a la enzima aislada según unas técnicas conocidas por lo general, y emplearla luego en esta forma.

La reacción se lleva a cabo por lo general a unas temperaturas de -5°C a 50°C, en particular de 0°C a 30°C, y durante un período de tiempo de 0,1 a 100 horas.

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

Asimismo, es objeto del invento un procedimiento, en el que la amida o respectivamente la solución que contiene la amida, se separa, p.ej., con respecto de las células de la biomasa, y la amida o bien se saponifica para dar el correspondiente ácido, o se convierte químicamente mediando adición de hidróxidos de metales alcalinos o alcalinotérreos, en las correspondientes sales de los ácidos. De manera preferida, la amida de MHA se saponifica con hidróxido de calcio y se aísla la correspondiente sal de calcio.

Ejemplos

Ejemplo 1

Clonación de la nitrilo hidratasa procedente de *Rhodococcus opacus*

Un ADN cromosomal de *Rhodococcus opacus* se digirió con las enzimas de restricción *PinAI*, *PstI* y *XmaI* (de Roche) y los fragmentos se separaron sobre un gel de agarosa al 0,8 %. Se llevó a cabo una transferencia de borrón de Southern según los métodos clásicos (p.ej. en Sambrook y colaboradores: *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) sobre una membrana cargada positivamente de nilón (Hybond-N+, de Amersham). La hibridación se efectuó con una sonda marcada con DIG según las instrucciones del fabricante (Roche). La sonda se produjo mediante una PCR con los cebadores degenerados 1F y 1R con un ADN genómico como molde. Los cebadores se habían derivado de regiones homólogas de la subunidad β , que se determinaron mediante una alineación de secuencias de diversas NHAsas. Sus secuencias se obtuvieron a partir de unos bancos de datos. Para el aislamiento de un fragmento de *PinAI* detectado con un tamaño de aproximadamente 2,2 kb (kilobases), unos fragmentos de ADN cortados con *PinAI* con un tamaño comprendido entre 2 y 2,5 kb se purificaron mediante una electroforesis en gel preparativa, se ligaron dentro del vector pUC18 (de Promega) cortado con *XmaI* y la tanda de ligación se transformó en el seno de *E. coli* JM 109 (de Promega). Unos transformantes positivos se identificaron mediante una hibridación de colonias con la misma sonda. Los clones obtenidos de esta manera contenían una inserción de 2.206 nt (nucleótidos) con el gen de la subunidad β y con la mayor parte del gen de la subunidad α de la nitrilo hidratasa.

Para la secuencia ausente, con el método arriba descrito, se preparó con los cebadores 2F y 2R una nueva sonda, que se hibrida junto al extremo 3' del fragmento clonado de *PinAI*. Como molde sirvió el fragmento de *PinAI* clonado en pUC18. Antes de la hibridación con esta sonda, desde la membrana más arriba descrita se eliminaron primeramente las señales cromáticas así como la primera sonda según las instrucciones del fabricante (Roche). Sobre esta membrana, con la segunda sonda se detectó una banda de *PstI* con un tamaño de 2 kb. Tal como se ha descrito más arriba, se clonó el correspondiente fragmento de ADN en el vector pUC18 abierto con *PstI*, el producto se transformó en el seno de *E. coli* JM109 y unos clones positivos se identificaron a través de una hibridación de colonias. El fragmento de *PstI* tiene un tamaño de 1.883 nt y contiene una parte (en 3') del gen de la subunidad α de la nitrilo hidratasa, el gen de la proteína auxiliadora P15K y una parte (en 5') del gen del transportador de cobalto.

Con el fin de clonar un fragmento de ADN con la secuencia ausente del gen del transportador de cobalto, con los cebadores 3F y 3R y con el fragmento de *PstI* clonado en pUC18 como molde se produjo una sonda, que se hibrida junto al extremo 3' del fragmento clonado de *PstI*. Con esta sonda, sobre la misma membrana, desde la que se habían eliminado por su parte unas señales cromáticas y la segunda sonda, se detectó una banda de *XmaI* con un tamaño de aproximadamente 1,7 kb. El correspondiente fragmento de ADN se clonó en el vector pUC18 abierto con *XmaI*, el producto se transformó en el seno de *E. coli* JM109 y los clones positivos se identificaron a través de una hibridación de colonias. Para esto, se empleó una sonda, que había sido amplificada con los cebadores 4F y 3R. El fragmento de *XmaI* tiene un tamaño de 1.747 nt y contiene una parte (en 3'-) del gen del transportador de cobalto.

La secuencia continua del racimo de genes, que contiene los polinucleótidos que codifican las subunidades α y β de la nitrilo hidratasa, de la proteína auxiliadora P15K y del transportador de cobalto, se reproduce en la SEQ ID NO:1.

Ejemplo 2

Construcción de los vectores de expresión

Los genes estructurales se clonaron en un conocido vector de expresión para *E. coli*, en el que los genes introducidos se encuentran bajo del control de un promotor de ramnosa. Adicionalmente, se introdujo un segundo promotor de ramnosa. El gen para la subunidad β -UE se amplificó para esto con los cebadores 5F y 5R, que introdujeron los sitios de corte para las enzimas de restricción *NdeI*, *BamHI* y *HindIII*. El segundo promotor de ramnosa se amplificó con los cebadores 6F y 6R, que introdujeron los sitios de corte para las enzimas de restricción *BamHI*, *NcoI*, y *HindIII*. El gen para la subunidad α -UE se amplificó con los cebadores 7F y 7R, que introdujeron los sitios de corte para las enzimas de restricción *NcoI*, *KpnI* y *HindIII*. El gen para la proteína P15K se amplificó con los

ES 2 400 360 T3

cebadores 8F y 8R, que introdujeron los sitios de corte para las enzimas de restricción KpnI y HindIII, y que modificaron el codón iniciador de GTG a ATG. El vector de expresión, que resultó de esta manera, se llama pUD 15.

El mapa de restricción se encuentra en la Figura 1, y la secuencia bajo la SEQ ID NO:24.

El gen para el transportador de cobalto se clonó en otro vector de expresión para *E. coli*, en el que los genes introducidos están también bajo el control del promotor de ramnosa. Para esto, él se amplificó con los cebadores 9F y 9R, que introdujeron los sitios de corte para las enzimas de restricción NdeI y HindIII, y que modificaron el codón iniciador de TTG a ATG. El vector de expresión, que resultó de esta manera, se llama pUD 16.

El mapa de restricción se encuentra en la Figura 2, y la secuencia bajo la SEQ ID NO:25.

Los plásmidos de expresión se transformaron en el seno de la cepa *E. coli* DSM 14459, que se ha presentado en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Colección alemana de microorganismos y cultivos celulares) (DSMZ).

Cebador:

1F	5'-ATG AAY GGH ATY TTC GA-3'
1R	5'-ATC CAG TGY YHG TAG TA-3'
2F	5'-CGA AGA CAT GAT CGT CGT G-3'
2R	5'-ACC GGT CCC ACA CCG A-3'
3F	5'-TCG AGG AGA TCG GAG G-3'
3R	5'-GTA TCG AAG GTG CTC ATC-3'
4F	5'-CGC GGG CTG GGT GAA-3'
5F	5'-CGG CGG AAT TCA AGA AGG AGA CCC GCA TAT GAA CGG-3'
5R	5'-GGT GCA AGC TTGGAT CCT GTC AGA TTC CTC GAG TAG-3'
6F	5'-GCG AAG GAT CCT GCA TGC ATC GAA ATT AAT ACG-3'
6R	5'-CAT CAA GCT TTT CGC CAT GGC TAT ATC TCC TTC-3'
7F	5'-CTG ACA GGA TCC AAG AAG GAG ATA TAG CCA TGG CCG A-3'
7R	5'-GTT GCA AGC TTG GTA CCG CTC AAG ACA TCG CCT CCC T-3'
8F	5'-GTG GGT ACC AAG AAG GAG GCG ATC ATA TGA GCA CGC-3'
8R	5'-GCG GAC GAG TAG CGA AGC TTG TTA GTT CAC CG-3'
9F	5'-TCA AAG CTT GAA GGA GAT ATA CAT ATG ACG ATT ACT-3'
9R	5'-GTC AAG CTT GGT ACC GAC ATC TCA CAC CTT CGA-3'

Los genes se encuentran en los segmentos:

pUD15: gen de la subunidad β : nt 25 - 732
gen de la subunidad α : nt 949 - 1.566
gen de la P15K: nt 1.592 - 2.005

pUD16: gen del transportador de cobalto: nt 25 - 1.095

Ejemplo 3

Expresión heteróloga de la nitrilo hidratasa en *E. coli* DSM 14559

La cepa DSM 14559 se depositó en conexión con el documento de patente alemana DE 101 55 928.

Las células transformadas con el pUD15 se cultivaron en un medio LB (LB Bouillon según Miller, VWR), que contenía 1 mM de CoCl_2 y 100 $\mu\text{g/ml}$ de ampicilina, mediando sacudimiento a 37°C. La cultivación para las células transformadas con pUD15 y pUD16 se llevó a cabo análogamente, el medio contenía, no obstante, adicionalmente

50 µg/ml de cloramfenicol. Las células se sobreinocularon después de esto todavía 3 veces más en el mismo medio, después de que ellas hubieren alcanzado por lo menos una OD₆₀₀ (densidad óptica a 600 nm) de 2. Después de 12 - 16 horas se sobreinoculó tanta cantidad del cultivo previo en un cultivo principal, tal que éste tuviese una OD₆₀₀ de 0,1. El medio de cultivación del cultivo principal correspondía al del cultivo previo, pero contenía adicionalmente 2 g/l de L-ramnosa. La cosecha de las células se efectuó después de una cultivación durante 22 horas.

Ejemplo 4

Determinación de las actividades enzimáticas

Las células se cultivaron tal como se ha descrito en el Ejemplo 3, se separaron mediante una centrifugación con respecto del medio de cultivo y se resuspendieron en el tampón patrón (un tampón de fosfato de potasio 50 mM, de pH 7,5). 50 µl de esta suspensión de células se añadieron a 700 µl del tampón clásico y, para la iniciación de la reacción, se mezclaron con 250 µl de una solución 200 mM del nitrilo en el tampón patrón. La concentración de las células en la suspensión celular se había de dimensionar en este caso de tal manera que, después de 10 min a 20°C, el nitrilo hubiese sido convertido químicamente en un 5 - 30 %. Después de 10 min a 20°C, se interrumpió la reacción mediante la adición de 20 µl de un ácido fosfórico semiconcentrado y las células se separaron mediante centrifugación.

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

La actividad de una unidad (U) se define como la cantidad de la enzima, que convierte químicamente en un minuto a 1 µmol del nitrilo de N-formil-valina en la amida. La actividad específica se indica en U por mg de biomasa seca (U/mg de BTM).

Ésta se mide con el Moisture Analyser modelo MA45 (de Sartorius).

Ejemplo 5

Expresión concomitante de los genes que codifican la subunidad α y la subunidad β de la nitrilo hidratasa y la proteína p15K.

La expresión se llevó a cabo tal como se ha descrito en el Ejemplo 3 con la cepa de E. coli DSM 14459 transformada, que contiene el plásmido pUD15. La actividad específica de las células fue de 23 U/mg de BTM.

Ejemplo 6

Expresión concomitante de los genes que codifican la subunidad α y la subunidad β de la nitrilo hidratasa, la proteína p15K y el transportador de cobalto.

La expresión se llevó a cabo tal como se ha descrito en el Ejemplo 3 con la cepa de E. coli DSM 14459 transformada, que contiene los plásmidos pUD15 y pUD16. La actividad específica de las células fue de 81 U/mg de BTM.

Ejemplo 7

Especificidad para el substrato

Se convirtieron químicamente diversos nitrilos análogamente al Ejemplo 3 con células transformadas en reposo de la cepa de E. coli DSM 14459, que contiene el plásmido pUD15. La actividad específica, que se obtuvo con el nitrilo de N-formil-valina, se estableció como igual a 100 %. Las otras actividades se indicaron con relación a ésta. Los resultados se reproducen en la Figura 3.

Ejemplo 8

Crecimiento de la cepa E. coli DSM 14459 transformada en presencia de sales de Co²⁺.

Las células transformadas de la cepa E. coli DSM 14459, que o bien contienen solamente el plásmido pUD15 o pUD15 y pUD16, se cultivaron tal como se ha descrito en el Ejemplo 3. La concentración de cobalto en el medio se hizo variar en este caso de 0,5 a 2 mM. Después de 24 horas se midió la densidad óptica del cultivo a 600 nm.

	E. coli con pUD15	E. coli con pUD15 y pUD16
CoCl ₂ 0,5 mM	2,808	2,524
CoCl ₂ 1,0 mM	2,6955	2,173
CoCl ₂ 2,0 mM	2,330	2,113

5 Se pone de manifiesto que también en el caso de unas altas concentraciones de cobalto solamente se puede comprobar una pequeña influencia sobre el crecimiento de las células.

10 Ejemplo 9

Reacción del nitrilo de metionina con células en reposo transformadas de E. coli DSM 14459, que contienen el plásmido pUD15.

15 Unas células de E. coli DSM 14459, que contienen el plásmido pUD15, se cultivaron y se separaron por centrifugación tal como se ha descrito en el Ejemplo 3. 2,8 g de las células, referido al peso en húmedo, se resuspendieron en 47,2 ml de un tampón de fosfato de potasio 50 mM, de pH 7,5, y se añadió el nitrilo de metionina a 20°C mediando agitación enérgica, de una manera continua con una velocidad tal que la concentración durante la
 20 de la reacción se llevó a cabo mediante una HPLC (cromatografía en fase líquida de alto rendimiento) tal como se ha descrito en el Ejemplo 4. Después de 320 min habían reaccionado totalmente 9,1 g del nitrilo para dar 10,4 g de la amida. Esto corresponde a una concentración de 176 g/l.

Breve descripción de las Figuras

25 Figura 1

Plásmido pUD15

30 rhaP promotor de ramnosa
 beta gen de la subunidad β de la nitrilo hidratasa
 alpha gen de la subunidad α de la nitrilo hidratasa
 P15K gen de la proteína auxiliadora P15K
 ori origen de la replicación
 35 bla gen para la resistencia a ampicilina (β-lactamasa)

Figura 2

Plásmido pUD16

40 rhaP promotor de ramnosa
 CoTrans gen del transportador de cobalto
 ori origen de la replicación
 Cmr gen para la resistencia a cloramfenicol

45 Figura 3

Actividad específica relativa en el caso de la conversión química de diversos nitrilos en comparación con la actividad en el caso de la conversión química del nitrilo de N-formil-valina.

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Degussa AG
- 5 <120> Nitrilo hidratasa de Rhodococcus opacus
- <130> 040069 BT
- <160> 25
- 10 <170> PatentIn version 3.1
- <210> 1
- <211> 3.146
- 15 <212> ADN
- <213> Rhodococcus opacus
- <220>
- <221> CDS
- 20 <222> (1)..(708)
- <223>
- <220>
- <221> CDS
- 25 <222> (710)..(1.327)
- <223>
- <220>
- <221> CDS
- 30 <222> (2.076)..(3.146)
- <223>
- <400> 1

```

atg aac ggc atc ttc gat cta ggc gga acc gac ggc atg ggg ccg gtc
48
Met Asn Gly Ile Phe Asp Leu Gly Gly Thr Asp Gly Met Gly Pro Val
1           5           10           15

gac aac gac aaa ggc acc gag ccg gtg ttc cgc tca gcg tgg gaa aag
96
Asp Asn Asp Lys Gly Thr Glu Pro Val Phe Arg Ser Ala Trp Glu Lys
20           25           30

gcc gcc ttc tcg atg ttc gca caa ggc gcc cga gct ggc ctc tac aac
144
Ala Ala Phe Ser Met Phe Ala Gln Gly Ala Arg Ala Gly Leu Tyr Asn
35           40           45

atc gac gag ttc cgg cac tgc gtc gag cag atg gac ccc gcc gag tat
192
Ile Asp Glu Phe Arg His Cys Val Glu Gln Met Asp Pro Ala Glu Tyr
50           55           60

tta cta tcg aac tac tac gag cac tgg acg cat gcc gtc gaa cac ttc
240
Leu Leu Ser Asn Tyr Tyr Glu His Trp Thr His Ala Val Glu His Phe
65           70           75           80

```

ES 2 400 360 T3

gcc cag caa aag aac ctc atc aca gcg gca gag ctc gaa aag cgc acg
 288
 Ala Gln Gln Lys Asn Leu Ile Thr Ala Ala Glu Leu Glu Lys Arg Thr
 85 90 95

cat ttc tac cgg gat aac cca gaa gcc ccc ctt ccg gag cgc aag gac
 336
 His Phe Tyr Arg Asp Asn Pro Glu Ala Pro Leu Pro Glu Arg Lys Asp
 100 105 110

cca gag ctc ctc gac ttc gtg aac acc gcg atc gcg aac ggt ttc gcg
 384
 Pro Glu Leu Leu Asp Phe Val Asn Thr Ala Ile Ala Asn Gly Phe Ala
 115 120 125

gcc tcc cgt gaa acc aat agg tcg gca gca ttc acc atc ggc gac cag
 432
 Ala Ser Arg Glu Thr Asn Arg Ser Ala Ala Phe Thr Ile Gly Asp Gln
 130 135 140

gta ctg att gct gcg gac agt cca ttc gga cac acc cga cgg gcc ggc
 480
 Val Leu Ile Ala Ala Asp Ser Pro Phe Gly His Thr Arg Arg Ala Gly
 145 150 155 160

tac atc cgc ggt aag acc gga gtc atc acc gcg aca cac ggc gcc tac
 528
 Tyr Ile Arg Gly Lys Thr Gly Val Ile Thr Ala Thr His Gly Ala Tyr
 165 170 175

gtc tat ccc gac acc gcc ggt aac ggg ctc ggt gag tgc cca gag cac
 576
 Val Tyr Pro Asp Thr Ala Gly Asn Gly Leu Gly Glu Cys Pro Glu His
 180 185 190

gtc tac acc gtg aag ttc acc gcc acc gaa ctt tgg ggc gaa cag agc
 624
 Val Tyr Thr Val Lys Phe Thr Ala Thr Glu Leu Trp Gly Glu Gln Ser
 195 200 205

ggt gat cgc cac agc acc gtc tat ttc gat gtc tgg gaa ccg tac ctc
 672
 Gly Asp Arg His Ser Thr Val Tyr Phe Asp Val Trp Glu Pro Tyr Leu
 210 215 220

tcg ctc gct acc gca ccc tct act cga gga atc tga c atg gcc gaa cag
 721
 Ser Leu Ala Thr Ala Pro Ser Thr Arg Gly Ile Met Ala Glu Gln
 225 230 235

cgc acc gac acc caa ttg cgt aca cac gaa gaa gtc gtc gcc cga gtc
 769
 Arg Thr Asp Thr Gln Leu Arg Thr His Glu Glu Val Val Ala Arg Val
 240 245 250 255

aag gcg ctc gag gcg ctg ctg atc gag aaa ggc gtc atg acg acc gag
 817
 Lys Ala Leu Glu Ala Leu Leu Ile Glu Lys Gly Val Met Thr Thr Glu
 260 265 270

ES 2 400 360 T3

gcc gtc gac cgg atg gcc gag gta tac gag aac gaa gtc ggc ccc cag
 865
 Ala Val Asp Arg Met Ala Glu Val Tyr Glu Asn Glu Val Gly Pro Gln
 275 280 285

atc ggc gct cag att gtc gcc aag gcg tgg acc gac ccg aag ttc aag
 913
 Ile Gly Ala Gln Ile Val Ala Lys Ala Trp Thr Asp Pro Lys Phe Lys
 290 295 300

aag agg ttg ctg gcc aat gcc acg act gcc tgc gca gag atg ggc tac
 961
 Lys Arg Leu Leu Ala Asn Ala Thr Thr Ala Cys Ala Glu Met Gly Tyr
 305 310 315

ggc ggt ctg cag ggc gaa gac atg atc gtc gtg gaa aac acc gac acc
 1009
 Gly Gly Leu Gln Gly Glu Asp Met Ile Val Val Glu Asn Thr Asp Thr
 320 325 330 335

gta cac aac gcg att gtg tgc acc ctc tgc tcc tgc tac ccg tgg ccg
 1057
 Val His Asn Ala Ile Val Cys Thr Leu Cys Ser Cys Tyr Pro Trp Pro
 340 345 350

gtc ttg ggc ctg cca ccg aac tgg tac aag gca ccg gct tac cgc gca
 1105
 Val Leu Gly Leu Pro Pro Asn Trp Tyr Lys Ala Pro Ala Tyr Arg Ala
 355 360 365

cgg atc gtg cgc gaa ccg ccg aag gtc ctc gcc gag gac ttc gac ttt
 1153
 Arg Ile Val Arg Glu Pro Arg Lys Val Leu Ala Glu Asp Phe Asp Phe
 370 375 380

ccc atc ccc gac gac gtc gag atc cgc gtg tgg gac tcg agc gcc gag
 1201
 Pro Ile Pro Asp Asp Val Glu Ile Arg Val Trp Asp Ser Ser Ala Glu
 385 390 395

ctg cgc tat tgg gtt tta ccg cag cgc cct gca cac acc gaa aga ttg
 1249
 Leu Arg Tyr Trp Val Leu Pro Gln Arg Pro Ala His Thr Glu Arg Leu
 400 405 410 415

acg gaa tcc gag ctg gta gcg ctg gtc acc cgc gac tcg atg atc ggt
 1297
 Thr Glu Ser Glu Leu Val Ala Leu Val Thr Arg Asp Ser Met Ile Gly
 420 425 430

gtg gga ccg gtg agg gag gcg atg tcg tga gcacgcgcat tgacgcaacc
 1347
 Val Gly Pro Val Arg Glu Ala Met Ser
 435 440

gagctcgggg aagcacgccg gcgaatcgag gcggttggtgt gtgatctgcc cgggtggtgac
 1407

ES 2 400 360 T3

gtaggtcac ggccttcaa cgagccgtgg gaattgcgtg ccttcgcat gcccggtgcc
1467

gtgtatcacc agggctacta cgaatggagt gagtttcagc tctccctgat cgcgtcgatc
1527

cgccactggg agcagggcga gggaaaggag ccgtggagct actacgagca ctggctcaat
1587

gcgctcgagt cggtaactgc cgccagcggc gccttatcgg acgcagtggg cctcgatgag
1647

cgcacgcgcg aagttctcac caccacagg aacacgaacc accaccatgc acatcgcgaa
1707

cccgctcgca tctcatctgc ggtgaactaa cccgcggcgc tactcgtccg ctggccagct
1767

ctctgcctgc tgtccagcga acgacacctc cgtgacagct tctcgttcaac cgacccgatc
1827

actgattccc gacgcgggta ccaacgagca cccgcgtata aacagaaccg caaaggatc
1887

gcagctgctg gggacgagcg aatagcggat cgctcgcggg ggccggacc atgcagctga
1947

tgctgctttc gcccgaaatag cccagatata cactggacga ggtgcgaggc ccgatacaag
2007

gcgagcgtca gcaaccggca aaccacagcg tccagagcca gcaccgtcat gtctagaaga
2067

ggaaagca ttg acg att act acc act tcg cca agg cag atc gcc ggt cgg
2117

Leu Thr Ile Thr Thr Thr Ser Pro Arg Gln Ile Ala Gly Arg
445 450

tgg aca cgt gcc gag cgg caa cga ctg agc gct atc atc ggc acc atc
2165

Trp Thr Arg Ala Glu Arg Gln Arg Leu Ser Ala Ile Ile Gly Thr Ile
455 460 465 470

gca ttg ctg cac gtg cta ggt atc gca atg tat ctc ggg cgc tcg ggt
2213

Ala Leu Leu His Val Leu Gly Ile Ala Met Tyr Leu Gly Arg Ser Gly
475 480 485

aac ccg gcc gcc gct ggt agc ctg gct ggc tcg gga ctg ctc gcc tat
2261

Asn Pro Ala Ala Ala Gly Ser Leu Ala Gly Ser Gly Leu Leu Ala Tyr
490 495 500

gtc ctg ggt gcg cgg cac gcg ttc gat gcc gac cac atc gcg gcc atc
2309

Val Leu Gly Ala Arg His Ala Phe Asp Ala Asp His Ile Ala Ala Ile
505 510 515

ES 2 400 360 T3

gac gac acc acc cgc atc atg ctc ctt cgc gga cgc cga ccc gtc ggc
 2357
 Asp Asp Thr Thr Arg Ile Met Leu Leu Arg Gly Arg Arg Pro Val Gly
 520 525 530

 gtc gga ttc ttt ttc gcc atg ggg cat tcg act gtc gtc ctc gtt ctc
 2405
 Val Gly Phe Phe Phe Ala Met Gly His Ser Thr Val Val Leu Val Leu
 535 540 545 550

 tct ctg atc gtc gct ttc gga cgc ggc tcg ctc agt tcg atg gaa cgc
 2453
 Ser Leu Ile Val Ala Phe Gly Ala Gly Ser Leu Ser Ser Met Glu Ala
 555 560 565

 tcc cgg gtc gag gag atc gga ggt tac gtc cgc acc tgc gtg gca gtg
 2501
 Ser Arg Val Glu Glu Ile Gly Gly Tyr Val Ala Thr Cys Val Ala Val
 570 575 580

 ctg ttc ttg gtg ctg gtg gcc gca ctc aac agt ttc gtt ctg cgc aag
 2549
 Leu Phe Leu Val Leu Val Ala Ala Leu Asn Ser Phe Val Leu Arg Lys
 585 590 595

 ctc ctc gct ctg tct cgt cgg atg cgc act ggg gaa gat atc tcc ggc
 2597
 Leu Leu Ala Leu Ser Arg Arg Met Arg Thr Gly Glu Asp Ile Ser Gly
 600 605 610

 gac ctc gag cgc ggg ctg ggt gaa cgg gga ttg ctc agc tgg ctt ctc
 2645
 Asp Leu Glu Arg Gly Leu Gly Glu Arg Gly Leu Leu Ser Trp Leu Leu
 615 620 625 630

 agc ggc cga ttg cgc ggg ctg att cgt tcg tcc tgg cac atg tac ccg
 2693
 Ser Gly Arg Leu Arg Gly Leu Ile Arg Ser Ser Trp His Met Tyr Pro
 635 640 645

 gtg ggc ctg ctc atg ggt ctc ggc ctg gaa acc gca tcc gaa gtg aca
 2741
 Val Gly Leu Leu Met Gly Leu Gly Leu Glu Thr Ala Ser Glu Val Thr
 650 655 660

 ttg ctg tct ctc act gcc tcc gca gcg agc gga ggt cag cta tcg cta
 2789
 Leu Leu Ser Leu Thr Ala Ser Ala Ala Ser Gly Gly Gln Leu Ser Leu
 665 670 675

 atg gcg att gtg agc ctt cca ttg ttg ttt gcc gcg ggg atg agc acc
 2837
 Met Ala Ile Val Ser Leu Pro Leu Leu Phe Ala Ala Gly Met Ser Thr
 680 685 690

 ttc gat act gca gac tca ctc gtc atg acc cgc gcc tat tcg tgg tcc
 2885
 Phe Asp Thr Ala Asp Ser Leu Val Met Thr Arg Ala Tyr Ser Trp Ser
 695 700 705 710

ES 2 400 360 T3

```

tat aac gat gcc cag cgc cgc ctt cgc ttc aac act gta acc acg ggt
2933
Tyr Asn Asp Ala Gln Arg Arg Leu Arg Phe Asn Thr Val Thr Thr Gly
      715                720                725

gcg acc atg gtc atc ggg ttc ttc gtc gcg gga atc tac gtt tct gga
2981
Ala Thr Met Val Ile Gly Phe Phe Val Ala Gly Ile Tyr Val Ser Gly
      730                735                740

ctg ctt gcg ccg cta cca ggg ttc ggt tgg ctg acc cct ctg ggc gcg
3029
Leu Leu Ala Pro Leu Pro Gly Phe Gly Trp Leu Thr Pro Leu Gly Ala
      745                750                755

atc gcc gac aac ttc gag ttc ctc ggc tac gca gtc gcc gga ttg ttc
3077
Ile Ala Asp Asn Phe Glu Phe Leu Gly Tyr Ala Val Ala Gly Leu Phe
      760                765                770

gtt gct acc tgg gca atc gca gca ctg gtt agc cgg cct cga cgg ctt
3125
Val Ala Thr Trp Ala Ile Ala Ala Leu Val Ser Arg Pro Arg Arg Leu
      775                780                785                790

gtc ggc agc tcg aag gtg tga
3146
Val Gly Ser Ser Lys Val
      795

```

<210> 2

<211> 235

5 <212> PRT

<213> Rhodococcus opacus

<400> 2

```

Met Asn Gly Ile Phe Asp Leu Gly Gly Thr Asp Gly Met Gly Pro Val
1          5          10          15

Asp Asn Asp Lys Gly Thr Glu Pro Val Phe Arg Ser Ala Trp Glu Lys
      20          25          30

Ala Ala Phe Ser Met Phe Ala Gln Gly Ala Arg Ala Gly Leu Tyr Asn
      35          40          45

Ile Asp Glu Phe Arg His Cys Val Glu Gln Met Asp Pro Ala Glu Tyr
      50          55          60

Leu Leu Ser Asn Tyr Tyr Glu His Trp Thr His Ala Val Glu His Phe
      65          70          75          80

```

ES 2 400 360 T3

Ala Gln Gln Lys Asn Leu Ile Thr Ala Ala Glu Leu Glu Lys Arg Thr
 85 90 95

His Phe Tyr Arg Asp Asn Pro Glu Ala Pro Leu Pro Glu Arg Lys Asp
 100 105 110

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

Ala Ser Arg Glu Thr Asn Arg Ser Ala Ala Phe Thr Ile Gly Asp Gln
 130 135 140

Val Leu Ile Ala Ala Asp Ser Pro Phe Gly His Thr Arg Arg Ala Gly
 145 150 155 160

Tyr Ile Arg Gly Lys Thr Gly Val Ile Thr Ala Thr His Gly Ala Tyr
 165 170 175

Val Tyr Pro Asp Thr Ala Gly Asn Gly Leu Gly Glu Cys Pro Glu His
 180 185 190

Val Tyr Thr Val Lys Phe Thr Ala Thr Glu Leu Trp Gly Glu Gln Ser
 195 200 205

Gly Asp Arg His Ser Thr Val Tyr Phe Asp Val Trp Glu Pro Tyr Leu
 210 215 220

Ser Leu Ala Thr Ala Pro Ser Thr Arg Gly Ile
 225 230 235

<210> 3

<211> 205

5 <212> PRT

<213> Rhodococcus opacus

<400> 3

Met Ala Glu Gln Arg Thr Asp Thr Gln Leu Arg Thr His Glu Glu Val
 1 5 10 15

Val Ala Arg Val Lys Ala Leu Glu Ala Leu Leu Ile Glu Lys Gly Val
 20 25 30

Met Thr Thr Glu Ala Val Asp Arg Met Ala Glu Val Tyr Glu Asn Glu
 35 40 45

ES 2 400 360 T3

Val Gly Pro Gln Ile Gly Ala Gln Ile Val Ala Lys Ala Trp Thr Asp
50 55 60

Pro Lys Phe Lys Lys Arg Leu Leu Ala Asn Ala Thr Thr Ala Cys Ala
65 70 75 80

Glu Met Gly Tyr Gly Gly Leu Gln Gly Glu Asp Met Ile Val Val Glu
85 90 95

Asn Thr Asp Thr Val His Asn Ala Ile Val Cys Thr Leu Cys Ser Cys
100 105 110

Tyr Pro Trp Pro Val Leu Gly Leu Pro Pro Asn Trp Tyr Lys Ala Pro
115 120 125

Ala Tyr Arg Ala Arg Ile Val Arg Glu Pro Arg Lys Val Leu Ala Glu
130 135 140

Asp Phe Asp Phe Pro Ile Pro Asp Asp Val Glu Ile Arg Val Trp Asp
145 150 155 160

Ser Ser Ala Glu Leu Arg Tyr Trp Val Leu Pro Gln Arg Pro Ala His
165 170 175

Thr Glu Arg Leu Thr Glu Ser Glu Leu Val Ala Leu Val Thr Arg Asp
180 185 190

Ser Met Ile Gly Val Gly Pro Val Arg Glu Ala Met Ser
195 200 205

<210> 4

<211> 356

5 <212> PRT

<213> Rhodococcus opacus

<400> 4

Leu Thr Ile Thr Thr Thr Ser Pro Arg Gln Ile Ala Gly Arg Trp Thr
1 5 10 15

Arg Ala Glu Arg Gln Arg Leu Ser Ala Ile Ile Gly Thr Ile Ala Leu
20 25 30

Leu His Val Leu Gly Ile Ala Met Tyr Leu Gly Arg Ser Gly Asn Pro
35 40 45

ES 2 400 360 T3

Ala Ala Ala Gly Ser Leu Ala Gly Ser Gly Leu Leu Ala Tyr Val Leu
50 55 60

Gly Ala Arg His Ala Phe Asp Ala Asp His Ile Ala Ala Ile Asp Asp
65 70 75 80

Thr Thr Arg Ile Met Leu Leu Arg Gly Arg Arg Pro Val Gly Val Gly
85 90 95

Phe Phe Phe Ala Met Gly His Ser Thr Val Val Leu Val Leu Ser Leu
100 105 110

Ile Val Ala Phe Gly Ala Gly Ser Leu Ser Ser Met Glu Ala Ser Arg
115 120 125

Val Glu Glu Ile Gly Gly Tyr Val Ala Thr Cys Val Ala Val Leu Phe
130 135 140

Leu Val Leu Val Ala Ala Leu Asn Ser Phe Val Leu Arg Lys Leu Leu
145 150 155 160

Ala Leu Ser Arg Arg Met Arg Thr Gly Glu Asp Ile Ser Gly Asp Leu
165 170 175

Glu Arg Gly Leu Gly Glu Arg Gly Leu Leu Ser Trp Leu Leu Ser Gly
180 185 190

Arg Leu Arg Gly Leu Ile Arg Ser Ser Trp His Met Tyr Pro Val Gly
195 200 205

Leu Leu Met Gly Leu Gly Leu Glu Thr Ala Ser Glu Val Thr Leu Leu
210 215 220

Ser Leu Thr Ala Ser Ala Ala Ser Gly Gly Gln Leu Ser Leu Met Ala
225 230 235 240

Ile Val Ser Leu Pro Leu Leu Phe Ala Ala Gly Met Ser Thr Phe Asp
245 250 255

Thr Ala Asp Ser Leu Val Met Thr Arg Ala Tyr Ser Trp Ser Tyr Asn
260 265 270

Asp Ala Gln Arg Arg Leu Arg Phe Asn Thr Val Thr Thr Gly Ala Thr
275 280 285

ES 2 400 360 T3

Met Val Ile Gly Phe Phe Val Ala Gly Ile Tyr Val Ser Gly Leu Leu
 290 295 300

Ala Pro Leu Pro Gly Phe Gly Trp Leu Thr Pro Leu Gly Ala Ile Ala
 305 310 315 320

Asp Asn Phe Glu Phe Leu Gly Tyr Ala Val Ala Gly Leu Phe Val Ala
 325 330 335

Thr Trp Ala Ile Ala Ala Leu Val Ser Arg Pro Arg Arg Leu Val Gly
 340 345 350

Ser Ser Lys Val
 355

- <210> 5
- <211> 3.146
- 5 <212> ADN
- <213> Rhodococcus opacus
- <220>
- <221> CDS
- 10 <222> (1.324)..(1.737)
- <223>
- <400> 5

atgaacggca tcttcgatct aggcggaacc gacggcatgg ggccggtcga caacgacaaa
 60

ggcaccgagc cgggtgttcg ctcagcgtgg gaaaaggccg ctttctcgat gttcgcacaa
 120

ggcgccccgag ctggcctcta caacatcgac gagttccggc actgcgtcga gcagatggac
 180

cccgccgagt atttactatc gaactactac gagcactgga cgcattccgt cgaacacttc
 240

gcccagcaaa agaacctcat cacagcggca gagctcgaaa agcgcacgca tttctaccgg
 300

gataaccag aagccccct tccggagcgc aaggaccag agctcctcga cttcgtgaac
 360

accgcgatcg cgaacggttt cgcggcctcc cgtgaaacca ataggtcggc agcattcacc
 420

atcggcgacc aggtactgat tgctcgggac agtccattcg gacacaccg acgggcccggc
 480

tacatccgcg gtaagaccgg agtcatcacc gcgacacacg ggcctcagc ctatcccgc
 540

ES 2 400 360 T3

```

accgccgta acgggctcgg tgagtgccca gagcacgtct acaccgtgaa gttcaccgc
600

accgaacttt ggggcgaaca gagcggatgat cgccacagca ccgtctatct cgatgtctg
660

gaaccgtacc tctcgtctgc taccgcaccc tctactcgag gaatctgaca tggccgaac
720

gcgcaccgac acccaattgc gtacacacga agaagtcgtc gcccgagtca aggcgctcg
780

ggcgctgctg atcgagaaag gcgtcatgac gaccgaggcc gtcgaccgga tggccgagg
840

atacgagaac gaagtcggcc ccagatcgg cgctcagatt gtcgccaagg cgtggaccg
900

cccgaagttc aagaagaggt tgctggccaa tgccacgact gcctgcgcag agatgggct
960

cggcggctcg cagggcgaag acatgatcgt cgtggaaaac accgacaccg tacacaacg
1020

gattgtgtgc accctctgct cctgctaccc gtggccggtc ttgggcttgc caccgaact
1080

gtacaaggca ccggcttacc gcgcacggat cgtgcgcgaa ccgcggaagg tcctcgccg
1140

ggacttcgac tttcccatcc ccgacgacgt cgagatccgc gtgtgggact cgagcgccg
1200

gctgcgctat tgggttttac cgcagcgcgc tgccacacacc gaaagattga ccgaatccg
1260

gctggtagcg ctggtcaccc gcgactcgat gatcgggtgtg ggaccggtga gggaggcga
1320

gtc gtc agc acg cgc att gac gca acc gag ctc ggg gaa gca cgc cgg
1368
    Val Ser Thr Arg Ile Asp Ala Thr Glu Leu Gly Glu Ala Arg Arg
        1           5           10           15

cga atc gag gcg ttg gtg tgt gat ctg ccc ggt ggt gac gta gcc tca
1416
Arg Ile Glu Ala Leu Val Cys Asp Leu Pro Gly Gly Asp Val Gly Ser
        20           25           30

cgc gcc ttc aac gag ccg tgg gaa ttg cgt gcc ttc gcg atg gcc gtt
1464
Arg Ala Phe Asn Glu Pro Trp Glu Leu Arg Ala Phe Ala Met Ala Val
        35           40           45

gcc gtg tat cac cag ggt cac tac gaa tgg agt gag ttt cag ctc tcc
1512
Ala Val Tyr His Gln Gly His Tyr Glu Trp Ser Glu Phe Gln Leu Ser
        50           55           60

```

ES 2 400 360 T3

ctg atc gcg tcg atc cgc cac tgg gag cag ggc gag gga agg gag ccg
 1560
 Leu Ile Ala Ser Ile Arg His Trp Glu Gln Gly Glu Gly Arg Glu Pro
 65 70 75

 tgg agc tac tac gag cac tgg ctc aat gcg ctc gag tcg gta ctc gcc
 1608
 Trp Ser Tyr Tyr Glu His Trp Leu Asn Ala Leu Glu Ser Val Leu Ala
 80 85 90 95

 gcc agc ggc gcc tta tcg gac gca gtg ggc ctc gat gag cgc acg cgc
 1656
 Ala Ser Gly Ala Leu Ser Asp Ala Val Gly Leu Asp Glu Arg Thr Arg
 100 105 110

 gaa gtt ctc acc acc cca cgg aac acg aac cac cac cat gca cat cgc
 1704
 Glu Val Leu Thr Thr Pro Arg Asn Thr Asn His His His Ala His Arg
 115 120 125

 gaa ccc gtc gcg atc tca tct gcg gtg aac taa cccgcggcgc tactcgtccg
 1757
 Glu Pro Val Ala Ile Ser Ser Ala Val Asn
 130 135

 ctggccagct ctctgcctgc tgtccagcga acgacacctc cgtgacagct tctcgttca
 1817

 cgacccgatc actgattccc gacgcggta ccaacgagca cccgcgtata aacagaaccg
 1877

 caaaggatc gcagctgtcg gggacgagcg aatagcggat cgctcgcggg ggccggaccc
 1937

 atgcagctga tgctgcttcc gccgcaatag cccagatata cactggacga ggtgcgaggg
 1997

 ccgatacaag gcgagcgtca gcaaccggca aaccacagcg tccagagcca gcaccgtcat
 2057

 gtctagaaga ggaaagcatt gacgattact accacttcgc caaggcagat cgccggtcgg
 2117

 tggacacgtg ccgagcggca acgactgagc gctatcatcg gcaccatcgc attgctgcac
 2177

 gtgctaggta tcgcaatgta tctcgggcgc tgggtaacc cggccgccgc tggtagcctg
 2237

 gctggctcgg gactgctcgc ctatgtcctg ggtgcgcggc acgcgttcga tgccgaccac
 2297

 atcgcggcca tcgacgacac caccgcctc atgtccttc gcggacgccg acccgtcggc
 2357

 gtcggattct ttttcgcat ggggcattcg actgtcgtcc tcgttctctc tctgatcgtc
 2417

ES 2 400 360 T3

gctttcggag cgggctcgt cagttcgatg gaagcgtccc gggtcgagga gatcggaggt
2477

tacgtcgcga cctgcgtggc agtgcgtgtc ttggtgctgg tggccgcact caacagtttc
2537

gttctgcgca agctcctcgc tctgtctcgt cggatgcgca ctggggaaga tatctcggc
2597

gacctcgagc ggggctggg tgaacgggga ttgctcagct ggcttctcag cggccgattg
2657

cgcgggctga ttcgttcgtc ctggcacatg tacccggtgg gcctgctcat gggctctcggc
2717

ctggaaacgg catccgaagt gacattgctg tctctcactg cctccgcagc gagcggaggt
2777

cagctatcgc taatggcgat tgtgagcctt ccattgttgt ttgccgcggg gatgagcacc
2837

ttcgatactg cagaactcact cgtcatgacc cgcgcctatt cgtggctcta taacgatgcc
2897

cagcgcgcc ttcgcttcaa cactgtaacc acgggtgcga ccatggtcat cgggttcttc
2957

gtcgcgggaa tctaegtctc tggactgctt gcgccgctac caggggttcgg ttggctgacc
3017

cctctgggcg cgategcgca caacttcgag ttctctggct acgcagtcgc cggattgttc
3077

gttgcctacct gggcaatcgc agcaactgggt agccggcctc gacggcttgt cggcagctcg
3137

aagggtgga
3146

- <210> 6
- <211> 137
- 5 <212> PRT
- <213> Rhodococcus opacus
- <400> 6

Val	Ser	Thr	Arg	Ile	Asp	Ala	Thr	Glu	Leu	Gly	Glu	Ala	Arg	Arg	Arg
1				5					10					15	
Ile	Glu	Ala	Leu	Val	Cys	Asp	Leu	Pro	Gly	Gly	Asp	Val	Gly	Ser	Arg
			20					25					30		
Ala	Phe	Asn	Glu	Pro	Trp	Glu	Leu	Arg	Ala	Phe	Ala	Met	Ala	Val	Ala
		35					40					45			

ES 2 400 360 T3

Val Tyr His Gln Gly His Tyr Glu Trp Ser Glu Phe Gln Leu Ser Leu
 50 55 60

Ile Ala Ser Ile Arg His Trp Glu Gln Gly Glu Gly Arg Glu Pro Trp
 65 70 75 80

Ser Tyr Tyr Glu His Trp Leu Asn Ala Leu Glu Ser Val Leu Ala Ala
 85 90 95

Ser Gly Ala Leu Ser Asp Ala Val Gly Leu Asp Glu Arg Thr Arg Glu
 100 105 110

Val Leu Thr Thr Pro Arg Asn Thr Asn His His His Ala His Arg Glu
 115 120 125

Pro Val Ala Ile Ser Ser Ala Val Asn
 130 135

5 <210> 7
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Cebador
 <400> 7

atgaayggha tyttcga
 17

15 <210> 8
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> Cebador
 <400> 8

atccagtgyy hgtagta
 17

25 <210> 9
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Artificial

30 <220>
 <223> Cebador
 <400> 9

cgaagacatg atcgtcgtg
 19

35 <210> 10
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Artificial

40 <220>
 <223> Cebador

ES 2 400 360 T3

<400> 10

accggtccca cacgga
16

5
<210> 11
<211> 16
<212> ADN
<213> Artificial

10
<220>
<223> Cebador

<400> 11

15

tcgaggagat cggagg
16

<210> 12
<211> 18
<212> ADN
<213> Artificial

20
<220>
<223> Cebador

<400> 12

25

gtatcgaagg tgctcatt
18

<210> 13
<211> 15
<212> ADN
<213> Artificial

30
<220>
<223> Cebador

35
<400> 13

cgcgggctgg gtgaa
15

<210> 14
<211> 36
<212> ADN
<213> Artificial

40
<220>
<223> Cebador

45
<400> 14

cggcgaatt caagaaggag acccgcatat gaacgg
36

50
<210> 15
<211> 36
<212> ADN
<213> Artificial

55
<220>
<223> Cebador

ES 2 400 360 T3

<400> 15
ggtgcaagct tggatcctgt cagattcctc gagtag
36

5 <210> 16
<211> 33
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
10 <223> Cebador

<400> 16
gcgaaggatc ctgcatgcat cgaaattaat acg
33

15 <210> 17
<211> 33
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
20 <223> Cebador

<400> 17
catcaagctt ttcgcatgg ctatatctcc ttc
33

25 <210> 18
<211> 37
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
30 <223> Cebador

<400> 18
ctgacaggat ccaagaagga gatatagcca tggccga
37

35 <210> 19
<211> 37
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
40 <223> Cebador

<400> 19
gttgcaagct tggtagcgt caagacatcg cctcct
37

45 <210> 20
<211> 36
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
50 <223> Cebador

<400> 20
gtgggtacca agaaggaggc gatcatatga gcacgc
36

55 <210> 21
<211> 32
<212> ADN
<213> Artificial

60

ES 2 400 360 T3

<220>
<223> Cebador

<400> 21

5 **gcggacgagt agcgaagctt gttagttcac cg**
32

<210> 22
<211> 36
<212> ADN
<213> Artificial

10 <220>
<223> Cebador

<400> 22

15 **tcaaagcttg aaggagatat acatatgacg attact**
36

<210> 23
<211> 33
<212> ADN
<213> Artificial

20 <220>
<223> Cebador

<400> 23

25 **gtcaaagcttg gtaccgacat ctcacacctt cga**
33

<210> 24
<211> 6307
<212> ADN
<213> E. coli, Rhodococcus opacus

30 <400> 24

ES 2 400 360 T3

aattcttaag aaggagatat acatatgaac ggcatcttcg atctaggcgg aaccgacggc
60
atggggcccg tgcacaacga caaaggcacc gagccggtgt tccgctcagc gtgggaaaag
120
gccgccttct cgatgttcgc acaaggcgcc cgagctggcc tctacaacat cgacgagttc
180
cggcactgcg tcgagcagat ggacccccgc gagtatttac tatcgaacta ctacgagcac
240
tggacgcatg ccgtcgaaca cttegccag caaaagaacc tcatcacagc ggcagagctc
300
gaaaagcgca cgcatttcta cggggataac ccagaagccc cccttccgga ggcgaaggac
360
ccagagctcc tcgacttcgt gaacaccgcg atcgcgaacg gtttcgcggc ctcccgtgaa
420
accaataggt cggcagcatt caccatcgcc gaccaggtac tgattgctgc ggacagtcca
480
ttcggacaca cccgacgggc cggctacatc cgcggttaaga ccggagtcat caccgcgaca
540
cacggcgccct acgtctatcc cgacaccgcc ggtaacgggc tcggtgagtg cccagagcac
600
gtctacaccg tgaagttcac cgccaccgaa ctttggggcg aacagagcgg tgatcgccac
660
agcaccgctc atttcgatgt ctgggaaccg tacctctcgc tcgctaccgc accctctact
720
cgaggaatct gacaggatcc tgcatgcatc gaaattaata cgacgaaatt aatacgactc
780
actatagggc aattgcgatc accacaattc agcaaattgt gaacatcatc acgttcatct
840

ES 2 400 360 T3

ttccctgggt gccaatggcc cattttcctg tcagtaacga gaaggctcgc aattcaggcg
900

cttttagac tggtcgtaat gaacaattct taagaaggag atatagccat ggccgaacag
960

cgcaaccgaca cccaattgcg tacacacgaa gaagtcgtcg cccgagtcaa ggcgctcgag
1020

gcgctgtga tcgagaaagg cgtcatgacg accgaggccg tcgaccggat ggccgaggta
1080

tacgagaacg aagtcggccc ccagatcggc gctcagattg tcgccaagc gtggaccgac
1140

ccgaagtca agaagaggtt gctggccaat gccacgactg cctgcgcaga gatgggctac
1200

ggcggtctgc agggcgaaga catgatcgtc gtggaaaaca ccgacaccgt acacaacgcg
1260

attgtgtgca cctctgctc ctgctaccg tggccggtct tggcctgcc accgaactgg
1320

tacaaggcac cggcttaccg cgcacggatc gtgcgcgaac cgcggaaggt cctcgccgag
1380

gacttcgact ttccatccc cgacgacgtc gagatccgcg tgtgggactc gagcgccgag
1440

ctgcctatt gggttttacc gcagcgcctt gcacacaccg aaagattgac ggaatccgag
1500

ctggtagcgc tggtcacccg cgactcgatg atcgggtgtg gaccgggtgag ggaggcgatg
1560

tcttgagcgg taccaagaag gaggcgatca tatgagcaag cgcattgacg caaccgagct
1620

cggggaagca cgccgcgaa tcgaggcgtt ggtgtgtgat ctgcccgtg gtgacgtagg
1680

ctcaecgcgc ttcaacgagc cgtgggaatt gcgtgccttc gogatggccg ttgccgtgta
1740

tcaccagggt cactacgaat ggagtgagtt tcagctctcc ctgatcgcgt cgatccgcca
1800

ctgggagcag ggcgagggaa gggagccgtg gagctactac gagcactgga tcaatgcgct
1860

cgagtcggta ctcgccgcca gcggcgcctt atcggacgca gtgggcctcg atgagcgcac
1920

gcgcaagtt ctcaccaccc cacggaacac gaaccacac catgcacatc gcgaaccgct
1980

cgcatctca tctgcggtga actaacaagc ttggctgttt tggcggatga gagaagattt
2040

ES 2 400 360 T3

tcagcctgat acagattaaa tcagaacgca gaagcggctc gataaaacag aatttgctg
2100

gcggcagtag cgcggtggtc ccacctgacc ccctgcccga ctcagaagtg aaacgcgcta
2160

gcccgatgg tagtgtgggg tctccccatg cgagagtagg gaactgccag gcatcaaata
2220

aaacgaaagg ctcagtcgaa agactgggccc tttcgtttta tctgttgttt gtcggtgaac
2280

gctctcctga gtaggacaaa tcccgcggga gcggatttga acgttgcgaa gcaacggccc
2340

ggaggggtggc gggcaggacg cccgccataa actgccaggc atcaaattaa gcagaaggcc
2400

atcctgacgg atggcctttt tgcgtttcta caaactcttt tgtttatttt tctaaataca
2460

ttcaaatatg tatccgctca tgagacaata accctgataa atgcttcaat aatattgaaa
2520

aaggaagagt atgagtattc aacatttccg tgtcgcctt attcctttt ttgcggcatt
2580

ttgccttctt gtttttgctc acccagaaac gctggtgaaa gtaaaagatg ctgaagatca
2640

gttgggtgca cgagtgggtt acatcgaact ggatctcaac agcggtaaga tccttgagag
2700

ttttgcctcc gaagaacggt ttccaatgat gagcactttt aaagttctgc tatgtggcgc
2760

ggtattatcc cgtgttgacg ccgggcaaga gcaactcggc cgccgcatac actattctca
2820

gaatgacttg gttgagtact caccagtcac agaaaagcat cttacggatg gcatgacagt
2880

aagagaatta tgcagtgctg ccataacccat gagtataaac actgcggcca acttacttct
2940

gacaacgacg ggaggaccga aggagctaac cgcttttttg cacaacatgg gggatcatgt
3000

aactcgcctt gatcgttggg aaccggaget gaatgaagcc ataccaaacg acgagcgtga
3060

caccacgatg cctgtagcaa tggcaacaac gttgcgcaaa ctattaactg gcgaactact
3120

tactctagct tcccggcaac aattaataga ctggatggag gcggataaag ttgcaggacc
3180

ES 2 400 360 T3

acttctgcg cggcccttc cggctggctg gtttattgct gataaatctg gagccgggta
3240

gcgtgggtct cgcgggatca ttgcagcact ggggccagat ggtaagccct cccgtatcgt
3300

agttatctac acgacgggga gtcaggcaac tatggatgaa cgaatatagac agatcgctga
3360

gataggtgcc tcaactgatta agcattggta actgtcagac caagtttact catatatact
3420

ttagattgat ttaaaacttc atttttaatt taaaaggatc taggtgaaga tcctttttga
3480

taatctcatg accaaaaatcc cttaaactga gttttcgttc cactgagcgt cagaccccg
3540

agaaaagatc aaaggatctt cttgagatcc tttttttctg cgcgtaatct gctgcttgca
3600

aacaaaaaaaa ccaccgctac cagcgggtgt ttgtttgccg gatcaagagc taccaactct
3660

ttttccgaag gtaactggct tcagcagagc gcagatacca aatactgtcc ttctagtga
3720

gccgtagtta gccaccact tcaagaactc tgtagcaccg cctacatacc tcgctctgct
3780

aatcctgtta ccagtggctg ctgccagtg cgataagtcg tgtcttaccg ggttggactc
3840

aagacgatag ttaccggata aggcgcagcg gtcgggctga acggggggtt cgtgcacaca
3900

gccagcttg gagcgaacga cctacaccga actgagatac ctacagcgtg agctatgaga
3960

aagcgcacg ctccccgaag ggagaaaggc ggacaggtat ccgtaagcg gcagggtcgg
4020

aacaggagag cgcacgagg agcttccagg gggaaacgcc tggtatcttt atagtctctgt
4080

cgggtttcgc cacctctgac ttgagcgtcg atttttgtga tgctcgtcag gggggcggag
4140

cctatgaaa aacgccagca acgcccctt tttacggctc ctggcctttt gctggccttt
4200

tgctcacatg ttctttcctg cgttatcccc tgattctgtg gataaccgta ttaccgctt
4260

tgagttagct gataccgctc gccgcagccg aacgaccgag cgcagcagat cagtgagcga
4320

ggaagcggaa gagcgcctga tgcggtatct tctccttacg catctgtcgg gtatttcaca
4380

ES 2 400 360 T3

ccgcataat ggtgcaactc cagtacaatc tgctctgatg ccgcatagtt aagccagtat
4440

acactccgct atcgtctacgt gactgggtca tggtgcgcc ccgacacccg ccaacacccg
4500

ctgacgcgcc ctgacgggct tgtctgtccc cggcatccgc ttacagacaa gctgtgaccg
4560

tctccgggag ctgcatgtgt cagaggtttt caccgtcatc accgaaacgc gcgaggcagc
4620

tgccgtaaag ctcatcagcg tggctgtgaa gcgattcaca gatgtctgcc tgttcatccg
4680

cgctccagctc gttgagtttc tccagaagcg ttaatgtctg gcttctgata aagcgggcca
4740

tgtaaagggc ggttttttcc tgtttggtea cttgatgctt ccgtgtaagg ggaatttct
4800

gttcatgggg gtaatgatac cgatgaaacg agagaggatg ctcacgatac gggttactga
4860

tgatgaacat gcccggttac tggaacgttg tgagggtaaa caactggcgg tatggatgcg
4920

gcgggaccag agaaaaatca ctcagggtca atgccagcgc ttcgtaata cagatgtagg
4980

tgttccacag ggtagccagc agcatcctgc gatgcagatc cggaacataa tgggtcaggg
5040

cgctgacttc cgcgtttcca gactttacga aacacggaaa ccgaagacca ttcattgtgt
5100

tgctcaggtc gcagacgttt tgcagcagca gtcgcttcc gttcgtctgc gtatcgggtga
5160

ttcattctgc taaccagtaa ggcaaccccg ccagcctagc cgggtcctca acgacaggag
5220

cacgatcatg cgcacccgtg gccaggacc aacgctgccc gagatgcgcc gcgtgcccgt
5280

gctggagatg gcggacgcga tggatatgtt ctgccaaagg ttggtttgcg cattcacagt
5340

tctccgcaag aattgattgg ctccaattct tggagtggcg aatccgttag cgagggtccc
5400

ccggcttcca ttcaggtcga ggtggcccgg ctccatgcac cgcgacgcaa cgcggggagg
5460

cagacaaggt atagggcggc gctacaatc catgccaacc cgttccatgt gctcggcgag
5520

ES 2 400 360 T3

gCggCataaa tCgCcgTgac gatCagCggT cCagTgatCg aagTtaggCt ggTaagagCc
5580

gCgagCgatC cTtgaagCtG tCccTgatGg tCgTcatCta cCtGcCtGga cagCcatGgCc
5640

tGcaacCgCgG gCacCccgat gCgCccGgaa gCgagaagaa tCataatGgG gaagGcCacC
5700

cagCctCgCg tCgCgaacCg cagCaagacG tagCccagCg cGtCgGcCgC catGcCgCgC
5760

ataatGgCct gCtttCtCgC gaaacGtttG gtGgCgGgac cagTgacGaa gGcttGagCg
5820

agGgCgtGca agattCcgaa taccGcaagC gacagGcCga tCacTgTcGc gCtCcagCga
5880

aagCggtCct cGccGaaaat gacCcagagC gCtGcCgGca cCtGtCctac gagTtGcatG
5940

ataaagaaga cagTcataag tGcGgCgacG atagTcatGc cCgCgCcca cGgaagGag
6000

cTgactGggt tgaagGctct caagGcCacC gGtCgacGct cTcCcttatG cGactCctGc
6060

attaggaagC agcCcagtag tagGttgagG cCgTtgagca cCgCgCcCgC aaggaatGgt
6120

gCatGcatGc atCgaaatta atacGacGaa attaataCga cTcactatag gGcaattGcG
6180

atCaccacaa tTcagcaaat tGtgaacacC atCacGttca tCtttCctG gTtGcCaatG
6240

gCccatttC cTgtCagtaa cGagaagGtC gCgaattCag gCgCtttTta gactGgtCgt
6300

aatgaac
6307

<210> 25

<211> 6191

<212> ADN

5 <213> E. coli, Rhodococcus opacus

<400> 25

aattCtTaaG aaggagatat acatatgacG attactacca cTtCgCcaag gCagatCgCc
60

gGtCggtGga cCgTgCcgga gCggCaacga cTgagCgCta tCacTgGcac catCgCattG
120

cTgCacgtGc taggtatCgC aatgtatCtC gGgCgCtCgG gTaaCccGgC cGccGctGgt
180

ES 2 400 360 T3

agcctggctg gctcgggact gctcgcctat gtccctgggtg cgcggcacgc gttcgatgcc
240

gaccacatcg cggccatcga cgacaccacc cgcacatgc tccttcgcgg acgcccaccc
300

gtcggcgctg gattcttttt cgcctatggg cattcgaactg tcgtcctcgt tctctctctg
360

atcgtcgctt tcggagcggg ctcgctcagt tegatggaag cgtcccgggt cgaggagatc
420

ggaggttacg tcgcgacctg cgtggcagtg ctgttcttgg tgctgggtgc cgcactcaac
480

agtttcgctt tgcgcaagct cctcgcctcg tctcgtcggg tgcgcaactg ggaagatatac
540

tcgggcgacc tcgagcgcgg gctgggtgaa cggggattgc tcagctggct tctcagcggc
600

cgattgcgcg ggctgattcg ttcgtcctgg cacatgtacc cgggtggcct gctcatgggt
660

ctcggcctgg aaaccgcac cgaagtgaca ttgctgtctc tcaactgecte cgcagcgagc
720

ggaggtcagc tatcgctaat ggcgattgtg agccttccat tgttgtttg cgcggggatg
780

agcaccttcg atactgcaga ctcactcgtc atgaccgcgg cctattcgtg gtctataaac
840

gatgccacgc gccgccttcg cttcaacact gtaaccacgg gtgcgaccat ggatcatcggg
900

ttcttcgctg cgggaatcta cgtttcttga ctgcttgcgc cgtaccagg gttcgggttg
960

ctgacccctc tgggcgcgat cgcgcacaac ttcgagttcc tcggctacgc agtcgccgga
1020

ttgttcgctg ctacctgggc aatcgcagca ctgggttagcc ggccctgcagc gcttgcggc
1080

agctcgaagg tgtgagatgt cggtagcaag cttggctggt ttggcggatg agagaagatt
1140

ttcagcctga tacagattaa atcagaacgc agaagcggtc tgataaaaca gaatttcct
1200

ggcgcgagta gcgcggtggt cccacctgac cccatgcoga actcagaagt gaaacgccgt
1260

agcgcgatg gtagtggtgg gtctcccat gcgagagtag ggaactgccca ggcatcaaat
1320

aaaacgaaag gctcagtcga aagactgggc ctttcgtttt atctgttgtt tgcgggtgaa
1380

ES 2 400 360 T3

cgctctctg agtaggacaa atccgcccggg agcggatttg aacggtgcga agcaacggcc
1440

cggaggggtgg cgggcaggac gcccgccata aactgccagg catcaaatta agcagaaggc
1500

catcctgacg gatggccttt ttgcgtttct acaaactctt ttgtttattt ttctaaatac
1560

attcaaatat gtatccgctc atgagacaat aacctgata aatgcttcaa taatatcgtc
1620

cattccgaca gcatcgccag tcactatggc gtgctgctag cgctatatgc gttgatgcaa
1680

ttctatgcg caccgcttct cggagcactg tccgaccgct ttggccgccc cccagtcctg
1740

ctcgettegc tacttggagc cactatcgac tacgggatca tggcgaccac acccgctcctg
1800

tggatcctct acgccggagc catcgtggcc ggcacaccg gcgccacagg tgcggttgc
1860

ggcgctata tcgccgacat caccgatggg gaagatcggg ctcgccactt cgggctcatg
1920

agcgcttgtt tcggcgtggg tatggtggca ggccccgtgg ccgggggact gttgggcgcc
1980

atctccttgc atgcaccatt ccttgcggcg gcggtgctca acggcctcaa cctactactg
2040

ggctgcttcc taatgcagga gtcgcataag ggagagcgtc gaccgatgcc cttgagagcc
2100

ttcaaccag tcagctcctt ccggtgggcg cggggcatga ctatcgtcgc cgcacttatg
2160

actgtcttct ttatcatgca actcgtagga caggtgcggg cagecctctg ggtcatttcc
2220

ggcgaggacc gcttctcgtg gagegcgagc atgatcggcc tgctccttgc ggtattcggg
2280

atcttgacg ccctcgtca agccttcgtc actggtcccc ccaccaaagc tttcggcgag
2340

aagcaggcca ttatcgccgg catggcggcc gacgcgctgg gctacgtctt gctggcgctc
2400

gcgacgcgag gctggatggc ctteccatt atgattcttc tcgcttccgg cggcatcggg
2460

atgcccgcgt tgcaggccat gctgtccagg caggtagatg acgaccatca gggacagctt
2520

ES 2 400 360 T3

caaggatcgc tcgcggtctt taccagccta acttcgatca ctggaccgct gatcgtcaccg
2580

gcgatttatg cgcctcggc gagcacatgg aacgggttgg catggattgt aggcgcggcc
2640

ctataccttg tetgectccc cgcgttgcgt cgcggtgcat ggagccgggc cacctcgacc
2700

tgaatggaag cggcggcac ctgcctaacg gattcaccac tccaagaatt ggagccaatc
2760

aattcttgcg gagaactgtg aatgcgcaaa ccaacccttg gcagaacata tccatcgcgt
2820

ccgccatctc cagcagccgc acgcggcgca tctcgggcag cgttgggtcc tggccacggg
2880

tgcgatgat cgtgctctg tcgttgagga cccggttagg ctggcgggggt tgccttactg
2940

gttagcagaa tgaatcaccg atacgcgagc gaacgtgaag cgactgctgc tgcaaaacgt
3000

ctgcgacctg agcaacaaca tgaatggtct tcggtttccg tgtttcgtaa agtctggaaa
3060

cgcggaagtc cctacgtgc tgctgaagtt gcccgcaaca gagagtggaa ccaaccggtg
3120

ataccacgat actatgactg agagtcaacg ccatgagcgg cctcatttct tattctgagt
3180

tacaacagtc cgcaccgtg tccggtagct ccttccggtg ggcgcggggc atgactatcg
3240

tcgccgact tatgactgtc ttctttatca tgcaactcgt aggacaggtg ccggcagcgc
3300

ccaacagtec cccggccacg gggcctgcca ccataccac gccgaaacaa gcgcctgca
3360

ccattatggt ccgcatctgc atgcaggat gctgctggct accctgtgga acacctacat
3420

ctgtattaac gaagegetaa ccgtttttat caggctctgg gaggcagaat aatgatcat
3480

atcgtcaatt attacctcca cggggagagc ctgagcaaac tggcctcagg catttgagaa
3540

gcacacggtc aactgcttc cggtagtcaa taaaccggta aaccagcaat agacataagc
3600

ggctatntaa cgaccctgcc ctgaaccgac gaccgggtcg aatttgcttt cgaatttctg
3660

ccattcatcc gcttattatc acttattcag gcgtagcacc aggcgnttaa gggcaccaat
3720

ES 2 400 360 T3

aactgcctta aaaaaattac gccccgccct gccactcadc gcagtactgt tgtaattcat
3780

taagcattct gccgacatgg aagccatcac agacggcatg atgaacctga atcgccagcg
3840

gcacagcac cttgtcgct tgcgtataat atttgcccat ggtgaaaacg ggggcaaga
3900

agttgtccat attggccaag tttaaatcaa aactggtgaa actcaccag ggattggctg
3960

agacgaaaaa catattctca ataaaccctt tagggaaata ggccaggtt tcaccgtaac
4020

acgccacatc ttggaatat atgtgtagaa actgccggaa atcgtcgtgg tattcactcc
4080

agagcgatga aaacgtttca gtttgctcat ggaaaacggt gtaacaagg tgaacactat
4140

cccatatcac cagctcaccg tctttcattg ccatacgaat tccgatgag cattcatcag
4200

gcgggcaaga atgtgaataa aggccggata aaacttgtgc ttatttttct ttacggtctt
4260

taaaaaggcc gtaatatcca gctgaacggt ctggttatag gtacattgag caactgactg
4320

aaatgcctca aaatgttctt tacgatgcca ttgggatata tcaacggtgg tatatccagt
4380

gatttttttc tccattttag cttccttagc tctgaaaat ctcgataact caaaaaatac
4440

gcccggtagt gatcttattt cattatggtg aaagttggaa cctcttacgt gccgatcaac
4500

gtctcatttt cgccaaaagt tggcccaggg ctteccggta tcaacagga caccaggatt
4560

tatttattct gcgaagtgat cttccgtcac aggtatttat tcggcgcaaa gtgcgtcggg
4620

tgatgctgcc aacttactga tttagtgtat gatgggtgtt ttgaggtgct ccagtggctt
4680

ctgtttctat cagctgtccc tctgttcag ctactgacgg ggtggtgcgt aacggcaaaa
4740

gcaccgccgg acatcagcgc tagcggagtg tatactggct tactatggtg gcaactgatga
4800

gggtgtcagt gaagtgttc atgtggcagg agaaaaaagg ctgcaccggt gcgtcagcag
4860

ES 2 400 360 T3

aatatgtgat acaggatata ttccgcttcc tcgctcactg actcgcctacg ctcggtcggt
4920

cgactgcggc gagcggaat ggcttacgaa cggggcggag atttctctga agatgccagg
4980

aagatactta acaggaagt gagagggcgg cggcaaagcc gttttccat aggctccgcc
5040

ccctgacaa gcatcacgaa atctgacgct caaatcagtg gtggcgaac ccgacaggac
5100

tataaagata ccaggcggtt ccctggcgg ctcctcctg cgctctcctg ttctgcctt
5160

tcggtttacc ggtgtcatc cgctgttatg gccgcggttg tctcattcca cgctgacac
5220

tcagttccgg gtaggcagtt cgctccaagc tggactgtat gcacgaacc ccggttcagt
5280

ccgaccgctg cgccttatcc ggtaactatc gtcttgagtc caaccggaa agacatgcaa
5340

aagcaccact ggcagcagcc actggtaatt gatttagagg agttagtctt gaagtcatgc
5400

gccggttaag gctaaactga aaggacaagt tttggtgact gcctcctcc aagccagtta
5460

cctcggttca aagagttggt agctcagaga accttcgaaa aaccgccctg caaggcgggt
5520

ttttcgttt cagagcaaga gattacgccc agacaaaac gatctcaaga agatcatctt
5580

attaagcttg catgcctgca ggacggatcc ccgggtaccg agctcgaatt taatcagata
5640

aaatattca agatttcagt gcaatttate tcttcaaatg tagcacctga agtcagcccc
5700

atcagatata agttgtaatt ctcatgtttg acagcttate atcgataagc tttaatgcgg
5760

tagttatca cagttaaatt gctaacgcag tcaggcaccg tgtatgaaat ctaacaatgc
5820

gctcctcgtc atcctcggca ccgtcacct ggatgctgta ggcataggct tggttatgcc
5880

ggtactgccg ggctcttgc gggattagtc atgccccgcg cccaccggaa ggagctgact
5940

gggtgaagg ctctcaaggg catcggtcga cgctctcct tatgcgactc ctgcattagg
6000

aagcagccca gtatagggt gaggccgtt agcaccgccg ccgcaaggaa tgggtcatgc
6060

atcgatcacc acaattcagc aaattgtgaa catcatcacg ttcattcttc cctggttgcc
6120

aatggcccat tttctgtca gtaacgagaa ggtcgcgaat tcaggcgctt tttagactgg
6180

tcgtaatgaa c
6191

REIVINDICACIONES

- 5 1. Racimo aislado de polinucleótidos procedente de *Rhodococcus opacus*, que contiene cuatro secuencias de nucleótidos, que codifican cuatro polipéptidos con unas secuencias de aminoácidos, que son idénticas en cada caso en por lo menos un 90 % con las secuencias de aminoácidos contenidas en las secuencias SEQ ID NO:2 hasta SEQ ID NO:4 y SEQ ID NO:6, poseyendo los polipéptidos las actividades de una nitrilo hidratasa, que se compone de las subunidades α y β , de la proteína auxiliadora P15K y de un transportador de cobalto.
- 10 2. Polinucleótidos de acuerdo con la reivindicación 1, escogidos entre el conjunto que se compone de:
- 15 a) un polinucleótido, que se compone de las posiciones 1 hasta 708 de la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO:1 o de la secuencia de nucleótidos complementaria con ésta,
- b) un polinucleótido con una secuencia de nucleótidos, que corresponde a la secuencia procedente de a) dentro del marco de la degeneración del código genético,
- 20 c) un polinucleótido, que se hibrida en condiciones rigurosas con las secuencias complementarias a) o b), abarcando las condiciones rigurosas el lavado en 0,1 x SSC a una temperatura de 50-68°C y
- d) un polinucleótido, con una secuencia de nucleótidos procedente de a), b) o c), que contiene unas mutaciones con sentido neutras en su función,
- codificando los polinucleótidos la subunidad β de la nitrilo hidratasa.
- 25 3. Polinucleótidos de acuerdo con la reivindicación 1, escogidos entre el conjunto que se compone de:
- a) un polinucleótido, que se compone de las posiciones 710 hasta 1.327 de la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO:1 o de la secuencia de nucleótidos complementaria con ésta,
- 30 b) un polinucleótido con una secuencia de nucleótidos, que corresponde a la secuencia procedente de a) dentro del marco de la degeneración del código genético,
- c) un polinucleótido, que se hibrida en condiciones rigurosas con las secuencias complementarias procedentes de a) o b), abarcando las condiciones rigurosas el lavado en 0,1 x SSC a una temperatura de 50-68°C y
- 35 d) un polinucleótido, con una secuencia de nucleótidos procedente de a), b) o c), que contiene unas mutaciones con sentido neutras en su función,
- 40 codificando los polinucleótidos la subunidad α de la nitrilo hidratasa, y codificando los polinucleótidos la proteína auxiliadora P15K.
- 45 4. Un polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1, que contiene las secuencias de aminoácidos, que son idénticas por lo menos en un 90 % con las SEQ ID NO:2 y SEQ ID NO:3, teniendo el polipéptido la actividad de una nitrilo hidratasa.
- 50 5. Una sonda o un cebador, que contiene por lo menos 20 nucleótidos consecutivos dentro de las posiciones 1 hasta 1.327 de la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO:1 o de su forma complementaria.
6. Un polinucleótido aislado de acuerdo con la reivindicación 2, que se hibrida en condiciones rigurosas con el complemento con las posiciones 1 hasta 708 de la SEQ ID NO:1, abarcando las condiciones rigurosas el lavado en 0,1 x SSC a una temperatura de 50 a 68°C.
- 55 7. Un polinucleótido aislado de acuerdo con la reivindicación 3, que se hibrida en condiciones rigurosas con el complemento con las posiciones 710 hasta 1.327 de la SEQ ID NO:1, abarcando las condiciones rigurosas el lavado en 0,1 x SSC a una temperatura de 50 a 68°C.
- 60 8. Unos vectores que contienen un(os) polinucleótido(s) escogidos entre los de las reivindicaciones 1 hasta 3 y 6 hasta 7.
9. El vector pUD15, que se compone de la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO:24.
10. El vector pUD16, que se compone de la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO:25.
- 65 11. Una célula anfitriona, transformada o transfectada mediante la introducción de un polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 1.

12. Una célula anfitriona, transformada mediante la introducción de un vector de acuerdo con las reivindicaciones 8 hasta 10.

5 13. Una célula anfitriona transformada de acuerdo con las reivindicaciones 11 o 12, siendo la célula anfitriona una bacteria de la familia de las Enterobacteriaceae, en particular Escherichia coli.

14. Procedimiento para la preparación de amidas a partir de nitrilos con unas nitrilo hidratasa procedentes de Rhodococcus o de unos microorganismos que contienen esta enzima, en el que

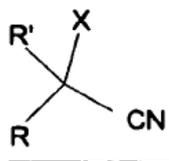
10 a) un microorganismo transformado, que contiene unos genes sobreexpresados con las secuencias de nucleótidos escogidas entre las de las reivindicaciones 1 hasta 3 y 6, 7, se fermenta en presencia de 0,15 a 4 mM de Co^{2+} , en unas condiciones, que dan lugar a la formación de la nitrilo hidratasa,

b) esta enzima se deja enriquecer en el microorganismo, y

c) esta enzima se aísla a partir de las células, o

15 d) se cosechan los microorganismos y se obtienen las células en reposo, que contienen la enzima, y

e) la enzima o los microorganismos que la contienen se hacen reaccionar con los compuestos de las fórmulas generales



(I)

y

20 $\text{R}''\text{-CN}$

(II)

en las que significan:

25 **X:** OH, H, alquilo con 1 a 4 átomos de C, en particular NH_2 ;

R: H, un radical alquilo saturado con 1 a 12 átomos de C, ramificado o sin ramificar, eventualmente sustituido con NH_2 ,

radicales alqueno con 1 a 12 átomos de C, ramificados o sin ramificar, o

grupos cicloalquilo con 3 a 6 átomos de C,

30 radicales alqueno sustituidos con grupos alquilo, correspondiendo el alquilo aquí a un radical de C_1 a C_3

y el alqueno a un radical divalente de C_3 a C_8 ,

R': H, alquilo con 1 a 3 átomos de C,

R'': un anillo insaturado de uno o dos núcleos, con 6 a 12 átomos de C, eventualmente sustituido con uno o dos grupos alquilo de C_1 - C_3 , Cl, Br o F, un radical alquil-nitrilo monovalente con 1 a 6 átomos de C,

35 para dar las correspondientes amidas,

15. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 14, caracterizado porque se emplean unas células anfitrionas de acuerdo con las reivindicaciones 11 hasta 13.

40 16. Nitrilo hidratasa producida recombinantemente de acuerdo con la reivindicación 14 con el origen de Rhodococcus opacus, que convierte químicamente a los α -aminonitrilos con una actividad específica de >50 U/mg de biomasa seca.

Figura 1

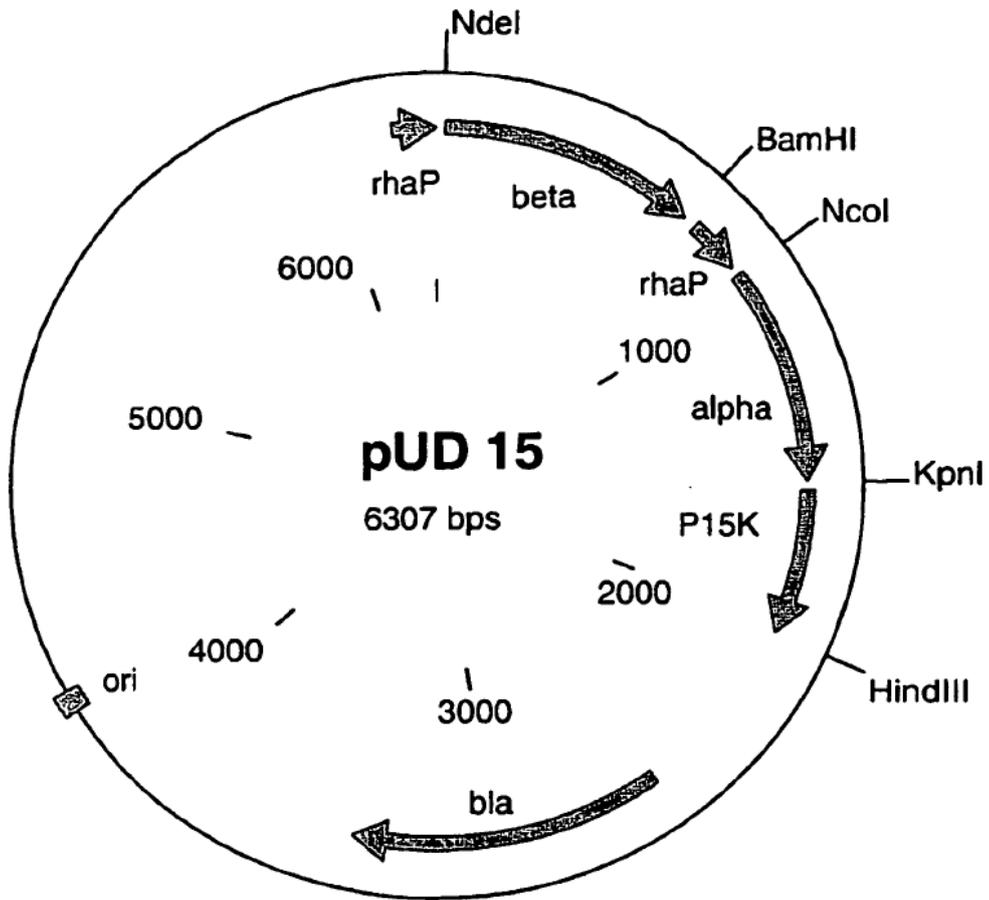


Figura 2

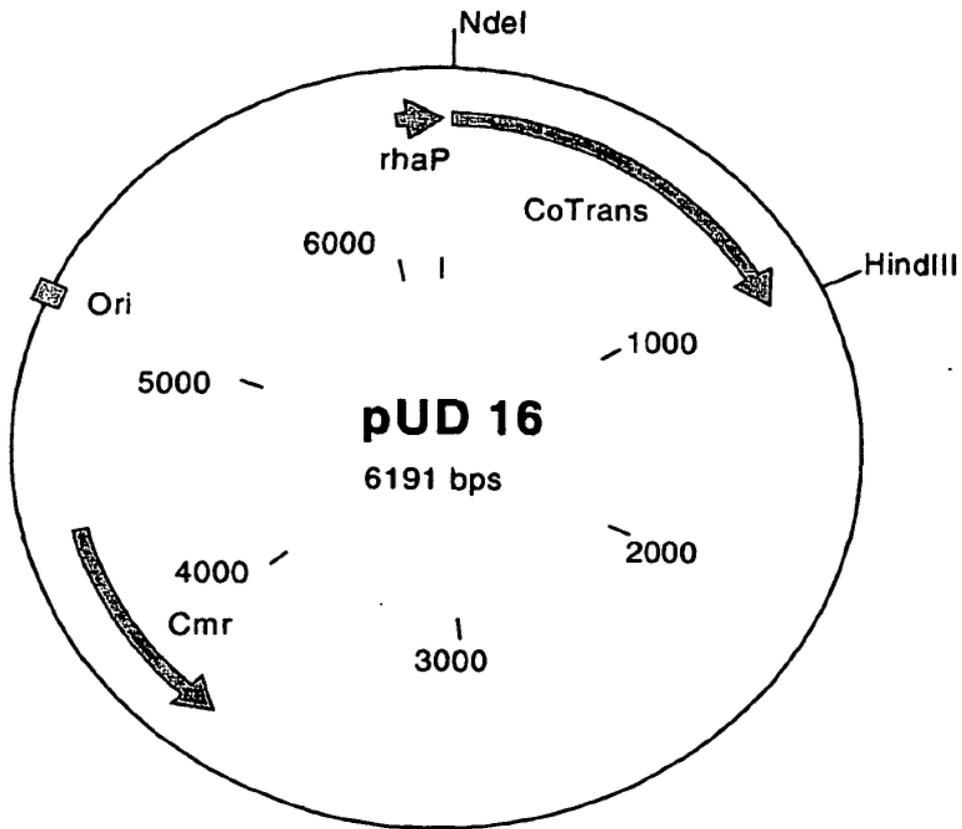


Figura 3

