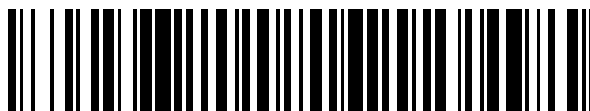


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 525 176**

51 Int. Cl.:

A01N 63/00 (2006.01)

A01P 21/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.03.2008 E 12161287 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.09.2014 EP 2471369**

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

30 Prioridad:

02.04.2007 US 695377

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
18.12.2014

73 Titular/es:

**GEORGIA STATE UNIVERSITY RESEARCH
FOUNDATION, INC. (100.0%)
P.O. Box 3999
Atlanta, GA 30302 , US**

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 525 176 T3

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

DESCRIPCIÓN

Catalizador de base biológica para retardar procesos de desarrollo de plantas

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a métodos para retardar el desarrollo de plantas que comprende exponer a una planta o parte de una planta a una o más enzimas. Se proporcionan además aparatos para retardar un proceso de desarrollo de plantas.

Antecedentes de la invención

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

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

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

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

55 Los métodos y composiciones para retardar el proceso de maduración de frutas incluyen, por ejemplo, la aplicación de sales de plata (por ejemplo, tiosulfato de plata), 2,5-norbornadieno, permanganato potásico, 1-metilciclopropeno (1-MCP), ciclopropeno (CP) y sus derivados. Estos compuestos tienen desventajas significativas, tales como la presencia de metales pesados, malos olores y propiedades explosivas cuando se comprimen, lo que les hace inaceptables o de aplicabilidad limitada para su utilización en la industria alimentaria. También se están investigando estrategias transgénicas para controlar la producción de etileno para retardar procesos de desarrollo de plantas (por

ejemplo, maduración de frutas) introduciendo secuencias de ácidos nucleicos que limiten la producción de etileno, particularmente reduciendo la expresión de las enzimas ACC-sintasa o ACC-oxidasa. La respuesta del público a productos agrícolas modificados genéticamente, sin embargo, no ha sido totalmente favorable.

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

Breve resumen de la invención

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

20 Cualquier aparato que permita la exposición de una planta o parte de una planta al catalizador y retarde el proceso de desarrollo de una planta de interés queda comprendido en la presente invención. Los aparatos ilustrativos incluyen aquellos en los que el catalizador está inmovilizado en una matriz y se colocan en, sobre o se fijan de otra manera a cualquier estructura física. Se consideran y describen con más detalle más adelante en la presente memoria diversas configuraciones de los aparatos descritos. Los métodos y aparatos de la presente invención para retardar un proceso de desarrollo de plantas son particularmente útiles para aumentar el periodo de conservación y facilitar el transporte a mayor distancia de productos vegetales, tales como frutas, verduras y flores, mejorando la satisfacción del consumidor con el producto y reduciendo las pérdidas de productos que resultan de maduración o senescencia inoportunas.

Breve descripción de los dibujos

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

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

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

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

45 La Figura 4 proporciona una representación no limitativa de un aparato para retardar la maduración de frutas. El aparato comprende una estructura de cámara ranurada que permite la inserción y sustitución de uno o más elementos modulares de catalizador, tal como se definen más adelante. Las capas externas de la estructura física pueden estar compuestas de un material que permita que el aire fluya al interior del catalizador.

Descripción detallada de la invención

50 La presente invención se describirá a continuación más completamente en la presente memoria en referencia a realizaciones específicas de la invención y, particularmente, a los diversos dibujos aportados. De hecho, la presente invención se puede realizar de muchas formas diferentes y no deben considerarse limitadas a las realizaciones descritas; en su lugar, estas realizaciones se proporcionan para que esta descripción cumpla los requisitos legales aplicables. Tal como se utiliza en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un", "uno/a", "el/la", incluyen referencias en plural, a no ser que el contexto indique claramente lo contrario.

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

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

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

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

En algunos aspectos de la invención, la una o más bacterias son “inducidas” a mostrar una característica deseada (por ejemplo, la capacidad de retardar un proceso de desarrollo de una planta, tal como la maduración de frutas) por exposición a un agente inductor adecuado o tratamiento con el mismo. Los agentes inductores incluyen, aunque sin limitación, asparagina, glutamina, cobalto, urea o cualquiera de sus mezclas. En realizaciones particulares, las
 55 bacterias se exponen al agente inductor asparagina o se tratan con él, más particularmente una mezcla de los agentes inductores que comprende asparagina, cobalto y urea. El agente inductor se puede añadir en cualquier momento durante el cultivo de las células deseadas. Por ejemplo, con respecto a bacterias, el medio de cultivo se puede suplementar con un agente inductor antes de comenzar el cultivo de las bacterias. Alternativamente, las bacterias se podrían cultivar en un medio durante una cantidad de tiempo predeterminada para cultivar las bacterias y el agente inductor se podría añadir en uno o más momentos predeterminados para inducir la actividad enzimática deseada en las bacterias. Además, el agente inductor se podría añadir al medio de cultivo (o a una mezcla diferente que incluya las bacterias cultivadas previamente) para inducir la actividad deseada en las bacterias después de que se haya completado el cultivo de las bacterias.

Aunque no se pretende estar limitado a un mecanismo particular, "inducir" las bacterias de la presente invención puede dar como resultado la producción (o producción aumentada) de una o más enzimas, tales como una nitrilo-hidratasa, amidasa y/o asparaginasa, y la inducción de una o más de estas enzimas puede desempeñar un papel en el retardo de un proceso de desarrollo de una planta de interés. Las "nitrilo-hidratasa", "amidasa" y "asparaginasa" comprenden familias de enzimas presentes en células de diversos organismos, incluyendo aunque sin limitación, bacterias, hongos, plantas y animales. Dichas enzimas son bien conocidas por expertos en la técnica, y cada clase de enzima posee actividades enzimáticas reconocidas. "Actividad enzimática", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere en general a la capacidad de una enzima para actuar como catalizador en un proceso, tal como la conversión de un compuesto en otro compuesto. En particular, la nitrilo-hidratasa cataliza la hidrólisis de nitrilo (o cianohidrina) a la amida correspondiente (o hidroxiaácido). La amidasa cataliza la hidrólisis de una amida al ácido o hidroxiaácido correspondiente. Análogamente, una enzima asparaginasa, tal como asparaginasa I, cataliza la hidrólisis de asparagina a ácido aspártico.

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

Están comprendidos además en la presente invención, métodos de retardo de un proceso de desarrollo de una planta que comprenden exponer una planta o parte de una planta a una o más enzimas seleccionadas del grupo que comprende nitrilo-hidratasa, amidasa, asparaginasa o una de sus mezclas, en los que la una o más enzimas se exponen a la planta o parte de la planta en una cantidad o a un nivel de actividad enzimática suficiente para retardar el proceso de desarrollo de una planta.

Las nitrilo-hidratasa, amidasa y/o asparaginasa se aíslan, purifican o semi-purifican a partir de cualquiera de las células anteriores y se exponen a la planta o parte de la planta en una forma más aislada. Véanse, por ejemplo, Goda et al., (2001) *J. Biol. Chem.* 276: 23480-23485; Nagasawa et al., (2000) *Eur. J. Biochem.* 267: 138-144; Soong et al., (2000) *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 1947-1952; Kato et al., (1999) *Eur. J. Biochem.* 263: 662-670. Un experto en la técnica apreciará además, que un único tipo celular puede ser capaz de producir (o ser inducido o modificado genéticamente para producir) más de una de las enzimas de la invención. Dichas células son adecuadas para su utilización en los métodos y aparatos descritos.

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

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

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

Organismo fuente	Nº de acceso	Identificador de secuencia	Valor proteico (% del intervalo de confianza)
Bacteria no cultivada (SP1); subunidad alfa de nitrilo-hidratasa	7657369	SEQ ID NO:7	100%

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

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

5 Generalmente, cualquier célula bacteriana, fúngica, vegetal o animal capaz de producir o ser inducida a producir nitrilo-hidratasa, amidasa, asparaginasa, o cualquiera de sus combinaciones se puede utilizar en la puesta en práctica de la invención. Una nitrilo-hidratasa, amidasa y/o asparaginasa se puede producir constitutivamente en una célula de un organismo particular (por ejemplo, una bacteria, un hongo, una célula vegetal o una célula animal) o, alternativamente, una célula puede producir la enzima o enzimas deseadas, solamente después de la "inducción" con un agente inductor adecuado. "Constitutivamente" pretende significar que se produce o expresa continuamente al menos una enzima de la invención en un tipo de célula particular. Otros tipos de células, sin embargo, pueden necesitar ser "inducidas", tal como se ha descrito anteriormente, para expresar nitrilo-hidratasa, amidasa y/o asparaginasa en una cantidad o nivel de actividad enzimática suficiente para retardar un proceso de desarrollo de una planta de interés. Es decir, una enzima de la invención se puede producir solamente (o producir a niveles suficientes) después de la exposición a un agente inductor adecuado o a un tratamiento con él mismo. Dichos agentes inductores se conocen en la técnica y se han resumido anteriormente. Por ejemplo, en algunos aspectos de la invención, la una o más bacterias son tratadas con un agente inductor, tal como asparagina, glutamina, cobalto, urea, o cualquiera de sus mezclas, más particularmente una mezcla de asparagina, cobalto y urea. Además, tal como se describe en la solicitud estadounidense pendiente de tramitación N° 11/669.011, titulada "Induction and Stabilization of Enzymatic Activity in Microorganisms", presentada el 30 de enero de 2007, la actividad de asparaginasa I se puede inducir en *Rhodococcus rhodochrous* DAP 96622 (Gram positiva) o *Rhodococcus sp.* DAP 96253 (Gram positiva), en medio suplementado con aminoácidos que contienen amida, o sus derivados. Otras cepas de *Rhodococcus* también pueden ser preferentemente inducidas de forma similar para mostrar actividad enzimática de asparaginasa I utilizando aminoácidos que contienen amida, o sus derivados.

25 En otros aspectos de la invención, *P. chloroaphis* (N° de depósito en ATCC 43051), que produce actividad de asparaginasa I en presencia de asparagina, y *B. kletoglutamicum* (N° de depósito en ATCC 21533), una bacteria gram positiva que también ha demostrado producir actividad de asparaginasa, se utilizan en los métodos descritos. Células fúngicas, tales como las del género *Fusarium*, células vegetales y células animales, que expresan una nitrilo-hidratasa, amidasa y/o asparaginasa, se pueden utilizar también en los métodos y aparatos descritos en la presente memoria, como células completas o como una fuente a partir de la cual aislar una o más de las enzimas anteriores.

30 En realizaciones adicionales, células hospedantes que han sido manipuladas genéticamente para expresar una nitrilo-hidratasa, amidasa y/o asparaginasa se pueden utilizar expuestas a una planta o parte de una planta de acuerdo con los presentes métodos y aparatos para retardar un proceso de desarrollo de una planta. Específicamente, un polinucleótido que codifica una nitrilo-hidratasa, amidasa o asparaginasa (o múltiples polinucleótidos cada uno de los cuales codifica una nitrilo-hidratasa, amidasa o asparaginasa) se puede introducir por técnicas estándares de biología molecular en una célula hospedante para producir una célula transgénica que expresa una o más de las enzimas de la invención. La utilización de las expresiones "polinucleótido", "construcción de polinucleótidos", "nucleótido" o "construcción nucleótidos" no pretende limitar la presente invención a DNA que comprende polinucleótidos o nucleótidos. Los expertos en la técnica reconocerán que los polinucleótidos y nucleótidos pueden comprender ribonucleótidos y combinaciones de ribonucleótidos y desoxirribonucleótidos.

Dichos desoxirribonucleótidos y ribonucleótidos incluyen tanto moléculas de origen natural como análogos sintéticos. Los polinucleótidos de la invención también abarcan todas las formas de secuencias incluyendo, aunque sin limitación, formas monocatenarias, formas bicatenarias y similares.

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

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

Además, la secuencia de nucleótidos de nitrilo-hidratasa, amidasa o asparaginasa puede estar contenida en, por ejemplo, un plásmido para la introducción en la célula hospedante. Los plásmidos típicos de interés incluyen vectores que tienen sitios de clonación, orígenes de replicación y marcadores seleccionables definidos. El plásmido puede incluir, además, secuencias de iniciación de la transcripción y de la traducción y terminadores de la transcripción y la traducción. Los plásmidos pueden incluir también casetes de expresión génica que contienen al menos una secuencia terminadora independiente, secuencias que permiten la replicación de la casete en eucariotas o procariotas o en ambas, (por ejemplo, vectores lanzaderas) y marcadores de selección para sistemas tanto procariotas como eucariotas. Los vectores son adecuados para replicación e integración en procariotas, eucariotas u óptimamente ambas. Para descripciones generales de sistemas y métodos de clonación, empaquetado y expresión, véanse Gilman and Smith (1979) *Gene* 8: 81-97; Roberts et al., (1987) *Nature* 328: 731-734; Berger and Kimmel (1989) *Guide to Molecular Cloning Techniques, Methods in Enzymology* Vol. 152 (Academic Press, Inc., San Diego, California); Sambrook et al., (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* Vols. 1-3 (2d ed; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, New York); y Ausubel et al., eds. (1994) *Current Protocols in Molecular Biology, Current Protocols* (Greene Publishing Associates, Inc., and John Wiley & Sons, Inc., New York; 1994 Supplement). Pueden utilizarse células hospedante transgénicas que expresan una o más de las enzimas de la presente invención en los métodos y aparatos descritos como células completas o como una fuente biológica a partir de la cual se pueden aislar una o más enzimas de la invención.

Además se proporcionan aparatos para retardar un proceso de desarrollo de una planta y para realizar los métodos de la invención. El catalizador comprende una o más enzimas (es decir, nitrilo-hidratasa, amidasa y/o asparaginasa) en una cantidad o a un nivel de actividad enzimática suficiente para retardar un proceso de desarrollo de una planta. Fuentes de las enzimas deseadas para su utilización como catalizador en los aparatos de la invención también se han descrito con detalle anteriormente. El catalizador comprende la(s) propia(s) enzima(s) en una forma aislada, purificada o semi-purificada.

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

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

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

Se puede conseguir mayor resistencia mecánica de una matriz de catalizador inmovilizado por reticulación. Por ejemplo, las células se pueden reticular químicamente para formar aglutinaciones de células. En una realización, las células recogidas son reticuladas utilizando glutaraldehído. Por ejemplo, las células se pueden poner en suspensión en una mezcla de agua desionizada y glutaraldehído seguido por adición de polietilenimina hasta que se alcance la floculación máxima. Las células reticuladas (típicamente en forma de partículas conformadas por varias células) se pueden recoger por simple filtración. Una descripción adicional de dichas técnicas se proporciona en López-Gallego et al., (2005) *J. Biotechnol.* 119: 70-75. También se resume más adelante en el Ejemplo 4 un protocolo general para la inmovilización de células, particularmente células de *Rhodococcus spp.*, en DEAE-celulosa reticulada con glutaraldehído.

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

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

el periodo de conservación de los productos vegetales, el control de los factores anteriores es importante para retardar el deterioro de dichos productos. Por consiguiente, se puede disponer un captador de dióxido de carbono en el aparato para reducir el contenido de dióxido de carbono.

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

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

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

La Figura 3B ilustra una estructura de catalizador 70 antes de fijar la estructura de catalizador al interior de un recipiente de la manera mostrada en la Figura 3A. Además de la capa de catalizador 64, la capa adhesiva 66 y la película desprendible 68, la estructura de catalizador 70 incluye una película desprendible adicional 72. La película desprendible 72, al igual que la película desprendible 68, protege la estructura de catalizador 70 cuando es empaquetada, enviada o almacenada. La película desprendible 72 se puede retirar para dejar expuesta la capa adhesiva 66 para permitir que la estructura de catalizador 70 se fije al interior del recipiente de la manera ilustrada en la Figura 3A.

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

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

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

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

Los siguientes ejemplos se ofrecen como ilustración y no como limitación:

40 **Parte experimental**

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

Ejemplo 1: Maduración retardada de frutas después de la exposición a *Rhodococcus spp.* Inducida (comparativo)

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

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

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

Ejemplo 2: Protocolos generales de fermentación e inducción

Proceso de fermentación

Los siguientes protocolos generales y medios de cultivo se utilizaron para la fermentación de las cepas de *Rhodococcus spp.*, *Rhodococcus sp.* DAP 96622 y *Rhodococcus rhodochrous* DAP 96253, para su utilización en otros experimentos:

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

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

20 Se prepararon inóculos a partir de cultivos de las cepas *Rhodococcus sp.* DAP 96622 y *Rhodococcus rhodochrous* DAP 96253 en un medio sólido adecuado y se incubaron a su temperatura apropiada (por ejemplo, 30°C). En realizaciones particulares, se cultivaron células en placas de agar-agar con YEMEA durante 4-14 días, preferiblemente 7 días. Alternativamente, se prepararon inóculos a partir de concentrados de células congeladas de operaciones de fermentación previas. Los concentrados de células se prepararon típicamente a una concentración de 20X respecto a la presente en el fermentador. Además, el inóculo se preparó a veces a partir de un medio bifásico adecuado (es decir, una combinación de medio líquido recubriendo a un medio sólido de la misma o de diferente composición). Cuando se utilizó un medio bifásico, el medio contenía generalmente YEMEA tanto en las capas líquidas como sólidas.

30 Para la inducción de nitrilo-hidratasa, a $t = 0$ horas, se añadieron $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y urea estériles hasta alcanzar concentraciones de 5-200 ppm de CoCl_2 y 750 mg/L - 10 g/L de urea, prefiriéndose generalmente 10-50 ppm de CoCl_2 y 7500 mg/L - 7,5 g/L de urea. En una realización particular, se añadieron de nuevo urea y/o cobalto durante la fermentación. Por ejemplo, se añadieron un volumen equivalente de urea y 150 ppm de CoCl_2 a las 4 - 6 horas o a las 24 - 30 horas. Además de la urea, se añadieron por etapas hasta una concentración final de 300 - 500 ppm de acrilonitrilo/acetonitrilo o asparagina 0,1 M - 0,2 M o a un caudal constante, comenzando en diversos momentos. Las operaciones de fermentación se terminaron cuando la masa de células y las concentraciones de enzimas fueron aceptables, típicamente a las 24-96 horas.

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

Descripción de los medios de cultivo

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

Extracto de levadura	0,5 g
Proteosa Peptona nº 3	0,5 g
Casaminoácidos	0,5 g
Glucosa	0,5 g
Almidón soluble	0,5 g
K ₂ HPO ₄	0,3 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,05 g
Piruvato sódico	0,3 g
H ₂ O desionizada o destilada	1,0 litro

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

Extracto de levadura	1,0 g
Proteosa peptona nº 3	1,0 g
Casaminoácidos	1,0 g
Glucosa	1,0 g
Almidón soluble	1,0 g
K ₂ HPO ₄	0,6 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,1 g
Piruvato sódico	0,5 g
H ₂ O desionizada o destilada	1,0 litro

Medio YEMEA

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

5 Inducción

Se utilizó el siguiente protocolo general para la inducción de las cepas de *Rhodococcus spp.*, *Rhodococcus sp.* DAP 96622 y *Rhodococcus rhodochromus* DAP 96253:

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

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

La actividad de nitrilo-hidratasa, amidasa y asparaginasa y la biomasa se evaluaron en células inducidas por asparagina de las cepas de *Rhodococcus spp.*, *Rhodococcus sp.* DAP 96622 y *Rhodococcus rhodochrous* DAP 96253. Diversas modificaciones en los componentes de los medios de cultivo, los métodos, los caudales y las concentraciones de administración de asparagina proporcionados a las células, y la fuente de las células se analizaron con respecto a sus efectos sobre las actividades de las enzimas anteriores y sobre la biomasa. Los apartados A a G de este ejemplo describen los aspectos específicos de cada conjunto de condiciones de ensayo y proporcionan un resumen de las actividades enzimáticas y biomasa obtenidas en cada una de las condiciones especificadas.

A. Esencialmente tal como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 2, un fermentador de 20 litros inoculado utilizando células de *Rhodococcus rhodochrous* DAP 96253 recogidas de medio sólido se suplementó continuamente con el inductor asparagina (120 μ L/minuto de una solución 0,2 M). Se utilizó Hy-Cotton 7803[®] en lugar de la proteosa peptona n^o3 en el medio R3A descrito anteriormente. Al final de la operación de fermentación, se midieron la actividad de nitrilo-hidratasa específica de acetonitrilo, la actividad de amidasa y la biomasa de acuerdo con métodos estándares conocidos en la técnica.

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

Tabla 3: Actividades enzimáticas y biomasa de células de *Rhodococcus rhodochrous* DAP 96253 después de la inducción con asparagina

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

B. Esencialmente tal como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 3A, con cambios del medio tal como se indica más adelante, se determinaron las actividades enzimáticas y la biomasa con células de *Rhodococcus rhodochrous* DAP 96253. En particular, se añadió YEMEA, dextrosa o maltosa a un medio R3A modificado, que contenía además Hy-Cotton 7803[®] como sustituto de la proteosa peptona n^o 3. Se añadió una solución 0,2 M de asparagina a un caudal continuo de 120 μ L/minuto comenzando a t = 8 horas. Al final de la operación de fermentación, se midieron la actividad de nitrilo-hidratasa específica de acrilonitrilo, la actividad de amidasa y la biomasa. Los resultados se resumen en la Tabla 4. Se observó un mayor rendimiento de biomasa con la adición al medio de YEMEA, dextrosa o maltosa.

Tabla 4: Actividades enzimáticas y biomasa de células de *Rhodococcus rhodochrous* DAP 96253 después de inducción continua con asparagina

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

C. Se utilizaron células de *Rhodococcus sp.* DAP 96622 de medio sólido como fuente del inóculo para una operación en un fermentador de 20 litros (véase el Ejemplo 2 para detalles del proceso de fermentación). Una solución 0,2 M de asparagina se añadió semi-continuamente cada 6 horas, comenzando a t = 24 horas, durante 50-70 minutos a un caudal de 2 mL/minuto. Se utilizó Hy-Cotton 7803[®] en lugar de la proteosa peptona n^o 3 en un medio R3A modificado. Al final de la operación de fermentación, se midieron la actividad de nitrilo-hidratasa específica de acrilonitrilo, la actividad de amidasa y la biomasa. Los resultados se resumen en la Tabla 5.

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

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

5 D. Se utilizaron células de *Rhodococcus sp.* DAP 96622 de medio sólido como fuente del inóculo para una operación en un fermentador de 20 litros. Una solución 0,2 M de asparagina se añadió semi-continuamente cada 6 horas, comenzando a $t = 12$ horas, durante 12-85 minutos a un caudal de 2,5 mL/minuto. Se utilizó hidrolizado de semilla de algodón en lugar de la proteosa peptona nº 3 en un medio R3A modificado. Al final de la operación de fermentación, se midieron la actividad de nitrilo-hidratasa específica de acrilonitrilo, la actividad de amidasa y la biomasa, y los resultados se resumen en la Tabla 6.

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

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

10

15 E. Se utilizaron células de *Rhodococcus rhodochrous* DAP 96253 congeladas previamente como fuente del inóculo para una operación en un fermentador de 20 litros. Se añadió YEMEA, dextrosa o maltosa a un medio R3A modificado que contenía además Hy-Cotton 7803[®] como sustituto de la proteosa peptona nº 3. Una solución 0,15 M de asparagina se añadió a un caudal continuo de 120 μ L/minuto comenzado a $t = 8$ horas. Al final de la operación de fermentación, se midieron la actividad de nitrilo-hidratasa específica de acrilonitrilo, la actividad de amidasa y la biomasa. Los resultados se resumen en la Tabla 7.

Tabla 7: Actividades enzimáticas y biomasa de células de *Rhodococcus rhodochrous* DAP 96253 después de inducción continua con asparagina

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

20 F. Se utilizaron células de *Rhodococcus rhodochrous* DAP 96253 cultivadas en medio bifásico como fuente de inóculo para una operación en un fermentador de 20 litros. Se utilizó un medio R3A modificado que se suplementó por la adición de un carbohidrato (es decir, YEMEA, dextrosa o maltosa) y que contenía además hidrolizado de semilla de algodón en lugar de la proteosa peptona nº 3. Una solución 0,15 M de asparagina se añadió a un caudal continuo de 1000 μ L/minuto comenzando a $t = 10$ horas. Al final de la operación de fermentación, se midieron la actividad de nitrilo-hidratasa específica de acrilonitrilo, la actividad de amidasa, la actividad de asparaginasa I y la biomasa. Los resultados se resumen en la Tabla 8.

25

Tabla 8: Actividades enzimáticas y biomasa de células de *Rhodococcus rhodochrous* DAP 96253 después de inducción continua con asparagina

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

30 G. Se utilizaron células de *Rhodococcus rhodochrous* DAP 96253 cultivadas en medio bifásico como fuente de inóculo para una operación en un fermentador de 20 litros. Se utilizó un medio R3A modificado que contenía maltosa (en lugar de dextrosa) y Hy-Cotton 7803[®] como sustituto de la proteosa peptona nº 3. Una solución 0,15 M de asparagina se añadió a un caudal continuo de 476 μ L/minuto comenzando a $t = 8$ horas. Al final de la operación de

fermentación, se midieron la actividad de nitrilo-hidratasa específica de acrilonitrilo, la actividad de amidasa y la biomasa, y los resultados se resumen en la Tabla 9.

Tabla 9: Actividades enzimáticas y biomasa de células de Rhodococcus rhodochrous DAP 96253 después de inducción continua con asparagina

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

5

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> Georgia State University Research Foundation, Inc.
- 5 <120> CATALIZADOR DE BASE BIOLÓGICA PARA RETARDAR PROCESOS DE DESARROLLO DE PLANTAS
- <130> HMJ04611EP1
- <140>
- 10 <141> 26-03-2008
- <150> PCT/US2008/058286
- <151> 26-03-2008
- 15 <150> US 11/695.377
- <151> 02-04-2007
- <160> 13
- 20 <170> FastSEQ para Windows Versión 4.0
- <210> 1
- <211> 229
- <212> PRT
- 25 <213> Rhodococcus sp.
- <400> 1

```

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

```

30 <210> 2

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

5 <400> 2

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

10 <210> 3
 <211> 229
 <212> PRT
 <213> Rhodococcus rhodochrous

15 <220>
 <223> Bacteria no cultivada BD2

<400> 3

```

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

```

<210> 4
 <211> 166
 <212> PRT
 <213> Desconocido

5

<220>
 <223> Bacteria no cultivada BD2

10

<220>
 <221> PÉPTIDO
 <222> (1)...(166)
 <223> Subunidad beta de nitrilo-hidratasa

15

<400> 4

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

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

5

<400> 5

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

10

<210> 6

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

5 <400> 6

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

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

10

<220>
 <223> Bacteria no cultivada SP1

15

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

20

<400> 7

ES 2 525 176 T3

```

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

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

```

<210> 8
 <211> 345
 <212> PRT
 <213> Rhodococcus rhodochrous

 <400> 8

5

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

<210> 9

<211> 345

<212> PRT

<213> Nocardia farcinica

5

<400> 9

```

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

```

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

5

<400> 10

```

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

```

<210> 11

<211> 339

<212> PRT

5 <213> Helicobacter pylori

<400> 11


```

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

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

Pro Thr Lys

```

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

 <400> 12

5

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

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

<210> 13

<211> 346

<212> PRT

5 <213> *Pseudomonas aeruginosa*

<400> 13

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

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para retardar un proceso de desarrollo de una planta que comprende exponer una planta o parte de una planta a una o más enzimas aisladas, en el que la una o más enzimas aisladas se seleccionan del grupo que comprende nitrilo-hidratasa, amidasa, asparaginasa y sus combinaciones, y en el que la una o más enzimas aisladas se exponen a la planta o parte de la planta en una cantidad suficiente para retardar el proceso de desarrollo de una planta.
2. El método de la reivindicación 1, en el que la una o más enzimas aisladas son proporcionadas por una o más bacterias.
- 10 3. El método de la reivindicación 2, en el que la una o más enzimas aisladas son purificadas o semi-purificadas de la una o más bacterias.
4. El método de la reivindicación 2 o 3, en el que la una o más bacterias se seleccionan del grupo que consiste en *Rhodococcus spp.*, *Brevibacterium ketoglutamicum*, *Pseudomonas chloroaphis* y sus mezclas.
- 15 5. El método de la reivindicación 4, en el que la una o más bacterias incluyen *Rhodococcus spp.*, opcionalmente, en el que la *Rhodococcus spp.* incluye la cepa *Rhodococcus rhodochrous* DAP 96253, la cepa *Rhodococcus sp.* DAP 96622, *Rhodococcus erythropolis* o sus mezclas.
6. El método de la reivindicación 2 o 3, en el que la una o más bacterias son inducidas por exposición a un agente inductor seleccionado del grupo que consiste en asparagina, glutamina, cobalto, urea y sus mezclas.
7. El método de la reivindicación 1, en el que la planta o parte de la planta es expuesta indirecta o directamente a la una o más enzimas aisladas.
- 20 8. El método de la reivindicación 1, en el que el proceso de desarrollo de una planta es maduración de frutas, maduración de verduras o abscisión de hojas.
9. El método de la reivindicación 1, en el que la parte de la planta es una fruta, una verdura o una flor; opcionalmente, en el que la fruta es una fruta climatérica, opcionalmente en el que la fruta climatérica se selecciona del grupo que consiste en plátanos, melocotones, ciruelas, nectarinas, manzanas, tomates, peras y aguacates.
- 25 10. El método de la reivindicación 1, en el que la parte de la planta es una flor y el proceso de desarrollo de una planta es senescencia floral, marchitamiento, abscisión o cierre de pétalos, opcionalmente en el que la flor es un clavel, rosa, orquídea, verdolaga, malva o begonia.
11. El método de la reivindicación 1, en el que el retardo del proceso de desarrollo de una planta da como resultado un mayor periodo de conservación o facilita el transporte a mayor distancia de la planta o parte de la planta.
- 30 12. El método de la reivindicación 1, en el que la una o más enzimas aisladas se inmovilizan y se colocan en, se colocan sobre o se fijan a una estructura física.
13. Un aparato para retardar un proceso de desarrollo de una planta que comprende múltiples capas, en el que al menos una capa comprende un catalizador que comprende una o más enzimas aisladas seleccionadas del grupo que consiste en nitrilo-hidratasa, amidasa, asparaginasa y sus combinaciones, en el que el catalizador está colocado en, está colocado sobre o está fijado a una estructura física, y en el que la una o más enzimas aisladas están dispuestas en una cantidad suficiente para retardar el proceso de desarrollo de una planta.
- 35 14. El aparato de la reivindicación 13, en el que la una o más enzimas aisladas están inmovilizadas en una matriz que comprende DEAE-celulosa reticulada, una matriz que comprende alginato, una matriz que comprende carragenanos, una matriz que comprende poliácridamida o perlas de alginato cálcico.
- 40 15. El aparato para retardar un proceso de desarrollo de una planta de la reivindicación 13, en el que el aparato es un aparato con catalizador permeable al aire para retardar un proceso de desarrollo de una planta y comprende:
- una primera capa; y
- una segunda capa que incluye un catalizador que comprende una o más enzimas aisladas seleccionadas del grupo que consiste en nitrilo-hidratasa, amidasa, asparaginasa y sus combinaciones, en el que la una o más enzimas aisladas están dispuestas en una cantidad suficiente para retardar el proceso de desarrollo de una planta;
- 45 en el que la primera capa proporciona integridad estructural al aparato.
16. El aparato de cualquiera de las reivindicaciones 13 a 15, en el que la estructura física es una película, lámina, capa de recubrimiento, caja, bolsita, bolsa o cámara ranurada.

