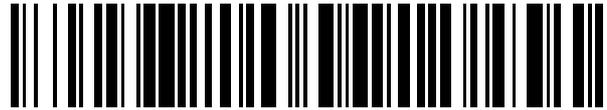


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 562 791**

51 Int. Cl.:

**C12N 9/78** (2006.01)

**C12N 11/00** (2006.01)

**C12P 7/42** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.10.2008 E 08845012 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.12.2015 EP 2215226**

54 Título: **Mejoras en nitrilasa microbiana inmovilizada para la producción de ácido glicólico**

30 Prioridad:

**31.10.2007 US 930744**

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

**08.03.2016**

73 Titular/es:

**E. I. DU PONT DE NEMOURS AND COMPANY  
(100.0%)  
Chestnut Run Plaza, 974 Center Road, P.O. Box  
2915  
Wilmington, DE 19805, US**

72 Inventor/es:

**DICOSIMO, ROBERT y  
BEN-BASSAT, ARIE**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 562 791 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

Mejoras en nitrilasa microbiana inmovilizada para la producción de ácido glicólico

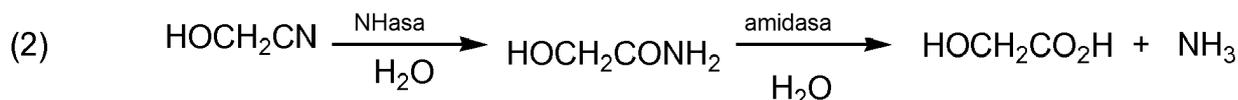
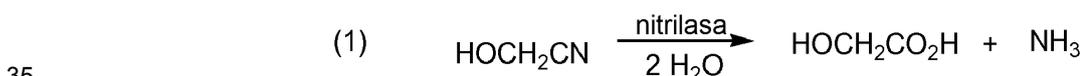
## Campo de la invención

5 Esta invención se refiere al campo de la síntesis de ácidos orgánicos y a la microbiología. Más específicamente, se proporciona un procedimiento para mejorar la actividad específica de un catalizador enzimático deshidratado que tiene actividad de nitrilasa para la hidrólisis de glicolonitrilo a ácido glicólico por rehidratación. En particular, se proporciona un procedimiento para pretratar un catalizador enzimático que tiene actividad de nitrilasa con glutaraldehído, inmovilizar las células pretratadas con glutaraldehído y reticular químicamente las células inmovilizadas antes de la deshidratación. Tras la rehidratación, el catalizador enzimático presenta una mejor actividad específica de nitrilasa en comparación con los catalizadores enzimáticos que tienen actividad de nitrilasa que son deshidratados y rehidratados sin dicho tratamiento.

## Antecedentes de la invención

15 El ácido glicólico (HOCH<sub>2</sub>COOH; Número de registro en *Chemical Abstracts* (CAS) 79-14-1) es el miembro más sencillo de la familia de los α-hidroxiácidos de los ácidos carboxílicos. Sus propiedades lo hacen ideal para un amplio espectro de aplicaciones de consumo e industriales, incluyendo el uso en la rehabilitación de pozos de agua, la industria del cuero, la industria del petróleo y gas, y la industria de lavandería y textil, como monómero en la preparación de poli(ácido glicólico) (PGA) y como componente en productos para el cuidado personal. El ácido glicólico es también un ingrediente principal para agentes de limpieza en una variedad de industrias (agentes de limpieza para equipos de tratamiento en las industrias láctea y alimentaria, agentes de limpieza para el hogar e instituciones, agentes de limpieza industriales [para equipo de transporte, mampostería, placas de circuitos impresos, calderas de acero inoxidable y equipos de procedimientos, torres de refrigeración/intercambiadores de calor] y el procesamiento de metales [para el decapado de metales, abrillantamiento de cobre, ataque químico, electrochapado y electropolido]). También se ha informado de que el poli(ácido glicólico) es útil como material barrera para gases (es decir, presenta altas características de barrera para el oxígeno) para el envasado de alimentos y bebidas carbónicas (documento WO 2005/106005 A1). Sin embargo, la síntesis química tradicional del ácido glicólico produce una cantidad significativa de impurezas que se deben eliminar antes de su uso. Por tanto sería muy bien recibida en la industria una nueva tecnología para producir comercialmente ácido glicólico, especialmente una que produzca ácido glicólico de alta pureza y a bajo coste.

20 Los catalizadores enzimáticos microbianos pueden hidrolizar un nitrilo (por ejemplo, glicolonitrilo) directamente a los correspondientes ácidos carboxílicos (por ejemplo, ácido glicólico) usando una nitrilasa (EC 3.5.5.7), donde no hay producción intermedia de la amida correspondiente (Ecuación 1), o por una combinación de las enzimas nitrilo-hidratasa (EC 4.2.1.84) y amidasa (EC 3.5.1.4), donde una nitrilo-hidratasa (NHasa) convierte inicialmente un nitrilo en una amida, y luego la amida es convertida posteriormente por la amidasa en el correspondiente ácido carboxílico (Ecuación 2):



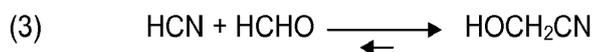
40 La hidrólisis enzimática de nitrilos a ácido glicólico con fines comerciales requiere la producción del catalizador enzimático a gran volumen por fermentación. Gran parte del volumen es atribuible al contenido de agua del caldo de fermentación. Debido a que dicho caldo de fermentación de gran volumen, el almacenamiento, y en muchos casos el transporte de dicho caldo de fermentación que contiene el catalizador enzimático, se plantean tanto problemas logísticos como económicos. Un mecanismo para proporcionar facilidad de almacenamiento y transporte del catalizador enzimático es aislar el catalizador enzimático del caldo de fermentación, inmovilizar el catalizador enzimático (por ejemplo, mediante atrapamiento en un gel de carragenina), y deshidratar el catalizador enzimático inmovilizado. El catalizador enzimático inmovilizado puede ser rehidratado antes de su uso para la producción de ácido glicólico. Sin embargo, la deshidratación y la rehidratación frecuentemente dan como resultado una pérdida significativa de la actividad enzimática.

45 La deshidratación o secado de catalizadores celulares inmovilizados se ha descrito previamente. La patente de EE.UU. 5.998.180 describe un procedimiento para la producción de una nitrilasa microbiana inmovilizada y secada, donde las células de *Rhodococcus rhodochrous* NCIMB 40757 o NCIMB 408333 que contienen dicha nitrilasa retienen al menos 80% de su actividad inicial después de la inmovilización en perlas de poli(acrilamida) reticulada, y donde la nitrilasa celular inmovilizada resultante retiene al menos 90% de su actividad inmovilizada

inicial después de que las perlas de poliacrilamida reticulada sean secadas hasta 12% de humedad a 60°C. B. DeGiulio et al., (*World J. Microbiol. Biotechnol.* 21: 739-746, (2005)) describen la inmovilización de bacterias de ácido láctico en alginato de calcio, seguido por liofilización del catalizador celular inmovilizado resultante, en donde al menos 72% de las células retuvo la actividad metabólica después de la liofilización. La patente de EE.UU. 5.846.762 describe la deshidratación de perlas de gelatina que contienen celobiasa covalentemente inmovilizada, y señala en la columna 6, líneas 9-11, que el alginato de calcio y la perlas de kappa-carragenina, una vez deshidratados, generalmente no pueden ser rehidratados.

Ninguno de los métodos descritos inmediatamente antes, para la deshidratación o liofilización de catalizadores enzimáticos inmovilizados y posterior rehidratación implica una mejora en la actividad de la enzima recuperada después de la rehidratación, o mejora en la estabilidad de la actividad enzimática cuando se emplea el catalizador enzimático rehidratado resultante en una reacción para convertir sustrato en producto, en comparación con un catalizador enzimático inmovilizado y rehidratado comparable que no se preparó con células pretratadas con glutaraldehído.

Además de la pérdida de actividad del catalizador enzimático como resultado del tratamiento de dicho catalizador enzimático, tal como en el caso de deshidratación/rehidratación, la hidrólisis enzimática de glicolonitrilo a ácido glicólico requiere típicamente una forma sustancialmente pura de glicolonitrilo. Se han descrito previamente métodos para sintetizar glicolonitrilo por reacción de soluciones acuosas de formaldehído y cianuro de hidrógeno (Patentes de EE.UU. 2.175.805; 2.890.238; y 5.187.301; Ecuación 3).



Sin embargo, estos métodos dan como resultado típicamente un producto de reacción de glicolonitrilo acuoso que requiere una purificación significativa (por ejemplo, purificación por destilación) puesto que muchas de las impurezas y/o subproductos de la reacción (incluyendo el exceso de formaldehído reactivo) pueden interferir con la conversión enzimática de glicolonitrilo en ácido glicólico, incluyendo la supresión de la actividad del catalizador (es decir, disminución de la actividad específica). En particular, es bien sabido que el formaldehído puede crear modificaciones indeseables en las proteínas por reacción con los grupos amino de residuos de aminoácidos N-terminales y las cadenas laterales de residuos de arginina, cisteína, histidina, y lisina (Metz et al., *J. Biol. Chem.*, 279 (8): 6235-6243 (2004)). La supresión de la actividad del catalizador disminuye la productividad global del catalizador (es decir, gramos totales de ácido glicólico formados por gramo de catalizador), añadiendo un costo significativo al procedimiento global que puede hacer la producción enzimática económicamente no viable en comparación con la síntesis química. Como tales, se necesitan condiciones de reacción que puedan ayudar a proteger la actividad enzimática contra las impurezas indeseables que disminuyen la actividad del catalizador.

Se ha descrito un método de producir glicolonitrilo de alta pureza sometiendo formaldehído a un tratamiento térmico antes de la reacción de síntesis del glicolonitrilo (solicitudes de patente US 2006/0160196 y US 2006/0247467; Ecuación 3). Sin embargo, el glicolonitrilo puede disociarse reversiblemente en formaldehído y cianuro de hidrógeno. Por tanto, sigue habiendo necesidad de proteger la actividad de nitrilasa contra los efectos indeseables tanto del formaldehído como del cianuro de hidrógeno producidos por la disociación de glicolonitrilo.

El documento WO 01/04278 enseña un método para conservar células microbianas inmovilizadas o no inmovilizadas que tienen actividad de nitrilasa y para estabilizar la actividad de nitrilasa de células microbianas no inmovilizadas.

Panova et al., *Adv. Synth. Catal.* 2007, 349, 1462-1467 describen un procedimiento quimioenzimático para la producción de ácido glicólico de alta pureza usando un transformante de *E. coli* MG1655 inmovilizada en carragenina y reticulada con glutaraldehído/polietilenamina que expresa el mutante de nitrilasa de *A. facilis* 72W.

La patente de EE.UU. 5.508.181 describe también dificultades similares relacionadas con la inactivación rápida del catalizador enzimático cuando se convierten compuestos de nitrilo en alfa-hidroxiácidos. Específicamente, la patente de EE.UU. 5.508.181 establece que los compuestos de alfa-hidroxi-nitrilo se disocian parcialmente en los aldehídos correspondientes, de acuerdo con el equilibrio de disociación. Se informó de estos aldehídos inactivaban la enzima en un corto período de tiempo uniéndose a la proteína, lo que hace que sea difícil obtener el  $\alpha$ -hidroxiácido o la  $\alpha$ -hidroxi-amida en una alta concentración con una alta productividad a partir de alfa-hidroxi-nitrilos (col. 2, líneas 16-29). Como solución para evitar la inactivación de la enzima debido a la acumulación de aldehídos, se añadieron a la mezcla de reacción iones fosfato o hipofosfito. Similarmente, la patente de EE.UU. 5.326.702 describe el uso de iones sulfito, disulfito o ditionito para secuestrar el aldehído y prevenir la inactivación de la enzima, pero concluye que la concentración de  $\alpha$ -hidroxiácido producido y acumulada incluso usando tales aditivos no es suficiente para la mayoría de los propósitos comerciales.

Además la patente de EE.UU. 6.037.155 enseña que la baja acumulación de producto  $\alpha$ -hidroxiácido está relacionada con la inactivación enzimática en un corto período de tiempo, debido a la acumulación del aldehído disociado. Los inventores de dicha patente sugieren que la actividad enzimática es inhibida en presencia de cianuro de hidrógeno (Asano et al., *Agricultural Biological Chemistry*, Vol. 46, pp. 1165-1174 (1982)) generado en la

disociación parcial del  $\alpha$ -hidroxi-nitrilo en agua junto con el aldehído o cetona correspondiente (Mowry, David T., *Chemical Reviews*, vol. 42, pp. 189-283 (1948)). Los inventores abordan el problema de la inactivación enzimática inducida por el aldehído usando microorganismos cuya actividad enzimática podría ser mejorada por adición de una sustancia de cianuro a la mezcla de reacción. La adición de una sustancia de cianuro limitaría la disociación del  $\alpha$ -hidroxi-nitrilo a aldehído y cianuro de hidrógeno. Si bien esta táctica proporciona un beneficio para el sistema, sólo se refiere a un aspecto asociado con la inactivación enzimática en la conversión de glicolonitrilo en ácido glicólico, porque, como se ha indicado anteriormente, se sabe que el glicolonitrilo se disocia reversiblemente en cianuro de hidrógeno y formaldehído, y se sabe que ambos afectan negativamente a la actividad del catalizador enzimático.

El documento WO 2006/069114 proporciona un procedimiento para producir ácido glicólico a partir de formaldehído y cianuro de hidrógeno. Más específicamente, el formaldehído tratado térmicamente y el cianuro de hidrógeno se hacen reaccionar para producir glicolonitrilo que tiene bajas concentraciones de impurezas. El glicolonitrilo se convierte posteriormente en una solución acuosa de glicolato de amonio usando un catalizador enzimático que tiene actividad de nitrilasa derivado de *Acidovorax facilis* 72W (ATCC 57746).

Se ha desarrollado un procedimiento separado para proteger la actividad específica de un catalizador enzimático que tiene actividad de nitrilasa cuando convierte glicolonitrilo en ácido glicólico en presencia de formaldehído, donde se consiguieron mejoras significativas en la actividad y estabilidad del catalizador por adición a la mezcla de reacción de un protector de amina o por inmovilización del catalizador nitrilasa en o sobre una matriz que se compone de un protector de amina, por ejemplo PEI, polialilamina, PVOH/polivinilamina, etc. En ese sistema, se mejora la actividad específica del catalizador en presencia de formaldehído.

El documento WO 2007/036235 se refiere a la inmovilización de enzimas, absorbiendo las enzimas, una amina polifuncional y un agente de reticulación sobre un soporte poroso en partículas en un aparato mezclador o en un aparato de lecho fluido.

La patente EP1233057 enseña la esterilización de una célula microbiana viable habiendo producido en ella una enzima industrialmente útil, sin desactivar la enzima.

A pesar de que muchos de los medios anteriores mejoraron la productividad del catalizador nitrilasa para el ácido glicólico, se sigue todavía observando generalmente una disminución significativa en la actividad enzimática inicial de la nitrilasa microbiana inmovilizada en el uso de dicho catalizador en las reacciones para la hidrólisis de glicolonitrilo, por ejemplo, en reacciones por lotes consecutivas con reciclaje del catalizador, o en la etapa inicial de puesta en marcha de una reacción continua en depósito agitado (abreviadamente en lo sucesivo CSTR por la expresión inglesa *Continuous Stirred Tank Reaction*) o un reactor de columna de lecho fijo. El problema de la pérdida significativa de actividad inicial de la nitrilasa durante la hidrólisis de glicolonitrilo fue abordado en parte por el pretratamiento del catalizador microbiano con glutaraldehído antes de la inmovilización en carragenina, donde se retuvo un porcentaje significativamente mayor de la actividad específica inicial de la nitrilasa microbiana inmovilizada ( $\mu$ moles de glicolonitrilo hidrolizado por minuto y por gramo de catalizador) durante la hidrólisis de glicolonitrilo a ácido glicólico (como sal de amonio).

La patente de EE.UU. 4.288.552 describe (columna 1, líneas 46-49, y columna 2, líneas 50-55) que las enzimas sensibles al glutaraldehído (tales como tiol-enzimas (por ejemplo, nitrilasa) y otras con un grupo SH en el sitio activo, o muy cerca de él, de la molécula de enzima) son inactivadas por agentes reactivos con tiol, tal como glutaraldehído. Por lo tanto, no sólo era impredecible que el pretratamiento de un catalizador enzimático que tiene actividad de nitrilasa con glutaraldehído no diera como resultado una disminución significativa de la actividad de nitrilasa microbiana antes de la inmovilización, pero sorprendentemente, el pretratamiento con glutaraldehído se encontró que beneficiaba la actividad del catalizador enzimático, particularmente cuando el catalizador enzimático inmovilizado fue deshidratado, y posteriormente rehidratado antes de su uso para la hidrólisis de glicolonitrilo a ácido glicólico. El procedimiento de la presente invención evita una pérdida significativa de actividad durante las etapas de deshidratación/rehidratación, y da como resultado un catalizador enzimático inmovilizado y rehidratado con una actividad inicial y posterior estabilidad de la actividad del catalizador enzimático durante el posterior uso de la enzima inmovilizada rehidratada para la conversión de glicolonitrilo en ácido glicólico. Este beneficio incorporado en el procedimiento descrito en la presente memoria que se proporciona para hacer frente a la necesidad de un procedimiento comercial, que incluye una etapa de deshidratación, para producir un catalizador enzimático que tiene actividad específica mejorada para la producción de ácido glicólico después de la rehidratación.

Por lo tanto, el problema a resolver es la necesidad de un procedimiento comercialmente viable para la producción de un catalizador enzimático que tenga actividad de nitrilasa para la hidrólisis de glicolonitrilo a ácido glicólico con actividad específica mejorada. Más específicamente, se necesita un procedimiento comercialmente aceptable para el uso de un catalizador enzimático que tenga actividad de nitrilasa para la hidrólisis de glicolonitrilo a ácido glicólico que minimice la pérdida de la actividad enzimática resultante de la deshidratación y la rehidratación antes de su uso y como resultado de la inactivación por impurezas o disociación de los reaccionantes.

### Sumario de la invención

Los presentes problemas han sido resueltos proporcionando un procedimiento para producir un catalizador enzimático deshidratado que tiene actividad de nitrilasa con actividad específica mejorada, que comprende:

- (a) producir por fermentación un catalizador enzimático que tiene actividad de nitrilasa;
- 5 (b) pretratar dicho catalizador enzimático con glutaraldehído;
- (c) inactivar opcionalmente el glutaraldehído sin reaccionar con bisulfito después del pretratamiento con glutaraldehído;
- (d) recuperar el catalizador enzimático de (b) o (c) e inmovilizar dicho catalizador enzimático en carragenina;
- 10 (e) reticular el catalizador enzimático inmovilizado en carragenina resultante de (d) con glutaraldehído y polietilenimina; y
- (f) deshidratar el catalizador enzimático inmovilizado y reticulado producido en la etapa (e);

en donde dicho catalizador enzimático comprende un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55 y 57.

- 15 También se describe un procedimiento para producir un catalizador enzimático inmovilizado y deshidratado que tiene una mejor actividad específica después de la rehidratación y el uso de dicho catalizador enzimático para la conversión de glicolonitrilo en ácido glicólico, comprendiendo dicho procedimiento:

- (a) producir por fermentación un catalizador enzimático que tiene actividad de nitrilasa;
- (b) pretratar dicho catalizador enzimático con glutaraldehído;
- 20 (c) inactivar opcionalmente el glutaraldehído sin reaccionar con bisulfito después del pretratamiento con glutaraldehído;
- (d) recuperar el catalizador enzimático de (b) o (c) e inmovilizar dicho catalizador enzimático en carragenina;
- (e) reticular el catalizador enzimático inmovilizado en carragenina resultante de (d) con glutaraldehído y polietilenimina; y
- 25 (f) deshidratar el catalizador enzimático inmovilizado y reticulado producido en la etapa (e).

Un aspecto adicional de la invención es rehidratar el catalizador inmovilizado y deshidratado de la etapa (f) anterior, en una solución acuosa. Y además, poner en contacto dicho catalizador enzimático rehidratado con glicolonitrilo en una solución acuosa, con lo cual se produce ácido glicólico. En un aspecto adicional, el ácido glicólico se recupera de dicha solución acuosa.

- 30 El catalizador enzimático inmovilizado que se produce por el procedimiento de las etapas (a) a (f) anteriores, conserva un porcentaje significativamente mayor de su actividad específica inicial ( $\mu$ moles de glicolonitrilo hidrolizado por minuto y por gramo de catalizador) cuando se compara con un catalizador enzimático inmovilizado preparado sin pretratamiento con glutaraldehído del catalizador enzimático antes de la inmovilización, reticulación, deshidratación y rehidratación, cuando se utiliza para la conversión de glicolonitrilo en ácido glicólico (como la sal de amonio).
- 35

- La solicitud proporciona el catalizador enzimático deshidratado como un mejor catalizador enzimático que tiene actividad de nitrilasa. El catalizador enzimático pretratado con glutaraldehído inmovilizado, reticulado y deshidratado de la invención conserva al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 75%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 85%, o al menos aproximadamente 90% de su actividad específica después de la rehidratación.
- 40

### Breve descripción de la figura, listado de secuencias y los depósitos biológicos

La invención puede ser entendida más completamente a partir de la figura, lista de secuencias, los depósitos biológicos, y la descripción detallada que juntos forman esta solicitud.

#### Figura

- 45 La Figura 1, paneles A-G, es un alineamiento por el programa CLUSTAL W (versión 1.83 utilizando parámetros por defecto) de varias secuencias de nitrilasa. La secuencia distintiva del catalizador conservada que rodea al residuo de cisteína del catalizador está resaltada con sombreado gris. Están subrayados los aminoácidos que

representan la tríada catalítica (Glu<sub>48</sub>, Lys<sub>130</sub> y Cys<sub>164</sub>; con la numeración basada en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4).

#### Listado de secuencias

5 Las siguientes descripciones de secuencias y listados de secuencias adjuntas cumplen con las normas que rigen las descripciones de secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos en las solicitudes de patentes como se establece en el 37 C.F.R §1.821-1.825. Las descripciones de secuencias contienen el código de una letra para los caracteres de las secuencias de nucleótidos y los códigos de tres letras para los aminoácidos como se define de conformidad con las normas de la IUPAC-IYUB descritas en *Nucleic Acids Research* 13: 3021-3030 (1985) y en el *Biochemical Journal* 219 (Nº 2): 345-373 (1984). Los símbolos y formatos utilizados para los datos de secuencias de nucleótidos y aminoácidos cumplen con las normas establecidas en 37 C.F.R §1.822.

10 La SEQ ID NO: 1 es la secuencia de aminoácidos del resto distintivo catalítico que abarca el residuo de cisteína esencial de las enzimas nitrilasas (Fórmula 1).

La SEQ ID NO: 2 es la secuencia de aminoácidos de un resto distintivo catalítico preferido que abarca el residuo de cisteína esencial de las enzimas nitrilasas (Fórmula 2).

15 La SEQ ID NO: 3 es la secuencia de nucleótidos de la secuencia codificadora de nitrilasa de *Acidovorax facilis* 72W que comprende un cambio en el codón de inicio de TTG a ATG para facilitar la expresión recombinante en *E. coli*.

La SEQ ID NO: 4 es la secuencia de aminoácidos deducida de la nitrilasa de *Acidovorax facilis* 72W (ATCC 55746).

20 La SEQ ID NO: 5 es la secuencia de aminoácidos de la nitrilasa de *Alcaligenes faecalis* JM3 (GENBANK® BAA02684.1).

La SEQ ID NO: 6 es la secuencia de aminoácidos de la nitrilasa de *Rhodococcus rhodochrous* J1 (GENBANK® Q03217).

La SEQ ID NO: 7 es la secuencia de aminoácidos de la nitrilasa de *Rhodococcus rhodochrous* K22 (GENBANK® Q02068).

25 La SEQ ID NO: 8 es la secuencia de aminoácidos de la nitrilasa de *Nocardia sp.* C-14-1 (GENBANK® AAX18182.1).

La SEQ ID NO: 9 es la secuencia de aminoácidos de la nitrilasa de *Bordetella bronchiseptica* RB50 (GENBANK® NP\_887662.1).

30 La SEQ ID NO: 10 es la secuencia de aminoácidos de la nitrilasa de *Arabidopsis thaliana* (GENBANK® AAB60275.1 y AAA19627.1).

La SEQ ID NO: 11 es la secuencia de aminoácidos de la nitrilasa de *Synechococcus elongatus* PCC 7942 (GENBANK® YP\_399857.1).

La SEQ ID NO: 12 es la secuencia de aminoácidos de la nitrilasa de *Synechococcus elongatus* PCC 6301 (GENBANK® YP\_171411.1).

35 La SEQ ID NO: 13 es la secuencia de aminoácidos de la nitrilasa de *Synechocystis sp.* PCC 6803 (GENBANK® NP\_442646.1).

La SEQ ID NO: 14 es la secuencia de aminoácidos de la nitrilasa de *Entomophila Pseudomonas* L48 (GENBANK® YP\_609048.1).

40 La SEQ ID NO: 15 es la secuencia de aminoácidos de la nitrilasa de *Zymomonas mobilis* (GENBANK® YP\_162942.1).

La SEQ ID NO: 16 es la secuencia de aminoácidos de la nitrilasa de *Bacillus sp.* OxB-1 (GENBANK® BAA90460.1).

La SEQ ID NO: 17 es la secuencia de aminoácidos de la nitrilasa de *Comamonas testosteroni* (GENBANK® AAA82085.1).

45 La SEQ ID NO: 18 es la secuencia de aminoácidos de la nitrilasa de *Synechococcus sp.* CC9605 (GENBANK® YP\_381420.1).

## ES 2 562 791 T3

- La SEQ ID NO: 19 es la secuencia de aminoácidos de la nitrilasa de *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 (GENBANK® YP\_260015.1).
- La SEQ ID NO: 20 es la secuencia de aminoácidos de la nitrilasa de *Nocardia farcinica* IFM 10152 (GENBANK® YP\_119480.1).
- 5 La SEQ ID NO: 21 es la secuencia de aminoácidos de la nitrilasa de *Alcaligenes faecalis* 1650 (GENBANK® AAY06506.1).
- La SEQ ID NO: 22 es la secuencia de aminoácidos de la nitrilasa de *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B728a (GENBANK® AAY35081.1).
- 10 La SEQ ID NO: 23 es la secuencia de aminoácidos de la nitrilasa de *Bradyrhizobium* sp. BTail (GENBANK® ZP\_00859948.1).
- La SEQ ID NO: 24 es la secuencia de aminoácidos de la nitrilasa de *Rhodococcus rhodochrous* NCIMB 11216 (GENBANK® CAC88237).
- La SEQ ID NO: 25 es la secuencia de aminoácidos de la nitrilasa de *Rhodococcus rhodochrous* ATCC™ 39484.
- 15 La SEQ ID NO: 26 es la secuencia de nucleótidos de una nitrilasa mutante de *A. facilis* 72W que comprende un cambio de codón que dio como resultado una única sustitución de aminoácido en el residuo de la posición 201 (L201Q; Leu → Gln).
- La SEQ ID NO: 27 es la secuencia de aminoácidos deducida de la nitrilasa mutante (SEQ ID NO: 26) que comprende una única sustitución de aminoácido en el residuo de la posición 201 (Leu201 → Gln) de la nitrilasa de *A. facilis* 72W.
- 20 La SEQ ID NO: 28 es la secuencia de nucleótidos de una nitrilasa mutante de *A. facilis* 72W que comprende un cambio de codón que dió como resultado una única sustitución de aminoácido en el residuo de la posición 201 (L201A; Leu → Ala).
- La SEQ ID NO: 29 es la secuencia de aminoácidos deducida de la nitrilasa mutante (SEQ ID NO: 28) que comprende una única sustitución de aminoácido en el residuo de la posición 201 (Leu201 → Ala) de la nitrilasa de *A. facilis* 72W.
- 25 La SEQ ID NO: 30 es la secuencia de nucleótidos de una nitrilasa mutante de *A. facilis* 72W que comprende un cambio de codón que dió como resultado una única sustitución de aminoácido en el residuo de la posición 201 (L201C; Leu → Cys).
- La SEQ ID NO: 31 es la secuencia de aminoácidos deducida de la nitrilasa mutante (SEQ ID NO: 30) que comprende una única sustitución de aminoácido en el residuo de la posición 201 (Leu201 → Cys) de la nitrilasa de *A. facilis* 72W.
- 30 La SEQ ID NO: 32 es la secuencia de nucleótidos de una nitrilasa mutante de *A. facilis* 72W que comprende un cambio de codón que dió como resultado una única sustitución de aminoácido en el residuo de la posición 201 (L201T; Leu → Thr).
- 35 La SEQ ID NO: 33 es la secuencia de aminoácidos deducida de la nitrilasa mutante (SEQ ID NO: 32) que comprende una única sustitución de aminoácido en el residuo de la posición 201 (Leu201 → Thr) de la nitrilasa de *A. facilis* 72W.
- La SEQ ID NO: 34 es la secuencia de nucleótidos de una nitrilasa mutante de *A. facilis* 72W que comprende un cambio de codón que dio como resultado una única sustitución de aminoácido en el residuo de la posición 201 (L201 G; Leu → Gly).
- 40 La SEQ ID NO: 35 es la secuencia de aminoácidos deducida de la nitrilasa mutante (SEQ ID NO: 34) que comprende una única sustitución de aminoácido en el residuo de la posición 201 (Leu201 → Gly) de la nitrilasa de *A. facilis* 72W.
- La SEQ ID NO: 36 es la secuencia de nucleótidos de una nitrilasa mutante de *A. facilis* 72W que comprende un cambio de codón que dio como resultado una única sustitución de aminoácido en el residuo de la posición 201 (L201 H; Leu → His).
- 45 La SEQ ID NO: 37 es la secuencia de aminoácidos deducida de la nitrilasa mutante (SEQ ID NO: 36) que comprende una única sustitución de aminoácido en el residuo de la posición 201 (Leu201 → His) de la nitrilasa de *A. facilis* 72W.

## ES 2 562 791 T3

- La SEQ ID NO: 38 es la secuencia de nucleótidos de una nitrilasa mutante de *A. facilis* 72W que comprende un cambio de codón que dió como resultado una única sustitución de aminoácido en el residuo de la posición 201 (L201 K; Leu → Lys).
- 5 La SEQ ID NO: 39 es la secuencia de aminoácidos deducida de la nitrilasa mutante (SEQ ID NO: 38) que comprende una única sustitución de aminoácido en el residuo de la posición 201 (Leu201 → Lys) de la nitrilasa de *A. facilis* 72W.
- La SEQ ID NO: 40 es la secuencia de nucleótidos de una nitrilasa mutante de *A. facilis* 72W que comprende un cambio de codón que dió como resultado una única sustitución de aminoácido en el residuo de la posición 201 (L201 N; Leu → Asn).
- 10 La SEQ ID NO: 41 es la secuencia de aminoácidos deducida de la nitrilasa mutante (SEQ ID NO: 40) que comprende una única sustitución de aminoácido en el residuo de la posición 201 (Leu201 → Asn) de la nitrilasa de *A. facilis* 72W.
- La SEQ ID NO: 42 es la secuencia de nucleótidos de una nitrilasa mutante de *A. facilis* 72W que comprende un cambio de codón que dió como resultado una única sustitución de aminoácido en el residuo de la posición 201 (L201S; Leu → Ser).
- 15 La SEQ ID NO: 43 es la secuencia de aminoácidos deducida de la nitrilasa mutante (SEQ ID NO: 42) que comprende una única sustitución de aminoácido en el residuo de la posición 201 (Leu201 → Ser) de la nitrilasa de *A. facilis* 72W.
- La SEQ ID NO: 44 es la secuencia de nucleótidos de una nitrilasa mutante de *A. facilis* 72W que comprende un cambio de codón que dió como resultado una única sustitución de aminoácido en el residuo de la posición 168 (F168K; Phe → Lys).
- 20 La SEQ ID NO: 45 es la secuencia de aminoácidos deducida de la nitrilasa mutante (SEQ ID NO: 44) que comprende una única sustitución de aminoácido en el residuo de la posición 168 (Phe168 → Lys) de la nitrilasa de *A. facilis* 72W.
- 25 La SEQ ID NO: 46 es la secuencia de nucleótidos de una nitrilasa mutante de *A. facilis* 72W que comprende un cambio de codón que dió como resultado una única sustitución de aminoácido en el residuo de la posición 168 (F168M; Phe → Met).
- La SEQ ID NO: 47 es la secuencia de aminoácidos deducida de la nitrilasa mutante (SEQ ID NO: 46) que comprende una única sustitución de aminoácido en el residuo de la posición 168 (Phe168 → Met) de la nitrilasa de *A. facilis* 72W.
- 30 La SEQ ID NO: 48 es la secuencia de nucleótidos de una nitrilasa mutante de *A. facilis* 72W que comprende un cambio de codón que dió como resultado una única sustitución de aminoácido en el residuo de la posición 168 (F168T; Phe → Thr).
- La SEQ ID NO: 49 es la secuencia de aminoácidos deducida de la nitrilasa mutante (SEQ ID NO: 48) que comprende una única sustitución de aminoácido en el residuo de la posición 168 (Phe168 → Thr) de la nitrilasa de *A. facilis* 72W.
- 35 La SEQ ID NO: 50 es la secuencia de nucleótidos de una nitrilasa mutante de *A. facilis* 72W que comprende un cambio de codón que dió como resultado una única sustitución de aminoácido en el residuo de la posición 168 (F168V; Phe → Val).
- 40 La SEQ ID NO: 51 es la secuencia de aminoácidos deducida de la nitrilasa mutante (SEQ ID NO: 50) que comprende una única sustitución de aminoácido en el residuo de la posición 168 (Phe168 → Val) de la nitrilasa de *A. facilis* 72W.
- La SEQ ID NO: 52 es la secuencia de nucleótidos de una nitrilasa mutante de *A. facilis* 72W que comprende un cambio de codón que dió como resultado una única sustitución de aminoácidos en el residuo de la posición 168 (T210A; Thr → Ala).
- 45 La SEQ ID NO: 53 es la secuencia de aminoácidos deducida de la nitrilasa mutante (SEQ ID NO: 52) que comprende una única sustitución de aminoácido en el residuo de la posición 210 (Thr210 → Ala) de la nitrilasa de *A. facilis* 72W.
- 50 La SEQ ID NO: 54 es la secuencia de nucleótidos de una nitrilasa mutante de *A. facilis* 72W que comprende un cambio de codón que dió como resultado una única sustitución de aminoácido en el residuo de la posición 168 (T210C; Thr → Cys).

La SEQ ID NO: 55 es la secuencia de aminoácidos deducida de la nitrilasa mutante (SEQ ID NO: 54) que comprende una única sustitución de aminoácido en el residuo de la posición 210 (Thr210 → Cys) de la nitrilasa de *A. facilis* 72W.

5 La SEQ ID NO: 56 es la secuencia de nucleótidos de la nitrilasa de *A. facilis* 72W expresada en la cepa *i* SS1001 de *E. coli* (ATCC PTA-1177).

La SEQ ID NO: 57 es la secuencia de aminoácidos deducida de la nitrilasa mutante de *A. facilis* 72W expresada en la cepa SS1001 de *E. coli* (ATCC PTA-1177).

### Depósitos biológicos

10 Los siguientes depósitos biológicos se han hecho en los términos del Tratado de Budapest sobre Reconocimiento internacional del Depósito de microorganismos para los fines del procedimiento en materia de patentes:

Referencia para identificación del depositante	Designación internacional del depósito	Fecha del depósito
<i>Acidovorax facilis</i> 72W	ATCC 55746	8 de marzo 1996
<i>E. coli</i> SS1001	ATCC PTA-1177	11 de enero 2000

Como se usa en la presente memoria, "ATCC" se refiere al Organismo internacional para el depósito de microorganismos *American Type Culture Collection* domiciliado en ATCC, 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209, EE.UU. La "Designación del depósito Internacional" es el número de acceso al cultivo depositado en ATCC.

15 Los depósitos mencionados se mantendrán en el depósito internacional indicado durante al menos treinta (30) años y se pondrán a disposición del público tras la concesión de una patente que los describe. La disponibilidad de un depósito no constituye una licencia para practicar la presente invención en derogación de los derechos de patente concedidos por la acción gubernamental.

### Descripción detallada de la invención

20 Se proporciona un procedimiento para mejorar la actividad específica de un catalizador enzimático inmovilizado, reticulado y deshidratado, que tiene actividad de nitrilasa para la hidrólisis de glicolonitrilo a ácido glicólico después de la rehidratación. En particular, se proporciona un procedimiento para pretratar con glutaraldehído un catalizador enzimático que tiene actividad de nitrilasa, inmovilizar las células pretratadas con glutaraldehído y reticular químicamente las células inmovilizadas antes de la deshidratación. Después de la rehidratación, el catalizador enzimático pretratado con glutaraldehído, inmovilizado y reticulado presenta mejor actividad específica de nitrilasa en comparación con catalizadores enzimáticos inmovilizados y reticulados que tienen actividad de nitrilasa que están deshidratados y rehidratados sin dicho tratamiento.

### Definiciones:

30 En esta descripción, se utilizan una serie de términos y abreviaturas. Salvo que se especifique lo contrario se aplican las siguientes definiciones.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "que comprende" significa la presencia de las características, números enteros, etapas o componentes indicados a los que se refieren las reivindicaciones, pero que no excluye la presencia o adición de una o más de otras características, números enteros, etapas, componentes o sus grupos.

35 Tal como se usa en la presente memoria, el término "aproximadamente" que modifica la cantidad de un ingrediente o reaccionante de la invención empleado se refiere a la variación en la cantidad numérica que puede ocurrir, por ejemplo, por los procedimientos típicos de medición y manipulación de líquidos utilizados para preparar concentrados o soluciones de uso en el mundo real; por errores involuntarios en estos procedimientos; por diferencias en la fabricación, la fuente o la pureza de los ingredientes empleados para preparar las composiciones o llevar a cabo los métodos; y similares. El término "aproximadamente" incluye también cantidades que difieren debido a las diferentes condiciones de equilibrio para una composición que resulta de una mezcla inicial particular. Sean o no modificadas por el término "aproximadamente", las reivindicaciones incluyen equivalentes a las cantidades. En una realización, el término "aproximadamente" significa dentro de 10% del valor numérico descrito, preferiblemente dentro de 5% del valor numérico descrito.

45 Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "glicolonitrilo" se abrevia como "GLN" y es sinónimo de hidroxiacetonitrilo, 2-hidroxiacetonitrilo, hidroximetilnitrilo y todos los demás sinónimos del compuesto de número de registro en el *Chemical Abstracts Service* (CAS) 107-16-4.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "ácido glicólico" se abrevia como "GLA" y es sinónimo de ácido hidroxiaacético, ácido hidroxietanoico y todos los demás sinónimos del compuesto de número de registro en el CAS 79-14-1. El ácido glicólico producido por los presentes procedimientos puede estar en forma del ácido carboxílico protonizado y/o la sal de amonio correspondiente.

5 Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "glicolato de amonio" se abrevia "NH<sub>4</sub>GLA".

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "glicolamida" es la amida derivada de la reacción de amoníaco con ácido glicólico y se refiere a todos los otros sinónimos de compuesto que tienen el número de registro CAS 598-42-5.

10 Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "glicólido" se refiere al compuesto de número de registro en el CAS 502-97-6.

15 Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "formaldehído" se abrevia como "FA" y es sinónimo de aldehído fórmico, aldehído metílico, oxometano, y todos los demás sinónimos del compuesto de número de registro en el CAS 50-00-0. El formaldehído comercialmente disponible se compone típicamente de una mezcla de formaldehído monómero ("formaldehído libre") y diversos oligómeros de formaldehído junto con algo de metanol (típicamente alrededor de 1% en peso a alrededor de 15% en peso).

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "cianuro de hidrógeno" es sinónimo de ácido prúsico, ácido cianhídrico y todos los demás sinónimos del compuesto de número de registro en el CAS 200-821-6.

20 Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "glutaraldehído" se abrevia "GA" y es sinónimo de pentanodial, 1,5-pentanodial, 1,5-pentanodiona, aldehído diglutárico, glutaral, glutardialdehído, dialdehído del ácido glutárico, dialdehído glutárico y todos las demás sinónimos de los compuestos de número de registro en el CAS 111-30-8.

25 Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "bisulfito" o "bisulfito de sodio" es sinónimo de sal sódica del ácido sulfuroso, sal monosódica del ácido sulfuroso, sulfito de sodio e hidrógeno, hidrogenosulfito de sodio, sulfito monosódico, sulfito ácido de sodio, bisulfito de sodio, bisulfato de sodio (sic), hidrogenosulfito de sodio, sulfito de sodio (NaHSO<sub>3</sub>) y todos los otros sinónimos del compuesto de número de registro en el CAS 7631-90-5.

30 Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "recuperación" significa aislamiento, purificación o transferencia del producto formado por el presente procedimiento. Los métodos para aislar y purificar el o los productos a partir de la mezcla de reacción son bien conocidos en la técnica y pueden incluir, aunque sin limitación, precipitación selectiva, cristalización, filtración, extracción con disolventes reactivos, intercambio iónico, electrodialisis, polimerización, destilación, descomposición térmica, alcoholisis, cromatografía en columna y sus combinaciones. En una realización, el término "recuperación" también puede incluir transferencia de la mezcla de productos (típicamente después de filtrar el catalizador enzimático) a otra reacción para crear uno o más productos. En una realización preferida, se utiliza intercambio iónico para recuperar el ácido glicólico.

35 Tal como se usa en la presente memoria, los términos "catalizador enzimático", "catalizador nitrilasa" o "catalizador de células microbianas" se refiere a un catalizador que se caracteriza por una actividad de nitrilasa (es decir, comprende al menos un polipéptido que tiene actividad de nitrilasa) para la conversión de glicolonitrilo en ácido glicólico y amoníaco. Una enzima nitrilasa convierte directamente un nitrilo (preferiblemente, un nitrilo alifático) en el ácido carboxílico correspondiente, sin formación de la amida correspondiente como producto intermedio (véase la ecuación 1). Las nitrilasas comparten varios dominios distintivos conservados conocidos en la técnica, incluyendo un dominio distintivo en la presente invención denominado "secuencia distintiva catalítica" o "secuencia distintiva". Esta región comprende un residuo de cisteína esencial (por ejemplo, Cys<sub>164</sub> de la SEQ ID NO: 4). Como tales, los polipéptidos que tienen actividad de nitrilasa se pueden identificar por la existencia de la secuencia distintiva de dominio catalítico (SEQ ID NO: 1). En una realización preferida, la secuencia distintiva es la SEQ ID NO: 2. El catalizador enzimático puede estar en forma de células microbianas enteras o células microbianas permeabilizadas. Tal como se usa en la presente memoria, "catalizador enzimático reciclado" se refiere a un catalizador enzimático que se reutiliza como catalizador enzimático en reacciones por lotes o continuas. Dependiendo de la etapa del procedimiento de producción o utilización del catalizador enzimático descrito en la presente memoria, el catalizador enzimático puede ser pretratado con glutaraldehído, inmovilizado, reticulado y deshidratado o rehidratado.

50 Tal como se utiliza en la presente memoria, los términos "*Acidovorax facilis*" y "*A. facilis*" se usan intercambiabilmente y se refieren a *Acidovorax facilis* 72W depositado en la *American Type Culture Collection* (una autoridad internacional de depósito), que tiene el número de acceso 55746 ("ATCC 55746"). Las nitrilasas mutantes derivadas de *A. facilis* 72W caracterizadas por su mejor actividad de nitrilasa en convertir glicolonitrilo en ácido glicólico han sido descritas previamente (véase la patente de EE.UU. 7.198.927 compartida con la sociedad titular de la presente). Ejemplos de estas nitrilasas mutantes derivadas de *A. facilis* 72W se proporcionan en las SEQ ID NO: 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53 y 55.

Tal como se utiliza en la presente memoria, los términos "*Escherichia coli*" y "*E. coli*". se usan intercambiamente. Varias cepas de *E. coli* adecuadas para la expresión recombinante se describen en la presente memoria, incluyendo, aunque sin limitación, *E. coli* MG1655 que tiene el número de depósito internacional ATCC 47076, *E. coli* FM5 que tiene el número de depósito internacional ATCC 53911, *E. coli* W3110 que tiene el número de depósito internacional ATCC 27325, *E. coli* MC4100 que tiene el número de depósito internacional ATCC 35695 y *E. coli* W1485 que tiene el número de depósito internacional ATCC 12435. En una realización las cepas de *Escherichia coli* adecuadas incluyen *E. coli* FM5 (ATCC 53911) y *E. coli* MG1655 (ATCC 47076).

Tal como se utiliza en la presente memoria, los términos "*E. coli* SS1001" o "SS1001" se refieren a una cepa de *E. coli* transformada que expresa la nitrilasa de *Acidovorax facilis* 72W que tiene el número de acceso en ATCC PTA-1177 (véase la patente de EE.UU. 6.870.038; incorporada en la presente memoria en su totalidad como referencia). La nitrilasa de *E. coli* SS1001 expresada recombinantemente (SEQ ID NO: 57) contiene 2 cambios de secuencia menores en comparación con la secuencia de nitrilasa de 72W de tipo natural (SEQ ID NO: 4). El codón de iniciación estaba cambiado de GTG a ATG para facilitar la expresión recombinante y se introdujo un artefacto durante la clonación que dio como resultado un cambio de un único aminoácido cerca del extremo C (Pro367 [CCA] → Ser [TCA]).

Tal como se utiliza en la presente memoria, los términos "mezcla de reacción de glicolonitrilo acuosa adecuada" y "mezcla de reacción acuosa adecuada" se refieren a los materiales (incluyendo al menos un protector de amina) y agua en la que entran en contacto el glicolonitrilo y el catalizador enzimático. Los componentes de la mezcla de reacción acuosa adecuada se proporcionan en la presente memoria y los expertos en la técnica apreciarán la gama de variaciones de componentes adecuada para este procedimiento.

Tal como se utiliza en la presente memoria, los términos "solución de glicolato de amonio acuosa", "solución acuosa que comprende glicolato de amonio" y "solución acuosa de glicolato de amonio" se utilizarán para describir una solución acuosa que comprende glicolato de amonio producido por la hidrólisis enzimática de glicolonitrilo bajo condiciones típicas de reacción enzimática (es decir, un intervalo de pH de aproximadamente 6 a aproximadamente 8). La solución acuosa de glicolato de amonio comprende glicolato de amonio a una concentración de al menos aproximadamente 0,1 por ciento en peso a aproximadamente 99% en peso de glicolato de amonio. En otra realización, la solución acuosa de glicolato de amonio se compone de al menos aproximadamente 10% en peso a aproximadamente 75% en peso glicolato de amonio. En una realización adicional, la solución acuosa de glicolato de amonio se compone de al menos aproximadamente 20% en peso a aproximadamente 50% en peso de glicolato de amonio. El pH de la solución acuosa de glicolato de amonio puede ser de aproximadamente 2 a aproximadamente 12, preferiblemente 5 a aproximadamente 10, más preferiblemente 6 a aproximadamente 8. El pH se puede ajustar según sea necesario antes de iniciar las etapas del procedimiento relacionadas con la recuperación del ácido glicólico (en forma de ácido o sal) de la solución acuosa de glicolato de amonio.

Tal como se usa en la presente memoria, los términos "productividad del catalizador" y "productividad del catalizador enzimático" se refieren a la cantidad total de producto producida por gramo de peso de células secas de catalizador enzimático. En la presente invención, el catalizador enzimático comprende una enzima nitrilasa (EC 3.5.5.7) y el producto formado es ácido glicólico y/o glicolato de amonio (dependiendo del pH de la reacción). En general, los procedimientos producidos que pretenden producir ácido glicólico se realizan en condiciones esencialmente de pH neutro de modo que el ácido glicólico producido esté predominantemente en forma de la sal correspondiente del ácido glicólico (es decir, glicolato de amonio). Generalmente, en reacciones por lotes con reciclaje del catalizador, la actividad del catalizador disminuye con cada reacción de reciclaje (inactivación enzimática).

Tal como se usa en la presente memoria, el término "productividad volumétrica" se refiere a la producción volumétrica de ácido glicólico en la reacción, expresada como gramos de ácido glicólico producido por volumen de mezcla de reacción por unidad de tiempo. Típicamente la productividad volumétrica se expresa como gramos de ácido glicólico /L/h.

El término "actividad de nitrilasa" o "actividad específica" se refiere a la actividad enzimática por unidad de masa (por ejemplo, miligramos) de proteína, peso de células secas o peso de perlas (catalizador inmovilizado) cuando se convierte glicolonitrilo en ácido glicólico (o el glicolato de amonio correspondiente). Se midieron comparaciones de la actividad de nitrilasa proporcionales al peso de células secas o al peso de perlas.

Tal como se usa en la presente memoria, el término "una unidad de actividad enzimática" o "una unidad de actividad de nitrilasa" o "U" se define como la cantidad de actividad enzimática requerida para la producción de 1  $\mu$ mol de producto ácido glicólico por minuto (U de GLA/g en peso de células secas o en peso de perlas) a una temperatura especificada (por ejemplo, 25°C).

Tal como se utiliza en la presente memoria, los términos "actividad relativa de nitrilasa", "mejor actividad de nitrilasa", y "mejora relativa de la actividad de nitrilasa" se refieren a la actividad de nitrilasa expresada como un múltiplo (o fracción) de una actividad de nitrilasa de referencia (control). Las nitrilasas descritas en la presente

memoria muestran una mejora significativa de la actividad de nitrilasa en relación con la actividad de nitrilasa observada con la nitrilasa de *Acidovorax facilis* 72W natural. Una "mejora significativa" de la actividad relativa de nitrilasa es una mejora de al menos 1,5 veces mayor que la actividad de nitrilasa en comparación con la actividad de nitrilasa de un control en condiciones de reacción idénticas. En otra realización, la mejora es al menos 2 veces mayor que la actividad de nitrilasa en comparación con la actividad de nitrilasa del control en condiciones de reacción idénticas. En una realización adicional, la mejora es al menos 4 veces mayor que la actividad de nitrilasa en comparación con la actividad de nitrilasa del control en condiciones de reacción idénticas.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "velocidad de reacción inicial" es una medición de la velocidad de conversión de glicolonitrilo en ácido glicólico en las condiciones de reacción indicadas, donde la medición de la velocidad de reacción comienza tras la adición inicial de glicolonitrilo a la mezcla de reacción, y donde la velocidad de reacción se mide durante un período de tiempo en el que la concentración de glicolonitrilo se mantiene por encima de aproximadamente 50 milimolar (mM) durante el curso de la reacción. La velocidad de reacción se mide como el cambio en la concentración de ácido glicólico producido por unidad de tiempo (por ejemplo, en moles de ácido glicólico/L/min o mM de ácido glicólico/hora).

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "mejora de la retención de la actividad específica inicial" se refiere a una comparación de un catalizador enzimático pretratado con glutaraldehído, inmovilizado y reticulado con un catalizador enzimático no pretratado con glutaraldehído, inmovilizado y reticulado, teniendo ambos actividad de nitrilasa, durante la conversión de glicolonitrilo en ácido glicólico en las condiciones de reacción establecidas después de la deshidratación y rehidratación, medida como micromoles de ácido glicólico producido por minuto y por g en peso de células secas de catalizador enzimático, o micromoles de ácido glicólico producido por minuto y por g de catalizador enzimático inmovilizado y reticulado, en donde la actividad específica como se mide en una primera reacción o reacción "inicial" después de la rehidratación, es retenida en mayor medida por el catalizador enzimático pretratado con glutaraldehído, inmovilizado y reticulado que por el catalizador enzimático no pretratado con glutaraldehído, inmovilizado y reticulado, para una o más reacciones posteriores. La mejora más notable, como se describe en la presente memoria, es para la cantidad de actividad retenida para la reacción inmediatamente después de una reacción por lotes inicial, medida en una o más reacciones por lotes subsiguientes con reciclaje del catalizador. Una segunda mejora notable, como se describe en la presente memoria, es para la cantidad de actividad retenida durante el curso de la realización de la reacción en un reactor de depósito continuamente agitado (CSTR), o en un reactor de flujo de pistón en lecho fijo, o en un reactor de lecho fluidizado o de lecho semi-fluidizado, después de la producción de al menos 40 g de ácido glicólico por gramo en peso de células secas de catalizador enzimático pretratado con glutaraldehído, inmovilizado y reticulado que ha sido deshidratado y rehidratado.

Tal como se utiliza en la presente memoria, los términos "organismo recombinante", "hospedante transformado", "transformante", "organismo transgénico", y "hospedante microbiano transformado" se refieren a un organismo hospedante que ha sido transformado con DNA heterólogo o extraño. Los organismos recombinantes de la presente invención expresan secuencias codificadoras extrañas o genes que codifican la enzima nitrilasa activa. "Transformación" se refiere a la transferencia de un fragmento de DNA al organismo hospedante. El fragmento de DNA transferido puede ser incorporado cromosómica o extracromosómicamente (es decir, a través de un vector) en el organismo hospedante. Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "casete de transformación" se refiere a un fragmento específico de DNA que contiene un conjunto de elementos genéticos convenientemente dispuestos para su inserción en una célula hospedante, por lo general como parte de un plásmido. Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "casete de expresión" se refiere a un fragmento específico de DNA que contiene un conjunto de elementos genéticos convenientemente dispuestos para su inserción en una célula hospedante, por lo general como parte de un plásmido que también permite una mayor expresión génica en el hospedante.

Tal como se utiliza en la presente memoria, los términos "fragmento de ácido nucleico" y "molécula de ácido nucleico" se refieren a una molécula de DNA que puede codificar un gen completo, la secuencia codificadora, y/o secuencias reguladoras que preceden (5', aguas arriba) o siguen (3', aguas abajo) a la secuencia codificadora. En un aspecto, las presentes moléculas de ácidos nucleicos codifican polipéptidos que tienen actividad de nitrilasa.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "gen" se refiere a una molécula de ácido nucleico que expresa una proteína específica. Como se usa en la presente memoria, puede o no puede incluir secuencias reguladoras que preceden (secuencias 5' no codificadoras) y que siguen (secuencias 3' no codificadoras) a la secuencia codificadora. "Gen quimérico" se refiere a cualquier gen que no es un gen natural, que comprende secuencias reguladoras y codificadoras que no se encuentran juntas en la naturaleza. Por consiguiente, un gen quimérico puede comprender secuencias reguladoras y secuencias codificadoras que se derivan de diferentes fuentes o secuencias reguladoras y secuencias codificadoras derivadas de la misma fuente, pero dispuestas de una manera diferente a la encontrada en la naturaleza. "Gen endógeno" se refiere a un gen natural en su localización natural en el genoma de un organismo. Un gen "extraño" se refiere a un gen que no se encuentra normalmente en el organismo hospedante, pero que se introduce en el organismo hospedante por transferencia de genes. Los genes extraños pueden comprender genes naturales insertados en un organismo no natural o genes

quiméricos. Un "transgén" es un gen que ha sido introducido en el genoma por un procedimiento de transformación.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "secuencia codificadora" se refiere a una secuencia de DNA que codifica una secuencia específica de aminoácidos. Tal como se usa en la presente memoria, "secuencias reguladoras adecuadas" se refieren a secuencias de nucleótidos localizadas aguas arriba (secuencias no codificadoras en 5'), dentro de, o aguas abajo (secuencias no codificadoras en 3') de una secuencia codificadora, y que influyen en la transcripción, procesamiento o estabilidad del RNA, o la traducción de la secuencia codificadora asociada. Las secuencias reguladoras pueden incluir promotores, secuencias situadas antes de las secuencias que se traducen, intrones, secuencias de reconocimiento de poliadenilación, sitios de procesamiento del RNA, sitios de unión a efectores, y estructuras de tallo-bucle.

"Promotor" se refiere a una secuencia de DNA capaz de controlar la expresión de una secuencia codificadora o RNA funcional. En general, una secuencia codificadora está situada en 3' respecto a una secuencia promotora. Los promotores pueden derivarse en su totalidad de un gen natural o estar compuestos de diferentes elementos derivados de diferentes promotores encontrados en la naturaleza, o incluso comprender segmentos de DNA sintéticos. Los promotores que hacen que un gen se exprese en la mayoría de tipos de células, en la mayoría de veces, o bajo la mayoría de condiciones ambientales se denominan comúnmente "promotores constitutivos". Los promotores que hacen que un gen se exprese sólo en presencia de un compuesto particular o condición ambiental se denominan comúnmente "promotores inducibles". Dado que en la mayoría de los casos los límites exactos de las secuencias reguladoras no han sido completamente definidos, los fragmentos de DNA de diferentes longitudes pueden tener idéntica actividad promotora.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "unida operativamente" se refiere a la asociación de secuencias de ácido nucleico con una única molécula de ácido nucleico de modo que la función de una secuencia se ve afectada por la otra. Por ejemplo, un promotor está unido operativamente a una secuencia codificadora cuando es capaz de afectar a la expresión de esa secuencia codificadora (es decir, que la secuencia codificadora está bajo el control transcripcional del promotor). Las secuencias codificadoras pueden unirse operativamente a las secuencias reguladoras en orientación con sentido o antisentido.

Tal como se usa en la presente memoria, el término "secuencias no codificadoras en 3' " se refiere a secuencias de DNA localizadas aguas abajo de una secuencia codificadora e incluyen secuencias de reconocimiento de la poliadenilación (normalmente limitadas a eucariotas) y otras secuencias que codifican señales reguladoras capaces de afectar el procesamiento del mRNA o a la expresión génica. La señal de poliadenilación (normalmente limitada a los eucariotas) se caracteriza normalmente por afectar a la adición de tramos de poli(ácido adenílico) al extremo 3' del precursor del mRNA.

Los expertos en la técnica conocen bien el "sesgo de codones" exhibido por una célula hospedante específica en el uso de codones de nucleótidos para especificar un aminoácido dado. Por lo tanto, cuando se sintetiza un gen para mejorar la expresión en una célula hospedante, es deseable diseñar el gen de modo que su uso de codones refleje el sesgo de codones preferido por la célula hospedante. Un estudio de genes derivados de la célula hospedante cuando está disponible la información de la secuencia puede determinar su sesgo de codones. La optimización de codones es bien conocida en la técnica y se ha descrito para varios sistemas, incluyendo, aunque sin limitación, levadura (Outchkourov et al., *Protein Expr. Purif.* 24 (1): 18-24 (2002)) y *E. coli* (Feng et al., *Biochemistry*, 39 (50):15399-15409 (2000)).

Catalizadores enzimáticos que tienen actividad de nitrilasa.

Todas las nitrilasas (EC 3.5.5.7) comparten una triada catalítica conservada (Glu, Lys y Cys) (Chauhan et al., *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 61:118-122 (2003); Pace, H. and Brenner, C., *Genome Biol.* [archivo digital en Internet] 2(1):reviews 0001.1-0001.9 (2001)). Todas las nitrilasas conocidas tienen una cisteína nucleófila en el sitio de la actividad enzimática (Cowan et al., *Extremophiles*, 2:207-216 (1998); Pace, H. and Brenner, C., *supra*; y Chauhan et al., *supra*) y todas son susceptibles de inactivación por reactivos de tiol (concentraciones 1,0 mM de cloruro de cobre, nitrato de plata, acetato mercúrico o cloruro férrico producían cada uno disminuciones importantes en la actividad de la enzima nitrilasa de *A. facilis* 72W). Los residuos de cisteína son también capaces de ser oxidados irreversiblemente a ácido sulfínico, dando como resultado una pérdida de la actividad enzimática. A pesar de la sensibilidad de las enzimas nitrilasas a diversos mecanismos inactivantes, las células de *A. facilis* 72W inmovilizadas son robustas, y capaces de retener mucha de su actividad de nitrilasa después de numerosas reacciones de reciclaje (Patentes de EE.UU. 6.870.038; 7.148.051 y 7.198.927; y Chauhan et al., *supra*). Los catalizadores nitrilasas derivados de la nitrilasa de *A. facilis* 72W han demostrado también catalizar la conversión de  $\alpha$ -hidroxinitrilos (es decir, glicolonitrilos) a ácidos  $\alpha$ -hidroxicarboxílicos (es decir, ácido glicólico) (véanse las patentes de EE.UU. 6.383.786; 6.416.980 y 7.198.927).

Se han descrito comparaciones de secuencias de la nitrilasa de *A. facilis* 72W con otras nitrilasas bacterianas (Patente de EE.UU. 6.870.038; Chauhan et al., *supra*). La nitrilasa de 72W tiene diversos dominios distintivos conservados incluyendo una región de 16 aminoácidos cerca del extremo amino (residuos de aminoácidos 40-55

de la SEQ ID NO: 4) y una región catalítica de 12 aminoácidos (residuos de aminoácidos 160-171 de la SEQ ID NO: 4) que contiene el residuo de cisteína esencial. Este residuo de cisteína esencial (Cys<sub>164</sub> de la SEQ ID NO: 4), junto con el ácido glutámico conservado (Glu<sub>48</sub> de la SEQ ID NO:4) y los residuos de lisina (Lys<sub>130</sub> de la SEQ ID NO:4), forman el resto de la triada catalítica encontrado en todas las nitrilasas (Pace, H., y Brenner, C., *supra*).

5 Las regiones que rodean cada uno de los residuos de la triada catalítica están altamente conservadas, especialmente la región que rodea al residuo catalítico de cisteína. El residuo catalítico de cisteína esencial está localizado en una región altamente conservada denominada el "resto distintivo catalítico" o "resto distintivo". Por tanto, el procedimiento descrito en la presente memoria es útil para proteger la actividad enzimática de cualquier nitrilasa que contenga el resto distintivo catalítico definido por la Fórmula 1 (los residuos de aminoácidos en letras **negritas** indican los residuos de aminoácidos estrictamente conservados, los residuos de aminoácidos en letra *cursiva* son los que presentan mínima variabilidad [es decir, una variación mínima de 3 o menos residuos de aminoácidos], el residuo catalítico de cisteína está subrayado):

Fórmula 1 (SEQ ID NO: 1). **Gly-Xaa<sub>1</sub>-Xaa<sub>2</sub>-Xaa<sub>3</sub>-Cys-Trp-Glu-Xaa<sub>4</sub>-Xaa<sub>5</sub>-Xaa<sub>6</sub>-Xaa<sub>7</sub>-Xaa<sub>8</sub>**

en donde

15 Xaa<sub>1</sub> = Ala o Gly;

Xaa<sub>2</sub> = Leu, Val o Ala;

Xaa<sub>3</sub> = Ala, Asn, Ile, Cys, Val o Gln;

Xaa<sub>4</sub> = His o Asn;

Xaa<sub>5</sub> = Leu, Tyr, Phe, Ala, Met, Lys, Val, Thr o Arg;

20 Xaa<sub>6</sub> = Asn, Gln, Met, Leu o Ser;

Xaa<sub>7</sub> = Pro o Thr; y

Xaa<sub>8</sub> = Leu o Val.

En una realización preferida, el resto distintivo de nitrilasa de Fórmula 1 es Xaa<sub>1</sub> = Ala o Gly; Xaa<sub>2</sub> = Leu; Xaa<sub>3</sub> = Ala, Asn, Ile, Cys, Val o Gln; Xaa<sub>4</sub> = His; Xaa<sub>5</sub> = Leu, Tyr, Phe, Ala, Met, Lys, Val, Thr o Arg; Xaa<sub>6</sub> = Ser, Gln, Asn o Met; Xaa<sub>7</sub> = Pro; y Xaa<sub>8</sub> = Leu; dando como resultado el resto distintivo catalítico representado por la siguiente fórmula:

Gly-Xaa<sub>1</sub>-Leu-Xaa<sub>3</sub>-Cys-Trp-Glu-His-Xaa<sub>5</sub>-Xaa<sub>6</sub>-Pro-Leu (SEQ ID NO: 2)

Ejemplos de nitrilasas, que incluyen las secuencias y la posición en la secuencia de resto distintivo catalítico correspondiente se proporcionan en la Tabla 1.

30 Tabla 1. Región de cisteína catalítica conservada - Restos distintivos catalíticos

Fuente de nitrilasa	Número de acceso en GenBank®	Secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:	Secuencia del resto distintivo (posiciones de los residuos de aminoácidos)
<i>Acidovorax facilis</i> 72W	ABD98457.1	4	GGLNCWEHFQPL (160-171)
<i>Alcaligenes faecalis</i> JM3	BAA02684.1	5	GALCCWEHLSPL (159-170)
<i>Rhodococcus rhodochrous</i> J1	Q03217	6	GALNCWEHFQTL (161-172)
<i>Rhodococcus rhodochrous</i> K22	Q02068	7	GGLNCWEHFQPL (166-177)
<i>Nocardia sp.</i> C-14-1	AAX18182.1	8	GGLNCWEHFQPL (154-165)
<i>Bordetella bronchiseptica</i> RB50	NP_887662.1	9	GAWCWENYMPL (161-172)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	AAB60275.1 AAA19627.1	10	GAAICWENRMPL (175-186)
<i>Synechococcus elongatus</i> PCC 7942	YP_399857.1	11	GALACWEHYNPL (157-168)
<i>Synechococcus elongatus</i> PCC 6301	YP_171411.1	12	GALACWEHYNPL (157-168)

Fuente de nitrilasa	Número de acceso en GenBank®	Secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:	Secuencia del resto distintivo (posiciones de los residuos de aminoácidos)
<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	NP_442646.1	13	GALACWEHYNPL (165-176)
<i>Pseudomonas entomophila</i> L48	YP_6090481.1	14	GAAVCWENYMP (161-172)
<i>Zymomonas mobilis</i>	YP_162942.1	15	GAAICWENYMPV (161-172)
<i>Bacillus</i> sp. OxB-1	BAA90460.1	16	GGLQCWEHFLPL (158-169)
<i>Comamonas testosteroni</i>	AAA82085.1	17	GGLQCWEHALPL (159-170)
<i>Synechococcus</i> sp. CC9605	YP_381420.1	18	GALACWEHYNPL (156-167)
<i>Pseudomonas fluorescens</i> Pf-5	YP_260015.1	19	GAVICWENMMPL (161-172)
<i>Nocardia farcinica</i> IFM 10152	YP_119480.1	20	GALCCWEHLQPL (159-170)
<i>Alcaligenes faecalis</i> 1650	AAY06506.1	21	GALCCWEHLSPL (159-170)
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> B728a	AAY35081.1	22	GALCCWEHLQPL (157-168)
<i>Bradyrhizobium</i> sp. BTail	ZP_00859948.1	23	GALCCWEHLQPL (163-174)
<i>Rhodococcus rhodochrous</i> NCIMB 11216	CAC88237	24	GALNCWEHFQTL (161-172)
<i>Rhodococcus rhodochrous</i> ATCC 39484™	N/A	25	GALNCWEHFQTL (161-172)

También se describe en la presente memoria el catalizador nitrilasa que comprende un polipéptido que tiene actividad de nitrilasa, aislado de un género seleccionado del grupo que consiste en *Acidovorax*, *Rhodococcus*, *Nocardia*, *Bacillus* y *Alcaligenes*. En otro ejemplo, el catalizador nitrilasa comprende un polipéptido que tiene actividad de nitrilasa aislado de un género seleccionado del grupo que consiste en *Acidovorax* y *Rhodococcus*.

- 5 En otra realización, el polipéptido que tiene actividad de nitrilasa procede de *Acidovorax facilis* 72W (ATCC 55746) o un polipéptido (que tiene actividad de nitrilasa) que es sustancialmente similar a la nitrilasa de *Acidovorax facilis* 72W (SEQ ID NO: 4) o la enzima derivada de *A. facilis* 72W representada por la SEQ ID NO: 51.

En una realización, el catalizador nitrilasa es una célula microbiana hospedante transformada para expresar al menos un polipéptido que tiene actividad de nitrilasa. En una realización, la célula hospedante transformada se selecciona del grupo que consiste en: *Comamonas* sp., *Corynebacterium* sp., *Brevibacterium* sp., *Rhodococcus* sp., *Azotobacter* sp., *Citrobacter* sp., *Enterobacter* sp., *Clostridium* sp., *Klebsiella* sp., *Salmonella* sp., *Lactobacillus* sp., *Aspergillus* sp., *Saccharomyces* sp., *Yarrowia* sp., *Zygosaccharomyces* sp., *Pichia* sp., *Kluyveromyces* sp., *Candida* sp., *Hansenula* sp., *Dunaliella* sp., *Debaryomyces* sp., *Mucor* sp., *Torulopsis* sp., *Methylobacteria* sp., *Bacillus* sp., *Escherichia* sp., *Pseudomonas* sp., *Rhizobium* sp., y *Streptomyces* sp. En una realización preferida, la célula microbiana hospedante se selecciona del grupo que consiste en *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp. y *Escherichia* sp. En una realización preferida, el catalizador es una célula hospedante de *Escherichia coli* que expresa recombinantemente uno o más de los polipéptidos que tienen actividad de nitrilasa.

También se describe en la presente memoria el catalizador nitrilasa que comprende un polipéptido que tiene actividad de nitrilasa, en donde dicho polipéptido que tiene actividad de nitrilasa tiene al menos 60% de identidad con la SEQ ID NO: 51, preferiblemente al menos 70% de identidad con la SEQ ID NO: 51, incluso más preferiblemente al menos 80% de identidad con la SEQ ID NO: 51, e incluso más preferiblemente al menos 90% de identidad con la SEQ ID NO: 51, y lo más preferiblemente al menos 95% de identidad con la SEQ ID NO: 51.

En la presente memoria se describen ejemplos de trabajo de diversos catalizadores que tienen actividad de nitrilasa derivados de diversas fuentes, incluyendo un catalizador derivado de nitrilasa de *A. facilis* 72W. Se han descrito en la técnica diversos mutantes derivados de la enzima nitrilasa de *Acidovorax facilis* 72W (Patentes de EE.UU. 7.148.051 y 7.198.927).

En una realización, el polipéptido que tiene actividad de nitrilasa se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55 y 57. En otra realización, el polipéptido que tiene actividad de nitrilasa se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 4, 24, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55 y 57. En

otra realización, el polipéptido que tiene actividad de nitrilasa se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 4, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55 y 57. En otra realización, el polipéptido que tiene actividad de nitrilasa se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 4, 24, 25 y 51. En otra realización, el catalizador nitrilasa comprende el polipéptido de la SEQ ID NO: 51.

#### 5 Nitrilasa de *Acidovorax facilis* 72W (ATCC 55746)

La nitrilasa de *A. facilis* 72W (EC 3.5.5.1) es un catalizador robusto para la producción de ácidos carboxílicos a partir de nitrilos alifáticos o aromáticos (documento WO 01/75077; Patente de EE.UU 6.870.038; y Chauhan et al., *supra*). También se ha demostrado que cataliza la conversión de  $\alpha$ -hidroxinitrilos (es decir, glicolonitrilo) en ácidos  $\alpha$ -hidroxicarboxílicos (es decir, ácido glicólico) (véanse las patentes de EE. UU. 6.383.786 y 6.416.980). Sin embargo, los catalizadores nitrilasa que tengan mejor actividad y/o estabilidad de nitrilasa (con relación a la nitrilasa de *A. facilis* 72W) cuando conviertan glicolonitrilo en ácido glicólico reducirán el coste de fabricación del ácido glicólico. Por tanto, un método para producir ácido glicólico que use un mejor catalizador de nitrilasa es útil para reducir el coste de fabricación del ácido glicólico, sin embargo la nitrilasa de *A. facilis* 72W es un catalizador enzimático para los fines de los procedimientos de la presente invención, así como dichas mejores nitrilasas descritas con detalle anteriormente.

#### Producción industrial del catalizador microbiano

Quando se desea la producción comercial de los catalizadores enzimáticos descritos en la presente memoria, se puede utilizar una variedad de metodologías de cultivo. Se pueden realizar operaciones de fermentación de modos por lotes, por lotes alimentados o continuo, siendo dichos métodos bien conocidos en la técnica (Thomas D. Brock en *Biotechnology: A Textbook of Industrial Microbiology*, Second edition (1989) Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA, (1989); Deshpande, Mukund V., *Appl. Biochem. Biotechnol.* 36(3): 227-234 (1992)).

Un método de cultivo por lotes clásico es un sistema cerrado donde la composición de los medios se ajusta al comienzo del cultivo y no está sometida a alteraciones artificiales durante el procedimiento de cultivo. Por tanto, al comienzo del procedimiento de cultivo el medio se inocula con el organismo u organismos deseados y se deja que tenga lugar el crecimiento o la actividad metabólica no añadiendo nada al sistema. Típicamente, sin embargo, un cultivo "por lotes" es por lote con respecto a la adición de la fuente de carbono y con frecuencia se realizan intentos de controlar factores tales como el pH y la concentración de oxígeno. En los sistemas por lotes, las composiciones de metabolitos y biomasa del sistema cambian constantemente hasta el momento en el que se termina el cultivo. Dentro de los cultivos por lotes, las células se moderan desde de una fase logarítmica estática hasta una fase logarítmica de alto crecimiento y finalmente hasta una fase estacionaria donde disminuye o se detiene la velocidad de crecimiento. Si no se tratan, las células en la fase estacionaria finalmente morirán. En algunos sistemas las células en la fase logarítmica son con frecuencia responsables de la mayor parte de la producción del producto final o producto intermedio. En otros sistemas se puede obtener una producción en fase estacionaria o post-exponencial.

Una variación en el sistema por lotes estándar es el sistema por lotes alimentado. Los procedimientos de cultivo por lotes alimentados son también adecuados en la presente invención y comprenden un sistema por lotes típico con la excepción de que el sustrato se añade en incrementos a medida que progresa el cultivo. Los sistemas por lotes alimentados son útiles cuando la represión de catabolitos es apta para inhibir el metabolismo de las células y cuando es deseable tener cantidades limitadas de sustrato en los medios. La medición de la concentración real del sustrato en los sistemas por lotes alimentados es difícil y por lo tanto se estima basándose en los cambios de factores medibles, tales como pH, oxígeno disuelto y presión parcial de los gases residuales, tales como CO<sub>2</sub>. Los métodos de cultivo por lotes y por lotes alimentados son usuales y bien conocidos en la técnica y se pueden encontrar ejemplos en Brock (*supra*) y Deshpande (*supra*).

La producción comercial de los presentes catalizadores enzimáticos que tienen actividad de nitrilasa también se puede realizar por un cultivo continuo. Los cultivos continuos son un sistema abierto en el que se añade continuamente a un biorreactor un medio de cultivo definido y se elimina simultáneamente durante el procedimiento una cantidad igual de medio acondicionado. Los cultivos continuos mantienen generalmente las células a una densidad en fase líquida alta y constante donde las células se desarrollan principalmente en fase logarítmica. Alternativamente, el cultivo continuo se puede realizar con células inmovilizadas a las que se añaden continuamente carbono y nutrientes y se eliminan continuamente de la masa celular productos valiosos, subproductos o productos residuales. La inmovilización celular se puede realizar utilizando una amplia gama de soportes sólidos compuestos de materiales naturales y/o sintéticos.

El cultivo continuo o semicontinuo permite la modulación de un factor o de cualquier número de factores que afecten al crecimiento celular o a la concentración celular final. Por ejemplo, un método mantendrá un nutriente limitante, tal como la fuente de carbono o el nivel de nitrógeno, en una tasa fija y permitirá que se moderen todos los demás parámetros. En otros sistemas, se pueden alterar continuamente una serie de factores que afecten al crecimiento mientras se mantenga constante la concentración celular, medida por la turbidez del medio. Los sistemas continuos intentan mantener las condiciones de crecimiento en estado estacionario y, por tanto, la

pérdida de células debido a los medios que se retiran debe equilibrarse con la tasa de crecimiento celular en el cultivo. Los métodos para modular los nutrientes y los factores de crecimiento en los procedimientos de cultivo continuos, así como las técnicas para maximizar la velocidad de formación de células, son bien conocidos en la técnica de la microbiología industrial y una variedad de métodos han sido detallados por Brock (*supra*).

5 Los medios de fermentación en la presente invención deben contener sustratos de carbono adecuados. Los sustratos adecuados pueden incluir, aunque sin limitación, monosacáridos, tales como glucosa y fructosa, disacáridos, tales como lactosa o sacarosa, polisacáridos, tales como almidón o celulosa, o sus mezclas, y mezclas no purificadas de materias primas renovables, tales como líquido filtrado de suero de queso, licor de maíz fermentado, melazas de remolacha azucarera y malta de cebada. Por tanto, se considera que la fuente de carbono  
10 utilizada en la presente invención puede abarcar una amplia variedad de sustratos que contengan carbono y solamente estará limitada por la elección del organismo.

Pretratamiento con glutaraldehído del catalizador enzimático antes de la inmovilización

15 El tratamiento con glutaraldehído de un cultivo de fermentación del catalizador enzimático puede ser una manera conveniente de matar los microbios en el cultivo, evitando así problemas de contención y seguridad en la manipulación, la conservación y el transporte asociados con los cultivos recombinantes vivos. Se ha descubierto ahora que el pretratamiento con glutaraldehído, o el pretratamiento con glutaraldehído seguido de tratamiento con bisulfito, puede preservar la actividad de nitrilasa en células en suspensión y en una forma inmovilizada.

20 La preservación de la actividad de nitrilasa por pretratamiento con glutaraldehído de un catalizador enzimático se ve afectada por el tiempo, la temperatura, la concentración de glutaraldehído, el pH y la concentración de productos inhibidores como amoníaco y otras aminas (por ejemplo, aminoácidos y péptidos) en los medios que interactúan con el glutaraldehído. Un método de pretratamiento con glutaraldehído preferido trata las células procedentes de la fermentación de alta densidad (100-150 DO<sub>550</sub>) con 5-10% en peso de glutaraldehído en agua que es suministrado preferiblemente como una mezcla adecuada de 50 mg a 500 mg de glutaraldehído/L-min, más preferiblemente suministrado como una mezcla adecuada de 50 mg a 200 mg de glutaraldehído/L-min, lo más  
25 preferiblemente suministrado como una mezcla adecuada de 50 mg a 100 mg de glutaraldehído/L-min, dando como resultado una concentración final de aproximadamente 3 g a aproximadamente 5 g de glutaraldehído/L (aproximadamente 0,025 g a aproximadamente 0,042 g de glutaraldehído por DO<sub>550</sub>), más preferiblemente de aproximadamente 3,6 g a aproximadamente 5 g de glutaraldehído/L (aproximadamente 0,030 g a aproximadamente 0,042 g de glutaraldehído por DO<sub>550</sub>). El cultivo pretratado con glutaraldehído se puede  
30 mantener en el fermentador durante aproximadamente 1 a 5 horas. A continuación se añade opcionalmente una solución al 10% en peso de bisulfito de sodio en agua a 1 g/L para inactivar el glutaraldehído residual.

35 El pH preferido para el pretratamiento con glutaraldehído del catalizador enzimático en el caldo de fermentación o en suspensión celular es desde pH 5,0 hasta 9,0, más preferiblemente desde pH 5,0 hasta 8,0, incluso más preferiblemente desde pH 5,0 hasta 7,0, todavía más preferiblemente desde pH 5,0 hasta 6,0, y lo más preferiblemente desde pH 5,0 hasta 5,5. La concentración de glutaraldehído residual después del pretratamiento con glutaraldehído es típicamente baja, en el intervalo de 10 - 200 ppm, y puede ser inactivado como se ha indicado anteriormente, con la adición de bisulfito de sodio hasta una concentración final de aproximadamente 1 g/L. Se encontró que el pretratamiento con glutaraldehído y bisulfito no tenía ningún efecto perjudicial significativo sobre la actividad de nitrilasa. La suspensión celular pretratada con glutaraldehído o glutaraldehído/bisulfito se  
40 enfría opcionalmente hasta 5 - 10°C, y se lava opcionalmente (por concentración y re-dilución de la suspensión celular o del caldo de fermentación) con agua o un tampón de conservación adecuado para eliminar el bisulfito residual y el glutaraldehído sin reaccionar.

Inmovilización del catalizador enzimático pretratado con glutaraldehído y reticulación química

45 Los métodos para la inmovilización de catalizadores enzimáticos han sido documentados ampliamente y son bien conocidos por los expertos en la técnica (*Methods in Biotechnology, Vol. 1: Immobilization of enzymes and Cells*; Gordon F. Bickerstaff, editor; Humana Press, Totowa, NJ, USA; 1997). También se ha documentado previamente la inmovilización del catalizador nitrilasa de *A. facilis* 72W (patente de EE.UU. 6.870.038).

50 Además, existe un método para la inmovilización en carragenina y posterior reticulación con glutaraldehído/polietilenimina del catalizador enzimático inmovilizado (y como se ha descrito en la patente de EE.UU. 6.870.038 y como se ha descrito con detalle en la patente de EE.UU. 6.551.804 B), sin embargo, un experto en la técnica reconocería y aplicaría fácilmente variaciones para realizar la inmovilización y reticulación.

55 Dichas variaciones están contempladas en la presente memoria y están dentro del alcance del presente procedimiento. Además, las cantidades o concentraciones de los componentes utilizados para la inmovilización y reticulación química variarán dependiendo de la cantidad y tipo de catalizador enzimático y la producción por fermentación del catalizador enzimático. Un experto en la técnica reconocería estos factores y ajustaría en consecuencia los procedimientos de inmovilización y reticulación química. Con relación a la reticulación con glutaraldehído y polietilenimina, la patente de EE.UU. 6.551.804 (*supra*), describe los procesos y procedimientos

para reticular químicamente células inmovilizadas con alginato. Dicha descripción se aplica también en la presente invención para células inmovilizadas en carragenina.

Deshidratación/rehidratación del catalizador enzimático microbiano inmovilizado en carragenina y reticulado con glutaraldehído/polietilenimina

5 Como se indicó anteriormente, un problema particular relacionado con el uso de un catalizador nitrilasa microbiano abordado en la presente solicitud es la conservación y transporte del catalizador enzimático. Aspectos de interés para la conservación y transporte de los catalizadores enzimáticos que tienen actividad de nitrilasa incluyen dificultades con el volumen del material y la inactivación de la actividad enzimática del material con el tiempo. Cuando se inmovilizó en carragenina y posteriormente se reticuló con glutaraldehído y polietilenimina, el catalizador nitrilasa microbiano inmovilizado resultante contenía aproximadamente 90% en peso de agua, y el catalizador se conservó típicamente a 5°C en un peso equivalente de tampón acuoso. Una reducción en la cantidad de agua presente en el catalizador de nitrilasa microbiano inmovilizado, y la eliminación del tampón acuoso utilizado para conservar el catalizador, disminuiría el volumen del catalizador y del tampón asociado necesario para ser transportado y conservado antes de su uso, y mejoraría aún más significativamente la economía de fabricación del ácido glicólico.

La deshidratación del catalizador enzimático inmovilizado y reticulado con glutaraldehído/polietilenimina se puede realizar por cualquier método conocido por los expertos en la técnica, incluyendo, aunque sin limitación, deshidratación al aire, deshidratación en una corriente de un gas inerte, deshidratación en una estufa a vacío con o sin purga con un gas inerte (por ejemplo, nitrógeno o argón) o liofilización (secado por congelación). La temperatura para la deshidratación puede variar preferiblemente desde aproximadamente 5°C hasta aproximadamente 60°C, más preferiblemente desde aproximadamente 15°C hasta aproximadamente 50°C y lo más preferiblemente desde aproximadamente 20°C hasta aproximadamente 40°C. Las perlas deshidratadas resultantes pueden perder hasta aproximadamente 91% de su peso húmedo inicial (cuando se comienza con perlas constituidas por aproximadamente 5% en peso de células secas de células que contiene nitrilasa microbianas). El catalizador celular inmovilizado y deshidratado puede ser conservado al aire o bajo una atmósfera inerte, y preferiblemente a temperaturas en el intervalo de - 25°C a 35°C, preferiblemente de 5°C a 25°C. El catalizador celular inmovilizado y deshidratado puede ser rehidratado colocando las perlas deshidratadas en agua o en un tampón acuoso adecuado, por ejemplo, una solución de glicolato de amonio 0,10 M (pH 7,3), siendo la temperatura de rehidratación preferiblemente de aproximadamente 5°C a aproximadamente 35°C. Las perlas rehidratadas resultantes se pueden usar directamente en una reacción para la producción de ácido glicólico a partir de glicolonitrilo, o conservarse en el líquido de rehidratación desde aproximadamente 5°C hasta aproximadamente 35°C hasta su uso.

Hidrólisis de glicolonitrilo a ácido glicólico usando un catalizador nitrilasa

La conversión enzimática de glicolonitrilo en ácido glicólico (en forma de ácido y/o de la sal de amonio correspondiente) se puede realizar poniendo en contacto un catalizador enzimático, un catalizador enzimático inmovilizado o un catalizador enzimático inmovilizado y reticulado que tiene actividad de nitrilasa en condiciones de reacción adecuadas, como se describe a continuación (es decir, en una mezcla de reacción acuosa a determinados intervalos de pH, temperaturas, concentraciones, etc.). En una realización, las células microbianas recombinantes enteras se pretratan con glutaraldehído, se inmovilizan en carragenina, se reticulan, se deshidratan y después de rehidratación el catalizador enzimático resultante se utiliza directamente para la conversión de glicolonitrilo en ácido glicólico, o las células inmovilizadas se pueden mantener separadas de la mezcla de reacción a granel usando cartuchos de membrana de fibra hueca o membranas de ultrafiltración. En una segunda realización, las células microbianas recombinantes enteras se inmovilizan en gel de poliacrilamida, y el catalizador enzimático resultante se utiliza directamente para la conversión de glicolonitrilo en ácido glicólico.

La concentración de catalizador enzimático en la mezcla de reacción acuosa depende de la actividad específica del catalizador enzimático y se elige para obtener la velocidad de reacción deseada. El peso de células húmedas de las células microbianas utilizadas como catalizador en reacciones de hidrólisis varía típicamente desde 0,001 gramos hasta 0,250 gramos de células húmedas por mL de volumen de reacción total, preferiblemente desde 0,002 gramos hasta 0,050 gramos de células húmedas por mL. El % en peso indicado de células húmedas por volumen de volumen de reacción total puede estar presente en la mezcla de reacción en forma de un catalizador enzimático inmovilizado preparado como se ha descrito anteriormente (*supra*), donde el peso de células húmedas como porcentaje del peso total del catalizador enzimático inmovilizado se conoce por el método de preparación del catalizador enzimático inmovilizado.

La temperatura de la reacción de hidrólisis de glicolonitrilo se elige para controlar tanto la velocidad de reacción como la estabilidad de la actividad del catalizador enzimático. La temperatura de la reacción puede variar desde justo por encima del punto de congelación de la mezcla de reacción (aproximadamente 0°C) hasta aproximadamente 65°C, con un intervalo preferido de temperatura de reacción desde aproximadamente 5°C hasta aproximadamente 35°C. La suspensión de catalizador enzimático se puede preparar poniendo en suspensión las células inmovilizadas y deshidratadas en agua destilada, o en una solución acuosa de un tampón que mantenga el

pH inicial de la reacción entre aproximadamente 5,0 y aproximadamente 10,0, preferiblemente entre aproximadamente 5,5 y aproximadamente 8,0, más preferiblemente entre aproximadamente 5,5 y aproximadamente 7,7, y lo más preferiblemente desde aproximadamente 6,0 hasta aproximadamente 7,7. A medida que avanza la reacción, el pH de la mezcla de reacción puede cambiar debido a la formación de una sal de amonio del ácido carboxílico a partir de la funcionalidad nitrilo correspondiente. La reacción se puede realizar para completar la conversión de glicolonitrilo sin control de pH, o se puede añadir un ácido o una base adecuados durante el transcurso de la reacción para mantener el pH deseado.

Se encontró que el glicolonitrilo era completamente miscible con agua en todas las proporciones a 25°C. En los casos en los que se eligen las condiciones de reacción, de tal manera que la solubilidad del sustrato (es decir, un  $\alpha$ -hidroxinitrilo) también dependa de la temperatura de la solución y/o la concentración de sal (tampón o el producto sal de amonio del ácido glicólico, también conocido como glicolato de amonio) en la fase acuosa, la mezcla de reacción puede estar compuesta inicialmente de dos fases: una fase acuosa que contiene el catalizador enzimático y  $\alpha$ -hidroxinitrilo disuelto, y una fase orgánica (el  $\alpha$ -hidroxinitrilo sin disolver). A medida que progresa la reacción, el  $\alpha$ -hidroxinitrilo se disuelve en la fase acuosa, y finalmente se obtiene una mezcla de producto en una sola fase. La reacción también puede ser realizada añadiendo el  $\alpha$ -hidroxinitrilo a la mezcla de reacción a una velocidad aproximadamente igual a la velocidad de reacción de la hidrólisis enzimática, manteniendo de este modo una mezcla de reacción acuosa en una sola fase, y evitando el problema potencial de inhibición por el sustrato de la enzima a altas concentraciones de material de partida.

El ácido glicólico puede estar en la mezcla de productos como una mezcla del ácido carboxílico protonizado y/o su sal de amonio correspondiente (dependiendo del pH de la mezcla de productos; el pKa del ácido glicólico es aproximadamente 3,83) y adicionalmente puede estar presente como una sal del ácido carboxílico con cualquier tampón que adicionalmente pueda estar presente en la mezcla de productos. Típicamente, el ácido glicólico producido está principalmente en forma de sal de amonio (el pH de la reacción de hidrólisis del glicolonitrilo está típicamente entre aproximadamente 5,5 y aproximadamente 7,7). El producto de ácido glicólico se puede aislar de la mezcla de reacción como el ácido carboxílico protonizado, o como una sal del ácido carboxílico, según se desee.

La concentración final de ácido glicólico en la mezcla de productos en la conversión completa de glicolonitrilo puede variar desde 0,001 M hasta el límite de solubilidad del producto ácido glicólico. En una realización, la concentración de ácido glicólico variará desde aproximadamente 0,10 M hasta aproximadamente 5,0 M. En otra realización, la concentración de ácido glicólico variará desde aproximadamente 0,2 M hasta aproximadamente 3,0 M.

El ácido glicólico puede ser recuperado en forma del ácido o la sal correspondiente usando una variedad de técnicas que incluyen, aunque sin limitación, intercambio iónico, electrodiálisis, extracción con disolvente reactivo, polimerización, descomposición térmica, alcoholisis y sus combinaciones.

Además, cuando una cantidad, concentración u otro valor o parámetro se da en forma de un intervalo, un intervalo preferido o una lista de valores superiores preferibles y valores inferiores preferibles, debe entenderse que están descritos específicamente todos los intervalos formados a partir de una pareja de cualquier límite superior del intervalo o valor preferido y cualquier límite inferior del intervalo o valor preferido, independientemente de si los intervalos se describen por separado. Cuando en la presente memoria se enumera un intervalo de valores numéricos, a menos que se indique lo contrario, se pretende que el intervalo incluya sus extremos, y todos los números enteros y fracciones dentro del intervalo. No se pretende que el alcance de la invención esté limitado a los valores específicos citados cuando se define un intervalo.

### Métodos generales

Los siguientes ejemplos se proporcionan para demostrar las realizaciones preferidas de la invención. Los expertos en la técnica deben apreciar que las técnicas descritas en los ejemplos siguientes representan técnicas descubiertas por el inventor para llevar bien a la práctica la invención, y por tanto se puede considerar que constituyen modos preferidos para su práctica.

Los materiales y métodos adecuados para el mantenimiento y crecimiento de cultivos bacterianos son muy conocidos en la técnica. Técnicas adecuadas para uso en los siguientes ejemplos se pueden encontrar descritos en *Manual of Methods for General Bacteriology* (1994) (Phillipp Gerhardt, R.G.E. Murray, Ralph N. Costilow, Eugene W. Nester, Willis A. Wood, Noel R. Krieg and G. Briggs Phillips, eds.), *American Society for Microbiology*, Washington, DC.) o por Thomas D. Brock, en *Biotechnology: A Textbook of Industrial Microbiology*, (1989) Second Edition, (Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA). Los métodos para inmovilizar catalizadores enzimáticos se pueden encontrar en Bickerstaff, G. F., *supra*.

Los procedimientos requeridos para la preparación de DNA genómico, la amplificación por PCR, las modificaciones del DNA por endo- y exo-nucleasas para generar extremos deseados para la clonación del DNA, las ligamientos y la transformación bacteriana, son bien conocidos en la técnica. Técnicas de DNA recombinante y de

clonación molecular estándares utilizadas en la presente invención son bien conocidas en la técnica y han sido descritas por Maniatis, *supra*; y por T. J. Silhavy, M. L. Bennan, and L. W. Enquist, *Experiments with Gene Fusions*, (1984) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring, NY; y por Ausubel, F.M. et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, (1994-1998) John Wiley & Sons, Inc., New York.

- 5 Todos los reactivos y materiales se obtuvieron de Aldrich Chemicals (Milwaukee, WI), DIFCO Laboratories (Detroit, MI), GIBCO/BRL (Gaithersburg, MD) o Sigma/Aldrich Chemical Company (St. Louis, MO) salvo indicación contraria.

Las abreviaturas en la memoria descriptiva corresponden a unidades de medida, técnicas, propiedades o compuestos de la siguiente manera: "s" significa segundo(s), "min" significa minuto(s), "h" significa hora(s), "d" significa densidad en g/mL, "µL" significa microlitros, "mL" significa mililitros, "L" significa litros, "mM" significa milimolar, "M" significa molar, "mmol" significa milimol(es), "p" significa peso, "% en peso" significa porcentaje en peso, "g" significa gramos, "µg" significa microgramos, "HPLC" significa cromatografía de líquidos de alta resolución, "DO" significa densidad óptica a la longitud de onda designada, "pcs" significa peso de células secas, "U" significa unidades de actividad de nitrilasa; "EDTA" significa ácido etilendiamintetraacético y "DTT" significa ditiotreitól. Una U de actividad de nitrilasa corresponde a la hidrólisis de 1 µmol de glicolonitrilo/min.

#### Metodología analítica

##### Análisis por HPLC

A menos que se indique lo contrario, se utilizó el siguiente método de HPLC. Las mezclas de productos de reacción se analizaron por el siguiente método de HPLC. Se añadieron partes alícuotas (0,01 mL) de la mezcla de reacción a 1,50 mL de agua y se analizó por HPLC (columna HPX 87H, 30 cm x 7,8 mm; fase móvil H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,01 N; caudal 1,0 mL/min a 50°C; volumen de inyección 10 µL; detector infrarrojo (IR), tiempo de análisis 20 min). El método se calibró para glicolonitrilo en una serie de concentraciones utilizando glicolonitrilo comercialmente disponible adquirido a Aldrich.

##### Análisis cuantitativo por <sup>13</sup>C RMN

25 Los espectros cuantitativos de <sup>13</sup>C RMN se obtuvieron utilizando un espectrómetro Varian Unity Inova (Varian, Inc., Palo Alto, CA) que funciona a 400 MHz. Las muestras se prepararon tomando 3,0 mL del producto de reacción junto con 0,5 mL de D<sub>2</sub>O en un tubo de RMN de 10 mm. Los espectros de <sup>13</sup>C RMN se obtuvieron típicamente usando una anchura espectral de 26 KHz con el transmisor situado en 100 ppm, puntos 128K y un pulso de 90 grados (pw90 = 10,7 microsegundos a una potencia del transmisor de 56 db). El <sup>13</sup>C T1 más largo (23 s) se asoció con el carbono del nitrilo GLN, y el tiempo total de reciclaje se fijó a un valor diez veces mayor que este valor (retraso del reciclaje d1 = 240 s, tiempo de adquisición, ta = 2,52 s). La señal media de 360 escaneos dio un tiempo de experimento total de 26,3 horas. La mejora nuclear Overhauser (NOE) fue suprimida controlando el desacoplamiento <sup>1</sup>H modulado por Waltz sólo durante el tiempo de adquisición (ta).

#### Ejemplo 1

##### 35 Fermentación de *E. coli* MG1655/pSW138-168V

Se realizaron cultivos de siembra de *E. coli* MG1655/pSW138-168V en 500 mL de medio LB complementado con 0,1 mg de ampicilina por mL durante 6-10 horas (DO<sub>550</sub> = 1-2) a 30°C con agitación (300 rpm) antes de la inoculación del fermentador. El cultivo de la cepa de *E. coli* MG1655/pSW138-168V productora de nitrilasa se realizó en fermentadores Braun Biostat C de 14 L (B. Braun Biotech International GmbH, Melsungen, Alemania) utilizando un medio mineral con glucosa, amoníaco y sales, y se usó lactosa para inducción. El medio del fermentador antes de la esterilización (7,5 L) se describe en la Tabla 2. Las adiciones después de la esterilización incluyen elementos trazas esterilizados por filtración (Tabla 3), 0,1 mg de ampicilina por mL, 2 g de casaminoácidos (Difco) por litro, 4 g de glucosa por litro y 500 mL de cultivo de siembra

45 Los puntos de ajuste de la fermentación se describen en la Tabla 4. Para controlar el pH se utilizaron NH<sub>4</sub>OH (40% p/v) y H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (20% p/v). La concentración de oxígeno disuelto se controló al 25% de saturación en aire con la agitación ajusta para elevar en primer lugar el aumento de la demanda de oxígeno seguido por aireación. El protocolo de alimentación de la fermentación utilizado con la inducción de lactosa se recoge en la Tabla 5. Los caudales de alimentación de glucosa se reducían si la glucosa se acumulaba por encima de 5 g/L. Después de 40-56 horas, el caldo de fermentación se enfrió bruscamente hasta 5-10°C y las células se recogieron por centrifugación. La pasta celular se congeló y conservó a -70°C. La pasta celular se denominó NIT 60 (1910 U de GLN/g en pcs).

Tabla 2. Medios de fermentación, antes de la esterilización.

(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	5,0 g/L
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	4,0 g/L
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3,5 g/L
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,6 g/L
Citrato sódico.2H <sub>2</sub> O	1,0 g/L
NZ Amine AS (Quest)	2,5 g/L
Antiespumante - Biospumex 153K	0,25 mL/L

Tabla 3. Elementos trazas en la fermentación

	Concentración
Ácido cítrico	10 g/L
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	1,5 g/L
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	5 g/L
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,39 g/L
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,38 g/L
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,2 g/L
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	0,3 g/L

Tabla 4. Puntos de ajuste de la fermentación

	Puntos de ajuste iniciales	Mínimo	Máximo
Agitador (rpm)	400	400	1000
Caudal de aire (litros estándar por minuto)	2	2	10
pH	6,8	6,8	6,8
Presión (kPa)	0,5	0,5	0,5
Oxígeno disuelto (Od)	25%	25%	25%
Temperatura °C	30	30	30

Tabla 5. Protocolo de alimentación de la fermentación usado con inducción de lactosa

Tiempo de fermentación transcurrido (h)	Caudal de alimentación (g/min)	Sustrato
0	0	Glucosa (por lotes)
5	0,27	Glucosa (50% p/p)
14	1,3	Lactosa (25% p/p)

**Ejemplo 2**

Inmovilización de *E. coli* MG1655/pNM18-168V en perlas de carragenina reticuladas con GA/PEI

Con agitación rápida, se añadieron lentamente 12 g de carragenina (FMC GP911) a 228 g de agua destilada desionizada, a 50°C, la mezcla resultante se calentó hasta 80°C hasta que la carragenina se disolvió completamente, y la solución resultante se enfrió con agitación hasta 52°C. En un vaso separado equipado con una barra de agitación, se añadieron 83,2 g de células congeladas de *E. coli* MG1655/pNM18-168V (25,2% en pcs) a 84,8 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,35 M (pH 7,3) a aproximadamente 25°C y se mezcló hasta que las células se pusieron en suspensión, y a continuación se añadió una solución de desoxirribonucleasa I (10 µL de 12.500 U/mL de DNasa (Sigma)/100 mL de suspensión celular). La suspensión celular se filtró consecutivamente por un elemento filtrante Nupro TF de 230 micrómetros y 140 micrómetros y se calentó con agitación hasta 50°C. A la solución de carragenina a 52°C, se añadieron con agitación, 160,0 g de una suspensión celular de *E. coli* MG1655/pNM18-168V a 50°C, y la suspensión de células/carragenina resultante se bombeó a través de una aguja de calibre 20 calentada eléctricamente a 47°C y se añadió gota a gota con agitación a KHCO<sub>3</sub> 0,25 M (pH = 7,3) a aproximadamente 37-38°C; el caudal a través de la aguja se ajustó a 5-8 mL/min. Se dejaron endurecer las perlas resultantes en este mismo tampón durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación, y se conservaron en bicarbonato de potasio 0,25 M (pH 7,3).

La reticulación química de las perlas inmovilizadas de células/carragenina se realizó por adición de 0,5 g de glutaraldehído (GA) al 25% en agua (Sigma M 752-07) a 20 g de perlas en suspensión en 48 mL de bicarbonato de potasio 0,25 M (pH 7,3) y agitación durante 1 hora a temperatura ambiente. A la suspensión de perlas se añadieron luego 2,0 g de polietilenimina al 12,5% en peso (PEI, BASF LUPASOL PS) en agua, y la suspensión de perlas se agitó durante 18 horas más a temperatura ambiente. Las perlas reticuladas con GA/PEI se recuperaron de la suspensión, se agitaron dos veces durante 15 minutos en 48 mL de bicarbonato de potasio 0,25 M (pH 7,3), y a continuación se almacenaron en bicarbonato de amonio 1,0 M (pH 7,3) a 5°C. Antes de su uso como catalizador para la conversión del glicolonitrilo en ácido glicólico (como la sal de amonio), las perlas se lavaron dos veces durante 15 minutos con 180 mL de glicolato de amonio 0,1 M (pH 7,3) a temperatura ambiente para eliminar el tampón de conservación de bicarbonato de amonio 1,0 M (pH 7,3). El catalizador celular inmovilizado resultante se identificó como NIT 60 inmovilizado.

**Ejemplo 3**

Deshidratación/rehidratación del transformante *E. coli* MG1655/pSW138-F168V inmovilizado en carragenina y reticulado con glutaraldehído/polietilenimina

Las perlas del transformante *E. coli* MG1655/pSW138-F168V inmovilizadas en carragenina y reticuladas con glutaraldehído/polietilenimina preparadas como se ha descrito en el Ejemplo 2 se deshidrataron en una estufa a vacío (176 mm de Hg) a 35°C con purga de nitrógeno durante 24 horas. La relación entre el peso de las perlas deshidratadas y el peso de las perlas originales (no deshidratadas) fue 0,0914. Las perlas deshidratadas se rehidrataron posteriormente colocando las perlas deshidratadas en una solución 20 veces (en peso) de glicolato de amonio 0,10 M (pH 7,3) a 5°C o 25°C durante 18 horas. Las perlas rehidratadas resultantes se lavaron dos veces con una solución 9 veces (en peso) de glicolato de amonio 0,10 M (pH 7,3), y a continuación se pesaron; la relación entre el peso de las perlas rehidratadas y el peso de las perlas originales (no deshidratadas) fue 0,210 para las perlas rehidratadas a 5°C, y la relación entre el peso de las perlas rehidratadas y el peso de las perlas originales fue 0,212 para las perlas rehidratadas a 25°C.

**Ejemplo 4**

Actividad específica del transformante *E. coli* MG1655/pSW138-F168V inmovilizado en carragenina y reticulado con glutaraldehído/polietilenimina antes y después de la deshidratación/rehidratación

Las reacciones por lotes para la conversión de glicolonitrilo en ácido glicólico se realizaron a 25°C en un baño de agua a temperatura controlada. Un primer recipiente de reacción equipado con una barra de agitación magnética se cargó con 8,0 g de perlas de *E. coli* MG1655/pSW138-168V/carragenina reticuladas con GA/PEI (peso de células secas 0,40 g, preparadas como se ha descrito en el Ejemplo 2 sin deshidratación/rehidratación), 6,0 mL de glicolato de amonio acuoso (4,0 M, pH 7,0) y 21,7 mL de agua destilada desionizada. Un segundo recipiente de reacción equipado con una barra de agitación magnética se cargó con 1,71 g de perlas de *E. coli* MG1655/pSW138-168V/carragenina reticuladas con GA/PEI rehidratadas (peso de células secas 0,41 g, preparadas como se ha descrito en el Ejemplo 3 con deshidratación a 35°C y rehidratación a 5°C), 6,0 mL de glicolato de amonio acuoso (4,0 M, pH 7,0) y 28,0 mL de agua destilada desionizada. Un tercer recipiente de reacción equipado con una barra de agitación magnética se cargó con 1,70 g de perlas de *E. coli* MG1655/pSW138-168V/carragenina reticuladas con GA/PEI rehidratadas (peso células secas 0,40 g, preparadas como se ha descrito en el Ejemplo 2 con deshidratación a 35°C y rehidratación a 25°C), 6,0 mL de glicolato de amonio acuoso (4,0 M, pH 7,0) y 28,0 mL de agua destilada desionizada. A continuación se añadieron simultáneamente y con agitación a cada recipiente de reacción 3,50 mL (3,75 g) de glicolonitrilo (GLN) al 60,8% en

5 peso en agua (GLN 40,0 mmol, formaldehído 0,320 mmol; estabilizado con ácido glicólico al 0,7% en peso) y se añadieron 0,80 mL de hidróxido de amonio acuoso (NH<sub>3</sub> al 1,875% en peso) (pH final 7,5). Las muestras de reacción (0,100 mL) se retiraron en tiempos predeterminados después de la adición de GLN y se mezclaron con 0,100 mL de agua, 0,010 mL de HCl 6,0 N y 0,200 mL de n-propanol 0,25 M en agua (patrón externo para HPLC), la mezcla se centrifugó y el líquido sobrenadante resultante se analizó por HPLC para determinar la velocidad de reacción inicial y la actividad específica del catalizador (U/g pcs) (Tabla 6).

Tabla 6. Actividad específica del transformante *E. coli* MG1655/pSW138-F168V inmovilizado en carragenina y reticulado con glutaraldehído/polietilenimina antes y después de la deshidratación/rehidratación

Biocatalizador celular inmovilizado	Temperatura de deshidratación (°C)	Temperatura de rehidratación (°C)	Actividad específica (U/g pcs)	Actividad después de la rehidratación (%)
Sin deshidratación	ninguna	ninguna	1787	-
Deshidratado/rehidratado	35	5	1049	59
Deshidratado/rehidratado	35	25	1032	58

### Ejemplo 5

10 Pretratamiento de *E. coli* MG1655/pSW138-168V con glutaraldehído antes de la inmovilización

Se realizó una fermentación de 200 L para producir un caldo que contuviera células de *E. coli* MG1655/pSW138-168V que se pretrataron posteriormente con glutaraldehído *in situ* antes de la inmovilización. En primer lugar se preparó un cultivo de pre-siembra cargando un matraz de agitación de 2 L con 0,5 L de medio de siembra que contenía extracto de levadura (Ambrex 695, 5,0 g/L), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (10,0 g/L), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (7,0 g/L), citrato de sodio dihidrato (1,0 g/L), (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (4,0 g/L), MgSO<sub>4</sub> heptahidrato (1,0 g/L) y citrato de amonio férrico (0,10 g/L). El pH del medio se ajustó hasta 6,8 y el medio se esterilizó en el matraz. Las adiciones posteriores a la esterilización incluyeron glucosa (10 mL, 50% en peso) y 1 mL de ampicilina (25 mg/mL). El medio de pre-siembra se inoculó con 1 mL de un cultivo madre congelado de *E. coli* MG1655/pSW138-168V en glicerol al 20% y se cultivó a 35°C y 300 rpm. El cultivo de siembra se transfirió a aproximadamente 2 DO<sub>550</sub> a un fermentador de siembra de 14 L (Braun) con 8 L de medio que contenía KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (3,50 g/L), FeSO<sub>4</sub> heptahidrato (0,05 g/L), MgSO<sub>4</sub> heptahidrato (2,0 g/L), citrato de sodio dihidrato (1,90 g/L), extracto de levadura (Ambrex 695, 5,0 g/L), antiespumante Biospumex153K (0,25 mL/L, Cognis Corporation), NaCl (1,0 g/L), CaCl<sub>2</sub> dihidrato (10 g/L) y solución de elementos trazas de NIT (10 mL/L). La solución de elementos traza contenía ácido cítrico monohidrato (10 g/L), MnSO<sub>4</sub> hidratado (2 g/L), NaCl (2 g/L), FeSO<sub>4</sub> heptahidrato (0,5 g/L), ZnSO<sub>4</sub> heptahidrato (0,2 g/L), CuSO<sub>4</sub> pentahidrato (0,02 g/L) y NaMoO<sub>4</sub> dihidrato (0,02 g/L). Las adiciones posteriores a la esterilización incluían 120 g de solución de glucosa (50% p/p) y 16 mL de solución madre de ampicilina (25 mg/mL).

La concentración de oxígeno disuelto (Od) se controló a 25% de saturación en aire. El Od se controló en primer lugar por una velocidad de agitación de paletas (400 hasta 1400 rpm) y más tarde por una velocidad de aireación (2 a 10 litros estándares por minuto). El pH se controló a 6,8. Para el control del pH se usaron NH<sub>4</sub>OH (29% p/p) y H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (20% p/v). La temperatura se controló a 35°C y la presión en cabeza fue 0,5 bares. A aproximadamente 6 DO<sub>550</sub> el cultivo se transfirió al fermentador Biostat-D Braun de 200 L. El medio utilizado fue el mismo que en el fermentador de siembra, el volumen de trabajo inicial fue 140 L y se cargó glucosa al 50% p/p a 8 g/L. La fermentación se inició como una operación por lotes, y una vez que se agotó la glucosa (<0,5 g/L) se inició una operación por lotes alimentados con glucosa al 50% p/p a un caudal predeterminado (Tabla 6), a aproximadamente 25 DO<sub>550</sub> la alimentación se cambió a una solución de D-lactosa al 25% con un caudal predeterminado (Tabla 7).

La temperatura se controló a 35,0°C, la presión en cabeza a 0,5 bares, el pH en la primera etapa (fase de glucosa) a 6,8 y en la segunda etapa (fase de lactosa) a 7,2, se utilizaron NH<sub>4</sub>OH (29% p/p) y H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (20% p/v) para el control del pH, el Od se controló en la primera etapa al 25% de saturación en aire y en la segunda etapa al 10%, el Od se controló en primer lugar por agitación (250-450 rpm) y más tarde por aireación (25-35 litros estándares por minuto). Los niveles de glucosa y lactosa se monitorizaron durante la operación de alimentación y si los niveles de glucosa superaban 0,1 g/L o la lactosa estaba por encima de 1 g/L, se detendría o se reduciría temporalmente el programa de alimentación. La operación se terminó 40 horas después de la iniciación de la alimentación de lactosa, y las células se recogieron por centrifugación o microfiltración o se mantuvieron en el recipiente para el tratamiento con glutaraldehído. La fermentación produjo aproximadamente 8 kg en peso de células secas con una actividad específica de nitrilasa de 2819 U de BZN/g pcs (1788 U de GLN /g pcs).

Tabla 7: Protocolo de alimentación

Intervalos de tiempo de alimentación, (h)	Caudal de alimentación, g/min	Sustrato	Etapas
0	6,13	50% p/p de glucosa	1 <sup>a</sup>
1	7,13	50% p/p de glucosa	1 <sup>a</sup>
2	8,28	50% p/p de glucosa	1 <sup>a</sup>
3	9,62	50% p/p de glucosa	1 <sup>a</sup>
4	11,18	50% p/p de glucosa	1 <sup>a</sup>
5	11,18	50% p/p de glucosa	1 <sup>a</sup>
6	11,18	50% p/p de glucosa	1 <sup>a</sup>
7	11,18	50% p/p de glucosa	1 <sup>a</sup>
8	11,18	50% p/p de glucosa	1 <sup>a</sup>
0	11,22	25% p/p de glucosa	2 <sup>a</sup>
2	24,42	25% p/p de glucosa	2 <sup>a</sup>
20	16,72	25% p/p de glucosa	2 <sup>a</sup>
30	18,7	25% p/p de glucosa	2 <sup>a</sup>
40	18,7	25% p/p de glucosa	2 <sup>a</sup>

Al final de la fermentación, la agitación se redujo hasta 150 rpm, se detuvo la aireación y la temperatura se mantuvo a 35°C. Se retiró parte del caldo de fermentación, dejando aproximadamente 180 kg en el fermentador. Este caldo remanente se tituló hasta pH 5,2 y se mantuvo a este pH con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 20% (20% p/p) y NaOH (50% p/p), mientras se añadían con agitación 9,0 L de glutaraldehído acuoso (GA, 10% p/p) a un caudal de ~90 mL/min; este caudal de adición era equivalente a 50 mg de glutaraldehído/L de caldo de fermentación/min, y la concentración final de glutaraldehído fue aproximadamente 5 g de glutaraldehído/L (0,035 g de glutaraldehído/DO<sub>550</sub>). Después de 5 h desde el inicio de la adición de glutaraldehído al caldo, el pH se ajustó a 7,0 y se añadieron con agitación 1,8 L de bisulfito de sodio acuoso (10% p/p, pH 7) (aproximadamente 1 g de bisulfito de sodio/L de concentración final), y el caldo se agitó durante 15 minutos más. A continuación se disminuyó la temperatura del caldo hasta 10°C y la agitación se disminuyó hasta 100 rpm. El caldo se concentró hasta 40 kg de suspensión celular usando una centrifugadora Diskstack (Alfa Laval), después se añadieron a la suspensión 50 kg de agua DI (20°C) y la mezcla se concentró por centrifugación para producir 40 kg de suspensión celular lavada. La suspensión (identificada como NIT 188A-C2) se conservó a 5°C, y una porción de la suspensión celular se usó directamente para la preparación de un catalizador celular inmovilizado (Ejemplo 6). La actividad específica de nitrilasa durante cada etapa del procedimiento se resume en la Tabla 8.

Tabla 8: Actividad de nitrilasa durante las diferentes etapas del tratamiento con GA y bisulfito

Etapas de fermentación	U de BZN/g pcs
Pretratamiento con GA	2819
Postratamiento con GA	3300
NaHSO <sub>3</sub>	2493

**Ejemplo 6**

Inmovilización de *E. coli* MG1655/pNM18-168V pretratada con glutaraldehído en perlas de carragenina reticuladas con GA/PEI.

El concentrado de la suspensión celular final recuperado del caldo de fermentación tratado con bisulfito de sodio y glutaraldehído del Ejemplo 5 se centrifugó a 5°C. El sedimento celular resultante se volvió a poner en suspensión en una cantidad 5 veces en peso de tampón de fosfato de potasio 0,35 M (pH 7,2), y la centrifugación de la suspensión celular resultante a 5°C produjo una pasta celular húmeda que se inmovilizó y reticuló químicamente

con GA y PEI como se ha descrito en el Ejemplo 2. El catalizador celular inmovilizado resultante se identificó como NIT 188A-C2 inmovilizado.

### Ejemplo 7

5 Deshidratación/rehidratación del biocatalizador inmovilizado en carragenina y reticulado con glutaraldehído/polietilenimina preparado usando los transformantes *E. coli* MG1655/pNM18-168V y *E. coli* MG1655/pSW138-F168V pretratados con glutaraldehído

10 Las perlas del transformantes *E. coli* MG1655/pSW138-F168V inmovilizadas en carragenina y reticuladas con glutaraldehído/polietilenimina preparadas como se ha descrito en el Ejemplo 6 utilizando células pretratadas con glutaraldehído se deshidrataron en una estufa a vacío (176 mm de Hg) a 35°C con purga de nitrógeno durante 20 horas, se pesaron y se deshidrataron como antes durante 4 horas más (un total de 24 horas). La relación entre el peso final de las perlas deshidratadas y el peso de las perlas originales (no deshidratadas) fue 0,217. Las perlas deshidratadas se rehidrataron posteriormente colocando las perlas en una solución 20 veces (en peso) de glicolato de amonio 0,10 M (pH 7,3) a 5°C durante 72 horas. Las perlas rehidratadas resultantes se lavaron dos veces con una solución 9 veces (en peso) de glicolato de amonio 0,10 M (pH 7,3), a continuación se pesaron; la relación entre el peso de las perlas rehidratadas y el peso de las perlas originales (no deshidratadas) fue 0,578 para las perlas rehidratadas a 5°C. El biocatalizador resultante se identificó como NIT 188A-C2-D inmovilizado.

### Ejemplo 8

20 Actividad específica del biocatalizador *E. coli* MG1655/pSW138-F168V inmovilizado en carragenina y reticulado con glutaraldehído/polietilenimina preparado usando los transformantes *E. coli* MG1655/pNM18-168V y *E. coli* MG1655/pSW138-F168V pretratados con glutaraldehído, antes y después de la deshidratación/re-hidratación del biocatalizador inmovilizado

25 En un procedimiento típico, se realizaron series duplicadas de reacciones por lotes para la conversión de glicolonitrilo en ácido glicólico en recipientes de reacción con camisa, de 50 mL, equipados con agitación superior y control de temperatura a 25°C. En una primera serie de reacciones duplicadas, cada recipiente de reacción se cargó con 4 g de perlas de *E. coli* MG1655/pSW138-168V/carragenina reticuladas con GA/PEI (0,20 g en peso de células secas; NIT 188A-C2 inmovilizado, preparado como se ha descrito en el Ejemplo 6 (pretratamiento con GA de las células antes de la inmovilización)), 3,0 mL de glicolato de amonio acuoso (4,0 M, pH 7,0) y 7,75 mL de agua destilada desionizada. En una segunda serie de reacciones duplicadas, cada recipiente de reacción se cargó con 2,55 g de perlas de *E. coli* MG1655/pSW138-168V/carragenina reticuladas con GA/PEI (0,20 g en peso de células secas; NIT 188A-C2-D inmovilizado, preparado como se ha descrito en el Ejemplo 7 (pretratamiento con GA de las células antes de la inmovilización y posterior deshidratación/rehidratación)), 3,0 mL de glicolato de amonio acuoso (4,0 M, pH 7,0) y 9,10 mL de agua destilada desionizada.

35 Cada recipiente de reacción se purgó con nitrógeno y la mezcla se agitó a 25°C, mientras se utilizaban bombas de jeringa programables para añadir simultáneamente 0,520 mL de glicolonitrilo (GLN) al 62% en peso en agua (GLN 6,0 mmol, formaldehído 0,006 mmol; estabilizada con ácido glicólico al 0,7 % en peso) y 0,150 mL de hidróxido de amonio acuoso (NH<sub>3</sub> al 0,9375% en peso); cada 2 h se añadió simultáneamente un volumen equivalente de soluciones de GLN e hidróxido de amonio (total de ocho adiciones simultáneas de solución de GLN e hidróxido de amonio acuoso) para mantener la concentración de GLN a  $\leq$  400 mM y el pH en un intervalo de 7,0-7,5. Se retiraron muestras de reacción (0,050 mL) en momentos predeterminados después de la primera adición de GLN y se añadieron a 0,010 mL de HCl 6,0 N y 0,200 mL de iso-propanol 0,25 M en agua (patrón externo de HPLC), se centrifugó la mezcla resultante, y el líquido sobrenadante se analizó por HPLC para determinar la velocidad de reacción inicial y la actividad específica del catalizador ( $\mu$ mol de ácido glicólico/min/g en pcs de biocatalizador). Al completarse la reacción, se produjo una conversión del 100% de GLN en ácido glicólico (en forma de sal de amonio) con un rendimiento > 99%. La Tabla 9 recoge las actividades específicas iniciales de los biocatalizadores.

45 Al final de la primera reacción, la mezcla acuosa de producto se decantó del catalizador (bajo nitrógeno) en cada recipiente de reacción, dejando una mezcla de catalizador celular inmovilizado y permaneciendo la solución del producto remanente. A continuación se añadió al recipiente de reacción suficiente agua destilada desionizada para reproducir el volumen de reacción inicial en la primera reacción antes de la adición de soluciones de GLN e hidróxido de amonio (aproximadamente 15,3 mL de volumen de reacción inicial) y se realizó una segunda reacción a 25°C por adición de partes alícuotas de GLN acuoso e hidróxido de amonio como se acaba de describir. Las actividades específicas del biocatalizador recuperado en reacciones por lotes consecutivas con reciclaje del catalizador se recogen en la Tabla 10.

Tabla 9. Actividad específica del biocatalizador *E. coli* MG1655/pSW138-F168V inmovilizado en carragenina y reticulado con glutaraldehído/polietilenimina preparado usando los transformantes *E. coli* MG1655/pNM18-168V y *E. coli* MG1655/pSW138-F168V pretratados con glutaraldehído.

Biocatalizador celular inmovilizado	Temperatura de deshidratación, (°C)	Temperatura de rehidratación, (°C)	Actividad específica. (U/g pcs)	Actividad después de la rehidratación, (%)
NIT 188A-C2	ninguna	ninguna	1826	-
NIT 188A-C2	ninguna	ninguna	1857	-
NIT 188A-C2-D	35	5	1660	90
NIT 188A-C2-D	35	5	1584	86

5 Tabla 10. Actividad específica del biocatalizador recuperado en reacciones por lotes consecutivas con reciclaje del biocatalizador utilizando un biocatalizador microbiano inmovilizado en carragenina y reticulado con glutaraldehído/PEI preparado utilizando células pretratadas con glutaraldehído.

Biocatalizador celular inmovilizado	Células inmovilizadas deshidratadas / rehidratadas	Actividad específica del biocatalizador (U de GLN/g pcs) en reacciones por lotes consecutivas				Disminución de la actividad específica, rxn1 a rxn4 (%)
		Reacción 1	Reacción 2	Reacción 3	Reacción 4	
NIT 188C2	no	1826	1518	1596	1759	4
NIT 188C2	no	1857	1656	1581	1947	0
NIT 188C2-D	sí	1660	1369	1472	1674	0
NIT 188C2-D	sí	1584	1392	1485	1417	10

### Ejemplo 9

10 Estabilidad en durante la conservación del biocatalizador inmovilizado en carragenina y reticulado con glutaraldehído/polietilenimina preparado utilizando un transformante *E. coli* MG1655/pNM18-168V pretratado con glutaraldehído, antes y después de la deshidratación/rehidratación del biocatalizador inmovilizado

15 Perlas de *E. coli* MG1655/pSW138-168V/carragenina reticuladas con GA/PEI recién preparadas (NIT 188A-C2 inmovilizado, preparado como se ha descrito en el Ejemplo 6 (pretratamiento con GA de las células antes de la inmovilización)) se conservaron durante 28 días en bicarbonato de amonio 1,0 M (pH 7,3) a 5°C. Las perlas de *E. coli* MG1655/pSW138-168V/carragenina reticuladas con GA/PEI deshidratadas (NIT 188A-C2 inmovilizado, deshidratado como se ha descrito en el Ejemplo 7) se conservaron en seco bajo nitrógeno a 5°C durante 28 días, y luego se rehidrataron tal como se ha descrito en el Ejemplo 7. Antes de su uso, los biocatalizadores se lavaron dos veces durante 15 minutos con 180 mL de glicolato de amonio 0,1 M (pH 7,0) a temperatura ambiente, luego se evaluaron en series duplicadas de reacciones por lotes consecutivas con reciclaje del biocatalizador utilizando el procedimiento descrito en el Ejemplo 8. La actividad específica de cada biocatalizador en cuatro reacciones por lotes consecutivas para convertir glicolonitrilo en glicolato de amonio se recoge en la Tabla 11.

20

Tabla 11. Actividad específica en reacciones por lotes consecutivas con reciclaje del biocatalizador usando catalizador microbiano inmovilizado en carragenina y reticulado con glutaraldehído/PEI preparado utilizando células pretratadas con glutaraldehído; biocatalizador conservado durante 28 días a 5°C, con o sin deshidratación.

	Actividad específica del biocatalizador en reacciones por lotes consecutivas (U de GLN/g pcs)				
	Reacción 1	Reacción 2	Reacción 3	Reacción 4	
Biocatalizador celular inmovilizado (células pretratadas con glutaraldehído)					Disminución de la actividad específica, rxn1 a rxn4 (%)
No deshidratado	1910	1455	1580	1543	19
No deshidratado	1987	1434	1472	1783	10
Deshidratado/rehidratado	1474	1467	1585	1318	11
Deshidratado/rehidratado	1493	1412	-	1665	0

**REIVINDICACIONES**

1. Un procedimiento para producir un catalizador enzimático deshidratado que tiene actividad de nitrilasa con mejor actividad específica, que comprende:
- (a) producir por fermentación un catalizador enzimático que tiene actividad de nitrilasa;
- 5 (b) pretratar dicho catalizador enzimático con glutaraldehído;
- (c) inactivar opcionalmente el glutaraldehído sin reaccionar con bisulfito después del pretratamiento con glutaraldehído;
- (d) recuperar el catalizador enzimático de (b) o (c) e inmovilizar dicho catalizador enzimático en carragenina;
- 10 (e) reticular el catalizador enzimático inmovilizado en carragenina resultante de (d) con glutaraldehído y polietilenimina; y
- (f) deshidratar el catalizador enzimático inmovilizado y reticulado producido en la etapa (e); en donde dicho catalizador enzimático comprende un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55 y 57.
- 15 2. El procedimiento de la reivindicación 1, que comprende además la etapa (g) rehidratar el catalizador enzimático de la etapa (f) en una solución acuosa.
3. El procedimiento de la reivindicación 2, que comprende además la etapa (h) poner en contacto el catalizador enzimático rehidratado de la reivindicación 2 con glicolonitrilo en una solución acuosa en condiciones de reacción adecuadas en las que se produce ácido glicólico.
- 20 4. El procedimiento de la reivindicación 3, que comprende además la etapa (i) recuperar el ácido glicólico producido en la etapa (h).
5. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el pH se mantiene entre 5,0 y 9,0 durante el pretratamiento con glutaraldehído.
- 25 6. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el pretratamiento con glutaraldehído en la etapa (b) comprende añadir glutaraldehído a un caldo de fermentación producido en la etapa (a) en una cantidad en el intervalo de aproximadamente 3 g/L (0,025 g de GA por DO<sub>550</sub>) y aproximadamente 5 g/L (0,042 g de GA por DO<sub>550</sub>).
7. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el pretratamiento con glutaraldehído en la etapa (b) comprende añadir glutaraldehído a un caldo de fermentación producido en la etapa (a) a un caudal de 50 mg/L/h a 500 mg/L/h.
- 30 8. El catalizador enzimático inmovilizado y reticulado, pretratado con glutaraldehído y deshidratado producido por el procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicho catalizador retiene al menos aproximadamente 70% de su actividad específica para hidrolizar glicolonitrilo a ácido glicólico después de rehidratación.



SEQ	ID	NO:	4	IPGYP----	YWAWLGDVKYSL	--FTSRYHENSLELGD	DRMRRLQLAARNKIALVMGYS
SEQ	ID	NO:	5	LPGYP----	FHWLGA	PAWSLK--YSARYYANSL	SDSAEFQRIAQAAARTLGFIALGYS
SEQ	ID	NO:	6	IPGYP----	YHIWVDS	PLAGMAK-FAVRYHENS	LTMDSPHVQRLLDAARDHNI
SEQ	ID	NO:	7	IPGYP----	YWAWIGDV	KWAVSD-FIPKYHENS	LTLDGDRMRRLQLAARQNNIALVMGYS
SEQ	ID	NO:	8	IPGYP----	YWAWIGDV	KWAVSE-FIPKYHENS	LTLDGDRMRRLQLAARQNNIALVMGYS
SEQ	ID	NO:	9	VGGYPK	GADFHIFLGGRT	PQGRA-QYQRYAETA	IAVPGPVT
SEQ	ID	NO:	10	IGGYP	RGFRFGLGV	GHNEGRD-EFRKYH	ASAIKVP
SEQ	ID	NO:	11	LPYYP----	YFSTVE	PPVLMGRS--ILKLYEQ	AFMTGPELQQIARAARQIIRLTVLLGVN
SEQ	ID	NO:	12	LPYYP----	YFSTVE	PPVLMGRS--HLKLYEQ	AFMTGPELQQIARAARQHRFLVLLGVN
SEQ	ID	NO:	13	VPYYP----	YFSTVE	PPVLMGKS--HLKLYEQ	EAVTVPGKVTQIAQA
SEQ	ID	NO:	14	LGGYPK	GEGFGTQLGYRL	PEGRE-AFARYFANA	IDVPGSETAALAGLSARTGASLVLGVI
SEQ	ID	NO:	15	IGGYPK	GLDFGARMG	TRTEAGRE-DFLRYW	KAAIDVPGKETARIGSFAAKMKAYLVVGV
SEQ	ID	NO:	16	IPGYP----	WWIWLGN	ADYGMK--YYIQLYKNS	VEIPLSLAVQKLSAG-TNKVYFCVSVT
SEQ	ID	NO:	17	IPGYP----	YWIW	TSNMDF	TGM--MWA
SEQ	ID	NO:	18	LPYYP----	YFSTVE	PPVLMGRS--HLALYE	QAVVPGPVTDAVAAAQYGMQVLLGVN
SEQ	ID	NO:	19	LGGYPK	GEGFGTQLGYRL	PEGRE-AFARYFANA	IEVPGVETDALAALSARTGANLVLGVI
SEQ	ID	NO:	20	VPGYP----	WWLWLD	SPAWGMQ--FVARYFD	NSLALDGPLFARLREAAARSAITVVVTGHS
SEQ	ID	NO:	21	LPGYP----	FHWLGA	PAWSLK--YSARYYANSL	SDSAEFQRIAQAAARTLGFIALGYS
SEQ	ID	NO:	22	IPGYP----	WFLWLD	DAPAWNMP--LVQRYHQ	QSLVLDVQARRISDAARHLGLYVVLGYS
SEQ	ID	NO:	23	IPGYP----	WHIWMDS	PAWCIGR	GFVQRYFDNSLAYDSPQAEALRAAVRKAQLTAVLGLS
SEQ	ID	NO:	24	IPGYP----	YHIWVDS	PLAGMAK-FAVRYHENS	LTMDSPHVQRLLDAARDHNI
SEQ	ID	NO:	25	IPGYP----	YHIWVDS	PLAGMAK-FAVRYHENS	LTMDSPHVQRLLDAARDHNI

FIGURA 1B

SEQ ID NO: 4	EREAGSRYLSQVFI DERGEI VANRRKLLKPTHVERTIY GEGNGTDFLTHDEA-FGRVSGEN
SEQ ID NO: 5	ERSGGSLYLGQCLIDDKQMLWSRRKLLKPTHVERTVFGEGYARDLIVSDTE-IGRVGALC
SEQ ID NO: 6	ERDGGSLYMTQLVIDADGQLVARRRKLKPTHVERSUYGEGNGSDISVYDMP-FARLGAEN
SEQ ID NO: 7	EKDGASRYLSQVFI DQNGDI VANRRKLLKPTHVERTIY GEGNGTDFLTHDFG-FGRVGGEN
SEQ ID NO: 8	EKDGASRYLSQVFI DQNGDI VANRRKLLKPTHVERTIY GEGNGTDFLTHDFG-FGRVGGEN
SEQ ID NO: 9	ERDGGTLYCTILFFSPEGELLGKHKRLMPTALERLLWGYDGGSTFPVYDTP-IGKLLAAVY
SEQ ID NO: 10	EKDGTYTLYCTALTTSPOGGFLGKHKRLMPTSLERCIWGQDGGSTIPVYDTP-IGKLLCAA I
SEQ ID NO: 11	ERDGGSLYNTQLLISDQDLLLLKRRKI TPTYHERMVWGQGGGAGLTVVETV-IGKVGAALA
SEQ ID NO: 12	ERDGGSLYNTQLLISDQDLLLLKRRKI TPTYHERMVWGQGGGAGLTVVETV-IGKVGAALA
SEQ ID NO: 13	EREEGSLYNTQLI FDADGALVLRKRI TPTYHERMVWGQDGGAGLRTVDTT-VGRISAAVA
SEQ ID NO: 14	ERSGNTLYCTVLFPEEGGLVAKHRKLLMPTGTERLIWKGKGGSTLPVVDGR-AGRISAAV
SEQ ID NO: 15	ERSEATLYCTALFFAPDCGLIGKHKRLMPTATERLVWGQDGGSTIEILDTA-VCKLCAA I
SEQ ID NO: 16	EKDGGSLYLTQLWFDPNGLIGKHKRLKATNAEKTIWGDGDSMMPPVETE-FGNLGGEG
SEQ ID NO: 17	EKDNASLYLTQLWFDPNGNLIGKHKRFKPTSSERAVWGDGDSMAPVFKTE-YGNLGGEG
SEQ ID NO: 18	ERDGGTLYNTQLLFN SCGELVLRKRI TPTYHERMVWGQDGGGSLKVVQTP-LARVGAALA
SEQ ID NO: 19	ERSGTYCTALYFDPQQGLSGKHKRLMPTGTERLIWKGKGGSTLPVLDTQ-VGRVAAVT
SEQ ID NO: 20	ERDGGSLYMGQAI IGADGEVLAARRKLLKPTHVERTVFGESDGSNLTVVDTTE-IGRLGALC
SEQ ID NO: 21	ERSGGSLYLGQCLIDDKGEMLWSRRKLLKPTHVERTVFGEGYARDLIVSDTE-IGRVGALC
SEQ ID NO: 22	ERNKASLYIGOWIIDDHGETVGVRRKLLKATHVERTMTFGEYDGSALRTFETP-VGVLGALC
SEQ ID NO: 23	ERDGGSLYIAQWLI GADGETIAKRRKLRPTHAEARTVYGEYDGSDLAVHERPDI GRISALC
SEQ ID NO: 24	ERDGGSLYMTQLI IDADGQLVARRRKLKPTHVERSUYGEGNGSDISVYDMP-FARLGAEN
SEQ ID NO: 25	ERDGGSLYMTQLI IDADGQLVARRRKLKPTHVERSUYGEGNGSDISVYDMP-FARLGAEN

\*:. . : \* : \*\* : . \* : \* : : \* : . . . . .

FIGURA 1C

```

SEQ ID NO:4  CWEEHQPESKFMMSYSLGEQVHVASWPAMSPLODPVDFOLSIEANATV-----TRSYAIE
SEQ ID NO:5  CWEEHESPLSKYALYSQHEAIIHAAWPSFSLYSEQAHALSAKVNMAA-----SQIYSVE
SEQ ID NO:6  CWEEHFQTLTKYAMYSMHEQVHVASWPAGMSLYQPEVPFAGVDAQLLTA-----TRMYALE
SEQ ID NO:7  CWEEHFQPLSKYMMYSLNEQIHVASWPAMFALTPDVHQLSVEANDTV-----TRSYAIE
SEQ ID NO:8  CWEEHFQPLSKYMMYSLNEQIHVASWPAMFALTPDVHQLSVEANDTV-----TRSYAIE
SEQ ID NO:9  CWENEMPELLRMAMYGKQIQIYCAPTADDKPTWVSTMQ-----IIVALE
SEQ ID NO:10 CWENRMPLRYRTALYAKGLELYCAPTADGSKQWQSSML-----HIAIE
SEQ ID NO:11 CWENHYNPIARFSLMTQGEIHCQAQFPGSLVGPISFSEQTAVT-----LRHHALE
SEQ ID NO:12 CWENHYNPIARFSLMTQGEIHCQAQFPGSLVGPISFSEQTAVT-----LRHHALE
SEQ ID NO:13 CWENHYNPIARFSLMTQGEIHCQAQFPGSLVGPISFSEQTAVT-----MRHHALE
SEQ ID NO:14 CWENHYNPIARFSLMTQGEIHCQAQFPGSLVGPISFSEQTAVT-----MRHHALE
SEQ ID NO:15 CWENHYNPIARFSLMTQGEIHCQAQFPGSLVGPISFSEQTAVT-----HVAAE
SEQ ID NO:16 CWENHYNPIARFSLMTQGEIHCQAQFPGSLVGPISFSEQTAVT-----HIAIE
SEQ ID NO:17 CWENHYNPIARFSLMTQGEIHCQAQFPGSLVGPISFSEQTAVT-----TKYIAIS
SEQ ID NO:18 CWENHYNPIARFSLMTQGEIHCQAQFPGSLVGPISFSEQTAVT-----MRHHALE
SEQ ID NO:19 CWENHYNPIARFSLMTQGEIHCQAQFPGSLVGPISFSEQTAVT-----HIAHE
SEQ ID NO:20 CWENHYNPIARFSLMTQGEIHCQAQFPGSLVGPISFSEQTAVT-----ARQYAVE
SEQ ID NO:21 CWENHYNPIARFSLMTQGEIHCQAQFPGSLVGPISFSEQTAVT-----SOIYSVE
SEQ ID NO:22 CWENHYNPIARFSLMTQGEIHCQAQFPGSLVGPISFSEQTAVT-----SRVYAAE
SEQ ID NO:23 CWENHYNPIARFSLMTQGEIHCQAQFPGSLVGPISFSEQTAVT-----SRVYAVE
SEQ ID NO:24 CWENHYNPIARFSLMTQGEIHCQAQFPGSLVGPISFSEQTAVT-----TRMYALE
SEQ ID NO:25 CWENHYNPIARFSLMTQGEIHCQAQFPGSLVGPISFSEQTAVT-----TRMYALE

```

FIGURA 1D



```

SEQ ID NO:4 AEGILYAEIDLEQILLAKAGADPVGHYSRDPDVLVSVQFDPNRNHTPVHRIGIDGRLLDVNTRS
SEQ ID NO:5 AEGLIADLNMEELAFAKAINDPVGHYSKPEATRLVLDLGHREPMTRVHSK---SVIQEE
SEQ ID NO:6 EEGILYADIDLSAITLAKQAADPVGHYSRDPDVLVSLNFNQRHTTPVN-----TAISTI
SEQ ID NO:7 AEGLLYAEIDLEQIILAKAAAADPAGHYSRDPDVLVSLKIDTRNHTPVQYITADGRTSLNSNS
SEQ ID NO:8 AEGLLYAEIDLEQIIVAKAAAADPAGHYSRDPDVLVSLKIDTRNHTPVQYVTEDEGSSLSNSNS
SEQ ID NO:9 EDAILVADIDLDVTRGKMDFDVVGHYARPDIFSLTVDERPKPPVTTL-----K
SEQ ID NO:10 SEGLITADLDLGDVVARAKLYFDSVGHYSRDPDVLHLTVNEHPKPVTFI-----S
SEQ ID NO:11 GEGLAIAEIDKSLITKRRKRMDSVGHYSRDPDVLVSLRINRSPATQVQAIG-----S
SEQ ID NO:12 GEGLAIAEIDKSLITKRRKRMDSVGHYSRDPDVLVSLRINRSPATQVQAIG-----S
SEQ ID NO:13 GEGLAIAIDLDFSLIAKRRKRMDSVGHYARPDLLQLTLNNQVWSALEAN-----P
SEQ ID NO:14 ARGLVCAEVDDELVRARYDFDVVGHYARPDVVFELSVDERPRPGVR-----F
SEQ ID NO:15 QEGVLVADIDLDLTIKARYDLDSVGHYGRPDIFELKVDQRSHQVITDQ-----F
SEQ ID NO:16 EEGIITYADIDLEQIIPGKFLIDSAGHYSTPGFSLSFDRTEKKPIKHIG-----E
SEQ ID NO:17 AEGIAVAEIDLNQIIYGGKWLDPAGHYSTPGFSLSTFDQSEHVPVKKIG-----E
SEQ ID NO:18 GEGLAIAIDLALITKRRKRMDSVGHYSRPELLSLQINSSPAVPVQNM-----S
SEQ ID NO:19 RAGLISAQIDTADLVRARYDYDVVGHYARPDVVFELTVQDRPRPGVR-----F
SEQ ID NO:20 EEGLVYADLEASAVAKSAADPVGHYSRDPDVLQLLWDP--RPRSVMR-----Q
SEQ ID NO:21 AEGLIADLNMEELAFAKAINDPVGHYSKPEATRLVLDLGHREPMTRVHSK---SVTREE
SEQ ID NO:22 EEGLLYATLDPAAITLAKVAADPAGHYSRDPDVTRLMFPN---NPTPCVV-----D
SEQ ID NO:23 QEGLLIAEIDLGMIGIAKNAADPAGHYSRDPDVTRLLNK---KPINRVE-----H
SEQ ID NO:24 EEGILYADIDLSAITLAKQAADPVGHYSRDPDVLVSLNFNQRRTTPVN-----TPLLSTI
SEQ ID NO:25 EEGILYADIDLSAITLAKQAADPVGHYSRDPDVLVSLNFNQRRTTPVN-----TPLLSTI

```

FIGURA 1F

SEQ ID NO: 4	RVENFRLRQAAEQERQASKRLGKLFEQS-----LLAEEPVPK---
SEQ ID NO: 5	APEPHVQSTAAPVAVSQTQSDTLLVQEPS-----
SEQ ID NO: 6	HATHLLVPQSGALDGVRELNAGADEQRALPS-----THSDETD RATASI
SEQ ID NO: 7	RVENYRLHLQADIEKVENAEAA TLPLDAPAP-----APEQKSGRAKAEA
SEQ ID NO: 8	RVENYRLRQLADIEKVENADSATVPLDVTTPEKQSGDVNANGNAKVNTNPSAKAKA
SEQ ID NO: 9	P-----
SEQ ID NO: 10	KVEKAEDDSNK-----
SEQ ID NO: 11	AAALPELPNLEAAPAEAEYDLHA-----
SEQ ID NO: 12	AAALPELPNLEAAPAEAEYDLHA-----
SEQ ID NO: 13	VTPNAIPAVSDPELTETIEALPNNPIFSH-----
SEQ ID NO: 14	IG-----
SEQ ID NO: 15	SRDOATEKKPVSSEISOLD-----
SEQ ID NO: 16	SAQETVTYEEIQYGNKANVKVHS-----
SEQ ID NO: 17	QTNHFI SYEDLHEDKMDMLTIPRRRVATA-----
SEQ ID NO: 18	TASVPLEPATATDALSSMEALNHV-----
SEQ ID NO: 19	T-----
SEQ ID NO: 20	VA-LSVASPAESAD-----DAEPAVR-----
SEQ ID NO: 21	APEQGVQSKIASVAISHPQSDTLLVQEPS-----
SEQ ID NO: 22	LPDLPISSSEIELL-----RPDIALEV-----
SEQ ID NO: 23	FS-LPVD SAAAALPGEAAVARPDQSI-----
SEQ ID NO: 24	HATHTFVFPQFGALDGVRELNAGADEQRALPS-----THSDETD RATATL
SEQ ID NO: 25	HATHTFVFPQFGALDGVRELNAGADEQRALPS-----THSDETD RATATL

FIGURA 1G