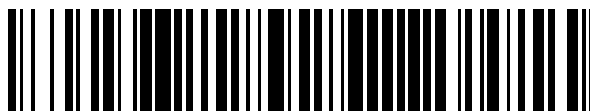


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 784 277**

51 Int. Cl.:

C12N 1/20 (2006.01)

C12N 9/88 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.09.2015** **PCT/EP2015/072594**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.04.2016** **WO16050861**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.09.2015** **E 15775162 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.02.2020** **EP 3201316**

54 Título: **Método de cultivo de microorganismos que tienen actividad de nitrilo hidratasa**

30 Prioridad:

30.09.2014 EP 14187144

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.09.2020

73 Titular/es:

SOLENIS TECHNOLOGIES CAYMAN, L.P.
(100.0%)
P.O. Box 309, Ugland House, South Church
Street, George Town, Grand Cayman, Cayman
Islands
KY1-1104, Cayman, KY

72 Inventor/es:

HAGE, KERSTIN;
SCHWALB, CARSTEN;
SPRÖTE, PETRA;
ÖDMAN, PETER;
BALDENIUS, KAI-UWE;
ERNST, BURKHARD;
STEIGELMANN, GUNTER;
FREYER, STEPHAN;
BOLLSCHWEILER, CLAUS;
BRAUN, MICHAEL GÜNTER y
DAEUWEL, JUERGEN

74 Agente/Representante:

DÍAZ DE BUSTAMANTE TERMINEL, Isidro

ES 2 784 277 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

Método de cultivo de microorganismos que tienen actividad de nitrilo hidratasa

- 5 La presente invención se refiere a métodos para cultivar un microorganismo productor de nitrilo hidratasa, a composiciones para cultivar un microorganismo productor de nitrilo hidratasa y al uso de composiciones que comprenden un sacárido y un ácido orgánico para cultivar un microorganismo productor de nitrilo hidratasa. La composición proporcionada en y a emplear en el contexto de la presente invención es particularmente adecuada para inducir tanto el crecimiento como la producción de nitrilo hidratasa de microorganismos correspondientes.
- 10 La poliacrilamida se usa ampliamente como floculante, como espesante en la industria del papel, como aditivo en la recuperación de petróleo terciario y en muchos otros campos. La materia prima para la poliacrilamida es, normalmente, su monómero acrilamida. En principio, existen dos métodos diferentes para producir acrilamida a escalas industriales: síntesis química y síntesis biológica, en donde los métodos de síntesis biológica están cada vez más en auge debido a las condiciones de reacción más suaves y la seguridad inherente del proceso. Debido a las
- 15 condiciones de reacción más suaves, la ausencia de catalizador de cobre y la conversión cuantitativa del nitrilo, se pueden evitar costosas etapas de procesamiento aguas abajo, tales como destilación o intercambio iónico, en la síntesis biológica, lo que da como resultado plantas más baratas con una superficie de planta drásticamente reducida.
- 20 Ambos métodos de síntesis usan acrilonitrilo como sustancia de partida. Mientras que el método de síntesis química usa catalizadores de cobre (por ejemplo, documentos US4048226, US3597481), el método de síntesis biológica emplea biocatalizadores para hidratar el acrilonitrilo para obtener acrilamida. En general, dichos biocatalizadores son microorganismos que pueden producir la enzima nitrilo hidratasa (nomenclatura IUBMB al 30 de septiembre de 2014: EC 4.2.1.84; N° CAS 2391-37-5; también conocida como, por ejemplo, NHasa). Los microorganismos
- 25 productores de nitrilo hidratasa se distribuyen en gran medida en el medio ambiente y comprenden, entre otros, representantes de *Rhodococcus rhodochrous*, *Rhodococcus pyridinovorans*, *Rhodococcus erythropolis*, *Rhodococcus equi*, *Rhodococcus ruber*, *Rhodococcus opacus*, *Aspergillus niger*, *Acidovorax avenae*, *Acidovorax facilis*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Agrobacterium radiobacter*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus pallidus*, *Bacillus smithii*, *Bacillus* sp BR449, *Bradyrhizobium oligotrophicum*, *Bradyrhizobium diazoefficiens*, *Bradyrhizobium japonicum*, *Burkholderia cenocepacia*, *Burkholderia gladioli*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumonia*, *Klebsiella variicola*, *Mesorhizobium ciceri*, *Mesorhizobium opportunistum*, *Mesorhizobium* sp F28, *Moraxella*, *Pantoea endophytica*, *Pantoea agglomerans*, *Pseudomonas chlororaphis*, *Pseudomonas putida*, *Rhizobium*, *Rhodopseudomonas palustris*, *Serratia liquefaciens*, *Serratia marcescens*, *Amycolatopsis*, *Arthrobacter*, *Brevibacterium* sp CH1, *Brevibacterium* sp CH2, *Brevibacterium* sp R312, *Brevibacterium imperiale*, *Corynebacterium nitrilophilus*, *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*, *Corynebacterium glutamicum*, *Corynebacterium hoffmanii*, *Microbacterium imperiale*, *Microbacterium smegmatis*, *Micrococcus luteus*, *Nocardia globerula*, *Nocardia rhodochrous*, *Pseudonocardia thermophila*, *Trichoderma*, *Myrothecium verrucaria*, *Aureobasidium pullulans*, *Candida famata*, *Candida guilliermondii*, *Candida tropicalis*, *Cryptococcus flavus*, *Cryptococcus* sp UFMG-Y28, *Debaryomyces hanseii*, *Geotrichum candidum*, *Geotrichum* sp JR1, *Hanseniaspora*, *Kluyveromyces thermotolerans*, *Pichia kluyveri*, *Rhodotorula glutinis*, *Comomonas testosteroni*, *Pyrococcus abyssi*, *Pyrococcus furiosus*, y *Pyrococcus horikoshii*.
- 30 (véase, por ejemplo, Prasad, *Biotechnology Advances* (2010), 28 (6): 725-741; FR2835531). La enzima nitrilo hidratasa depende de hierro o de cobalto (es decir, posee un átomo de hierro o de cobalto coordinado en su centro de actividad), que se caracteriza particularmente por su capacidad para catalizar la conversión de acrilonitrilo para obtener acrilamida mediante la hidratación del acrilonitrilo (Kobayashi, *Nature Biotechnology* (1998), 16: 733 - 736).
- 35 La capacidad de los microorganismos para actuar como biocatalizadores para convertir el acrilonitrilo en acrilamida depende básicamente de dos parámetros: crecimiento suficiente de los microorganismos y su tasa de producción de nitrilo hidratasa. Los métodos de fermentación conocidos para el cultivo de microorganismos productores de nitrilo hidratasa se enfrentan a varias dificultades diferentes, por ejemplo, altas concentraciones de fuentes de carbono o nitrógeno adecuadas para el crecimiento pueden inhibir la producción de enzimas, llamada "represión de catabolitos" (Leonova, *Applied Biochem Biotechnol* (2000), 88: 231-241) o inhibir los efectos de los cofactores de iones metálicos (EP-B1 1283256 ; Pei, *Biotechnology letters* (2013), 35: 1419-1424). Estas dificultades dan como resultado bajas
- 40 tasas de actividad de nitrilo hidratasa dentro de un período de tiempo dado, ya sea debido a las bajas tasas de producción de enzima (es decir, los microorganismos están creciendo principalmente pero aún exhiben bajas tasas de producción de enzima) o debido a las bajas tasas de crecimiento de microorganismos (es decir, los microorganismos exhiben altas tasas de producción, pero todavía hay muy pocos microorganismos).
- 45 Por tanto, existe la necesidad de un método de cultivo de microorganismos productores de nitrilo hidratasa que permita obtener altos rendimientos de actividad de nitrilo hidratasa en poco tiempo.

Este problema técnico objetivo ha sido superado por la presente invención como se define en las reivindicaciones y como se describe y ejemplifica a continuación en el presente documento.

La esencia de la presente invención radica en el sorprendente hallazgo de que las combinaciones de sacáridos y ácidos orgánicos aumentan las tasas de crecimiento y de producción de nitrilo hidratasa de acuerdo con los niveles de actividad de nitrilo hidratasa. Sin estar vinculados a la teoría, se cree que la importación de sacárido en las células es mejorada por los ácidos orgánicos.

5 Por tanto, la presente invención se refiere a un método para cultivar un microorganismo productor de nitrilo hidratasa (NHasa), que comprende las etapas de:

(a) poner en contacto dicho microorganismo con una composición acuosa que comprende un sacárido (i) y un ácido orgánico (ii);

(b) cultivar dicho microorganismo en dicha composición acuosa de (a).

10 La presente invención también se refiere a microorganismos obtenidos de u obtenibles por el método de cultivo descrito y proporcionado en el presente documento.

La presente invención también se refiere a una composición para cultivar un microorganismo productor de nitrilo hidratasa, comprendiendo dicha composición un sacárido (i) y un ácido orgánico (ii).

15 La presente invención se refiere además al uso de una composición que comprende un sacárido (i) y un ácido orgánico (ii) para cultivar un microorganismo productor de nitrilo hidratasa.

A continuación, cuando se definan y especifiquen adicionalmente características individuales (tales como, por ejemplo, nitrilo hidratasa, microorganismo, composición, sacárido, ácido orgánico, etc.) del método, la composición y el uso de dicha composición como se describe y proporciona de acuerdo con la presente invención, dichas definiciones y especificaciones se aplicarán a todo, el método de la invención, la composición de la invención y el uso de la invención de dicha composición como se describe y se proporciona en el presente documento.

20 Como ha resultado en línea con los hallazgos de la presente invención, algunos sacáridos parecen ser más potentes en combinación con ácidos orgánicos para aumentar la actividad de nitrilo hidratasa (por ejemplo, permitiendo un alto crecimiento de microorganismos y una alta producción de enzimas) que otros. Por consiguiente, en una realización, el sacárido (i) comprendido por la composición tal como se proporciona y que se empleará en el contexto de la presente invención es un monosacárido. Además, en el contexto de la presente invención, el sacárido (i) puede ser un sacárido en el que el número de átomos de carbono es al menos 5, preferentemente al menos 6. En una realización, el número de átomos de carbono en el sacárido (i) es 6. Los ejemplos específicos para el sacárido contenido en la composición proporcionada en el presente documento y que se empleará en el contexto de la presente invención incluyen glucosa, fructosa, ribosa y manosa; preferentemente glucosa, fructosa o manosa. En una realización, el sacárido (i) es glucosa.

35 El ácido orgánico (ii) contenido en la composición proporcionada en el presente documento y que se empleará en el contexto de la presente invención puede ser, por ejemplo, un ácido orgánico que comprende no más de 3 grupos carboxilo, preferentemente no más de 2 grupos carboxilo, y de la manera más preferente no más de 1 grupo carboxilo. Dichos ácidos orgánicos se han encontrado en línea con la presente invención como particularmente potentes para aumentar la actividad de nitrilo hidratasa como se describe y ejemplifica adicionalmente en el presente documento y en los ejemplos. El ácido orgánico (ii) generalmente no tiene un tamaño limitado, pero puede comprender, por ejemplo, no más de 6 átomos de carbono, preferentemente no más de 4 átomos de carbono, y de la manera más preferente no más de 3 átomos de carbono. Ejemplos particulares de ácidos orgánicos en el contexto de la presente invención incluyen ácido láctico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido málico y ácido succínico. En una realización de la presente invención, el ácido orgánico (ii) se selecciona del grupo que consiste en ácido láctico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido málico y ácido succínico; preferentemente del grupo que consiste en ácido láctico, ácido tartárico, ácido málico y ácido succínico; más preferentemente del grupo que consiste en ácido láctico, ácido tartárico y ácido málico; y de la manera más preferente es ácido láctico.

45 En una realización específica de la presente invención, el sacárido (i) contenido en la composición proporcionada en el presente documento y que se empleará en el contexto de la presente invención es glucosa, y el ácido orgánico (ii) es ácido láctico.

En el contexto del método de cultivo de un microorganismo productor de nitrilo como se proporciona y se describe en el presente documento, es posible primero poner el microorganismo en contacto con una composición que comprende un sacárido (i) (y aún no un ácido orgánico (ii)) de acuerdo con la etapa (a), posteriormente comenzar a cultivar el microorganismo de acuerdo con la etapa (b), y solo entonces añadir un ácido orgánico (ii) a la composición durante el cultivo del microorganismo. Además, *viceversa*, en el contexto del método de cultivo de un microorganismo productor de nitrilo como se proporciona y describe en el presente documento, es posible primero poner el microorganismo en contacto con una composición que comprende un ácido orgánico (i) (y aún no un sacárido (ii)) de acuerdo con la etapa (a), posteriormente comenzar a cultivar el microorganismo de acuerdo con la etapa (b), y solo entonces añadir un sacárido (i) a la composición durante el cultivo del microorganismo. En otras palabras, no es necesario que ambos componentes, sacárido (i) y ácido orgánico (ii), estén presentes en la

composición en contacto con el microorganismo desde el comienzo del cultivo. Por el contrario, también es posible que uno o ambos componentes (i) y (ii) se puedan añadir a la composición después de que el cultivo del microorganismo productor de nitrilo hidratasa haya comenzado, siempre que al final el microorganismo se cultive en una composición que comprende ambos componentes para lograr el efecto deseado de aumentar la actividad de nitrilo hidratasa.

La relación de sacárido (i) y ácido orgánico (ii) como están contenidos en la composición proporcionada en el presente documento y que se empleará en el contexto de la presente memoria descriptiva no está generalmente limitada. Los posibles ejemplos de relaciones (siempre indicadas en el presente documento como relación peso/peso) entre el sacárido (i) y el ácido orgánico (ii) contenidos en la composición proporcionada en el presente documento y que se empleará en el contexto de la presente invención son 1:9 a 9: 1; 2:8 a 8:2; 2,5:7,5 a 7,5:2,5; 3:7 a 7:3; 3,5:6,5 a 6,5:3,5; 4:6 a 6:4; 4,5:5,5 a 5,5:4,5; o 1:1. En la memoria descriptiva, la relación entre sacárido (i) y ácido orgánico (ii) en la composición está entre 2:8 y 9:1, preferentemente entre 3:7 y 9:1, más preferentemente 3:7 y 8:2, más preferentemente 3:7 y 7,5:2,5, y de la manera más preferente entre 3:7 y 7:3 o entre 1:1 y 7:3. En el contexto de la presente invención, estas relaciones se refieren a los pesos respectivos de sacárido (i) y ácido orgánico (ii) tal como se añaden a la composición proporcionada en el presente documento y que se empleará en el contexto de la presente invención para cultivar el microorganismo productor de nitrilo hidratasa. Por ejemplo, las relaciones en la composición pueden variar durante el cultivo del microorganismo productor de nitrilo hidratasa, ya que ambos componentes se pueden consumir o convertir de forma independiente más rápido o más lento, o dado que uno o ambos componentes se añaden en cantidades adicionales durante el transcurso del cultivo.

En una realización específica de la presente invención, el sacárido (i) contenido en la composición proporcionada en el presente documento y que se empleará en el contexto de la presente invención es glucosa, el ácido orgánico (ii) es ácido láctico y la relación entre sacárido (i) y ácido orgánico (ii) en la composición está entre 3:7 y 7:3.

La composición que comprende un sacárido (i) y un ácido orgánico (ii) como se describe y proporciona y que se empleará de acuerdo con la presente invención puede comprender además componentes adicionales que son útiles para composiciones para cultivar microorganismos como se conoce en la técnica. De la manera más preferente, en el contexto de la presente invención, dicha composición es una composición acuosa. Otros componentes pueden incluir, por ejemplo, una fuente de nitrógeno (por ejemplo, una sal de amonio o nitrato, un ácido orgánico tal como ácido glutámico, un extracto de levadura o un hidrolizado de proteínas), una fuente de fósforo (por ejemplo, una sal de fosfato, que también puede proporcionar capacidad tamponante), una fuente de azufre (por ejemplo, una sal de sulfato), una fuente de cobalto y/o hierro (como cofactor para la NHasa), inductores para la expresión de nitrilo hidratasa tales como urea, fuentes de otros nutrientes tales como magnesio, calcio, zinc, manganeso, cobre, así como vitaminas.

El cultivo de microorganismos productores de nitrilo hidratasa como se describe en el presente documento, particularmente en el contexto de la etapa (b) del método proporcionado en el presente documento, puede realizarse de una manera habitual conocida por el experto en la materia. Es decir, la composición proporcionada en el presente documento y que se empleará en este contexto debe contener, además de un sacárido (i) y un ácido orgánico (ii) como se describen en el presente documento, componentes adicionales necesarios para permitir el crecimiento y mantenimiento del microorganismo a cultivar. Además, otros parámetros tales como temperatura, pH, concentración de oxígeno disuelto, presión, aireación y agitación, deben establecerse para permitir el crecimiento y el mantenimiento de los microorganismos a cultivar en el contexto de la presente invención. En este contexto, las temperaturas típicas para el cultivo de microorganismos como se describe y ejemplifica en el presente documento pueden estar entre 30 °C y 40 °C, preferentemente entre 35 °C y 38 °C, de la manera más preferente entre 36,5 °C y 37,5 °C, particularmente a 37 °C. Sin embargo, también se pueden establecer otras temperaturas dependiendo del microorganismo a cultivar en el contexto de la presente invención. El pH debe mantenerse entre 6 y 8, preferentemente entre 6,5 y 7,5, ya sea proporcionando un tampón en el medio de fermentación o mediante la adición controlada por retroalimentación de un ácido y/o base fuerte. Los valores típicos de concentración de oxígeno disuelto pueden estar entre el 5 % y el 75 %, preferentemente 20 % y 40 % de la concentración de saturación.

En el contexto de la presente invención, después del cultivo del microorganismo productor de nitrilo hidratasa de acuerdo con el método de cultivo descrito y proporcionado en el presente documento, el microorganismo puede recogerse de la composición de cultivo y secarse o acumularse de otro modo. Opcionalmente, la suspensión celular puede concentrarse antes del secado, por ejemplo, mediante centrifugación o filtración de flujo transversal (en modo de microfiltración o ultrafiltración). Las células también se pueden lavar con agua o una solución tampón antes de del secado para eliminar las sustancias residuales del caldo de fermentación. Por ejemplo, el microorganismo puede secarse posteriormente mediante secado por pulverización, secado en lecho fluidizado, granulación por pulverización o liofilización después del cultivo, preferentemente por atomización o liofilización. Por ejemplo, las células pueden secarse por pulverización en condiciones suaves, tal como con una temperatura de entrada de 80 a 150 °C, preferentemente de 90 a 120 °C, y una temperatura de salida de, por ejemplo, 35 a 65 °C, preferentemente 40 a 50 °C, a un contenido de agua residual del 1 al 10 %, preferentemente del 4 al 8 % en peso.

En el contexto de la presente invención, el microorganismo productor de nitrilo hidratasa a cultivar con la

composición que comprende un sacárido (i) y un ácido orgánico (ii) puede ser cualquier microorganismo que sea capaz de producir la enzima nitrilo hidratasa como se describe en el presente documento. La enzima nitrilo hidratasa es dependiente de hierro o cobalto (es decir, posee un átomo de hierro o cobalto coordinado en su centro de actividad) que se caracteriza particularmente por su capacidad para catalizar la conversión de acrilonitrilo para obtener acrilamida mediante la hidratación de acrilonitrilo (Kobayashi, Nature Biotechnology (1998), 16: 733 - 736). Dichos microorganismos a emplear en el contexto de la presente invención pueden ser microorganismos capaces de producir naturalmente nitrilo hidratasa, es decir, que contienen naturalmente un gen que codifica nitrilo hidratasa. Dichos microorganismos también pueden ser microorganismos que son naturalmente capaces de producir nitrilo hidratasa, y que además están modificados genéticamente, por ejemplo, para aumentar la producción de nitrilo hidratasa, o para aumentar la estabilidad y/o exportación de nitrilo hidratasa. Dichos microorganismos también pueden ser microorganismos que no son capaces naturalmente de producir nitrilo hidratasa, y que además están modificados genéticamente para expresar y producir de forma estable nitrilo hidratasa. En este contexto, los microorganismos naturalmente capaces de producir nitrilo hidratasa son conocidos en la técnica y comprenden, entre otros, representantes de *Rhodococcus rhodochrous*, *Rhodococcus pyridinovorans*, *Rhodococcus erythropolis*, *Rhodococcus equi*, *Rhodococcus ruber*, *Rhodococcus opacus*, *Aspergillus niger*, *Acidovorax avenae*, *Acidovorax facilis*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Agrobacterium radiobacter*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus pallidus*, *Bacillus smithii*, *Bacillus* sp BR449, *Bradyrhizobium oligotrophicum*, *Bradyrhizobium diazoefficiens*, *Bradyrhizobium japonicum*, *Burkholderia cenocepacia*, *Burkholderia gladioli*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumonia*, *Klebsiella varicola*, *Mesorhizobium ciceri*, *Mesorhizobium opportunistum*, *Mesorhizobium* sp F28, *Moraxella*, *Pantoea endophytica*, *Pantoea agglomerans*, *Pseudomonas chlororaphis*, *Pseudomonas putida*, *Rhizobium*, *Rhodopseudomonas palustris*, *Serratia liquefaciens*, *Serratia marcescens*, *Amycolatopsis*, *Arthrobacter*, *Brevibacterium* sp CH1, *Geobacillus* sp RAPc8, *Brevibacterium* sp CH2, *Brevibacterium* sp R312, *Brevibacterium imperiale*, *Corynebacterium nitrilophilus*, *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*, *Corynebacterium glutamicum*, *Corynebacterium hoffmanii*, *Microbacterium imperiale*, *Microbacterium smegmatis*, *Micrococcus luteus*, *Nocardia globerula*, *Nocardia rhodochrous*, *Pseudonocardia thermophila*, *Trichoderma*, *Myrothecium verrucaria*, *Aureobasidium pullulans*, *Candida famata*, *Candida guilliermondii*, *Candida tropicalis*, *Cryptococcus flavus*, *Cryptococcus* sp UFMG-Y28, *Debaryomyces hansenii*, *Geotrichum candidum*, *Geotrichum* sp JR1, *Hanseniaspora*, *Kluyveromyces thermotolerans*, *Pichia kluyveri*, *Rhodotorula glutinis*, *Comomonas testosteroni*, *Pyrococcus abyssi*, *Pyrococcus furiosus*, y *Pyrococcus horikoshii*. Además, los microorganismos que no expresan naturalmente nitrilo hidratasa tales como *Escherichia* (por ejemplo, *Escherichia coli*) pueden emplearse una vez que han sido modificados genéticamente para expresar y producir hidratos de nitrilo de forma estable. En una realización de la presente invención, el microorganismo productor de nitrilo hidratasa es un representante del género *Rhodococcus*, por ejemplo, de la especie *Rhodococcus rhodochrous* o *Rhodococcus pyridinovorans*. En este contexto, los ejemplos de representantes de la especie *Rhodococcus rhodochrous* pueden comprender las cepas depositadas bajo el n°. NCIMB 41164, FERM-BP 1478 (J1), M33 o M8. Además, en el contexto de la presente invención, los microorganismos productores de nitrilo hidratasa pueden ser microorganismos modificados genéticamente que naturalmente no contienen un gen que codifica una nitrilo hidratasa pero que han sido manipulados para contener un polinucleótido que codifica una nitrilo hidratasa (por ejemplo, por transformación, transducción, transfección, conjugación u otros métodos adecuados para transferir o insertar un polinucleótido en una célula como se conoce en la técnica; véase, Sambrook y Russell 2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, CSH Press, Cold Spring Harbor, NY, EE. UU.), lo que permite a los microorganismos producir la enzima nitrilo hidratasa. Para este propósito, puede ser necesario insertar polinucleótidos adicionales que pueden ser necesarios para permitir la transcripción y traducción del gen de nitrilo hidratasa o ARNm, respectivamente. Dichos polinucleótidos adicionales pueden comprender, entre otras, secuencias promotoras, colas polyT o polyU, u orígenes de replicación u otras secuencias de control de plásmidos. En este contexto, los microorganismos modificados genéticamente que, naturalmente, no contienen un gen que codifica una nitrilo hidratasa, pero que han sido manipulados para contener polinucleótidos que codifican una nitrilo hidratasa pueden ser microorganismos procariotas o eucariotas. Los ejemplos de dichos microorganismos procariotas incluyen, por ejemplo, representantes de la especie *Escherichia coli*. Los ejemplos de dichos microorganismos eucariotas incluyen, por ejemplo, levadura (por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae*).

En una realización específica de la presente invención, el sacárido (i) contenido en la composición proporcionada en el presente documento y que se empleará en el contexto de la presente invención es glucosa, el ácido orgánico (ii) es ácido láctico y el microorganismo productor de nitrilo hidratasa es *Rhodococcus rhodochrous*, por ejemplo, NCIMB 41164 o FERM-BP 1478.

En otra realización específica de la presente invención, el microorganismo productor de nitrilo hidratasa es un *Rhodococcus rhodochrous*, y la relación entre sacárido (i) y ácido orgánico (ii) en la composición está entre 3:7 y 7:3.

En una realización específica adicional de la presente invención, el sacárido (i) contenido en la composición proporcionada en el presente documento y que se empleará en el contexto de la presente invención es glucosa, el ácido orgánico (ii) es ácido láctico, el microorganismo productor de nitrilo hidratasa es *Rhodococcus rhodochrous*, y la relación entre sacárido (i) y ácido orgánico (ii) en la composición está entre 3:7 y 7:3.

En el contexto de la presente invención, el término "nitrilo hidratasa" significa la enzima nitrilo hidratasa (también denominada en el presente documento "NHasa") que es capaz de catalizar la hidratación de acrilonitrilo a acrilamida, es decir, que tiene actividad de nitrilo hidratasa. En el contexto de la presente invención, la actividad de una nitrilo

hidratasa en el sentido de la presente invención se puede determinar de la siguiente manera: primero haciendo reaccionar 100 µl de una suspensión celular, lisado celular, polvo de enzima disuelto o cualquier otra preparación que contenga la supuesta nitrilo hidratasa con 875 µl de un tampón de fosfato de potasio 50 mM y 25 µl de acrilonitrilo a 25 °C en un agitador de tubos Eppendorf a 1.000 rpm durante 10 minutos. Después de 10 minutos de tiempo de reacción, se extraen muestras y se inactivan inmediatamente añadiendo el mismo volumen de ácido clorhídrico al 1,4 %. Después de mezclar la muestra, las células se eliminan por centrifugación durante 1 minuto a 10.000 rpm y la cantidad de acrilamida formada se determina analizando el sobrenadante transparente por HPLC. La concentración de acrilamida debe estar entre 0,25 y 1,25 mmol/l; si es necesario, la muestra debe diluirse en consecuencia y la conversión debe repetirse. La actividad enzimática se deduce de la concentración de acrilamida dividiendo la concentración de acrilamida derivada del análisis por HPLC por el tiempo de reacción, que ha sido de 10 minutos y multiplicando este valor por el factor de dilución entre la muestra de HPLC y la muestra original. Las actividades >10 U/ml, preferentemente >100 U/ml, más preferentemente >1.000 U/ml indican la presencia de una nitrilo hidratasa expresada funcionalmente y se consideran actividad de nitrilo hidratasa y, por tanto, como una enzima nitrilo hidratasa en el contexto de la presente invención. Por ejemplo, la nitrilo hidratasa como se usa en el presente documento también comprende enzimas clasificadas bajo la nomenclatura IUBMB (al 30 de septiembre de 2014) como EC 4.2.1.84 o como N° CAS 2391-37-5, así como enzimas modificadas o mejoradas que son, por ejemplo, capaces de convertir un compuesto de nitrilo (por ejemplo, acrilonitrilo) en un compuesto de amida (por ejemplo, acrilamida) más rápidamente, o que pueden producirse con una mayor relación de rendimiento/tiempo, o que son más estables, siempre que sean capaces de catalizar la conversión (es decir, la hidratación) de un compuesto de nitrilo (por ejemplo, acrilonitrilo) a un compuesto de amida (por ejemplo, acrilamida). En el contexto de la presente invención, la nitrilo hidratasa puede ser un polipéptido codificado por un polinucleótido que comprende o consiste en una secuencia de nucleótidos que es al menos un 70 %, preferentemente al menos un 75 %, más preferentemente al menos un 80 %, más preferentemente al menos un 85 %, más preferentemente al menos un 90 %, más preferentemente al menos un 95 %, más preferentemente al menos un 96 %, más preferentemente al menos un 97 %, más preferentemente al menos un 98 %, más preferentemente al menos un 99 %, más preferentemente al menos un 99,5 %, y de la manera más preferente un 100 % idéntica a la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1 (la subunidad alfa de nitrilo hidratasa de *R. rhodochrous*:

GTGAGCGAGCACGTCAATAAGTACACGGAGTACGAGGCACGTACCAAGGCGATCGAAACCTTGCTGTACGAGC
GAGGGCTCATCACGCCGCCGCGGTGACCGAGTCGTTTCGTAACGAGATCGGCCCGATGGGCG
GTGCCAAGGTCGTGGCCAAAGTCCTGGGTGGACCCTGAGTACCGCAAGTGGCTCGAAGAGGACGCGACGGCCG
CGATGGCGTCATTGGGCTATGCCGGTGAGCAGGCACACCAAAATTCGGCGGTCTTCAACGACTCCCAAACGCAT
CACGTGGTGGTGTGCACTCTGTGTTCTGCTATCCGTGGCCGGTGCTTGGTCTCCCGCCCGCCTGGTACAAGA
GCATGGAGTACCGGTCCCGAGTGGTAGCGGACCCTCGTGGAGTGCTCAAGCGCGATTTCGGTTCGACATCCC
CGATGAGGTGGAGGTGAGGTTTGGGACAGCAGCTCCGAAATCCGCTACATCGTCATCCCGGAACGGCCGGCC
GGCACCAGCGTTGGTCCGAGGAGGAGCTGACGAAGCTGGTGAGCCGGGACTCGATGATCGGTGTCAAGTAAT
GCGCTCACACCGCAGGAAGTGATCGTATGA) y/o a la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 3 (subunidad beta de nitrilo hidratasa de *R. rhodochrous*:

ATGGATGGTATCCACGACACAGGCGGCATGACCGGATACGGACCGGTCCCCTATCAGAAGGACGAGCCCTTCT
TCCACTACGAGTGGGAGGGTCGACCCTGTCAATTCTGACTTGATGCATCTCAAGGGCATATCGTGGTGGGAC
AAGTCGCGGTTCTTCCGGGAGTCGATGGGGAACGAAACTACGTCAACGAGATTGCGAACTCGTACTACACCCA
CTGGCTGAGTGCGGCAGAACGTATCCTCGTCGCCGACAAGATCATCACGAAGAAGAGCGAAAGCACCGTGTG
CAAGAGATCCTTGAGGGTGGTACACGGACAGGAAGCCGTGCGGGAAGTTCGATCCGGCCAGATCGAGAAG
GCGATCGAACGGCTTCACGAGCCCCACTCCCTAGCGCTTCCAGGAGCGGAGCCGAGTTTCTCTCTCGGTGACA
AGATCAAAGTGAAGAGTATGAACCCGCTGGGACACACACGGTGCCCGAAATATGTGCGGAACAAGATCGGGGA
AATCGTCGCCTACCACGGCTGCCAGATCTATCCCGAGAGCAGCTCCGCCGGCCTCGGCGACGATCCTCGCCCG
CTCTACACGGTCCGTTTCCGCCAGGAAGTGTGGGCGACGACGGAACGGGAAAGACGAGTAGTGTGCGTCTG
ATCTCTGGAACCGTATCTCTGCGTGA), siempre que el polipéptido codificado por dicho polinucleótido sea capaz de catalizar la hidratación de acrilonitrilo a acrilamida (por ejemplo, tiene actividad de nitrilo hidratasa) como se describe y ejemplifica en el presente documento. También en el contexto de la presente invención, la nitrilo hidratasa puede ser un polipéptido que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que es al menos un 70 %, preferentemente al menos un 75 %, más preferentemente al menos un 80 %, más preferentemente al menos un 85 %, más preferentemente al menos un 90 %, más preferentemente al menos un 95 %, más preferentemente al menos un 96 %, más preferentemente al menos un 97 %, más preferentemente al menos un 98 %, más preferentemente al menos un 99 %, más preferentemente al menos un 99,5 %, y de la manera más preferente un 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 (subunidad alfa de nitrilo hidratasa de *R. rhodochrous*: VSEHVNKYTE YEARTKAIET LLYERGLITP AAVDRVVSYY ENEIGPMGGA KVVAKSWVDP EYRKWLEEDA TAAMASLGYA GEQAHQISAV FNDSQTHVHV VCTLCSYCPW PVLGLPPAWY KSMEYRSRVV ADPRGVLRD FGFDIPDEVE VRVWDSSSEI RYVIVPERPA GTDGWSEEEL TKLVSRDSMI GVSNAITPQE VIV) y/o a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 (subunidad beta de nitrilo hidratasa de *R. rhodochrous*: MDGIHDTGGM TGYGPVPYQK DEPFHYEWE NRTLSILTWM HLKISWWDK SRFFRESMGN ENYVNEIRNSY YTHWLSAAE RILVADKIIT EERKRVQIE ILEGRTDRK PSRKFDPAQI EKAIERLMHP HSLALPGAEP SFSLGDKIKV KSMNPLGHTR CPKYVRNKIG EIVAYHGCQI YPESSAGLG DDPRLPYTVA FSAQELWGDD GNGKDVVCVD LWEPLYISA), siempre que dicho polipéptido sea capaz de catalizar la hidratación de acrilonitrilo a acrilamida como se describe y ejemplifica en el presente documento.

El nivel de identidad entre dos o más secuencias (por ejemplo, secuencias de ácido nucleico o secuencias de aminoácidos) se puede determinar fácilmente mediante métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, mediante análisis BLAST. Generalmente, en el contexto de la presente invención, si dos secuencias (por ejemplo, secuencias de polinucleótidos o secuencias de aminoácidos) a comparar mediante, por ejemplo, las comparaciones de secuencias difieren en identidad, entonces el término "identidad" puede referirse a la secuencia más corta y esa parte de la secuencia más larga que coincide con dicha secuencia más corta. Por lo tanto, cuando las secuencias que se comparan no tienen la misma longitud, el grado de identidad puede referirse preferentemente al porcentaje de residuos de nucleótidos en la secuencia más corta que son idénticos a los residuos de nucleótidos en la secuencia más larga o al porcentaje de nucleótidos en la secuencia más larga que son idénticos a la secuencia de nucleótidos en la secuencia más corta. En este contexto, el experto en la materia puede determinar fácilmente la parte de una secuencia más larga que coincide con la secuencia más corta. Además, como se usa en el presente documento, los niveles de identidad de secuencias de ácido nucleico o secuencias de aminoácidos pueden referirse a la longitud completa de la secuencia respectiva y, preferentemente, se evalúa por pares, en el que cada espacio debe contarse como un emparejamiento erróneo. Estas definiciones para las comparaciones de secuencias (por ejemplo, el establecimiento de valores de "identidad") deben aplicarse a todas las secuencias descritas y divulgadas en el presente documento.

Además, el término "identidad" como se usa en el presente documento significa que hay una equivalencia funcional y/o estructural entre las secuencias correspondientes. Las secuencias de ácidos nucleicos/aminoácidos que tienen los niveles de identidad dados a las secuencias de ácidos nucleicos/aminoácidos particulares descritas en el presente documento pueden representar derivados/variantes de estas secuencias que, preferentemente, tienen la misma función biológica. Pueden ser variaciones de origen natural, por ejemplo, secuencias de otras variedades, especies, etc., o mutaciones, y dichas mutaciones pueden haberse formado naturalmente o pueden haber sido producidas por mutagénesis deliberada. Además, las variaciones pueden ser secuencias producidas sintéticamente. Las variantes pueden ser variantes de origen natural o variantes producidas sintéticamente o variantes producidas por técnicas de ADN recombinante. Se pueden haber producido desviaciones de las secuencias de ácido nucleico descritas anteriormente, por ejemplo, por delección, sustitución, adición, inserción y/o recombinación. El término "adición" se refiere a añadir al menos un residuo de ácido nucleico/aminoácido al final de la secuencia dada, mientras que "inserción" se refiere a insertar al menos un residuo de ácido nucleico/aminoácido dentro de una secuencia dada. El término "delección" se refiere a borrar o eliminar al menos un residuo de ácido nucleico o residuo de aminoácido en una secuencia dada. El término "sustitución" se refiere al reemplazo de al menos un residuo de ácido nucleico/residuo de aminoácido en una secuencia dada. Nuevamente, estas definiciones, como se usan en el presente documento, se aplican, *mutatis mutandis*, para todas las secuencias proporcionadas y descritas en el presente documento.

Generalmente, como se usan en el presente documento, los términos "polinucleótido" y "ácido nucleico" o "molécula de ácido nucleico" deben interpretarse como sinónimos. Generalmente, las moléculas de ácido nucleico pueden comprender, entre otras, moléculas de ADN, moléculas de ARN, tiofosfatos de oligonucleótidos, ribo-oligonucleótidos sustituidos o moléculas de APN. Además, el término "molécula de ácido nucleico" puede referirse a ADN o ARN o híbridos de los mismos o cualquier modificación de los mismos que se conoce en la técnica (véanse, por ejemplo, los documentos US 5525711, US 471 1955, US 5792608 o EP 302175 para ejemplos de modificaciones). La secuencia de polinucleótidos puede ser monocatenaria o bicatenaria, lineal o circular, natural o sintética, y sin ninguna limitación de tamaño. Por ejemplo, la secuencia de polinucleótidos puede ser ADN genómico, ADNc, ADN mitocondrial, ARNm, ARN antisentido, ARN ribozimático o un ADN que codifica tales ARN o quimeroplastos (Gamper, Nucleic Acids Research, 2000, 28, 4332 - 4339). Dicha secuencia de polinucleótidos puede estar en forma de un vector, plásmido o de ADN o ARN viral. También se describen en el presente documento moléculas de ácido nucleico que son complementarias a las moléculas de ácido nucleico descritas anteriormente y moléculas de ácido nucleico que pueden hibridar con las moléculas de ácido nucleico descritas en el presente documento. Una molécula de ácido nucleico descrita en el presente documento también puede ser un fragmento de las moléculas de ácido nucleico en el contexto de la presente invención. Particularmente, dicho fragmento es un fragmento funcional. Ejemplos de tales fragmentos funcionales son las moléculas de ácido nucleico que pueden servir como cebadores.

Generalmente, la presente invención se refiere a todas las realizaciones descritas en el presente documento, así como a todas las permutaciones y combinaciones de las mismas. Los aspectos o realizaciones particulares descritos en el presente documento no deben interpretarse como limitantes del alcance de la presente invención en dichos aspectos o realizaciones.

Los siguientes ejemplos ilustran la presente invención. Sin embargo, la presente invención no debe interpretarse como limitada por los siguientes ejemplos.

Ejemplos

Ejemplo 1

Cultivo de *Rhodococcus ssp.*

Se evaluaron diferentes relaciones de azúcar/ácido orgánico para diferentes cepas de *Rhodococcus* (*R. rhodochrous* "CIBA" (NCIMB 41164) y *R. rhodochrous* "J1" (FERM BP-1478)), en un sistema de microfermentación.

El medio de cultivo básico contenía extracto de levadura (Biospringer) (1,25 g/l), KH_2PO_4 (10 g/l), K_2HPO_4 (10 g/l), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (1 g/l), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,375 g/l), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (25 mg/l), solución de oligoelemento (2,5 g/l) (véase a continuación), $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$ (31,2 mg/l), antiespumante P2000 (BASF) (62,5 mg/l), urea (7 g/l) y glutamato de amonio (2,5 g/l) en H_2O . Solución de oligoelementos: monohidrato de ácido cítrico (40 g/l), $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (11 g/l), $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (8,5 g/l), $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (3 g/l) y $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0,8 g/l) en H_2O .

El medio se suplementó luego con 10 g/l de fuente de carbono (sacárido, ácido orgánico o mezcla de ambos como se indica en las tablas a continuación). El pH se ajustó a 6,6 usando H_3PO_4 o NaOH. El medio se inoculó directamente a partir del stock criogénico a OD 0,05 (medida a 600 nm). El cultivo se llevó a cabo a 37 °C durante 64 h a 1.100 rpm en un sistema de micro fermentación BioLector (M2P Labs, Baesweiler, Alemania) usando placas de 48 pocillos de forma floreada con un volumen de trabajo de 1,5 ml. Después del cultivo, se extrajeron muestras, se inactivaron con ácido clorhídrico y se determinó la actividad de nitrilo hidratasa como se describe en el ejemplo 2.

En las tablas a continuación, se proporcionan actividades relativas de nitrilo hidratasa para diferentes cepas y relaciones de sacárido/ácido. Las actividades de nitrilo hidratasa logradas con el sacárido como única fuente de carbono se establecieron al 100 %.

Tabla 1: *R. rhodochrous* "CIBA"

Sacárido	Ácido	Relación en peso de sacárido/ácido						
		Solo ácido	1/9	3/7	1/1	7/3	1/9	Solo sacárido
Glucosa	Láctico	N/A	24 %	1037 %	1242 %	748°	422 %	100 %
	Tartárico	173 %	244 %	1354 %	1044 %	737°	191 %	100 %
	Málico	197 %	392 %	1199 %	2596 %	1709 %	801 %	100 %
	Cítrico	164 %	190 %	161 %	1433 %	635 %	57 %	100 %
	Succínico	150 %	510 %	1365 %	2303 %	122E	547 %	100 %
Sacárido	Ácido	Relación en peso de sacárido/ácido						
		Solo ácido	1/9	3/7	1/1	7/3	1/9	Solo sacárido
Fructosa	Láctico	N/A	1 %	93 %	156 %	225 %	160 %	100 %
	Tartárico	34 %	46 %	128 %	106 %	148 %	60 %	100 %
	Málico	39 %	94 %	278 %	333 %	363 %	399 %	100 %
	Cítrico	32 %	0 %	134 %	291 %	251 %	81 %	100 %
	Succínico	30 %	16 %	0 %	182 %	152 %	93 %	100 %
Sacárido	Ácido	Relación en peso de sacárido/ácido						
		Solo ácido	1/9	3/7	1/1	7/3	1/9	Solo sacárido
Manosa	Láctico	N/A	188 %	8947 %	2141 %	2888 %	363 %	100 %
	Tartárico	1388 %	1519 %	3543 %	2415 %	333 %	178 %	100 %
	Málico	1579 %	911 %	633 %	1185 %	1326 %	503 %	100 %

	Cítrico	1315 %	81 %	92 %	857 %	754 %	272 %	100 %
	Succínico	1204 %	2477 %	2658 %	2660 %	1395 %	226 %	100 %
Ribosa	Láctico	N/A	99 %	5939 %	7655 %	9628 %	957 %	100 %
	Tartárico	1487 %	1039 %	4630 %	14304 %	11834 %	170 %	100 %
	Málico	1693 %	2022 %	7187 %	15682 %	17555 %	434 %	100 %
	Cítrico	1409 %	1748 %	3172 %	12115 %	5503 %	1663 %	100 %
	Succínico	1291 %	3378 %	9647 %	17868 %	14895 %	444 %	100 %

Tabla 2: *R. rhodochrous* "J1"

Sacárido	Ácido	Relación en peso de sacárido/ácido						
		Solo ácido	1/9	3/7	1/1	7/3	1/9	Solo sacárido
Glucosa	Láctico	1963 %	2092 %	5069 %	4934 %	731 %	1836 %	100 %
	Succínico	N/A	1920 %	1270 %	4110 %	5548 %	1668 %	100 %
Sacárido	Ácido	Relación en peso de sacárido/ácido						
		Solo ácido	1/9	3/7	1/1	7/3	1/9	Solo sacárido
Fructosa	Láctico	73 %	76 %	79 %	134 %	118 %	55 %	100 %
	Succínico	N/A	33 %	47 %	130 %	145 %	51 %	100 %

5 Ejemplo 2

Medición de la actividad de nitrilo hidratasa

Se tomaron muestras del medio de cultivo del ejemplo 1 y se diluyeron 1:10 (v/v) con 50 mmol/l de tampón KH_2PO_4 (pH 7,0). La solución obtenida se diluye adicionalmente 1:20 (v/v) con 50 mmol/l de tampón KH_2PO_4 (pH 7,0) para lograr un factor de dilución final de 1:200 para el medio de cultivo.

10 Reacción:

Se pipetearon 875 μl de tampón KH_2PO_4 (pH 7,0) en un tubo Eppendorf de 2 ml. Se añadieron 100 μl del medio de cultivo diluido y la mezcla se incubó previamente en un termomezclador a 25 °C durante 5 minutos a 500 rpm. Después de la incubación previa, la reacción se inició mediante la adición de 25 μl de acrilonitrilo. La reacción se llevó a cabo a 25 °C y 1.000 rpm durante 10 minutos.

15 Preparación de muestras:

Después de 10 minutos de tiempo de reacción, la reacción se inactivó transfiriendo 300 μl de la solución de reacción a un tubo Eppendorf de 1,5 ml que contenía 300 μl de ácido clorhídrico al 1,4 % (m/v). La mezcla se sometió a vórtice brevemente y se centrifugó en una centrífuga de mesa durante 1 minuto a 10.000 rpm para separar las células. Se mezclaron 100 μl del sobrenadante transparente con 900 μl de agua. La mezcla se analizó posteriormente por HPLC.

20

Análisis por HPLC:

- Columna: Aqua 5 μ C18 125A, 250 x 4,60 mm (Phenomenex)
- Temperatura de la estufa: 45 °C

- Volumen de inyección: 1 µl
- Detección: UV 210 nm
- Flujo: 1,0 ml/min
- Disolvente A: 25 mmol/l de KH₂PO₄ pH 2,5

- 5
- Disolvente B: acetonitrilo
 - Separación: 10 % B (isocrático)
 - Retención: acrilamida: -3,6 min,
 - El valor de HPLC debe estar entre 0,25 y 1,25 mmol/l

10 La concentración de acrilamida determinada por HPLC debe estar entre 0,25 y 1,25 mmol/l. Si esto no se logra directamente, la concentración celular usada en la reacción debe ajustarse en consecuencia.

Determinación de la actividad de nitrilo hidratasa:

- c: cantidad de sustancia [mM] producto (valor de HPLC)
 - t: tiempo de incubación [min], en esta prueba 10 min
 - k: factor de dilución - dilución total desde la muestra inicial hasta el cálculo de la actividad de la muestra de HPLC en kU/l
- 15

◦ Actividad (en kU/l) = $\frac{c}{t} \bullet k$

Una unidad de actividad [U] se define como 1 µmol de acrilamida generado durante un minuto de tiempo de reacción.

20

REIVINDICACIONES

1. Método para cultivar un microorganismo productor de nitrilo hidratasa, que comprende las etapas de:

(a) poner en contacto dicho microorganismo con una composición acuosa que comprende un sacárido (i) y un ácido orgánico (ii); y

(b) cultivar dicho microorganismo en dicha composición acuosa de (a),

en donde la relación de sacárido (i) respecto a ácido orgánico (ii) es de 3:7 a 7:3 en peso,

en donde el sacárido se selecciona del grupo que consiste en glucosa, fructosa, manosa y ribosa,

en donde el ácido orgánico se selecciona del ácido láctico, ácido tartárico, ácido málico, ácido cítrico y ácido succínico.

2. Composición para cultivar un microorganismo productor de nitrilo hidratasa, comprendiendo dicha composición un sacárido (i) y un ácido orgánico (ii)

en donde la relación de sacárido (i) respecto a ácido orgánico (ii) es de 3:7 a 7:3 en peso,

en donde el sacárido se selecciona del grupo que consiste en glucosa, fructosa, manosa y ribosa,

en donde el ácido orgánico se selecciona del ácido láctico, ácido tartárico, ácido málico, ácido cítrico y ácido succínico.

3. Uso de una composición que comprende un sacárido (i) y un ácido orgánico (ii) para cultivar un microorganismo productor de nitrilo hidratasa

en donde la relación de sacárido (i) respecto a ácido orgánico (ii) es de 3:7 a 7:3 en peso, en donde el sacárido se selecciona del grupo que consiste en glucosa, fructosa, manosa y ribosa,

en donde el ácido orgánico se selecciona del ácido láctico, ácido tartárico, ácido málico, ácido cítrico y ácido succínico.

4. Método de la reivindicación 1, composición de la reivindicación 2, o uso de la reivindicación 3, en donde dicho sacárido (i) es un monosacárido.

5. Método de la reivindicación 1 o 4, composición de la reivindicación 2 o 4, o uso de la reivindicación 3 o 4, en donde el número de átomos de carbono contenidos en dicho sacárido (i) es al menos 5, preferentemente al menos 6.

6. Método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 4 a 5, composición de una cualquiera de las reivindicaciones 2 o 4 a 5, o uso de una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, en donde dicho ácido orgánico (ii) comprende no más de 3 grupos carboxilo, preferentemente no más de 2 grupos carboxilo, de la manera más preferente no más de 1 grupo carboxilo.

7. Método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 4 a 6, composición de una cualquiera de las reivindicaciones 2 o 4 a 6, o uso de una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6, en donde dicho ácido orgánico (ii) comprende no más de 6 átomos de carbono, preferentemente no más de 4 átomos de carbono, de la manera más preferente no más de 3 átomos de carbono.

8. Método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 4 a 7, composición de una cualquiera de las reivindicaciones 2 o 4 a 7, o uso de una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7, en donde dicho microorganismo

pertenece a la especie *Rhodococcus rhodochrous* o *Rhodococcus pyridinovorans*.

5 9. Método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 4 a 8, composición de una cualquiera de las reivindicaciones 2 o 4 a 8, o uso de una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 8, en donde dicha nitrilo hidratasa está codificada por un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que es al menos un 70 % idéntica a la secuencia de nucleótidos que se muestra en la SEQ ID NO: 1 y/o la SEQ ID NO: 3.

10 10. Método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 4 a 9, composición de una cualquiera de las reivindicaciones 2 o 4 a 9, o uso de una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 9, en donde dicha nitrilo hidratasa tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos un 70 % idéntica a la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 2 y/o la SEQ ID NO: 4.

15 11. Método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 4 a 10, en donde dicho microorganismo se seca después del cultivo.