(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 275 732**

(51) Int. Cl.:
C12P 13/02 (2006.01)
C12P 7/40 (2006.01)
C12N 1/20 (2006.01)
C12N 9/14 (2006.01)
C12N 9/88 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Número de solicitud europea: **01971983 .0**
(86) Fecha de presentación : **30.08.2001**
(87) Número de publicación de la solicitud: **1315824**
(87) Fecha de publicación de la solicitud: **04.06.2003**

(54) Título: **Procedimiento para la reacción enzimática de compuestos con al menos una función nitrilo y/o al menos una función amida.**

(30) Prioridad: **30.08.2000 DE 100 42 835**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.06.2007

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.06.2007

(73) Titular/es: **BASF Aktiengesellschaft**
67056 Ludwigshafen, DE

(72) Inventor/es: **Hauer, Bernhard;**
Pressler, Uwe;
Ress-Löschke, Marion;
Syldatk, Christoph;
Christian, Hans-Jürgen y
Pietzsch, Markus

(74) Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

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).

Venta de fascículos: Oficina Española de Patentes y Marcas. Pº de la Castellana, 75 – 28071 Madrid

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la reacción enzimática de compuestos con al menos una función nitrilo y/o al menos una función amida.

Los compuestos de nitrilo están ampliamente extendidos en la naturaleza. En todas las clases de organismos investigadas hasta la fecha se encuentran representantes con la propiedad de síntesis de compuestos de nitrilo.

En la síntesis química se emplean nitrilos, entre otros, como disolvente hidrófilo y fácilmente volátil, como por ejemplo acetonitrilo, propionitrilo y cianuro de bencilo como material de partida para resinas de bencilo. Acrilonitrilo y adiponitrilo se emplean en grandes cantidades para la obtención de polímeros, como látex y nylon. En la síntesis química se emplea frecuentemente ácido cianhídrico también como grupo protector, y por lo tanto se produce como residuo.

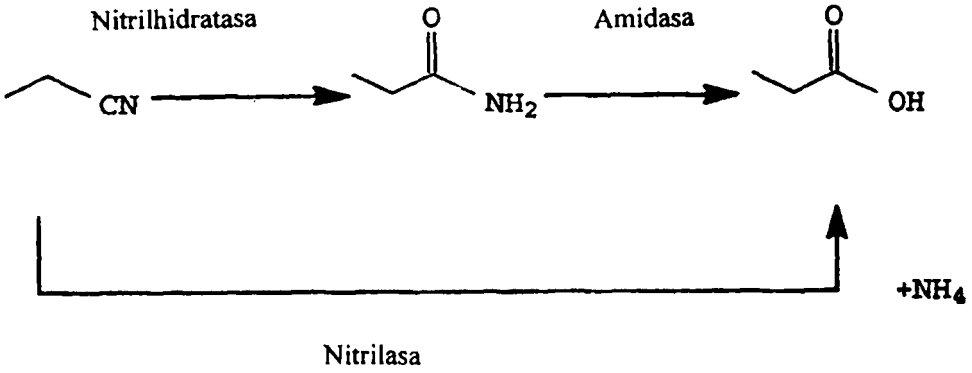
El nitrilo de ácido propiónico se obtiene técnicamente, entre otras maneras, mediante el alquilado de cianuros (síntesis de Kolbe), o la deshidratación de propionamida.

En la naturaleza, los compuestos de nitrilo se degradan en la mayor parte de los casos a través de microorganismos. La reacción de compuestos de nitrilo mediante células microbianas vivas se efectúa por dos vías diferentes.

Una nitrilasa (E.C. 3.5.5.1) puede catalizar la reacción de nitrilos para dar ácido sin la liberación de producto intermedio amida, directamente en un procedimiento de un paso.

Por el contrario, un sistema de nitrilhidratasa-amidasa es una reacción de dos enzimas, en la que la nitrilhidratasa (E.C. 4.2.1.84) saponifica el nitrilo para dar amida de ácido carboxílico. Este paso es una adición de agua, por lo cual las nitrilhidratasas no se clasifican entre las hidrolasas, sino entre las liasas.

La amida de ácido carboxílico se transforma entonces en el correspondiente ácido y amonio a través de una amidasa (E.C. 3.5.1.4) en un segundo paso. Las diferentes vías de reacción se representan en la siguiente figura.



En la familia de actinomicetes están ampliamente extendidas actividades de nitrilhidratasa, también ciertos hongos inferiores pueden utilizar tales compuestos. Especialmente la especie *Rhodococcus*, bacterias de suelo que crecen tipo micelas, se pueden desarrollar con nitrilos como única fuente de carbono y nitrógeno. Pero también representantes de la especie *Corynebacterium, Brevibacterium* y *Agrobacterium* poseen nitrilhidratasas para el metabolizado de polímeros que se presentan en la naturaleza con grupos nitrilo. También los representantes de la especie *Pseudomonas* son cepas conocidas con propiedades hidrolizantes de nitrilo.

La US 4.421.855 describe un procedimiento para la obtención de acrilamida, partiendo de acrilonitrilo, en el que se emplea un microorganismo inmovilizado con actividad de nitrilhidratasa. En el procedimiento se inmoviliza el microorganismo en un gel de poliacrilamida.

La EP 0 252 564 B1 reivindica un *Rhodococcus Sp*. NCIB 122 18, así como un procedimiento para la obtención de 2,6-difluorbenzamida bajo empleo de la bacteria de la especie *Rhodococcus*.

La WO 95/04828 describe enzimas con una actividad de nitrilhidratasa, así como microorganismos que sobreexprimen estos enzimas.

La EP 0 204 555 B1 describe un procedimiento en el que se hace reaccionar una amida con un microorganismo (*Rhodococcus Sp*. AK-32, *Rhodococcus Sp*. AK-33) para dar la correspondiente amida.

La EP 133 927 A1 describe la reacción de nitrilos para dar las correspondientes amidas mediante microorganismos apropiados. La actividad de estos microorganismos es fotoinducible. Son ejemplos de microorganismos apropiados bacterias grampositivas de la especie *Coryne-Bakterium, Nocardia, Bacillus, Bakteridium, Mikrococcus* y *Brevi-Bakterium*.

La DE 25 56 701.5 (US 4.001.081) describe un procedimiento para la obtención de amidas mediante hidrólisis de los correspondientes nitrilos, en el que se emplean bacterias de las especies *Bacillus*, *Bakteridium, Mikrococcus* y *Brevi-Bakterium*.

La US 5.030.571 reivindica la cepa *Rhodococcus erythropolis* NCIB 122 73, así como sus mutantes productos de arilacilamidasa.

La EP 0 326 482 B1 describe un procedimiento para la obtención de enantiómeros S(+) de ácidos 2-arilalcanoicos, en el que se hacen reaccionar las correspondientes amidas mediante microorganismos o enzimas, que se obtienen también a partir de microorganismos. Los microorganismos cuya actividad de amidasa se aprovecha en este caso, son seleccionados entre las *Brevi-bacterias* y *Coryne-bacterias*.

La EP 0 344 044 B1 describe un procedimiento para la obtención de enantiómeros R(+) de ácidos 2-ariloxi- o 2-ariltioalcanoicos, partiendo de las correspondientes amidas mediante reacción con *Corynebakterium* o *Brevibakterium*.

La US 4.629.700 describe un procedimiento en el que se hacen reaccionar polinitrilos aromáticos de microorganismos con actividad de nitrilasa (*Rhodococcen*).

La EP 0 348 901 B1 describe un procedimiento para la obtención de ácidos orgánicos con actividad óptica α-substituidos. En este procedimiento se puede transformar un nitrilo racémico α-substituido o una amida con un microorganismo de la especie *Alcaligenes, Pseudomonas, Rodopseudomonas, Corynebakterium sp., Acinetobacter*, *Bacillus, Microbakterium, Rhodococcus* y *Candida*. Por lo demás se reivindica una nitrilasa de *Acinetobacter sp.* cepa AK 226, que puede transformar un nitrilo racémico α-substituido en un ácido orgánico con actividad óptica α-substituido.

La DE 24 44 849 C2 describe un procedimiento para la obtención de ácidos orgánicos mediante hidrólisis de los correspondientes nitrilos. En este procedimiento se emplean cepas bacterianas definidas (grampositivas).

La DE 43 13 649 C1 describe un microorganismo *Rhodococcus erythropolis* DSM 7529, así como un procedimiento para la obtención microbiana de un complejo enzimático de nitrilhidratasa/amidasa para la degradación de nitrilos orgánicos. El microorganismo reivindicado transforma los productos intermedios orgánicos que portan grupos nitrilo en las correspondientes amidas, o bien derivados de ácido carboxílico. A tal efecto, el microorganismo requiere como inductores nitrilos, lactamas, o iones de elementos de grupos secundarios.

La EP 0 473 328 A2 reivindica un procedimiento para la obtención de ácidos carboxilícos con actividad óptica 2-substituidos. A tal efecto se hace reaccionar el nitrilo racémico 2-substituido con microorganismos, que son aptos de transformar el grupo nitrilo en grupo ácido carboxílico. Además de los microorganismos mencionados se encuentra también un *Rhodococcus erythropolis* (IFO 123 20).

La EP 0 330 529 B1 reivindica un procedimiento para la obtención de enantiómeros S de ácidos 2-arilpropiónicos, en el que se emplea un microorganismo de la especie de *Brevi bacterias* y *Coryne bacterias*.

La EP 0 444 640 B1 reivindica un procedimiento para la generación de una cantidad elevada de actividad de nitrilasa a partir de la cepa microbiana de *Rhodococcus*. En este caso se emplean compuestos de lactama como inductores para la actividad de nitrilasa.

En el procedimiento conocido por el estado de la técnica es desventajoso que sólo sea apropiado para empleo a escala industrial de manera condicional. En este caso, sobre todo es problemático que un cultivo con concentración celular elevada en el biorreactor es posible sólo de manera limitada, por lo demás, una concentración de eductos relativamente reducida conduce a la interrupción de la reacción debido a efectos de inhibición. Los procedimientos conocidos están caracterizados además por requisitos especiales en condiciones de cultivo, actividad reducida y especificidad reducida de los microorganismos empleados. En este caso son desfavorables en especial la labilidad de los microorganismos conocidos frente a fluctuaciones de temperatura y valor de pH. Por lo demás, los microorganismos conocidos son difícilmente o apenas no reutilizables.

La tarea de la presente invención ha consistido en poner a disposición un procedimiento para la reacción enzimática de nitrilos y/o amidas para dar las correspondientes amidas y/o ácidos carboxilícos. En este caso era interesante en especial el empleo del procedimiento a escala industrial. A tal efecto, los microorganismos empleados en el procedimiento presentarán en especial un cultivo en concentración celular elevada, así como una tolerancia a una concentración de eductos lo más elevada posible. Una actividad elevada, así como especificidad del microorganismo empleado, era deseable al igual que el empleo de microorganismos completos, como también en forma de un complejo enzimático aislado a partir de los mismos.

Era de especial interés la reacción selectiva de oligo- o polinitrilos para dar las correspondientes monoamidas, o bien ácidos monocarboxílicos. Además era deseable un control selectivo de la reacción mediante parámetros técnicos de procedimientos sencillos, una separación sencilla de microorganismos a partir del sistema de reacción, estabilidad elevada de microorganismos en el almacenaje, así como la aptitud para reutilización una vez concluida la reacción. En lo posible, el procedimiento será empleable además como procedimiento tanto continuo, discontinuo, como también por cargas.

Se encontró que estas tareas complejas se solucionan mediante un procedimiento en el que se emplean microorganismos y/o complejos de nitrilhidratasa-amidasa aislados a partir de los mismos, siendo seleccionados los microorganismos a partir del grupo que está formado por *Rhodococcus erythropolis* DSM 1302, *Rhodococcus erythropolis* DSM 13475 y *Rhodococcus erythropolis* DSM 13476.

Se descubrió que los microorganismos según la invención, así como los complejos de nitrilhidratasa-amidasa aislados a partir de los mismos, son aptos para transformar compuestos con al menos una función nitrilo y/o al menos una función amida con especificidad elevada, en las correspondientes amidas y/o ácidos carboxilícos. Por lo tanto, un objeto de la presente invención se refiere a un procedimiento para la reacción enzimática de compuestos con al menos una función nitrilo y/o al menos una función amida con al menos un microorganismo, y/o un complejo de nitrilhidratasa-amidasa aislado a partir de este microorganismo, siendo seleccionado el microorganismo a partir del grupo que se forma por *Rhodococcus erythropolis* DSM 13002, *Rhodococcus erythropolis* DSM 13475 y *Rhodococcus erythropolis* DSM 13476.

En lugar de la función nitrilo, los compuestos obtenidos de este modo portan entonces una función amida, o bien una función ácido carboxílico.

En el procedimiento según la invención es especialmente ventajoso poder hacer reaccionar los compuestos con al menos una función nitrilo tanto para dar compuestos con la correspondiente función amida, como también para dar compuestos con la correspondiente función ácido carboxílico, y esto se puede controlar selectivamente en dependencia de las condiciones de reacción.

Puesta en práctica de procedimiento

El procedimiento según la invención se puede llevar a cabo en una pluralidad de variantes: habitualmente se presentan substrato (nitrilo y/o amida) en forma pura o en disolución, y se pone en contacto con el microorganismo y/o complejo de nitrilhidratasa-amidasa del microorganismo. Si el substrato se presenta en disolución, se trata preferentemente de una disolución acuosa, el substrato, si es necesario, se puede disolver por medio de un disolvente. El substrato, en caso necesario, se puede disolver en un disolvente aprótico. A modo de ejemplo cítense dimetilformamida y dimetilsulfóxido. En este caso se puede añadir el substrato al medio de cultivo en la fase de crecimiento de microorganismos, este sirve entonces como fuente de carbono y/o nitrógeno adicional. Del mismo modo es posible el cultivo de microorganismos sin adición de substrato, y adición de substrato tras consecución de la fase de crecimiento estacionaria de microorganismos. Además es posible el cultivo de microorganismos (con o sin substrato), la separación del medio de cultivo, a modo de ejemplo mediante filtración, centrifugado, resuspensión en un medio apropiado y adición del substrato. Del mismo modo, los microorganismos se pueden cultivar para el aislamiento del complejo de nitrilhidratasa-amidasa con o sin adición de substrato, tras aislamiento del complejo de nitrilhidratasa-amidasa se efectúa entonces la incubación con el substrato como se describe anteriormente.

La selección de la forma de adición de substrato (en forma pura o en disolución) se ajusta a la solubilidad de substrato. Preferentemente se añade el substrato en forma pura, ya que de este modo se evita una dilución indeseable de la carga de reacción.

En el caso de una adición continua de substrato se ha mostrado ventajoso ajustar en la carga de reacción la concentración en substrato que se sitúa en el máximo de actividad del sistema enzimático. Para propionitrilo, esta concentración se sitúa entre 100 y 300 mM.

Para la reacción enzimática se emplean los microorganismos en forma de células completas, habitualmente de una concentración de biomasa seca de 0,2 a 50 g/l, en especial 1 a 10 g/l. Para el aislamiento del complejo nitrilhidratasa-amidasa se emplean habitualmente 20 a 100, en especial 30 a 80 g/l de biomasa seca. La biomasa seca se determina mediante pesada de 10 ml de suspensión celular tras secado a 100ºC durante 4 horas. Tanto los microorganismos, como también los complejos de nitrilhidratasa-amidasa aislados a partir de los mismos, se pueden emplear también en forma de liofilizados. En especial, el liofilizado conduce a una mejora de la estabilidad al almacenaje. Los microorganismos, o bien los complejos de nitrilhidratasa-amidasa aislados a partir de los mismos, se resuspenden habitualmente en un tampón de reacción apropiado. Como tampón de reacción son apropiadas disoluciones salinas acuosas, o bien sistemas tampón. Son ejemplos de tampones de reacción apropiados disoluciones acuosas de hidrogenofosfato, dihidrogenofosfato y/o sistemas tri-tampón, que presentan habitualmente un valor de pH de 6,5 a 10,5, en especial de 7 a 8, en especial de 7,2.

La reacción se puede llevar a cabo a una temperatura de 10 a 40ºC, en especial de 15 a 40ºC, preferentemente de 20 a 38ºC. El desarrollo de la reacción se puede seguir mediante identificación de substratos y/o productos en la carga de reacción, a modo de ejemplo mediante métodos cromatográficos (por ejemplo HPLC). El aislamiento de productos a

partir de la carga de reacción se puede efectuar mediante técnicas de purificación habituales, como por ejemplo secado, centrifugado, separación por membrana, concentración en vacío o cristalización. A una purificación de productos se puede anteponer, en caso dado, un tratamiento con carbón activo y/o una cromatografía de intercambio iónico.

Los productos obtenidos en el procedimiento según la invención se pueden obtener ventajosamente a partir de la disolución de reacción acuosa a través de extracción o cristalización, o a través de extracción y cristalización. A tal efecto se acidifica la disolución de reacción acuosa con un ácido, como un ácido mineral (por ejemplo HCl o H_2SO_4) o un ácido orgánico, ventajosamente a valores de pH por debajo de 2, y a continuación se extrae con un disolvente orgánico. La extracción se puede repetir varias veces para el aumento del rendimiento. Como disolventes orgánicos, en principio se pueden emplear todos los disolventes que muestran un límite de fases con agua, en caso dado tras adición de sales. Los disolventes ventajosos son disolventes como tolueno, benceno, hexano, metil-terc-butiléter o acetato de etilo.

Tras concentración por evaporación de la fase orgánica, los productos se pueden obtener generalmente en buenas purezas químicas, es decir, en más de un 90% de pureza química. No obstante, tras extracción, la fase orgánica se puede concentrar por evaporación sólo en parte, y el producto se puede cristalizar. A tal efecto se enfría la disolución ventajosamente a una temperatura de 0 a 10ºC. La cristalización se puede efectuar también directamente a partir de la disolución orgánica. El producto cristalizado se puede absorber en el mismo o en otro disolvente para la nueva cristalización, y cristalizar de nuevo. Mediante la cristalización subsiguiente, al menos simple, se puede aumentar adicionalmente la pureza de enantiómeros del producto según posición del eutéctico.

No obstante, los productos se pueden cristalizar a partir de la disolución de reacción también directamente tras acidificado con un ácido a un valor de pH ventajosamente por debajo de 2. Ventajosamente, a tal efecto se concentra por evaporación la disolución acuosa bajo calentamiento, y se reduce en su volumen en un 10 a un 90%, preferentemente un 20 a un 80%, de modo especialmente preferente un 30 a un 70%. Preferentemente se lleva a cabo la cristalización bajo refrigeración. Para la cristalización son preferentes temperaturas entre 0 y 10ºC. Por motivos de costes es preferente la cristalización directa a partir de la disolución acuosa. Del mismo modo es preferente una elaboración de productos a través de una extracción, y en caso dado subsiguiente cristalización.

En estos modos de elaboración preferentes, el producto del procedimiento según la invención se puede aislar en rendimientos de un 60 a un 100%, preferentemente de un 80 a un 100%, de modo especialmente preferente de un 90 a un 100%, referido al substrato empleado para la reacción. El producto aislado se distingue por una pureza química elevada de > 90%, preferentemente > 95%, de modo especialmente preferente de > 98%.

Los productos obtenidos de este modo son apropiados como material de partida para síntesis orgánicas para la obtención de fármacos o productos agroquímicos, o para la disociación de racematos.

La presente invención comprende el conocimiento de que la actividad enzimática de microorganismos y/o de complejos de nitrilhidratasa-amidasa aislados a partir de los mismos se puede controlar selectivamente según selección de condiciones de cultivo y parámetros de procedimiento, en especial de valor de pH y temperatura de reacción. En dependencia de la reacción enzimática deseada, el especialista selecciona las condiciones de cultivo, el tampón de reacción, así como las condiciones de reacción. En este caso es de especial significado la selección del valor de pH del tampón de reacción: si se emplea como substrato un compuesto con una función nitrilo, y es deseable la reacción a amida (reacción de nitrilhidratasa), se han mostrado ventajosos los siguientes parámetros de procedimiento: pH 8 a 10,5, en especial pH 9 a 10. Si se emplea como substrato un compuesto con una función nitrilo, y se desea la reacción para dar el ácido orgánico (reacción de nitrilhidratasa-amidasa), se han mostrado ventajosos los siguientes parámetros de procedimiento: pH 6 a 10,5, y en especial 7 a 9. Si se emplea como substrato un compuesto con una función amida (reacción de amidasa) son ventajosos los siguientes parámetros de procedimiento: pH 6 a 9, en especial pH 7 a 8.

Si se emplea como substrato un compuesto con función nitrilo y amida, y es deseable la reacción selectiva de nitrilo, o bien de la función amida (reacción de nitrilhidratasa, o bien amidasa), el especialista puede seleccionar la misma mediante elección selectiva del valor de pH y la temperatura. La presente invención incluye el conocimiento de que el procedimiento según la invención se puede emplear por una parte para la degradación selectiva de nitrilos y/o amidas, como también para la síntesis de amidas y/o ácidos carboxilícos.

Compuesto con al menos una función nitrilo

Los compuestos que portan al menos una función nitrilo (R-CN), y que se pueden hacer reaccionar con los microorganismos según la invención y/o los complejos de nitrilhidratasa-amidasa aislados a partir de los mismos, son, a modo de ejemplo, nitrilos alifáticos saturados, como acetonitrilo, propionitrilo, nitrilo de ácido succínico, nitrilo de ácido adípico, nitrilos con insaturación etilénica, como acrilonitrilo y metacrilonitrilo, dinitrilos aromáticos, como benzonitrilo y nitrilo de ácido ftálico, y nitrilos heterocíclicos, como nitrilo de ácido nicotínico. Además son apropiados dinitrilos, como por ejemplo dinitrilo de ácido ftálico, dinitrilo de ácido succínico, dinitrilo de ácido adípico, así como polinitrilos, como por ejemplo tricianohexano. Es especialmente preferente propionitrilo. Los nitrilos se pueden emplear en una concentración de 0,5 a 200 g/l, especialmente de 2 a 150 g/l, en especial de 5,0 a 60 g/l. En principio son apropiados compuestos con un número ilimitado de funciones nitrilo. Son especialmente apropiados compuestos con 5 o menos funciones nitrilo. De modo especialmente preferente se emplean compuestos con una y/o dos funciones nitrilo.

Compuestos con al menos una función amida

Los compuestos que portan al menos una función amida, y que se pueden hacer reaccionar con los microorganismos según la invención, y/o los complejos de nitrilhidratasa-amilasa aislados a partir de los mismos, son, a modo de ejemplo, amidas alifáticas saturadas, amidas alifáticas con insaturación etilénica, amidas aromáticas y amidas heterocíclicas. A modo de ejemplo cítense: propionamida, acetoamida, succinoamida, adipoamida, acrilamida, metacrilamida, benzamida, amida de ácido ftálico, nicotinamida. Las diamidas apropiadas son, a modo de ejemplo, diamida de ácido ftálico, diamida de ácido succínico y diamida de ácido adípico. Son especialmente apropiadas propiamida, acetoamida y/o acrilamida. Las amidas se pueden emplear en una concentración de 0,5 a 500 g/l, en especial de 5,0 a 60 g/l, de modo especialmente preferente de 7 a 25 g/l. En principio son apropiados compuestos con un número ilimitado de funciones amida. Son especialmente apropiados compuestos con 5 o menos funciones amida. Son especialmente preferentes compuestos con una y/o dos funciones amida.

Además son apropiados como substratos compuestos que portan tanto al menos una función nitrilo, como también una función amida.

En otra forma de ejecución del procedimiento se pueden inmovilizar los microorganismos y/o los complejos de nitrilhidratasa-amidasa aislados a partir de los mismos. Sorprendentemente se descubrió que, mediante el inmovilizado, se puede conseguir no sólo una separación sencilla de la disolución de reacción y una aptitud para reutilización de microorganismos y/o de complejos de nitrilhidratasa-amidasa aislados a partir de los mismos, sino que el inmovilizado estabiliza la actividad enzimática, en especial la actividad de amidasa. Son apropiados métodos conocidos de inmovilizado, como por ejemplo el reticulado transversal con glutaraldehído, o el enlace a un soporte. Se ha mostrado ventajoso llevar a cabo el inmovilizado a 0 hasta 10ºC, en especial a 4ºC. El enlace a un soporte se efectúa habitualmente mediante adsorción, enlace iónico o enlace covalente. A modo de ejemplo se debe citar la inclusión en un polímero de alginato (inmovilizado de células completas) o la inclusión en un retículo covalente a base de acrilamida (enlace covalente).

En una forma preferente de ejecución de la presente invención, los microorganismos y/o los complejos de nitrilhidratasa-amidasa aislados a partir de los mismos se aíslan en forma de polímeros de alginato, este inmovilizado es apropiado en especial para los microorganismos en forma de células completas. El inmovilizado en forma de polímeros de alginato se efectúa habitualmente mediante obtención de una disolución de alginato que se mezcla con una suspensión celular en proporción 1:1 (fracciones volumétricas). Se ha mostrado ventajoso seleccionar la proporción de concentración de suspensión celular respecto a la concentración de disolución de alginato en el intervalo de 20:1 a 5:1, en especial de 15:1 a 7,5:1. Es especialmente preferente una proporción de 10:1. Esto significa que se añade, a modo de ejemplo, una suspensión celular al 30% en peso a una disolución de alginato al 3% en peso. Si en lugar de microorganismos se inmovilizan los complejos de nitrilhidratasa-amidasa aislados a partir de los mismos, se emplea una concentración correspondientemente más reducida, que resulta mediante cálculo sencillo para el especialista. Habitualmente se pulveriza la mezcla de suspensión celular y/o complejo de nitrilhidratasa-amidasa y disolución de alginato en la disolución de reticulante por medio de goteo por pulverizado. Como reticulante es apropiada, a modo de ejemplo, una disolución de $CaCl_2$. En este caso se llega al intercambio de iones Na^+ monovalentes o de alginato con iones Ca^{2+} divalentes de disolución de reticulante, que unen entre sí las hebras de alginato. Se obtienen polímeros de alginato, cuyo diámetro se puede ajustar en dependencia de las cabezas de pulverizado empleadas. Los diámetros habituales se sitúan en el intervalo de 0,5 a 2 mm, en especial 0,8 y 1,0 mm. Se ha mostrado especialmente ventajoso, en especial para el estabilizado de la actividad enzimática, llevar a cabo el inmovilizado de alginato de modo que las perlas de alginato presenten un diámetro de 0,8 a 1,0 mm.

En otra forma de ejecución, el inmovilizado se efectúa mediante inclusión en un retículo covalente a base de acrilamida. En este caso se ha mostrado ventajoso polimerizar previamente las disoluciones de acrilamida, bismetacrilamida, TEMED, así como persulfato amónico, a temperatura ambiente, y después añadir la suspensión celular y/o el complejo de nitrilhidratasa-amidasa aislado, preferentemente a 4ºC. La proporción de acrilamida respecto a bisacrilamida se sitúa habitualmente en el intervalo de 40:1 a 2:1, preferentemente en 30:1 a 5:1, en especial 10:1 a 8:1. La presente invención incluye concomitantemente el conocimiento de que se puede conseguir un aumento de las actividades enzimáticas, en especial de la actividad de nitrilhidratasa, mediante una reducción de la fracción de acrilamida.

El procedimiento según la invención se puede llevar a cabo tanto de manera continua, como también en control de proceso discontinuo (procedimiento discontinuo), así como en control de proceso por cargas con adición de substrato continua y/o discontinua (cargas de alimentación, así como cargas de alimentación repetidas). El procedimiento, en especial bajo empleo de microorganismos inmovilizados y/o complejos de nitrilhidratasa-amidasa inmovilizados, se puede llevar a cabo tanto en el reactor de agitación, como también en lecho fijo.

Para la consecución de una concentración de producto elevada con inhibición simultánea de un desactivado se ha mostrado especialmente ventajoso llevar a cabo el procedimiento según la invención en control de proceso por cargas con adición de substrato continua. En este caso es especialmente preferente el empleo de microorganismos inmovilizados y/o complejos de nitrilhidratasa-amidasa inmovilizados.

La presente invención incluye el conocimiento de que la actividad de nitrilhidratasa y/o amidasa se puede controlar selectivamente según control de proceso seleccionado, y según parámetros de proceso seleccionados. Las siguientes tablas reúnen los parámetros para la reacción de nitrilhidratasa, o bien amidasa, obtenidos en diferentes controles de proceso.

Nitrilhidratasa	**Actividad (aparente) [U/g BTM]**	**Semiperiodo de actividad enzimática [h]**	**Producto por biomasa [mol/g BTM]**	**BTM [g/l]**	**Tiempo de reacción [h]**	**Volumen de reacción [m]**
control de proceso						
discontinuo	9000	no determinado	no determinado	0,77	1	25
discontinuo, empleo reiterado (inmovilizado)	5814	6,94	no determinado	1,55	8	25
discontinuo, adición de substrato pulsada (inmovilizado)	9500	10,00	0,01	2,94	2	50
discontinuo, alimentación por cargas	75	46,00	0,75	4,00	366	500
discontinuo, alimentación por cargas (inmovilizado)	67	no determinado no determinado	0,56	2,70	450	250
reactor de agitación continuo (inmovilizado)	650	57,00	1,69	1,07	216	100
lecho fijo reactor tubular (inmovilizado)	92	138,00	2,33	3,00	4,00	20
Amidasa	**Actividad específica [U/g BTM]**	**Semiperiodo de actividad enzimática [h]**	**Producto por biomasa [mol/g BTM]**	**BTM [g/l]**	**Tiempo de reacción [h]**	**Volumen de reacción [m]**
control de proceso						
discontinuo	300,0	no determinado	no determinado	0,77	1	25
discontinuo, empleo reiterado (inmovilizado)	283,00	no determinable	no determinado	1,55	8	25
adición de substrato discontinua, pulsada (inmovilizado)	341,0	no determinable	0,01	2,94	2	50
discontinuo, alimentación por cargas	75,0	57,00	0,75	4,00	366	500
discontinuo, alimentación por cargas (inmovilizado)	67,0	no determinado	0,56	2,70	450	250

Amidasa	Actividad específica [U/g BTM]	Semiperiodo de actividad enzimática [h]	Producto por biomasa [mol/g BTM]	BTM [g/l]	Tiempo de reacción [h]	Volumen de reacción [m]
control de proceso						
reactor de agitación continuo (inmovilizado)	40,00	111,00	1,80	1,07	1311	150
lecho fijo/reactor tubular (inmovilizado)	6,1	no determinable	0,40	0,66	1050	25
Actividad (aparente) = cuota de reacción específica observable; producto por biomasa = suma de producto formado a lo largo del tiempo de reacción, referido a la biomasa empleada; actividad (aparente) = cuota de reacción específica observable; producto por biomasa = suma de producto formado a lo largo del tiempo de reacción, referido a la biomasa empleada; no determinable = desactivado nulo a lo largo del tiempo de reacción						

Es especialmente preferente el control de proceso discontinuo, ya que se alcanza la máxima actividad específica tanto respecto a la nitrilhidratasa, como también a la actividad de amidasa.

En especial es preferente, entre otras cosas respecto a una máxima concentración de producto posible, el control de proceso discontinuo con adición de substrato discontinua (= pulsada).

Para la consecución de una concentración de producto lo más elevada posible, referida a la biomasa empleada, se ha mostrado ventajoso el empleo de un reactor tubular continuo.

En una forma preferente de ejecución del procedimiento, la reacción en el reactor tubular continuo, se pueden obtener actividades específicas elevadas para ambos enzimas con cantidades de producto satisfactorias, referidas a la biomasa seca.

La presente invención comprende el conocimiento de que el procedimiento según la invención se puede llevar a cabo también en varias etapas. A tal efecto, como primera etapa es apropiada, a modo de ejemplo, la puesta en práctica en reactor tubular continuo con etapa subsiguiente en reactor de lecho fijo continuo.

El especialista puede seleccionar las diversas etapas según reacción deseada, conociendo los parámetros aislados de controles de proceso.

Además son objeto de la presente invención la cepa *Rhodococcus erythropolis* DSM 13002, la cepa *Rhodococcus erythropolis* DSM 13475, así como la cepa *Rhodococcus erythropolis* DSM 13476, así como respectivamente mutantes con las mismas propiedades. Se debe entender por mutantes con las mismas propiedades aquellos microorganismos que se pueden asignar a *Rhodococcus erythropolis* desde el punto de vista taxonómico, y que presentan al menos un 80% de actividad específica de las cepas según la invención en una reacción con propionitrilo.

Estas cepas se depositaron en la colección alemana de microorganismos y cultivos celulares GmbH (DSMZ Braunschweig) bajo los números DSM 13002, DSM 13475 y DSM 13476.

Las 3 cepas presentan las siguientes características quimiotaxonómicas.

- Aminoácido diagnóstico de petidoglicano: ácido meso-diaminopimelínico,
- azúcares de hidrolizados de células completas: arabinosa y galactosa,
- ácidos micólicos: ácidos micólicos de *Rhodococcus* con una longitud de cadena de 32 a 46 átomos de carbono,
- muestra de ácido graso: ácidos grasos saturados e insaturados no ramificados más ácido esteárico de tubérculos,
- menaquinonas: MK-8 (H_2).

Además, las tres cepas son grampositivas, aerobias y mesófilas, y forman colonias de color amarillo claro a beige.

Adicionalmente, para la cepa *Rhodococcus erythropolis* DSM 13002 se lleva a cabo un secuenciado completo de 16S-rDNA, que da por resultado una coincidencia de más del 99,5% con las secuencias de las regiones específicas de *Rhodococcus erythropolis*.

Condiciones de cultivo

Los microorganismos se mantienen habitualmente sobre placas de agar en medio complejo LB, como se describe en el ejemplo 1. El cultivo en medio de cultivo se efectúa habitualmente en medio líquido en matraces vibradores con deflectores y/o diferentes reactores de agitación, así como en mayores cantidades en reactores de biomasa. Los medios líquidos pueden contener como fuente de carbono y nitrógeno exclusivamente un nitrilo, o mezclas de diversos nitrilos, como por ejemplo propionitrilo, acetonitrilo, isobutironitrilo, metacrilonitrilo, benzonitrilo, lactonitrilo, tricianhexano, cianhidrina de hidroxipivalaldehído, que se emplean en una concentración de 0,5 a 10 g/l, preferentemente 2 a 7 g/l, en especial de 4 a 6 g/l. Es preferente el cultivo de microorganismos en un medio de cultivo que contiene como fuente de carbono glucosa, y como fuente de nitrógeno sulfato amónico y/o nitrato amónico. Habitualmente se emplea como fuente de carbono glucosa en una cantidad de 0,5 a 20 g/l, en especial 1 a 5 g/l. Ventajosamente se emplea como fuente de carbono glucosa en una concentración de 2 g/l. Como fuentes de carbono adicionales o alternativas son apropiados succinato, acetato y/o citrato. Según actividad deseada (nitrilhidratasa y/o amidasa) el especialista puede seleccionar las condiciones de cultivo. La presente invención comprende el conocimiento de que se puede aumentar en especial la actividad de nitrilhidratasa mediante empleo de glucosa, mientras que la actividad de amidasa se puede aumentar mediante cultivo en medio exento de glucosa.

En una forma de ejecución de la invención, la actividad de nitrilhidratasa y de amidasa se pueden controlar selectivamente mediante la selección de la concentración de glucosa en el medio.

Como fuente de nitrógeno se emplea habitualmente sulfato amónico en una cantidad de 0,5 a 10 g/l, en especial 1 a 5 g/l. La presente invención comprende el conocimiento de que la adición de amonio, en especial en forma de sulfato amónico, aumenta claramente la actividad de complejo de nitrilhidratasa-amidasa, en especial la actividad de amidasa. En una forma de ejecución, el medio de cultivo puede contener un nitrilo como fuente de carbono y nitrógeno, así como adicionalmente una fuente de carbono adicional y una fuente de nitrógeno adicional. El medio de cultivo contiene habitualmente una fuente de nutrientes orgánica, como extracto de levadura, extracto de malta, peptona y/o extracto de carne. A este medio se puede añadir una fuente de nutrientes inorgánica, que contiene, a modo de ejemplo, fosfatos, sodio, potasio, hierro, magnesio, manganeso y/o cinc. En caso dado, se puede añadir al medio una disolución de vitaminas. La presente invención comprende además el conocimiento de que la adición de hierro, en especial en forma de sulfato de hierro(III), conduce a un aumento de actividad de nitrilhidratasa, mientras que la reacción de amidasa se puede suprimir completamente en el caso de cultivo en ausencia de hierro. Los medios líquidos designados medio 1 y medio 2 en el ejemplo 2 representan medios líquidos apropiados para el cultivo. Para la consecución de una actividad de nitrilhidratasa-amidasa elevada se ha mostrado ventajoso cultivar los microorganismos en el medio 2.

El valor de pH del medio de cultivo se sitúa generalmente entre pH 5 a pH 9, en especial entre pH 6 a pH 8. La temperatura de cultivo se sitúa habitualmente entre 10 y 40ºC, en especial entre 20 y 35ºC, preferentemente entre 27 y 32ºC. Las condiciones estándar para el cultivo son pH 7,2 y 30ºC. Ventajosamente, por medio de agitador o gasificado con oxígeno se consigue una saturación de oxígeno de la disolución de cultivo lo más elevada posible, para no limitar el crecimiento de microorganismos estrictamente aerobios. Bajo estas condiciones es posible un cultivo aerobio generalmente 2 a 5 días. En el caso de cultivo en el reactor de biomasa se ha mostrado ventajoso añadir extracto de levadura y/o sulfato amónico en el transcurso del cultivo al alcanzar la fase de crecimiento estacionaria, esta nueva adición con dosificación se puede efectuar varias veces. Bajo las citadas condiciones es posible cultivar los microorganismos hasta una concentración de 1 a 5 g de biomasa seca (BTM)/l. Tras alcanzar la fase de crecimiento estacionaria se separan los microorganismos, habitualmente por medio de centrifugado, y después se pueden emplear directamente para el procedimiento (= biomasa), emplear como material de partida para un inmovilizado, o emplear para el aislamiento del complejo de nitrilhidratasa-amidasa. Según actividad deseada (nitrilhidratasa y/o amidasa) el especialista puede seleccionar las condiciones de cultivo. El cultivo de microorganismos se puede llevar a cabo con o sin la adición de un inductor.

Si se añade un inductor al medio de cultivo, este se añade habitualmente en una concentración de 0,2 a 7,5 g/l. En el caso de inductores se puede tratar de nitrilos, que sirven como fuente de carbono y nitrógeno, pero también son apropiados otros compuestos, como amidas y lactamas. Como inductores son apropiados, a modo de ejemplo, propionitrilo, butironitrilo, isovaleronitrilo, isobutironitrilo, propionamida, acrilamida, butiramida, crotonamida, metacrilamida, isobutiramida y urea. Como inductores son especialmente apropiados nitrilo de ácido crotónico, crotonamida, metacrilamida y lactamas. Como lactamas son preferentes amidas intramoleculares de γ-aminoácidos con 4 a 6 átomos de carbono, en especial ε-caprolactama, γ-butirolactama (= pirrolidona) y δ-valerolactama (= 2-piperidona). En especial es apropiada ε-caprolactama en una concentración de 0,5 a 5,0 g/l.

Aislamiento del complejo de nitrilhidratasa-amidasa

Otro objeto de la presente invención se refiere al complejo de nitrilhidratasa-amidasa procedente de un microorganismo que es seleccionado a partir del grupo que se forma por *Rhodococcus erythropolis* DSM 13002, *Rhodococcus erythropolis* DSM 13475 y *Rhodococcus erythropolis* DSM 13476. El aislamiento del complejo de nitrilhidratasa-amidasa a partir de los microorganismos reivindicados se puede llevar a cabo en este caso según procedimientos del estado

de la técnica. En este caso, los microorganismos se cultivan en primer lugar hasta la densidad celular deseada, y se separan mediante centrifugado del medio de cultivo. La disgregación celular se puede llevar a cabo, a modo de ejemplo, por medio de tratamiento enzimático (lisozima) y subsiguiente tratamiento mecánico (prensa francesa, disgregación ultrasónica). Alternativamente, la disgregación celular es posible directamente sin tratamiento de lisozima previo, en un molino de vidrio bajo refrigeración de nitrógeno. La separación de las membranas celulares a partir de la disgregación celular se efectúa habitualmente mediante centrifugado. Ventajosamente, todos los pasos de aislamiento del complejo de nitrilhidratasa-amidasa se llevan a cabo a 4ºC. El exceso de este centrifugado contiene el complejo de nitrilhidratasa-amidasa, que se puede emplear directamente, o se puede purificar, en caso dado mediante pasos de procedimiento subsiguientes. Como pasos de procedimiento subsiguientes cítense, a modo de ejemplo: ultracentrifugado, salinizado, precipitación con disolventes orgánicos, así como purificación por medio de cromatografía de adsorción, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) y/o cromatografía de permeación en gel.

Ejemplo 1

Mantenimiento de cepa sobre placa de agar

Componente del medio	Concentración
Bacto Trypton, Difco 0123-15-5	10 g/l
extracto de levadura, Gibco BRL, UK 20047-056	5 g/l
NaCl	10 g/l
agar	15 g/l

Las substancias se disolvieron en 970 ml de agua completamente desalinizada, se ajustaron a pH 7,2 con NaOH 1 M, y después se completó a 1 litro de volumen final.

Las disoluciones se esterilizaron a 121ºC y una atmósfera de presión durante 21 minutos, y se vertieron bajo el banco de esterilizado en cápsulas de Petri plásticas estériles adquiribles comercialmente. Tras el enfriamiento se envasaron las placas en medio estéril, y se almacenaron a 4ºC.

El cultivo puro de microorganismos DSM 13002, DSM 13475 y DSM 13476 se sobreinoculó regularmente cada cuatro semanas sobre placas de agar LB, se incubó durante dos días a 30ºC en el espacio de reproducción, y a continuación se almacenaron a 4ºC en el espacio de refrigeración.

Ejemplo 2

Medios para el cultivo celular en cultivo líquido

Medio 1		Medio 2	
tratamiento en autoclave separado		tratamiento en autoclave separado	
K_2HPO_4	0,5 g/l	Na_2HPO_4	0,5 g/l
KH_2PO_4	0,5 g/l	KH_2PO_4	0,5 g/l
tratamiento en autoclave separado		esterilizado por filtración	
$(NH_4)_2SO_4$	2 g/l	ácido cítrico	0,2 g/l
$MgSO_4 \times 7\ H_2O$	0,5 g/l	$Fe(II)SO_4 \times 7\ H_2O$	0,2 g/l
$CoCl_2$	10 mg/l	tratamiento en autoclave separado	
caprolactama	0,5 g/l	$(NH_4)_2\ SO_4$	2 g/l
extracto de levadura	3 g/l	$MgSO_4 \times 7\ H_2O$	1,1 g/l
SL5 (véase anteriormente)	2 ml/l	$CaCl_2 \times 2\ H_2O$	0,05 g/l
		extracto de levadura	2 g/l
		SL6 (véase a continuación)	1 ml/l
tratamiento en autoclave separado		tratamiento en autoclave separado	
glucosa	2 g/l	glucosa	2 g/l

Todos los componentes excepto la disolución de glucosa se ajustaron con NaOH a pH 7,2 antes del esterilizado.

Componentes de las disoluciones de elementos en trazas SL5 y SL6

SL5		SL6	
EDTA	2,5 g/l	EDTA	5 g/l
$Fe(III)SO_4 \times H_2O$	1 g/l	$ZnSO_4 \times 7\ H_2O$	1,1 g/l
$ZnSO_4 \times 7\ H_2O$	0,05 g/l	$CuSO_4 \times 5\ H_2O$	0,04 g/l
$MnCl_2 \times 4\ H_2O$	0,015 g/l	$MnSO_4 \times 1\ H_2O$	6 g/l
H_3BO_3	0, 15 g/l	H_3BO_3	0,06 g/l
$CoCl_2 \times 6\ H_2O$	0,1 g/l	KJ	0,01 g/l
$CuCl_2 \times 2\ H_2O$	0,005 g/l		
$NiCl_2 \times 6\ H_2O$	0,01 g/l		
$Na_2MoO_4 \times 2\ H_2O$	0,015 g/l		

Se elaboraron los medios en el orden citado anteriormente. A tal efecto se obtuvieron disoluciones concentradas: 800 ml de sales (junto con la disolución de hierro añadida mediante filtración por esterilizado), 150 ml de tampón y 50 ml de glucosa para un total de 1 litro de disolución, de modo que, tras la reunión de estas disoluciones en medio estéril, resultaron las concentraciones descritas anteriormente.

Las disoluciones de sal de hierro del medio 2 se obtuvieron con las mismas fracciones ponderales (w/w) en ácido cítrico, situándose la solubilidad máxima en 2 g/l de sales de hierro. Tras el ajuste del valor de pH a pH 7,2 se añadieron las disoluciones a los componentes de medio restantes sometidos a tratamiento en autoclave a través de un esterilizado por filtración con filtros estériles de 0,2 μm (Gelman Science, Michigan, USA).

El cultivo con el medio 2 dio por resultado una actividad específica de nitrilhidratasa claramente más elevada, de 60 000 U/g BTM, y de amidasa de 400 U/g BTM, frente a las actividades específicas del cultivo con medio 1.

Ejemplo 3

Producción de biomasa en matraz de vibración

Para la producción de biomasa se emplearon matraces Erlenmeyer con deflectores (Schott, Mainz, D) con 250, 500, 1.000 o 5.000 ml de volumen de carga.

En este caso se cargó con un 20% de volumen de carga máximo de matraz del medio empleado en cada caso sin glucosa y, en el caso de medio 1, también sin tampón fosfato, se esterilizó a 121ºC y una atmósfera de presión durante 21 minutos, y después se cargó bajo un banco de trabajo estéril Variolab (Waldner, Wangen, D) con los demás componentes de medio esterilizados por separado. Los matraces se incubaron a 120 r.p.m. durante 48 horas tras el inoculado a 30ºC en una máquina vibratoria de rotación (New Brunswick Scientific, Edison, USA).

Para los numerosos ensayos para el optimizado del medio, los ensayos de actividad y la determinación de biomasa húmeda, las células se cosecharon una vez finalizado el cultivo a través de centrifugado durante 20 minutos a 5.000 r.p.m., y 4ºC en un rotor JA-10 con una ultracentrífuga (Beckmann J2-21 M/E).

Para el empleo de cultivo como cultivo de inoculado (Inóculo), las suspensiones celulares se añadieron en medio estéril a los respectivos medios en los biorreactores.

Ejemplo 4

Producción de biomasa en biorreactor de 100 litros

Para la producción de una mayor cantidad de masa celular homogénea se llevó a cabo un cultivo a escala de 60 litros. A tal efecto se empleó un biorreactor de acero (tipo 9230 FLAW IL, Bioengineering, Wald, CH).

Para la preparación del cultivo se calibraron la unidad de medida de pO_2 y de pH. Se determinó la tara de pesada sobre la que se encontraba el biorreactor. Después se esterilizó el biorreactor total junto con 57 litros de tampón fosfato dispuesto (véase ejemplo 2, medio 1) durante 21 minutos a 121ºC y 2 bar. Para la regulación de pH se obtuvieron respectivamente 3 litros de disoluciones de NaOH al 10% (w/v) y de ácido fosfórico al 10% (w/v), y esterilizaron en los recipientes de reserva. Tras el enfriamiento se añadieron los 500 ml de disolución de glucosa concentrada, 2,5 litros de disolución concentrada de sales y extracto de levadura, antiespumante (Ucolub N115, Fragol Schmiermittelindustrie

GmbH, Mühlheim/Ruhr, D), y en último lugar se añadió el inóculo al reactor en medio estéril. La extracción de muestras se efectuó a través de una válvula de presión esterilizable por vapor. El contenido del biorreactor se descargó en el fondo del biorreactor a través de un grifo, y se trasladó a la separación de células.

Para el cultivo celular se ajustaron condiciones y parámetros representados en la siguiente tabla:

Condiciones de cultivo para el cultivo en biorreactor de 100 litros tipo 9230 FLAW IL

Parámetro	
velocidad de ventilación	10 N/min.
índice revoluciones	150 r.p.m.
temperatura	30ºC
$pH_{teórico}$ ΔpH	7,2 0,5

Ajuste del pH con 10% (w/v) de NaOH

(estéril en depósito de reacción con superposición de presión)

10% (v/v) de H_3PO_4

(estéril en depósito de reacción con superposición de presión).

Se llevó a cabo un cultivo en tres etapas. El cultivo previo 1 se inoculó en 5 matraces Erlenmeyer de 500 ml con deflectores (medio 1) de una placa de agar (véase ejemplo 1) con un ojal de inoculado en un volumen de 50 ml, y se incubó 48 h a 30ºC en un vibrador. Con estos cultivos previos se inocularon respectivamente 5 matraces Erlenmeyer de 500 ml estériles con un contenido de 1 litro respectivamente (medio 1). Antes de la adición del inóculo al caldo de cultivo en el biorreactor se extrajo una muestra en blanco del reactor, y después se cargaron los 5 litros de inóculo en el reactor, de modo que en total se presentaban 64,6 litros de liquido de cultivo en el reactor.

Tras la consecución de la fase estacionaria después de 27,5 horas se añadió 1 litro de extracto de levadura estéril/sulfato amónico, con una concentración de 173 g/l de extracto de levadura y 115 g/l de sulfato amónico. En este momento se habían extraído 7,9 litros del biorreactor mediante extracción de muestras. Después de 38,5 horas de tiempo de proceso se añadieron 5 litros de concentrado, constituido por: 90,3 g/l de extracto de levadura y 60,2 g/l de sulfato amónico.

Durante el tiempo de cultivo se extrajeron muestras estériles a intervalos regulares, y se determinó la densidad óptica y la concentración en biomasa seca, el valor de pH, y adicionalmente el valor de glucosa y amonio de las mismas.

Por lo demás se midió la presión de oxígeno pO_2 del medio en el biorreactor a través de una sonda de medida. El análisis de gas de escape proporcionó continuamente los valores de medida para el contenido en volumen porcentual en oxígeno YO_2 y dióxido de carbono YCO_2 en el aire de escape del fermentador. Estos se leyeron y registraron cronológicamente en cada extracción de muestra.

Después de 54 horas se concluyó el cultivo tras la consecución de la fase de crecimiento estacionaria de las células. El contenido del biorreactor se descargó, y se obtuvo la biomasa húmeda a partir del mismo con una centrífuga rápida Cepa (tipo GLE, firma Carl Padberg, Lahr, D).

Condiciones de centrifugado

diámetro de tambor:	44 mm;
índice de revoluciones:	33.750 r.p.m.
velocidad de flujo:	250 ml/min.

La biomasa húmeda obtenida de este modo se dividió en porciones de 100 g respectivamente, y se almacenó a 4ºC para empleo inmediato, o bien se congeló a -20ºC.

Ejemplo 5

Determinación de actividad con células libres en reposo

La biomasa obtenida a partir del cultivo (ejemplo 4) se empleó para la medida de actividades de nitrilhidratasa y amidasa. Para este ensayo de actividad se emplearon concentraciones de biomasa seca de 0,2 a 0,7 g/l.

Ejemplo 5a)

Actividad de nitrilhidratasa

El ensayo de actividad estándar con células libres en reposo se llevó a cabo como sigue:

En un reactor de vidrio de 50 ml (EHS, Bovenden, D) se añadió a 25 ml de tampón de reacción una punta de espátula de masa celular, y esta se suspendió mediante agitación con un núcleo agitador sobre un agitador magnético. El reactor se temperó a través de una camisa calentable, ajustándose la temperatura constantemente a 26ºC con un baño de agua. La reacción se inició mediante adición de 169 μl de propionitrilo puro. Por consiguiente, la concentración inicial de propionitrilo en el ensayo de actividad ascendía a 100 mM. Tras momentos definidos de 0, 1, 3, 5, 15, 30 y 60 minutos se extrajo respectivamente una muestra de 1 ml con una jeringa a través de un filtro de 0,2 μm (Gelman Science, Michigan, USA), diámetro 25 mm, y se detuvo la reacción a través de la separación de células efectuada en este caso. Las concentraciones de substrato y producto se determinaron por medio de HPLC. De la suspensión celular remanente residual en el reactor se determinó la biomasa seca una vez concluido el ensayo.

Para la determinación aislada de la actividad de nitrilhidratasa se extrajeron muestras después de 0, 1, 3, 5 y 10 minutos.

Ejemplo 5b)

Actividad de amidasa

Se llevaron a cabo experimentos para la determinación aislada de la actividad de amidasa del mismo modo que se describe en el ejemplo 5a), pero con la variación de emplear como substrato 312 μl de una disolución madre 8 M de propionamida en agua completamente desalinizada. Se empleó correspondientemente menos volumen de suspensión celular para obtener un volumen total de 25 ml en el reactor tras la adición de substrato. La extracción de muestras se efectuó después de 0, 1, 15, 30, 45 y 60 minutos.

Determinaciones de actividad con células inmovilizadas

Para la determinación de actividades de células inmovilizadas se midieron mediante volumetría 2 ml de inmovilizado goteado en una probeta de 25 ml cargada con 5 ml de tampón de reacción 3, y se completó a 25 ml con tampón de reacción 3. La reacción se efectuó como en el ensayo estándar con células libres, pero la extracción de muestras se efectuó mediante pipeteado de 1 ml de suspensión, incluyendo las perlas de inmovilizado, y subsiguiente filtración. De este modo se impidió una concentración de inmovilizado en la disolución de reacción.

Sistemas tampón para conversiones de células en reposo

Sistema	
tampón de reacción 1	
Na_2HPO_4	50 mM
NaH_2PO_4	50 mM
pH	7,2
tampón de reacción 2	
TRIS/HCl	50 mM
pH	7,2
tampón de reacción 3 tampón de reacción 2 con 0,5 g/l de $CaCl_2$	
el tampón del reacción 1 se obtuvo mediante mezclado de ambas disoluciones madre de 50 mM hasta la consecución del valor de pH deseado. El tampón de reacción 2 y 3 se ajustó al valor de pH deseado mediante titración con NaOH.	

Valoración del ensayo de actividad estándar

Las actividades de las células se refirieron siempre a la biomasa seca empleada en el reactor. A tal efecto, en el caso de células inmovilizadas se estimó la biomasa seca a través de la biomasa húmeda empleada para la obtención del inmovilizado, y el volumen empleado de inmovilizado. El factor de conversión (UF) de biomasa húmeda respecto a biomasa seca se determinó en UF = 4,5. Para determinar las actividades de los enzimas, partir de los puntos de medida, mediante aplicación de tangentes y cálculo de la respectiva pendiente a través de una regresión lineal, se determinaron las velocidades de reacción iniciales de la respectiva formación de producto. Esto se efectúa como se representa en la figura 1.

La actividad se indicó como actividad específica, referida a la concentración de biomasa seca empleada en la carga en U/g BTM. El cálculo se efectuó mediante medida de formación de producto en el momento del comienzo de reacción. La actividad específica se calcula entonces correspondientemente a la ecuación

$$r = \frac{\text{Concentración [mM]}}{\text{Tiempo [min]}} \times 1000 \times \frac{1}{\text{BTM [g/l]}} = \left[\frac{U}{gBTM}\right]$$

r = velocidad de reacción inicial específica [U/g BTM]

concentración/tiempo = pendiente de las tangentes en los puntos de medida [mM/min]

BTM = concentración de biomasa seca en la carga [g/l].

Ejemplo 6

Determinación del óptimo de temperatura de reacciones enzimáticas

La temperatura óptima para las reacciones de nitrilhidratasa y de amidasa en el sistema de células completas se determinó como sigue. Las condiciones para la reacción eran las del ensayo de actividad estándar (véase ejemplo 5) a pH 7,2. La concentración de substrato empleada para la reacción se situaba en 100 mM de propionitrilo para la reacción de nitrilhidratasa, o bien 100 mM de propionamida para la reacción de amidasa bajo empleo de un reactor de vidrio de 50 ml con 25 ml de volumen medio. Antes del comienzo del ensayo, las células se incubaron previamente a la respectiva temperatura durante 5 minutos, y después se inició la reacción. Las velocidades de reacción iniciales de las respectivas reacciones enzimáticas se determinaron en el ensayo de actividad estándar a la temperatura investigada. Las velocidades de reacción específicas obtenidas se aplicaron frente a la temperatura (véase la figura 2).

Ejemplo 7

Determinación del óptimo de pH de reacciones enzimáticas

El óptimo de pH para la actividad específica de nitrilhidratasa, como también de amidasa, se determinó como sigue.

Las condiciones para la reacción eran las del ensayo de actividad estándar (véase ejemplo 5) a 26ºC. La concentración de substrato empleada para la reacción se situaba en 100 mM de propionitrilo para la reacción de nitrilhidratasa, o bien 100 mM de propionamida para la reacción de amidasa bajo empleo de un reactor de vidrio de 50 ml con 25 ml de volumen medio. Las células se incubaron previamente durante 5 minutos al respectivo valor de pH antes del comienzo del ensayo, y después se inició la reacción (véase la figura 3).

La actividad específica de nitrilhidratasa mostraba un óptimo pronunciado a pH 9,5, pero era aún activa a pH 10,5. A pH 6 era inactiva.

La actividad específica de amidasa mostraba un óptimo más bien ancho entre pH 7,2 y pH 8,5. La amidasa, al contrario que la nitrilhidratasa, era aún activa a pH 6.

Ejemplo 8

Inmovilizado de Rhodococcus erythropolis DSM 13002

Ejemplo 8a)

Inmovilizado de las células en alginato

Obtención de disoluciones para el inmovilizado de alginato

Componente	Composición
disolución de alginato	3 % (w/v) en H_2O
suspensión celular	30 % (w/v) en tampón de reacción 2
disolución de reticulante	tampón de reacción 2 con 1,0 g/l de $CaCl_2$
tampón de reacción	tampón de reacción 2 con 0,5 g/l de $CaCl_2$

La disolución de alginato se mezcló con la suspensión celular en proporción 1:1 y se almacenó sobre hielo. Después se bombeó la suspensión a través de una bomba de tubo flexible en un aparato para el goteo por pulverizado.

Las perlas de alginato producidas, con un diámetro de aproximadamente 0,9 mm, se endurecieron 30 minutos en la disolución de reticulante, se lavaron con tampón de reacción 3, y se almacenaron hasta empleo subsiguiente a 4ºC.

Tras el endurecimiento, el inmovilizado estaba constituido por partículas casi esféricas, que mostraban una muy buena estabilidad frente a las fuerzas de abrasión y cizallamiento presentes debido a la agitación con un núcleo magnético en el ensayo de actividad estándar. Tras el inmovilizado se tamizaron las partículas, determinándose tamaños de grano entre 0,8 y 1 mm en un 90% de las partículas obtenidas. Otro 5% se situaba entre 1 y 1,4 mm de tamaño, todo el resto era mayor o menor que el diámetro indicado.

Ejemplo 8b)

Inmovilizado de células en acrilamida

Obtención de disoluciones para el inmovilizado de acrilamida

Nº	Componente	Composición
1	disolución madre de acrilamida 1	Rotiphorese Gel30 (Roth GmbH+Co., Karlsruhe, D), 30 % de acrilamida, 0,8 % de bisacrilamida
2	disolución madre de acrilamida 2	Rotiphorese Gel19 (Roth GmbH+Co., Karlsruhe, D), 19 % de acrilamida, 1 % de bisacrilamida
3	disolución madre de acrilamida 3	0,0277 g de bisacrilamida disuelta en 3,52 ml de H_2O bidestilada
4	TEMED	disolución de N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina (Bio-RAD Lab. München, D)
5	disolución de APS	disolución de persulfato amónico al 10 % (w/v) en H_2O bidestilada (siempre recién elaborada)
6	suspensión celular	3 g de biomasa húmeda suspendida con 2 ml de tampón de reacción 2

Carga 1

Nº	Componente	Volumen
2	disolución madre de acrilamida 2	5 ml
4	TEMED	75 µl
5	disolución de APS	150 µl
6	suspensión celular	5 ml

Las disoluciones número 2, 4, 5 se mezclaron en una cápsula Petri, y se polimerizaron previamente 2 minutos a temperatura ambiente. Después se añadió la suspensión celular (6), y se mezcló con una espátula, evitándose cuidadosamente una formación de burbujas. Para la polimerización se almacenó la cápsula Petri en una placa metálica enfriada previamente durante unos 15 minutos. Tras endurecimiento del gel se lavó este con tampón de reacción 2, y se almacenó a 4ºC en el frigorífico hasta empleo subsiguiente.

Carga 2

Nº	Componente	Volumen
1	disolución madre de acrilamida 2	5 ml
5	disolución de APS	5 ml
4	TEMED	100 µl
6	suspensión celular	250 µl

Las disoluciones número 1 y 5 se incubaron igualmente en una cubeta Petri de vidrio, y se incubaron 2 minutos a temperatura ambiente. Después se añadieron las disoluciones número 6 y 4, y se mezclaron con una espátula, evitándose cuidadosamente una formación de burbujas. Para la polimerización se procedió como en la carga 1. Tras endurecimiento del gel se lavó este con tampón de reacción 2, y se almacenó a 4ºC en el frigorífico hasta empleo subsiguiente.

Carga 3

Nº	Componente	Volumen
2	disolución madre de acrilamida 2	1,48 ml
3	disolución madre de acrilamida 3	3,52 ml
4	TEMED	250,00 µl
5	disolución de APS	100,00 µl
6	suspensión celular	5,00 ml

La obtención del inmovilizado se efectuó como se describe en la carga 1.

En este caso se produjo un gel sólido, aproximadamente de 1 mm de grosor, pero que era muy sensible frente a cargas por cizallamiento, como se producen, por ejemplo, mediante agitación o flexión simple.

En las cargas 1 a 3 se varió la proporción de acrilamida respecto a bisacrilamida. En este caso, en la carga 1, la proporción de acrilamida respecto a bisacrilamida se situaba en 30:1, en la carga 2 en 19:0,8, y en la carga 3 en 9:1.

Las velocidades de reacción iniciales para la nitrilhidratasa y la amidasa en las diversas cargas para el inmovilizado de la biomasa se representan en la figura 4.

Velocidades de reacción iniciales de nitrilhidratasa y de amidasa a diferentes concentraciones de acrilamida/bisacrilamida en las cargas para el inmovilizado de acrilamida de células en reposo. El inmovilizado se empleó en el ensayo de actividad estándar, y se determinaron las velocidades de reacción iniciales.

Se pudo verificar una mejora del rendimiento respecto a la actividad de nitrilhidratasa mediante la reducción de la fracción de acrilamida en la disolución de polímero.

Ejemplo 9

Inducción de nitrilhidratasa y reacción de amidasa para Erythropolis rhodococcus 13002

A tal efecto se elaboró un medio 1 sin β-caprolactama y cloruro de cobalto, y se añadieron los respectivos componentes a las demás cargas. La biomasa se investigó respecto a su actividad específica tras la recogida en el ensayo de actividad estándar. Los valores obtenidos se representan en la siguiente tabla.

Influencia de diversos inductores sobre la actividad específica de la biomasa

Inductor	Actividad de nitrilhidratasa [U/g BTM]	Actividad de amidasa [U/g BTM]
sin	37854	255
0,50 g/l de β-caprolactama	32159	136
fenilpropionitrilo 1,00 mM	26515	172
1,00 g/l de acetamida	1292	0
1,00 g/l de propionamida	5712	124
1,00 g/l de urea	3070	0
0,01 g/l de cloruro de cobalto	37342	133
0,10 g/l de cloruro de cobalto	10815	170

El sistema enzimático se presenta en el medio empleado con actividad elevada. La adición de β-caprolactama reduce la actividad específica de amidasa en comparación con el medio sin inductores. También mediante fenilpropionitrilo se inhibieron ambos enzimas en su actividad. Propionamida, acetamida y urea inhiben la actividad de nitrilhidratasa frente a la carga sin inductores hasta en un 90%, la de amidasa hasta un 50%. La adición de cloruro de cobalto en el medio propuesto condujo a una reducción de la actividad específica de amidasa a bajas concentraciones, también a una pérdida de actividad específica de nitrilhidratasa a concentraciones más elevadas.

Ejemplo 10

Aislamiento del complejo de nitrilhidratasa-amidasa

Para la disgregación celular se cultivó *Rhodococcus erythropolis* en medio 2 (véase ejemplo 2) durante la noche (20 h, 28ºC, 130 r.p.m.), y a continuación se cosechó (5000 x g, 15 min., 4ºC). El comprimido celular se absorbió en tampón EDTA-sucrosa, y la pared celular se degradó con 1 mg/ml de lisozima (incubación 1 h, 4ºC).

Tampón EDTA-sucrosa:

5 ml	0,25 M EDTA pH 8
1 ml	10 mM tris/Cl pH 8
20 ml	1 mM EDTA, 10 mM tris/Cl pH 8,34% de sucrosa
30 mg	lisozima.

Tras centrifugado y lavado de las células (5000 x g, 15 min, 4ºC) se absorbe el aglomerado en 20 g/l de tampón KH_2PO_4 (pH 7, + 10 mM ditiotreitol), y se disgrega con la prensa francesa (1250 kg/cm^2) tres veces bajo refrigeración. La fracción de membrana se separó mediante centrifugado (20.000 x g, 30 min, 4ºC). El exceso obtenido de este modo contiene el complejo de nitrilhidratasa-amidasa. Este contiene un 10% de actividad residual, referido a la biomasa húmeda empleada. Alternativamente, las células se pueden emplear de manera directa sin tratamiento con lisozima tras cultivo en un molino de vidrio (Braun Melsungen) bajo refrigeración de N2 (3 x 2 nm, 30 sec, + 10 sec. Kühlung). No obstante, la actividad residual obtenida de este modo es claramente más reducida por regla general.

Ejemplo 11

Degradación de nitrilos a través de Rhodococcus erythropolis DSM 13002, DSM 13475 y DSM 13476

Para la investigación de la degradación de nitrilos a través de los microorganismos según la invención se cultivaron las cepas en el medio 1 (véase ejemplo 2) durante la noche (28ºC, 150 r.p.m., 20 h) bajo adición de 5 g/l de acetonitrilo. El medio de cultivo se separó por centrifugado, los microorganismos se resuspendieron en el tampón de reacción 1 (50 mM Na_2HPO_4, 50 mM NaH_2PO_4, pH 7,2), y las reacciones se iniciaron mediante adición de los correspondientes nitrilos. La temperatura de reacción se situaba en 22ºC. Después de 1, o bien 15 horas, se detuvo la reacción, y se determinó la velocidad de conversión [(producto formado/substrato empleado) x 100] a través de la determinación de substratos, o bien a través de la determinación de productos. La siguiente tabla muestra los resultados para los 3 microorganismos.

Velocidad de conversión en [%]

Nitrilo	DSM 13002	DSM 13475	DSM 13476
acetonitrilo			
(1 h)	56	100	46
(15 h)	77	100	96
nitrilo de ácido adípico			
(1 h)	100	77	40
(15 h)	100	95	100
benzonitrilo			
(1 h)	5	5	5
(15 h)	65	46	35
acrilonitrilo			
(1 h)	35	n.d.	45
(15 h)	42		71
tricianohexano			
(1 h)	47	18	66
(15 h)	78	30	100
n.d. no determinado			

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la reacción enzimática de compuestos con al menos una función nitrilo y/o al menos una función amida con al menos un microorganismo y/o al menos un complejo de nitrilhidratasa-amidasa aislado a partir de este microorganismo, **caracterizado** porque el microorganismo es seleccionado a partir del grupo que está formado por *Rhodococcus erythropolis* DSM 13002, *Rhodococcus erythropolis* DSM 13475, y *Rhodococcus erythropolis* DSM 13476.

2. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque el microorganismo se presenta en forma de células completas.

3. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque el microorganismo y/o el complejo de nitrilhidratasa-amidasa se presenta en forma inmovilizada.

4. Procedimiento según la reivindicación 3, **caracterizado** porque el microorganismo y/o el complejo de nitrilhidratasa-amidasa se presenta inmovilizado en forma de polímeros de alginato.

5. Procedimiento según las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado** porque como compuesto con al menos una función nitrilo se emplean compuestos que son seleccionados a partir del grupo que está formado por nitrilos alifáticos saturados, nitrilos alifáticos con insaturación etilénica, nitrilos aromáticos y nitrilos heterocíclicos.

6. Procedimiento según la reivindicación 5, **caracterizado** porque se emplea propionitrilo, acetonitrilo y/o acrilonitrilo.

7. Procedimiento según las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado** porque como compuesto con al menos una función amida se emplean compuestos que son seleccionados a partir del grupo que está formado por amidas alifáticas saturadas, amidas alifáticas con insaturación etilénica, amidas aromáticas y amidas heterocíclicas.

8. Procedimiento según la reivindicación 7, **caracterizado** porque se emplea propionamida, acetoamida y/o acrilamida.

9. Procedimiento según las reivindicaciones 1 a 8, **caracterizado** porque se lleva a cabo el procedimiento como control de proceso discontinuo con adición de substrato continua.

10. *Rhodococcus erythropolis* DSM 13002.

11. *Rhodococcus erythropolis* DSM 13475.

12. *Rhodococcus erythropolis* DSM 13476.

13. Complejo de nitrilhidratasa-amidasa procedente de un microorganismo que es seleccionado a partir del grupo que está formado por *Rhodococcus erythropolis* DSM 13002, *Rhodococcus erythropolis* DSM 13475 y *Rhodococcus erythropolis* DSM 13476.

Fig. 1: Determinación de actividad
(Rhodococcus erythropolis DSM 13002)

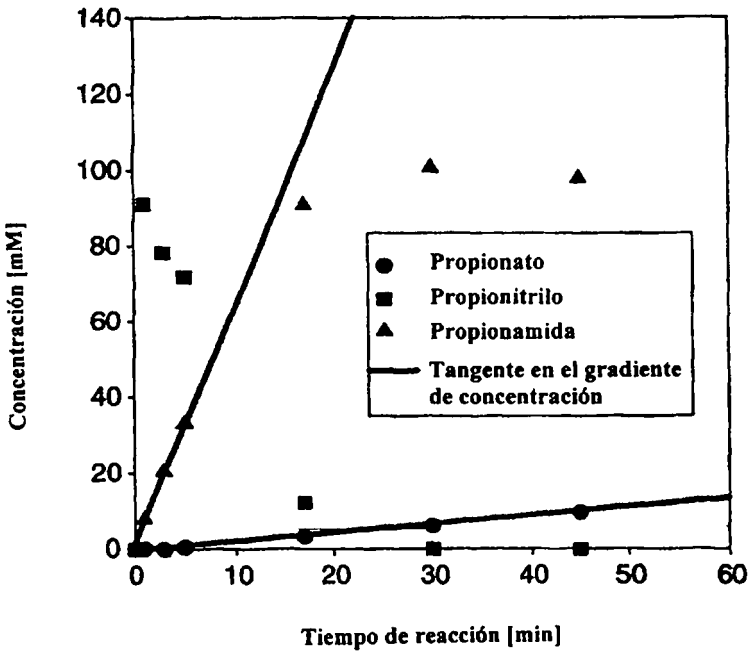


Fig. 2: Optimo de temperatura de la reacción enzimática (Rhodococcus erythropolis DSM 13002)

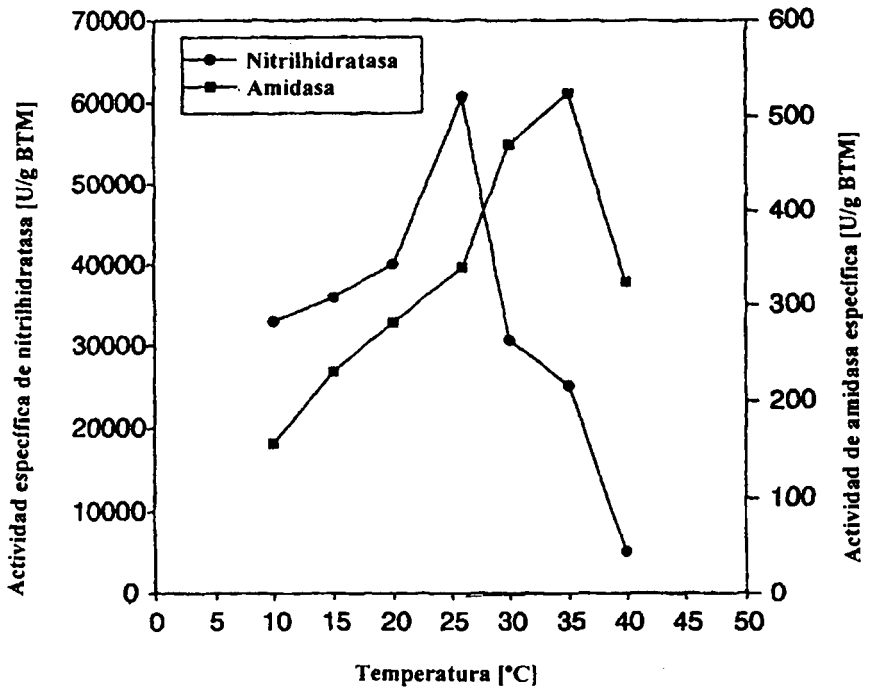


Fig. 3: Optimo de pH de la reacción enzimática
(Rhodococcus erythropolis DSM 13002)

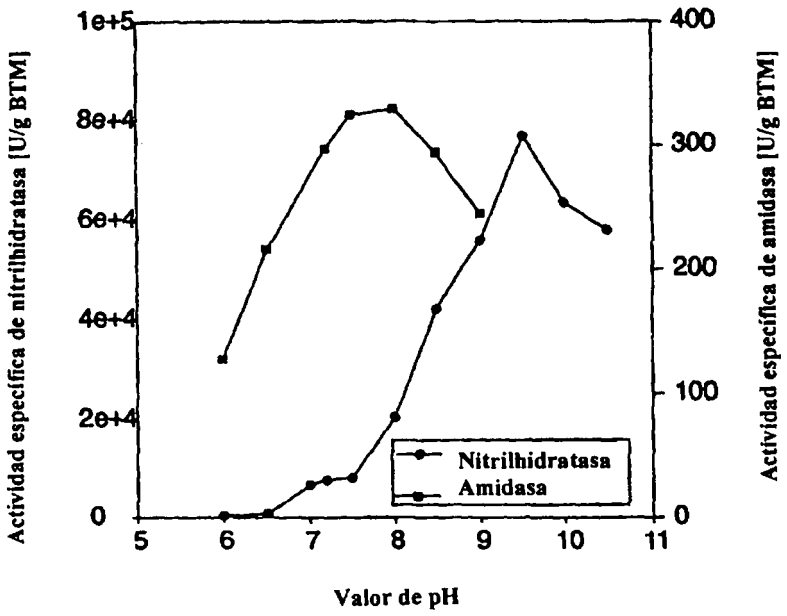


Fig. 4: Velocidad de reacción inicial de nitrilhidratasa y de amidasa con diversas cargas para el inmovilizado

(Rhodococcus erythropolis DSM 13002)

