



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 319 875**

51 Int. Cl.:

C12N 1/20 (2006.01)

C12N 9/78 (2006.01)

C12P 13/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02709997 .7**

96 Fecha de presentación : **08.01.2002**

97 Número de publicación de la solicitud: **1352050**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **15.10.2003**

54 Título: **Procedimiento microbiológico para la producción de amidas.**

30 Prioridad: **09.01.2001 EP 01100493**
27.12.2001 US 342373 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
14.05.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
14.05.2009

73 Titular/es: **Lonza AG.**
Münchensteinerstrasse 38
4052 Basel, CH

72 Inventor/es: **Robins, Karen, Tracey y**
Nagasawa, Toru

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).

DESCRIPCIÓN

Procedimiento microbiológico para la producción de amidas.

5 La invención de refiere a microorganismos que son capaces de tolerar concentraciones de acetonitrilo de cuando menos 3 M, una enzima con actividad de nitrilhidratasa, un procedimiento para la preparación de amidas con el uso de estos microorganismos o las enzimas, así como el uso de estos microorganismos para la eliminación de residuos de acetonitrilo.

10 Para la preparación de amidas, como por ejemplo la amida de ácido nicotínico, una vitamina del complejo de vitamina B que es esencial para los animales y el hombre, ya se conocen muchos procedimientos biotecnológicos.

De manera ejemplar la EP-A 0 307 926 describe la reacción de 3-cianopiridina a amida del ácido nicotínico por medio de *Rhodococcus rhodochrous* J1. Este procedimiento tiene la desventaja, de que el *Rhodococcus rhodochrous* J1 tiñe de rojo y por lo tanto se requiere una decoloración del producto. Además, este microorganismo muestra un valor de K_M alto con relación al sustrato de 3-cianopiridina, tiene una tolerancia mínima a la temperatura y una tolerancia mínima con relación a la 3-cianopiridina.

La WO 99/05306 describe de manera ejemplar un procedimiento para la preparación de amida de ácido nicotínico partiendo del correspondiente nitrilo por medio de microorganismos del género *Rhodococcus*, *Amycolatopsis* y *Actinomyces*. La desventaja de éste procedimiento es que los microorganismos utilizados del género *Amycolatopsis* se inactivan a alta temperatura. Además estos microorganismos consisten de una mínima tolerancia en contra de la 3-cianopiridina y la amida del ácido nicotínico. Los microorganismos descritos del género *Rhodococcus* tienen un valor K_M alto con relación a la 3-cianopiridina y una mínima estabilidad a la temperatura. Por lo tanto este procedimiento no es rentable para un procedimiento con una gran técnica.

El objetivo de la presente invención es proporcionar microorganismos que sean estables, que muestren un valor de K_m importante para por ejemplo, el sustrato de 3-cianopiridina, para que se puedan emplear en un procedimiento rentable para la preparación de amidas, del cual las correspondientes amidas se puedan preparar con un muy buen rendimiento y se puedan aislar en una buena pureza.

Este objetivo se logra con los microorganismos de acuerdo a la reivindicación 1, con la enzima de acuerdo a las reivindicaciones 6 o 7 y con el procedimiento de acuerdo a la reivindicación 8.

35 Los microorganismos de acuerdo a la invención se obtienen a través de una selección adecuada por ejemplo de muestras de suelo, fango o aguas negras, de manera usual con técnicas conocidas microbiológicas. En general se seleccionan los microorganismos a través del cultivo con una piridinaldoxima de la fórmula general



45 o con nitrilos como fuente de C en presencia de iones de cobalto y de manera ejemplar extracto de levadura y/o sales de amonio. A partir de los cultivos obtenidos se seleccionan entonces cada uno de los microorganismos, los cuales son capaces de tolerar una concentración de acetonitrilo de cuando menos 3 M y que están en la posición de convertir nitrilo, especialmente 3-cianopiridina y acetinitrilo en la correspondiente amida.

50 Como piridinaldoxima se pueden emplear piridin-2-, piridin-3- o piridin-4-aldoxima.

Para la selección los nitrilos adecuados son también los que se pueden usar después de la biotransformación como sustrato, por ejemplo, acetonitrilo, (nitrilo del ácido acético), propionitrilo, butironitrilo, nitrilo del ácido crotónico, nitrilo del ácido adípico y nitrilo del ácido malónico.

55 Como fuente para los iones de cobalto se prefieren los llamados “compuestos de cobalto que generan iones de cobalto”, por ejemplo sales de Co^{2+} - ó Co^{3+} - como cloruro de cobalto, sulfato de cobalto y acetato de cobalto. Preferentemente se emplean como compuestos de cobalto una sal de Co^{2+} como por ejemplo, CoCl_2 . El cultivo se puede realizar entonces también conjuntamente con el cobalto metálico o con otros compuestos de cobalto. De manera habitual se emplean cobalto o compuestos de cobalto en una cantidad de 1 a 30 mg/L, preferentemente de 1 a 20 mg/L en un medio de cultivo.

60 Como sales de amonio se pueden emplear de manera ejemplar el fosfato de amonio como $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ o $(\text{NH}_4)\text{H}_2\text{PO}_4$.

Los microorganismos se cultivan antes de la biotransformación propia en medio adecuados. Los medios de cultivo adecuados son, por ejemplo, los medios que se describen en las Tablas 3 o 5.

ES 2 319 875 T3

El cultivo se realiza de manera habitual a una temperatura de 20 a 40°C y a un valor de pH de entre 5 y 8, preferentemente a una temperatura de 25 a 35°C y a un valor de pH entre 6 y 7.5.

Durante el cultivo se inducen las enzimas convenientes, la nitrilhidratasa a través de la adición de un inductor de enzimas.

Como inductores de enzimas se pueden emplear nitrilos alifáticos saturados o insaturados o las correspondientes amidas. Como nitrilos alifáticos se pueden emplear todos los alcano-C₂₋₇-nitrilos, especialmente butironitrilo, isobutironitrilo, nitrilo del ácido valerianico o nitrilo del ácido isovalerianico, o alcano-C₃₋₇-nitrilos, como especialmente metacrilonitrilo o nitrilo del ácido crotonico. Como amidas alifáticas se pueden emplear todas las alcano-C₂₋₇-amidas especialmente como butiramida, isobutiramida, amida del ácido valerianico o amida del ácido propionico, o alcano-C₃₋₇-amidas, por ejemplo como metacrilamida o amida del ácido crotonico. Los inductores de enzimas preferidos son metacrilamida, butiramida, isobutiramida, amida del ácido valerianico, metacrilonitrilo, amida del ácido crotonico, butironitrilo e isobutironitrilo. Especialmente preferido se usa metacrilonitrilo como inductor de enzimas.

Los microorganismos de acuerdo a la invención toleran una concentración de acetonitrilo desde cuando menos 3 M. De ello se entiende que la actividad enzimática luego de una hora de incubación con acetonitrilo 3 M en amortiguador de fosfato de potasio 0.1 M a pH 7.0 y 20°C es estable, es decir, que la pérdida de actividad máxima asciende a 10%. Los microorganismos preferidos toleran una concentración de acetonitrilo de cuando menos 6 M durante 1 hora por arriba o por debajo de las condiciones mencionadas con una pérdida de actividad máxima de 50%. Los microorganismos especialmente preferidos toleran una concentración de acetonitrilo de cuando menos 9 M durante 1 hora bajo las condiciones mencionadas con una pérdida de actividad máxima del 70%.

En los microorganismos más preferidos, la actividad enzimática misma es estable luego de una incubación de varios minutos con 15 M y 19 M de acetonitrilo (acetonitrilo puro correspondiente). Por lo tanto la pérdida de la actividad enzimática en la incubación con acetonitrilo 15 M se mantiene luego de 10 minutos en menos de 10%.

Los microorganismos de acuerdo a la invención, muestran una alta estabilidad térmica, es decir, una alta estabilidad a altas temperaturas como los microorganismos conocidos hasta ahora. Preferentemente la pérdida de la actividad enzimática de los microorganismos de acuerdo a la invención, luego de 1 hora de incubación en amortiguador de fosfato de potasio, pH 7.0 a 60°C asciende como máximo al 10% y la pérdida de actividad enzimática luego de 2 horas de incubación bajo las condiciones mencionadas asciende como máximo al 40%.

Bajo actividad enzimática se entiende aquí la actividad de la nitrilhidratasa, especialmente la actividad de nitrilhidratasa con relación a la 3-cianopiridina como sustrato.

Las características adicionales de los microorganismos de acuerdo a la invención son una alta tolerancia en relación a los sustratos de 3-cianopiridina especialmente utilizados y en relación a los productos de amida del ácido nicotínico producidos especialmente de los mismos y un valor bajo de K_M con relación a la 3-cianopiridina. Una característica especialmente sobresaliente es también, que puede acumular acetamida en una concentración muy alta como la concentración de una solución de acetamida saturada a 30°C (aproximadamente 220-230 g de acetamida en 100 ml de agua).

Los microorganismos de acuerdo a la invención son la cepa de *Rhodococcus* sp. FZ4 y sus variantes y mutantes equivalentes funcionales. Bajo variantes y mutantes equivalentes funcionales se entienden tales variantes y mutantes, que toleran el acetonitrilo en las concentraciones de cuando menos 3 M. Especialmente preferidas son la cepas "negativas al pigmento" de *Rhodococcus*, es decir, cepas que no pintan de rojo, los cuales, que pueden llevar a la decoloración del producto deseado. Tales cepas se pueden producir igualmente a partir de microorganismos que forman pigmentos a través de mutagénesis por medio de radiaciones UV o químicos mutágenos.

La cepa *Rhodococcus* sp. FZ4 fue depositada el 11 de julio del 2000 en la Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GMBH (DSMZ), Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig, de acuerdo al Tratado de Budapest bajo el número de depósito DSM 13597. Este microorganismo no se puede acompañar, con base en sus fecha de identificación, a ninguna de las especies *Rhodococcus* conocidas hasta ahora y se puede añadir como una nueva especie.

Las variantes y mutantes equivalentes funcionales de la cepa *Rhodococcus* sp. FZ4 se pueden formar ya sea a través de mutación espontánea o por ejemplo a través de radiación UV o químicos mutágenos. Las variantes y mutaciones preferidas de la cepa *Rhodococcus* sp. FZ4 son "negativas al pigmento", es decir no poseen ningún color rojo, que pudiera conducir a un proceso de decoloración de un producto deseado.

El extracto de enzima se puede obtener de manera ejemplar a través de la descomposición de los microorganismos, que se realiza por medio de ultrasonido, prensa francesa o por medio del método de la lisozima.

Las enzimas de acuerdo a la invención con actividad de nitrilhidratasa se consiguen a partir de los microorganismos descritos arriba, preferentemente se obtienen a partir de los microorganismos del género *Rhodococcus*, especialmente a partir del microorganismo *Rhodococcus* sp. FZ4 (DSM 13597).

ES 2 319 875 T3

Estas enzimas muestran especialmente las siguientes características:

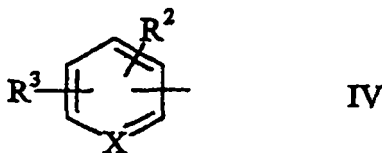
- a) un valor de K_m para el sustrato de acetonitrilo de 2.84 ± 1.00 mM para el sustrato de 3-cianopiridina de 80.5 ± 15.0 mM, cada uno en 0.05 M de amortiguador de fosfato de potasio, pH 7.0 a 20°C;
- b) un pH óptimo de pH 6.5 ± 1.0 a 20°C en 0.05 M de amortiguador de fosfato de potasio;
- c) un peso molecular nativo de $465 + 50$ kDa, determinado a través de HPLC.

La propia biotransformación se puede realizar con los microorganismos descritos arriba, con un extracto de enzima de estos microorganismos o con la enzima aislada. Preferentemente, la biotransformación se realiza con los microorganismos *Rhodococcus sp.* FZ4.

Como sustratos para la biotransformación se pueden emplear los nitrilos de la fórmula general:



En la fórmula general II el sustituyente R^1 significa un grupo alquilo- C_{1-6} , un grupo alqueno- C_{2-6} o un grupo de la fórmula general IV



En la fórmula general IV, X significa un átomo de nitrógeno o $-CH=$ y los sustituyentes R^2 y R^3 significan independientemente uno de otro un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno, un grupo alquilo C_{1-6} o un grupo alqueno C_{2-6} .

Como grupo alquilo C_{1-6} se puede emplear metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, ter-butilo, isobutilo, pentilo y sus isómeros así como hexilo y sus isómeros. Como grupos alqueno C_{2-6} se pueden emplear por ejemplo vinilo, alilo, 1-propen-1-ilo o 1-propen-2-ilo.

Como átomo de halógeno se puede emplear F, Cl, Br o I.

Representantes preferidos del nitrilo de la fórmula general II son acetonitrilo, butironitrilo, acrilonitrilo, propionitrilo, nitrilo del ácido crotónico, 2-cianopiridina, 3-cianopiridina, 4-cianopiridina, benzonitrilo, fluorobenzonitrilo, clorobenzonitrilo y bromobenzonitrilo. Los sustratos más preferidos son acetonitrilo y 3-cianopiridina.

Preferentemente se realiza la biotransformación bajo la adición única o continua. Como lo conoce el experto en la materia, la concentración del sustrato está constituida dependiendo de la solubilidad del sustrato constituido.

Preferentemente el procedimiento se realiza con células latentes (no crecidas).

Como medios para la biotransformación se pueden emplear los usuales en el campo científico, de manera ejemplar amortiguador de fosfato, amortiguador HEPES, amortiguador de citrato y amortiguador de borato con concentración molar baja. Bajo el término amortiguadores de fosfato con concentración molar baja, se entienden preferentemente un amortiguador de fosfato de 0.01 hasta 0.5 M, especialmente preferido es un amortiguador de fosfato de 0.05 hasta 0.25 M.

Preferentemente, se realiza la biotransformación a una temperatura de 5 hasta 50°C, especialmente preferido a una temperatura de 20 hasta 40°C. El valor de pH preferido está entre 5 y 10, el valor especialmente preferido se encuentra entre 6 y 7.5.

Luego de la reacción de los nitrilos de la fórmula general II, las amidas correspondientes de la fórmula general



en donde R^1 tiene el significado ya mencionado, se pueden aislar dado el caso luego de la división de las células, a través de los métodos de renovación usuales como por ejemplo, la cristalización o el secado por pulverización.

Un objetivo adicional de la presente invención es el uso de los microorganismos descritos antes, especialmente del género *Rhodococcus*, para la remoción del acetonitrilo residual.

ES 2 319 875 T3

El acetonitrilo es un solvente, que se utiliza por ejemplo en la HPLC, y posteriormente se debe evacuar como subproducto. Con la remoción de acuerdo a la invención del acetonitrilo residual, el acetonitrilo se puede presentar en una concentración máxima hasta de 19 M, que comprende acetonitrilo puro. De manera ventajosa se utiliza una solución o suspensión de acetonitrilo de 0.25 hasta 15.0 M, preferentemente de 1 hasta 10 M.

De manera ventajosa se emplean o utilizan los microorganismos para la remoción del acetonitrilo residual a una temperatura de 5 a 50°C, preferentemente a una temperatura de 20 hasta 40°C. El valor del pH preferentemente se encuentra entre 5 y 10, preferentemente entre 6 y 8.

La duración de la reacción del acetonitrilo a acetamida para la remoción de los subproductos está en dependencia de la concentración del acetonitrilo. De manera ejemplar, en la preparación de solución/suspensión de acetamida de 9.5 M, consiste de aproximadamente 2 horas, a un pH de 7.0 a una temperatura de aproximadamente 20°C.

Identificación de la cepa FZ4 (DSM 13597)

A) “marcadores” quimiotaixonómicos

1) aminoácido de diagnóstico de los peptidoglicanos: ácido meso-diaminopimélico.

2) Ácido micólico: los ácidos micólicos están presentes con una longitud de cadena desde C₄₀ hasta C₄₅.

3) Muestra de ácidos grasos: se proveen ácidos grasos saturados e insaturados, lineales, así como una porción elevada del ácido tuberculoestearínico. De la muestra del ácido graso se identificaría la cepa FZ4 como perteneciendo al género *Rhodococcus*.

B) “marcadores” convencionales

El aspecto macroscópico y la morfología de las células de la cepa FZ4 fueron muy semejantes a *Rhodococcus rhodochrous*. Las colonias de la cepa FZ4 son rojo salmón (RAL 3022) y los cultivos jóvenes se desarrollan ramificándose, los cuales se desarrollan en forma de varillas y capullos.

Con base en los “marcadores” quimiotaixonómicos y convencionales se identificaron la cepa FZ4 como perteneciendo a la especie *Rhodococcus rhodochrous*, por lo tanto con un factor de correlación inferior.

C) Análisis de las primeras 500 bases del ADNr 16s

La secuencia de las primeras 500 bases del ADNr 16s muestra una similitud de sólo 97.7% a la cepa representante típica para las especies *Rhodococcus rhodochrous*, *Rhodococcus rhodochrous* DSM 43241, y del 99.1% a otra cepa de referencia *Rhodococcus rhodochrous*. Entonces la similitud de la secuencia de las primeras 500 bases del ADN 16r de la cepa FZ4 y aquella de la cepa *Rhodococcus rhodochrous* DSM 43241 yace en 99.5%, y se puede identificar a la cepa FZ4 como no perteneciendo a la especie *Rhodococcus rhodochrous*.

La cepa FZ4 se identificaría entonces como una nueva especie dentro del género *Rhodococcus*.

La figura 1 representa la biotransformación del acetonitrilo a acetamida con células en reposo de *Rhodococcus sp.* FZ4.

La figura 2 representa la temperatura óptima de la actividad de nitrilhidratasa de *Rhodococcus sp.* FZ4 en células inmovilizadas.

La figura 3 representa la estabilidad térmica de la actividad de nitrilhidratasa del *Rhodococcus sp.* FZ4 en células inmovilizadas.

La figura 4 representa el pH óptimo de la actividad de nitrilhidratasa del *Rhodococcus sp.* FZ4 en células inmovilizadas.

La figura 5 representa la estabilidad del pH de la actividad de la nitrilhidratasa del *Rhodococcus sp.* FZ4 en células inmovilizadas.

La figura 6 representa la tolerancia a la 3-cianopiridina de la actividad del *Rhodococcus sp.* FZ4 en células inmovilizadas.

La figura 7 representa la tolerancia a la amida del ácido nicotínico de la actividad de la nitrilhidratasa del *Rhodococcus sp.* Fz4 en las células inmovilizadas.

ES 2 319 875 T3

La figura 8 representa la influencia de la concentración de acetonitrilo en la actividad de nitrilhidratasa del *Rhodococcus sp.* FZ4 en células inmovilizadas en la biotransformación del acetonitrilo a la acetamida.

La figura 9 representa la influencia de la concentración de acetonitrilo en la actividad de la nitrilhidratasa del *Rhodococcus sp.* FZ4 en células inmovilizadas.

La figura 10 representa la actividad de nitrilhidratasa del *Rhodococcus sp.* Fz4 en células inmovilizadas en dependencia a la concentración de la 3-cianopiridina.

La figura 11 se representa al relación logarítmica del peso molecular de la nitrilhidratasa y la proteína de referencia contra cada uno de los tiempos de retención del HPLC.

La figura 12 representa la relación logarítmica del peso molecular de las subunidades de la nitrilhidratasa y la proteína de referencia contra cada uno de los valores RF de SDS Page.

La figura 13 representa la actividad de la nitrilhidratasa purificada a partir del *Rhodococcus sp.* FZ4 en dependencia a la concentración de la 3-cianopiridina.

La figura 14 representa la actividad de la nitrilhidratasa purificada a partir de *Rhodococcus sp.* FZ4 en dependencia con la concentración de acetonitrilo.

La figura 15 representa la estabilidad térmica de la nitrilhidratasa purificada a partir de *Rhodococcus sp.* Fz4.

La figura 16 representa el pH óptimo de la nitrilhidratasa purificada a partir de *Rhodococcus sp.* Fz4.

La figura 17 representa el pH de estabilidad de la nitrilhidratasa a partir de *Rhodococcus sp.* FZ4.

Ejemplo 1

Determinación de la actividad de la nitrilhidratasa

Para la determinación de la actividad de la nitrilhidratasa se incubó una mezcla de reacción que consiste de 3-cianopiridina (1.0 M; 1.0 mL), amortiguador de fosfato de potasio (0.1 M, pH 7.0, 0.5 mL) y suspensión celular (0.5 mL) bajo agitación a 20°C durante 5 minutos. La reacción se detiene a través de la adición de HCl (5 M; 0.1 mL). Luego de la filtración (filtro de 0.2 μ m) de la mezcla de reacción se determinó la cantidad de las amidas de ácido nicotínico formadas por medio de HPLC (Waters Spherisorb 5 μ ODS2 (4.6 x 150 mm); KH₂PO₄/H₃PO₄ (10 mM; pH 2.8)/acetonitrilo = 9:1 (v/v); 1 mL/min; 230 nm). La actividad total se representa como μ mol de amida del ácido nicotínico formado/(min x mL) y la actividad específica se representa como μ mol de amida del ácido nicotínico formada/(min x OD_{610 nm}).

Ejemplo 2

Aislamiento de la cepa *Rhodococcus sp.* FZ4 (DSM 13597)

En Arch. Microbiol. 1998, 170, 85-90 se describe que la cepa *Rhodococcus sp.* YH3-3 (TPU 3453) metaboliza la 3-piridinaldoxima a través de 3-cianopiridina y amida del ácido nicotínico a ácido nicotínico. En este caso se induce la actividad de la aldoximdeshidratasa así como la actividad de la nitrilhidratasa y amidas de la cepa *Rhodococcus sp.* YH3-3 (TPU 3453) tanto de diferentes aldoximas como de nitrilos.

Diferentes muestras de suelo se inocularon en el medio de enriquecimiento de acuerdo a la Tabla 1 y se incubaron de 7 a 10 días a 37°C. Los cultivos así obtenidos se inoculan en el mismo medio y nuevamente se cultivaron de 7 a 10 días a 37°C. Este procedimiento se repite tres veces. Correspondientemente el cultivo se diluye y se coloca en placas. Luego de 5 días de incubación de las placas a 37°C se obtienen las colonias individuales. Las colonias individuales se prueban a las ya existentes respecto a una actividad de nitrilhidratasa de acuerdo al Ejemplo 1. De esta manera se aísla la cepa de *Rhodococcus sp.* FZ4 (DSM 13597). En lugar de la 3-piridinaldoxima se pueden emplear también el nitrilo, acetonitrilo, propionitrilo, butironitrilo, nitrilo de ácido crotónico, nitrilo de ácido adípico y nitrilo de ácido malónico como fuente de carbono.

ES 2 319 875 T3

TABLA 1

Medio de enriquecimiento

Componentes	Concentración [g/L]
3-piridinaldoxima	3.0 ó 1.0
(NH ₄) ₂ HPO ₄	2.0
KH ₂ PO ₄	2.0
NaCl	1.0
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0.2
CoCl ₂ x 6 H ₂ O	0.01
Extracto de levadura	0.2

con agua hasta completar 1 L (pH 7.0)

Ejemplo 3

Influencia de los cofactores durante el cultivo en la actividad de la nitrilhidratasa de Rhodococcus sp. FZ4

La cepa de *Rhodococcus sp. FZ4* (DSM 13597) se inoculó en el medio de precultivo de acuerdo a la Tabla 2 y se incubó de 1 a 2 días a 28°C bajo agitación. El precultivo en el medio basal de acuerdo a la Tabla 3, el cual contiene ya sea CoCl₂ o FeSO₄, se inocula y se cultiva de 2 a 3 días a 28°C bajo agitación. La actividad de la nitrilhidratasa se determina de acuerdo al Ejemplo 1. Los resultados se muestran en la tabla 4. Una actividad de la nitrilhidratasa estuvo presente solo si se cultiva el *Rhodococcus sp. FZ4* en presencia de cobalto.

TABLA 2

Medio de precultivo

Componentes	Concentración [g/L]
Peptona	5.0
Extracto de carne	5.0
NaCl	2.0
Extracto de levadura	0.5

Con agua se completa a 1 L (pH 7.0)

ES 2 319 875 T3

TABLA 3

Medio basal

Componentes	Concentración [g/L]
Extracto de levadura	0.2
Peptona	0.2
L-glutamato, sal de sodio	15.0
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0.5
CoCl ₂ x 6 H ₂ O (ó FeSO ₄ x 7H ₂ O)	0.004
Crotonamida	5.0

con agua se completa hasta 1 L (pH 6.8)

TABLA 4

Influencia de los cofactores durante el cultivo en la actividad de la nitrilhidratasa

Cofactor	Crecimiento [OD _{610 nm}]	Actividad total [μmol/(minx ml)]	Actividad específica [μmol/(minx ml) x OD _{610 nm}]
FeSO ₄	2.86	0.989	0.346
CoCl ₂	2.79	38.1	13.1

ES 2 319 875 T3

Ejemplo 4

Influencia de los inductores durante el cultivo en la actividad de la nitrilhidratasa del Rhodococcus sp. FZ4

La cepa de *Rhodococcus sp. FZ4* (DSM 13597) se inoculó en el medio de precultivo de acuerdo a la Tabla 2 y se incubó de 1 a 2 días a 28°C bajo agitación. El precultivo se inoculó en el medio de cultivo de acuerdo a la Tabla 5, el cual contiene diferentes inductores, y se cultivó 3 días a 28°C bajo agitación. La actividad de la nitrilhidratasa se determinó de acuerdo al Ejemplo 1. Los resultados se muestran conjuntamente en la Tabla 6. La nitrilhidratasa se expresó de *Rhodococcus sp. FZ4* durante el cultivo solo en presencia de un inductor.

TABLA 5

Medio de cultivo

Componente	Concentración [g/L]
Extracto de levadura	1.0
Citrato de sodio	10.0
Extracto de malta	15.0
Inductor	0.2% (p/v)
KH ₂ PO ₄	2.0
MgSO ₄ X 7 H ₂ O	0.5
CoCl ₂ X 6 H ₂ O	0.015

Con agua se completa hasta 1 L (pH 7.0)

ES 2 319 875 T3

TABLA 6

Influencia de los inductores en la actividad de la nitrilhidratasa

Inductor	Creci- miento [OD _{610 nm}]	Actividad total [$\mu\text{mol}/$ (minxmL)]	Actividad específica [$\mu\text{mol}/$ (minxmLxOD _{610nm})]
Metacrilamida	4.55	569	125
Isobutiramida	3.55	387	109
Butiramida	4.7	344	73.2
Metacrilnitrilo	4.61	330	71.5
Crotonamida	9.32	558	59.9
Butironitrilo	5.26	307	58.4
Amida del ácido valeriánico	5.61	322	57.5
Isobutironitrilo	5.24	273	52.1
Nitrilo del ácido crotónico	8.24	407	49.4
Amida del ácido propiónico	5.17	149	28.7
Valeronitrilo	3.70	120	32.4
Nitrilo del ácido isocapróico	4.72	134	28.5
Isovaleronitrilo	3.22	74.7	23.2
Nitrilo del ácido caprónico	4.54	104	23.0
Propionitrilo	4.72	95.8	20.3
Acrilamida	5.17	60.5	11.7
3-pentenitrilo	4.62	62	13.4
ϵ -caprolactama	4.44	40.3	9.08
Benzonitrilo	5.62	40.3	7.17
Amida del ácido picolínico	3.80	26.1	6.87
---	4.2	27.7	6.59
Cianacetamida	4.75	30.9	6.50
Acetamida	4.37	21.6	4.98
Acetonitrilo	4.46	18.4	4.13

ES 2 319 875 T3

TABLA 6 (continuación)

Inductor	Creci- miento [OD _{610 nm}]	Actividad total [$\mu\text{mol}/$ (minxmL)]	Actividad específica [$\mu\text{mol}/$ (minxmLxOD _{610nm})]
3-cianopiridina	5.54	12.3	2.21
Amida del ácido nicotínico	5.03	10.9	2.17
Benzamida	3.88	8.24	2.12
Acrilonitrilo	3.27	5.91	1.81
Amida del ácido nicotínico	3.55	4.94	1.39
Urea	6.16	5.66	0.918

Ejemplo 5

Cultivo de *Rhodococcus sp. FZ4*

La cepa de *Rhodococcus sp. FZ4* se inoculó en el medio de precultivo de acuerdo a la Tabla 2 y se incubó 1 a 2 días a 28°C bajo agitación. El precultivo se inoculó en el medio de cultivo de acuerdo a la tabla 5 con 6 g/L de metacrilamida como inductor y se cultivó 3 días a 28°C bajo agitación. Luego de 48 h se alimentó adicionalmente metacrilamida (0.2%(v/v)).

En los ejemplos 6 a 13 se emplearon las células de *Rhodococcus sp. Fz4*.

Ejemplo 6

Especificidad del sustrato de la actividad de la nitrilhidratasa del *Rhodococcus sp. FZ4*

La actividad de la nitrilhidratasa del *Rhodococcus sp. Fz4* se determinó con referencia a diferentes sustratos de acuerdo al Ejemplo 1, solo que en vez de 3-cianopiridina se emplea el correspondiente sustrato y se modifican las condiciones de HPLC del correspondiente sustrato empleado. La especificidad del sustrato de la actividad de la nitrilhidratasa del *Rhodococcus sp. FZ4* en comparación a la especificidad del sustrato de la actividad de la nitrilhidratasa del *Rhodococcus rhodochrous* J1 se representa en la Tabla 7.

TABLA 7

Comparación de las especificidades de la actividad de la nitrilhidratasa del *Rhodococcus sp. FZ4* y del *Rhodococcus sp. J1*

	Rhodococcus sp. FZ4	Rhodococcus rhodochrous J1
Substrato	Actividad relativa [%]	Actividad relativa [%]
Acetonitrilo	646	0 (Nitrilhidrasa A) 115 (Nitrilhidratasa B)
Acrilnitrilo	498	478
Butironitrilo	466	26
Propionitrilo	412	435
3-cianpiridino	100	100
4-cianpiridino	98.4	70
Crotonsaurenitrilo	92.1	78
Benzonitrilo	41.7	27
2-cianpiridino	39.3	45
m-clorobenzonitrilo	39.3	43
p-clorobenzonitrilo	8.25	13
metacrilonitrilo	3.64	87
o-clorobenzonitrilo	0	2.8

Ejemplo 7

Temperatura óptima y estabilidad térmica de la actividad de la nitrilhidratasa de *Rhodococcus sp. FZ4*

La actividad de la nitrilhidratasa se determinó de acuerdo al Ejemplo 1, a temperaturas diferentes en la región de 20 a 70°C. La temperatura óptima para la actividad de la nitrilhidratasa se encuentra a 60°C (Fig. 2).

Para determinar la estabilidad térmica de la actividad de la nitrilhidratasa, se incubaron las suspensiones celulares 15 minutos a diferentes temperaturas en la región de 40 a 70°C. Entonces se determinó la actividad de la nitrilhidratasa de acuerdo al Ejemplo 1 a 20°C. La actividad de la nitrilhidratasa luego de 15 minutos de incubación a las temperaturas en la región de 40 a 60°C correspondió a la actividad de nitrilhidratasa original (Fig. 3).

Ejemplo 8

pH óptimo y pH de estabilidad de la actividad de la nitrilhidratasa de *Rhodococcus sp. FZ4*

La actividad de la nitrilhidratasa se determinó de acuerdo al Ejemplo 1 a diferentes valores del pH en la región de 3 a 12 bajo el empleo de amortiguadores diferentes (0.1 M). El pH óptimo de la actividad de la nitrilhidratasa permanece entre 6 y 7 (Fig. 4). Para determinar la estabilidad al pH de la actividad de la nitrilhidratasa, se incubó la suspensión celular a diferentes valores del pH en la región de 4 a 10 durante 24 horas a 20°C. Entonces la suspensión celular se

centrifugó. Las células divididas se lavaron y se resuspendieron en amortiguador de fosfato de potasio (9.1 M; pH 7.0). La actividad de la nitrilhidratasa se determinó de acuerdo al Ejemplo 1. La actividad de la nitrilhidratasa luego de 24 horas de incubación a valores de pH en la región de 5 a 10 corresponde aproximadamente a la actividad de la nitrilhidratasa original (Fig. 5).

Ejemplo 9

Influencia de la concentración de la 3-cianopiridina en la actividad de nitrilhidratasa de Rhodococcus sp. FZ4

Una suspensión de células se incubó durante 60 minutos a 20°C a diferentes concentraciones de 3-cianopiridina en la región de 0 a 10% (p/v). Las células se dividieron, se lavaron y se resuspendieron en amortiguador de fosfato de potasio (0.1 M; pH 7.0). La actividad de la nitrilhidratasa se determinó de acuerdo al Ejemplo 1. La actividad de la nitrilhidratasa luego de 60 minutos de incubación a concentraciones de 3-cianopiridina en la región de 0 a 20% (p/v) corresponde aproximadamente a la actividad de la nitrilhidratasa original (Fig. 6).

Ejemplo 10

Influencia de la concentración de la amida del ácido nicotínico en la actividad de la nitrilhidratasa de Rhodococcus sp. FZ4

Una suspensión de células se incubaron durante 24 horas a 20°C a diferentes concentraciones de amida del ácido nicotínico en la región de 0 a 20% (p/v). Las células se dividieron, se lavaron y resuspendieron en 0.1 M en amortiguador de fosfato de potasio (0.1 M; pH 7.0). La actividad de la nitrilhidratasa se determinó de acuerdo al Ejemplo 1. La actividad de la nitrilhidratasa luego de 24 horas de incubación a concentraciones de amida del ácido nicotínico en la región de 0 a 20% (p/v) corresponde aproximadamente a la actividad de la nitrilhidratasa original (Fig. 7).

Ejemplo 11

Determinación de los valores de K_M para la 3-cianopiridina con respecto a la nitrilhidratasa del Rhodococcus sp. FZ4

Una mezcla de reacción que consiste de 3-cianopiridina (0.1-1.0 M; 1.0-1.8 mL), solución acuosa de NaCl (0.85% (p/v); 0.7 hasta 0.1 mL), amortiguador de fosfato de potasio (0.1 M; pH 7.0; 0.3 mL) y suspensión celular (0.01 mL) se incubaron 10 minutos a 30°C bajo agitación. El volumen total de la mezcla de reacción permanece según la concentración de 3-cianopiridina entre 2.0 a 2.2 mL. La reacción se detuvo a través de la adición de HCl (2 M; 0.1 mL). Luego de la centrifugación (12 000 Upm; 5 min) de la mezcla de reacción, se determinó la cantidad de la amida de ácido nicotínico formada por medio de HPLC de acuerdo al Ejemplo 1. El valor del pH se determinó a 160 mM (Fig. 10).

Ejemplo 12

Comparación de las actividades de la nitrilhidratasa de Rhodococcus sp. FZ4 con las actividades de la nitrilhidratasa de los microorganismos conocidos Amycolatopsis sp. NA40, Rhodococcus sp. GF270 y Rhodococcus rhodochrous J1

Los valores de K_M para el sustrato de 3-cianopiridina con relación a las actividades de la nitrilhidratasa de Rhodococcus sp. FZ4, Rhodococcus sp. GF270 (DSM 12211; WO 99/05306), Amycolatopsis sp. NA40 (DSM 11617; WO 99/05306) y Rhodococcus rhodochrous J1 se determinaron de acuerdo al Ejemplo 11 bajo el uso de cada uno de los microorganismos. Los valores de K_M de las cepas de Amycolatopsis sp. NA40 y Rhodococcus sp. FZ4 son inferiores a aquellos de los otros microorganismos (Tabla 8).

TABLA 8

Comparación de los valores K_M para el sustrato de 3-cianopiridina

K_M [mM]			
<i>Rhodococcus sp. FZ4</i>	<i>Rhodococcus sp. GF270</i>	<i>Amycolatopsis sp. NA40</i>	<i>Rhodococcus rhodochrous J1</i>
160	> 200	41.7	200

ES 2 319 875 T3

La estabilidad térmica de las actividades de la nitrilhidratasa del *Rhodococcus sp.* FZ4, *Rhodococcus sp.* GF270, *Amycolatopsis sp.* NA40 y *Rhodococcus Rhodocrous* J1 se determinaron de acuerdo al Ejemplo 7 bajo el empleo de cada uno de los microorganismos y de las condiciones de incubación dadas en la Tabla 9. La actividad de la nitrilhidratasa de las cepas de *Rhodococcus sp.* FZ4 muestra en comparación a la actividad de la nitrilhidratasa de los otros microorganismos, la estabilidad térmica más grande.

TABLA 9

Comparación de la estabilidad térmica de las actividades de la nitrilhidratasa

Actividad relativa [%]				
	<i>Rhodococcus sp</i> FZ4	<i>Rhodococcus sp</i> GF270	<i>Amycolatopsis sp</i> NA40	<i>Rhodococcus rhodocrous</i> J1
15 min a				
50°C	100	100	nd ^a	100
60°C	93	95	nd ^a	80
70°C	2	5	nd ^a	0
60 min a				
20°C	100	100	100	nd ^a
30°C	100	100	95	nd ^a
40°C	100	100	80	nd ^a
50°C	100	100	32	nd ^a
60°C	100	89	0	nd ^a
70°C	6	0	0	nd ^a
60°C para				
0 min	100	100	nd ^a	nd ^a
30 min	100	67-80	nd ^a	nd ^a
60 min	92-100	52-68	nd ^a	nd ^a
120 min	72-87	29-47	nd ^a	nd ^a

^a no determinado

La influencia de la concentración de 3-cianopiridina en las actividades de la nitrilhidratasa del *Rhodococcus sp.* FZ4, *Rhodococcus sp.* GF270, *Amycolatopsis sp.* NA40 y *Rhodococcus rhodocrous* J1 se determinó de acuerdo al Ejemplo 9 y el empleo de cada uno de los microorganismos y de las concentraciones de 3-cianopiridina dada en la tabla 10. Las actividades de la nitrilhidratasa de la cepa *Rhodococcus sp.* FZ4 y *Rhodococcus sp.* GF270 muestran la tolerancia más alta frente a la 3-cianopiridina.

ES 2 319 875 T3

TABLA 10

Comparación de la influencia de la concentración de la 3-cianopiridina en la actividad de la nitrilhidratasa

Actividad relativa [%]				
3-cianopiridina [% (p/v)]	<i>Rhodococcus</i> sp FZ4	<i>Rhodococcus</i> sp GF270	<i>Amycolatopsis</i> sp NA40	<i>Rhodococcus rhodocrous</i> J1
0	100 ^a	100 ^a	100 ^b	100 ^b
2.5	100 ^a	100 ^a	74 ^b	nd ^c
5.0	100 ^a	100 ^a	56 ^b	86 ^b
7.5	100 ^a	100 ^a	47 ^b	nd ^c
10.0	100 ^a	100 ^a	16 ^b	63 ^b

^a Incubación durante 60 min; ^b Incubación durante 15 min.

^c no determinado

La influencia de la concentración de amida del ácido nicotínico en las actividades de *Rhodococcus* sp. FZ4, *Rhodococcus* sp. GF270, *Amycolatopsis* sp. NA40 y *Rhodococcus rhodocrous* J1 se determinó de acuerdo al Ejemplo 9 con el empleo de cada uno de los microorganismos y de la concentración de la amida del ácido nicotínico dada en la Tabla 11. Las actividades de la nitrilhidratasa de las cepas *Rhodococcus* sp. FZ4 y *Rhodococcus* sp. GF270, muestran las más altas tolerancias contra la amida del ácido nicotínico (Tabla 11).

TABLA 11

Comparación de la influencia de la concentración de la amida del ácido nicotínico en las actividades de la nitrilhidratasa

Actividad relativa [%]				
Amida del ácido nicotínico [% (p/v)]	<i>Rhodococcus</i> sp FZ4	<i>Rhodococcus</i> sp GF270	<i>Amycolatopsis</i> sp NA40	<i>Rhodococcus rhodocrous</i> J1
0	100	100	100	nd ^a
10	100	100	55	nd ^a
20	100	100	0	nd ^a
30	100	100	0	nd ^a

^a no determinado

Ejemplo 13

Biotransformación de la 3-cianopiridina a la amida del ácido nicotínico con Rhodococcus sp. FZ4

Una solución de 3-cianopiridina se alimentó en 42 porciones (42 x 0.52 g = 21.8 g; 0.21 mol) a un recipiente que consiste de una suspensión de células (13.7 mg de peso seco de las células, 4 mL) y amortiguador de fosfato de potasio (0.1 M; pH 6.0; 16 mL). La siguiente porción de 3-cianopiridina se empleó para la mezcla de reacción dada, cuando la 3-cianopiridina se hizo reaccionar en la mezcla de reacción en forma cuantitativa a la amida del ácido nicotínico. La mezcla de reacción se estabilizó en el transcurso de la reacción. Mientras tanto se formaron 25.7 g (rendimiento cuantitativo) de amida del ácido nicotínico.

Ejemplo 14

Biotransformación del acetonitrilo a acetamida con Rhodococcus sp. Fz4

Acetonitrilo (5 mL; 95 mmol) se hizo gotear durante 80 minutos a una mezcla de reacción que consistía de amortiguador de fosfato de potasio (0.1 M; pH 7.0; 4.5 mL) y suspensión celular (4.88 mg en peso seco de células; 0.5 mL) a 20°C. La reacción posterior se realizó a 20°C bajo agitación. La formación de acetamida durante la reacción se realizó por medio de HPLC (Waters Spherisorp 5 μ OPDS2 (4.6 x 150 mm); KH₂PO₄ (10 mM; pH 2.5)/Acetonitrilo = 99/1 (v/v); 1.0 mL/min; 210 nm). Dentro de 120 minutos se formaron 6.14 g (Rendimiento cuantitativo) de acetamida, la cual se acumuló en el medio de reacción (Fig. 1).

Ejemplo 15

Influencia de la concentración de acetonitrilo en la actividad de la nitrilhidratasa del Rhodococcus sp. FZ4 en la biotransformación de acetonitrilo a acetamida

Una mezcla de reacción que consiste de acetonitrilo (0.2-19.0 M; 1.0-1.6 mL), solución de NaCl acuoso (0.85% (p/v); 0.6-0.0 mL), amortiguador de fosfato de potasio (0.1 M; pH 7.0; 0.3 mL) y la suspensión de células (0.1 mL) se incubó 10 minutos a 20°C bajo agitación. El volumen de reacción total fue de 2.0 mL. La reacción se detuvo mediante la adición de MeOH. La mezcla de reacción se centrífugo (12 000 Upm, 5 min) y la cantidad de acetamida formada se determinó por medio de HPLC de acuerdo al Ejemplo 14.

La actividad de la nitrilhidratasa fue aproximadamente constante en la región de 0.1 hasta 15 M de acetonitrilo (Fig. 8).

Ejemplo 16

Influencia de la concentración de acetonitrilo en la actividad de nitrilhidratasa del Rhodococcus sp. FZ4

Se incubaron las células con acetonitrilo (0.0-15.0 M) en amortiguador de fosfato de potasio (0.1 M, pH 7.0) a 1 hora a 20°C. La suspensión celular se centrífugo (12 000 upm), 5 min) y la células se resuspendieron en solución acuosa de NaCl (0.85% (p/v)). La mezcla de reacción consiste de esta suspensión de células (0.1 mL), 3-cianopiridina (0.5 M; 1.0 mL), solución acuosa de NaCl (0.85% (p/v); 0.6 mL) y amortiguador de fosfato de potasio (0.1 M; pH 7.0; 0.3 mL) se incubó 5 minutos a 30°C bajo agitación. La reacción se detuvo por la adición de MeOH. La mezcla de reacción se centrífugo (12 000 Upm, 5 min) y la cantidad de acetamida formada se determinó por medio de HPLC de acuerdo al Ejemplo 14.

La actividad de la nitrilhidratasa fue aproximadamente constante luego de 1 hora de incubación con acetonitrilo en la región de concentración de 0 a 3 M. Luego de 1 hora de incubación con acetonitrilo al 6 M presenta aún el 60% de la actividad de la nitrilhidratasa original. Luego de 1 hora de incubación con acetonitrilo al 9 M presenta aún aproximadamente 35% de actividad de nitrilhidratasa original (Fig. 9).

Ejemplo 17

Producción del mutante negativo al pigmento del Rhodococcus sp. FZ4

La cepa de *Rhodococcus* sp. FZ4 se incubó en un medio de "caldo nutritivo" (50 mL) y a 28°C bajo agitación hasta que se alcanzó un OD_{610 nm} de 6.29. El precultivo (10 mL) se inoculó entonces en un medio de "caldo nutritivo" (25 mL) y se incubó a 28°C bajo agitación hasta que se logró un OD_{610 nm} de 1.90. El cultivo así obtenido (10 mL) se centrífugo (8 000 Upm, 5 min). El sobrenadante se eliminó y el precipitado de células se suspendió en cloruro de sodio (5 mL) amortiguado con fosfato. La suspensión de células se colocó en un plato de petri de vidrio (90 mm diámetro). Las células se sometieron a luz ultravioleta con una lámpara UV (15 W, 254 nm) a una distancia de 25 cm durante 17 minutos. Entonces se incubaron las células en un medio de "caldo nutritivo" de doble concentración a 28°C durante 4 días bajo agitación. El cultivo así obtenido se diluyó 100 veces y alícuotas de 100 μ l se colocaron en placas de "placas de agar" y se incubaron a 28°C. De ahí se hicieron crecer 150 colonias individuales por placa. Las placas se exponen a la luz del día para inducir la formación de los pigmentos rojos. Las colonias de los mutantes negativos al pigmento se pueden diferenciar fácilmente de aquellos de los mutantes coloreados y de los tipos silvestres rojos.

Ejemplo 18

Purificación de la nitrilhidratasa a partir de Rhodococcus sp. FZ4

- 5 El *Rhodococcus sp.* FZ4 se reviste de acuerdo al Ejemplo 3 en un fermentador de 2 L. El cultivo se centrifuga y el precipitado celular se resuspende en solución de NaCl acuoso (0.85% (p/v)). La suspensión celular se traslada en ácido butírico (0.44 mM) que contiene amortiguador de fosfato de potasio (0.1 M; pH 7.0) y se trata con ultrasonido. Los restos celulares se retiran por medio de centrifugación. El sobrenadante se utilizó para la purificación de la nitrilhidratasa de acuerdo a la Tabla 12. La actividad de la nitrilhidratasa se determinó de acuerdo al Ejemplo 1, en lugar de la suspensión celular se utiliza entonces cada uno de los extractos.

TABLA 12

Purificación de nitrilhidratasa a partir de Rhodococcus sp. FZ4

Etapa de purificación	Contenido de proteína [mg]	Actividad total [$\mu\text{mol}/\text{min}$]	Actividad específica [$\mu\text{mol}/(\text{min} \times \text{mg})$]
Extracto libre de células	335	5881	17.6
Precipitación de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	198	6087	28.4
DEAE-Sephacel	73.0	3553	48.7
Butil-Toyopearl	66.2	2035	30.7
Fenil-Sepharose	26.2	890	34.0

Ejemplo 19

Determinación de los pesos moleculares de la nitrilhidratasa purificada

El peso molecular se determina con HPLC (TSK gel G 300 SW (0.75 x 60 cm)); amortiguador de fosfato de potasio (0.1 M; pH 7.5) y cloruro de potasio (0.2 M); 0.7 mL/min; 280 nm).

- 50 El peso molecular de la nitrilhidratasa asciende a 465 kDa (Fig. 11).

La nitrilhidratasa consiste a de subunidades α con un peso molecular de 27.7 kDa y una subunidad β con un peso molecular de 31.2 kDa (Fig. 12).

Ejemplo 20

Estabilidad térmica de la nitrilhidratasa purificada

- 60 Una solución que consiste de nitrilhidratasa en solución (0.697 $\mu\text{mol}/\text{min}$; 0.025 mL) y amortiguador de fosfato de potasio (0.1 M; pH 7.0; 0.475 mL) se incubó 60 minutos a diferentes temperaturas en la región de 20 a 70°C. Entonces la solución se enfría con un baño de hielo a 20°C y se agrega 3-cianopiridina (0.5 M; 0.500 mL). La mezcla de reacción se incubó durante 10 minutos a 20°C. La reacción se detiene por medio de la adición de MeOH. La cantidad de amida del ácido nicotínico formado se determina por medio de HPLC de acuerdo al Ejemplo 1. La actividad de la nitrilhidratasa disminuyó luego de 60 minutos de incubación a temperaturas por arriba de 40°C ostensiblemente, luego de 60 minutos de incubación a 50°C la actividad de la nitrilhidratasa ascendió sólo a aproximadamente 25% de la actividad original (Fig. 15).

Ejemplo 21

PH óptimo de la nitrilhidratasa purificada

Una mezcla de reacción que consiste de 3-cianopiridina (0.5 M; 0.500 mL), solución de nitrilhidratasa (0.697 $\mu\text{mol}/\text{min}$, 0.025 mL) y diferentes amortiguadores en un pH en la región de 4 a 11 (0.1 M; 0.0475 mL) se incubó 10 minutos a 20°C. La reacción se detuvo por la adición de MeOH. La cantidad de amida del ácido nicotínico formada se determinó por medio de HPLC de acuerdo al Ejemplo 1. El pH óptimo de la nitrilhidratasa permanece en la región de 6.0 a 6.5 (Fig. 16).

Ejemplo 22

PH de estabilidad de la nitrilhidratasa purificada

Una solución que consiste de nitrilhidratasa en solución (8.36 $\mu\text{mol}/\text{min}$; 0.47 mL), diferentes amortiguadores a pH en la región de 4.0 a 11.0 (0.3 M; 0.10 mL) y agua destilada (0.03 mL) se incubó durante 30 minutos a 20°C. La mezcla de reacción que consiste de una alícuota de la nitrilhidratasa en solución incubada (0.05 mL), 3-cianopiridina (0.5 M; 0.5 mL) y cada una de los amortiguadores (0.1 M; 0.45 mL) se incubó durante 10 minutos a 20°C. La reacción se detuvo por la adición de MeOH. La cantidad de amida del ácido nicotínico formada se determinó por medio de HPLC de acuerdo al Ejemplo 1. La actividad de la nitrilhidratasa corresponde luego de 60 minutos de incubación a un pH en la región de 6 a 8 aproximadamente a la actividad de la nitrilhidratasa original (Fig. 17).

Ejemplo 23

Especificidad del sustrato de la nitrilhidratasa purificada

Una mezcla de reacción que consiste de nitrilhidratasa en solución (0.695 $\mu\text{mol}/\text{min}$; 0.025 mL), diferentes sustratos (0.500 mL) y amortiguador de fosfato de potasio (0.1 M, pH 7.0; 0.475 mL) se incubó de 5 a 10 minutos a 20°C. Las concentraciones del sustrato empleado se encuentran en la región de 0.015 hasta 0.250 M. La reacción se detuvo por la adición de MeOH. La cantidad formada de amida se determinó por medio de HPLC. Los resultados se conjuntan en la tabla 13. La nitrilhidratasa muestra la más alta actividad bajo los sustratos probados referente al sustrato de acetonitrilo.

TABLA 13

Especificidad del sustrato de la nitrilhidratasa purificada

Substrato	Concentración [M]	Actividad relativa [%]
Acetonitrilo	0.2	1008
acrilonitrilo	0.2	774
Propionitrilo	0.2	693
Butironitrilo	0.2	578
Nitrilo de ácido crotónico	0.2	114
3-cianopiridina	0.25	100 ^a
4-cianopiridina	0.125	92.8
Benzonitrilo	0.015	75.6
m-clorbenzonitrilo	0.015	66.5
2-cianpiridina	0.125	36.7
p-clorbenzonitrilo	0.015	8.31
Metacrilamida	0.2	1.39
o-clorbenzonitrilo	0.015	0

^aActividad total: 4164 $\mu\text{mol}/(\text{min} \times \text{mL})$

Ejemplo 24

Influencia de los inhibidores potenciales en la nitrilhidratasa purificada

- 5 Una solución que consiste de nitrilhidratasa en solución (0.695 $\mu\text{mol}/\text{min}$; 0.025 mL), amortiguador de fosfato de potasio (0.1 M; pH 7.0; 0.475 mL), agua destilada (0.150 mL) e inhibidores potenciales diferentes (0.100 mL) se incubó 5 minutos a 20°C. Entonces se agregó 3-cianopiridina (1.0 M; 0.250 mL). La concentración de los inhibidores en la mezcla de reacción ascendió a 1.0 mM. La mezcla de reacción se incubó durante 10 minutos a 20°C. La reacción se detuvo por la adición de MeOH. Las cantidades de amida del ácido nicotínico formada se determinaron por medio de HPLC de acuerdo al Ejemplo 1. Los resultados se muestra en la tabla 14. Bajo los inhibidores potenciales probados la hidroxilamina y cianuro de potasio muestran la acción inhibitoria más fuerte.

TABLA 14

Influencia de los inhibidores potenciales en la nitrilhidratasa purificada

Inhibidor	Actividad relativa [%]
Ácido p-cloromercuribenzoico ^a	187
Tiron	114
Fluoruro de fenilmetasulfonilo	110
1,10-fenantrolina	106
Urea	106
Ditiotreitol	103
EDTA ^b	100
---	100 ^c
Cisteamina	99.1
8-hidroxiquinolina	97.8
2,2'-bipiridilo	97.8
Yodoacetato	96.7
N-etilmaleinimida	95.3
Azida de sodio	93.5
5.5'-ditiobis(2-ácido nitrobenzoico) ^a	93.4
Dietilditioicarbamato	93.3
D-cicloserina	86.3
Fenilhidrazina	84.6
2-mercaptoetanol	76.3
Hidroxilamina	1.34
Cianida de potasio	0

^a0.1 mM. ^bácido etilendiamintetraacético

^cActividad total: 3776 $\mu\text{mol}/(\text{min} \times \text{mL})$

Ejemplo 25

Influencia de los iones metálicos en la actividad de la nitrilhidratasa purificada

La influencia de los iones metálicos en la actividad de la nitrilhidratasa purificada se realizó de acuerdo al Ejemplo 24, pero bajo la adición de iones metálicos en lugar de inhibidores potenciales. Las concentraciones de iones metálicos en la mezcla de reacción asciende a 1.0 mM. Los resultados se conjuntan en la Tabla 15. Bajo los iones metálicos probados los cationes de plata solos y los cationes de bivalentes de plata muestran una acción inhibidora.

TABLA 15

Influencia de los iones metálicos en la actividad de la nitrilhidratasa purificada

Iones Metálicos	Actividad relativa [%]
CuSO ₄	177
MnCl ₂	123
NiCl ₂	123
ZnSO ₄	121
FeSO ₄	113
CaCl ₂	113
CoCl ₂	110
FeCl ₃	105
---	100 ^a
AgNO ₃	0
HgCl ₂ ^b	0

^aActividad total: 3375 $\mu\text{mol}/(\text{min} \times \text{mL})$

^b0.1 mM.

Ejemplo 26

Determinación del valor de K_M para la 3-cianopiridina con respecto a la nitrilhidratasa purificada

A una solución que consiste de nitrilhidratasa en solución (0.0697 $\mu\text{mol}/\text{min}$; 0.025 mL) y amortiguador de fosfato de potasio (0.1 M; pH 7.0; 0.475 mL) se agregó 3-cianopiridina en diferentes concentraciones (3.1-800 mM; 0.500 mL). La mezcla de reacción se incubó 10 minutos a 20°C. La reacción se detuvo por la adición de metanol y la cantidad de amida del ácido nicotínico se determinó por medio de HPLC de acuerdo al Ejemplo 1. El valor de K_M para la 3-cianopiridina ascendió a 80.5 mM (Fig. 13).

Ejemplo 27

Determinación del valor de K_M para el acetonitrilo con respecto a la nitrilhidratasa purificada

A una solución que consiste nitrilhidratasa en solución (0.0697 $\mu\text{mol}/\text{min}$; 0.025 mL) y amortiguador de fosfato de potasio (0.1 M; pH 7.0; 0.475 mL) se agregó acetonitrilo en diferentes concentraciones (2.5-80 mM; 0.500 mL). La mezcla de reacción se incubó durante 10 minutos a 20°C. La reacción se detuvo con la adición de metanol y la cantidad de acetamida formada se determinó por medio de HPLC de acuerdo al Ejemplo 14. El valor de K_M para el acetonitrilo ascendió a 2.84 mM (Fig. 14).

REIVINDICACIONES

1. Microorganismos de la especie *Rhodococcus sp.* FZ4, según han sido depositados bajo el número DSM 13597.

2. Microorganismos de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizados** porque son capaces de tolerar una concentración de acetonitrilo de al menos 3 M.

3. Microorganismos de acuerdo con la reivindicación 2, **caracterizados** porque son capaces de hacer reaccionar la 3-cianopiridina para dar nicotinamida.

4. Microorganismos de acuerdo con al menos una de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizados** porque están presentes ácidos micólicos que tienen una longitud de cadena de 48C.

5. Extractos enzimáticos, obtenibles de los microorganismos de acuerdo con al menos una de las reivindicaciones 1 a 4.

6. Nitrilo hidratasa, obtenible a partir de los microorganismos según se reivindica en una de las reivindicaciones 1 a 4.

7. Nitrilo hidratasa, **caracterizada** por

a) un valor K_M de 2.84 ± 1.00 mM para el sustrato acetonitrilo y de 80.5 ± 15.0 mM para el sustrato 3-cianopiridina

b) un pH óptimo de 6.5 ± 1.0

c) un peso molecular de 465 ± 50 kDa, que comprende subunidades α y β , determinado por HPLC.

8. Método para preparar amidas de la fórmula general



en la cual R^1 es un grupo C_{1-6} -alquilo, un grupo C_{2-6} -alquenilo o un grupo de fórmula general



en el cual X es un átomo de nitrógeno o -CH=, y R^2 y R^3 son independientemente uno de otro un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno, un grupo alquilo C_{1-6} o un grupo alquenilo C_{2-6} , **caracterizado** porque un nitrilo de la fórmula general



en la cual R^1 es como se definió más arriba, es convertido por medio de un microorganismo de acuerdo con al menos una de las reivindicaciones 1 a 4, un extracto enzimático de acuerdo con la reivindicación 5 o por medio de una enzima de acuerdo con al menos una de las reivindicaciones 6 y 7.

9. Método de acuerdo con la reivindicación 8, **caracterizado** porque el nitrilo usado es 3-cianopiridina o acetonitrilo.

10. Método de acuerdo con al menos una de las reivindicaciones 8 y 9, **caracterizado** porque la reacción es llevada a cabo a una temperatura desde 5 hasta 50°C y a un pH desde 5 a 10.

11. Uso de los microorganismos de acuerdo con al menos una de las reivindicaciones 1 a 4 para remover los residuos de acetonitrilo.

Figura 1

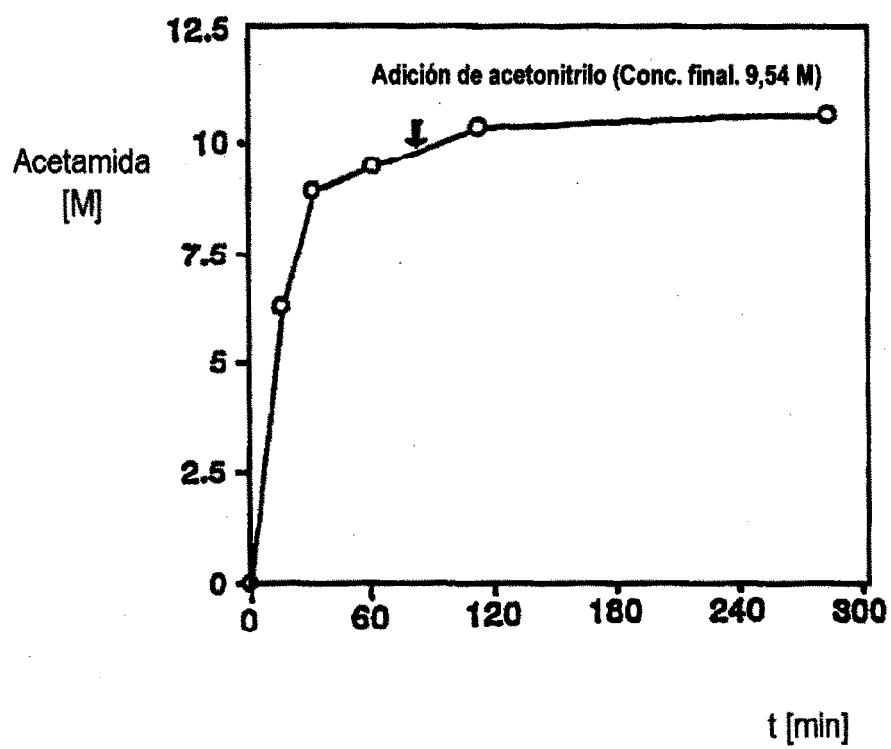


Figura 2

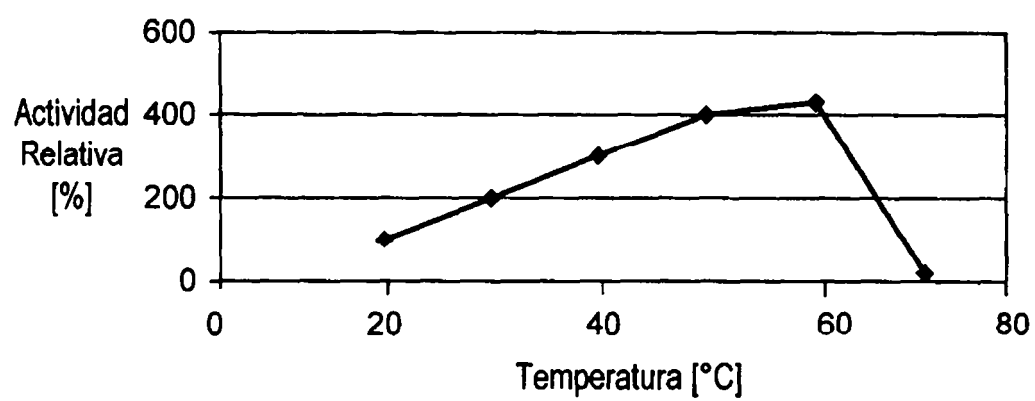


Figura 3

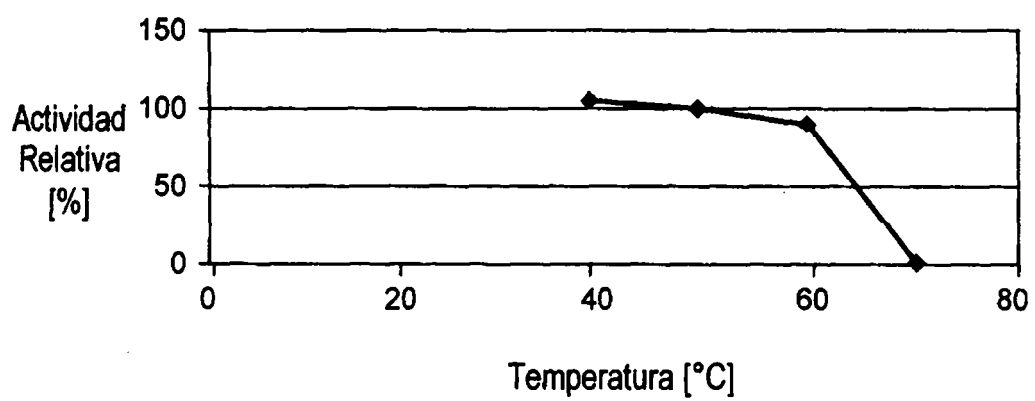


Figura 4

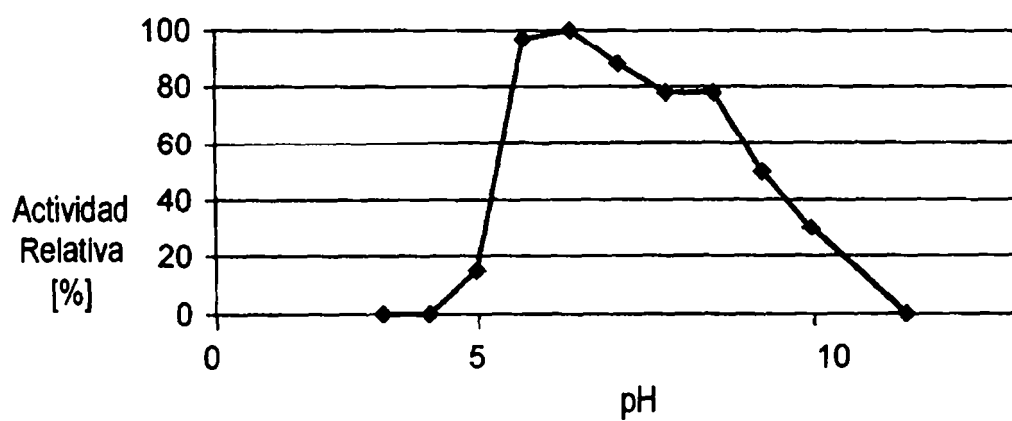


Figura 5

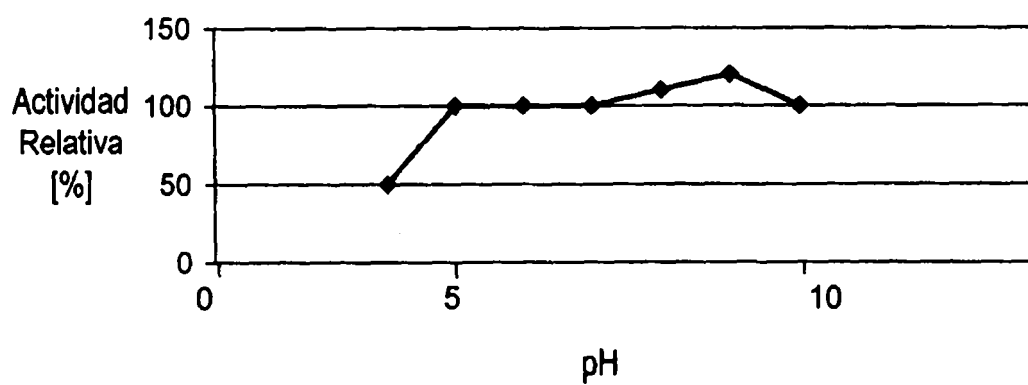


Figura 6

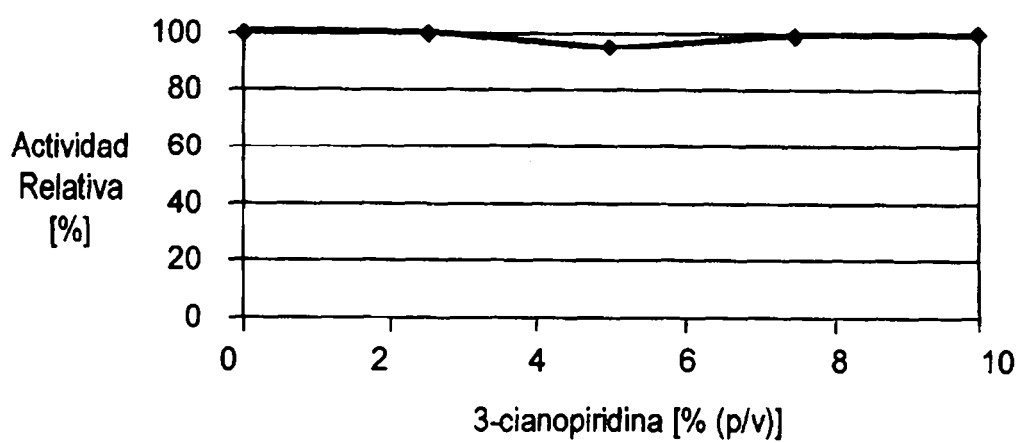
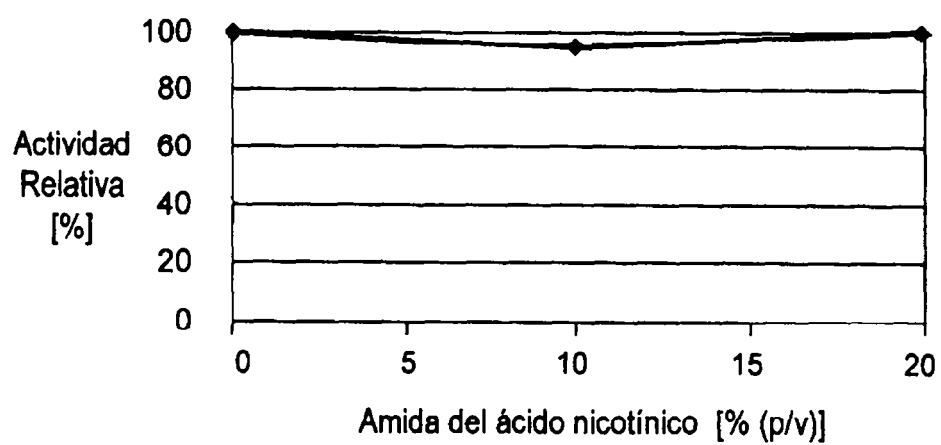


Figura 7



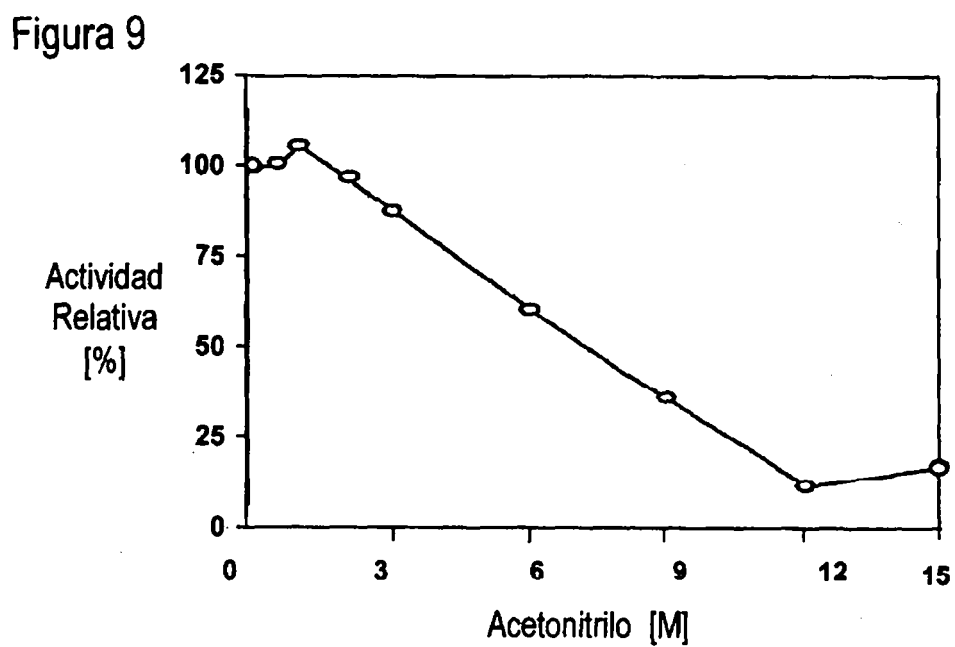
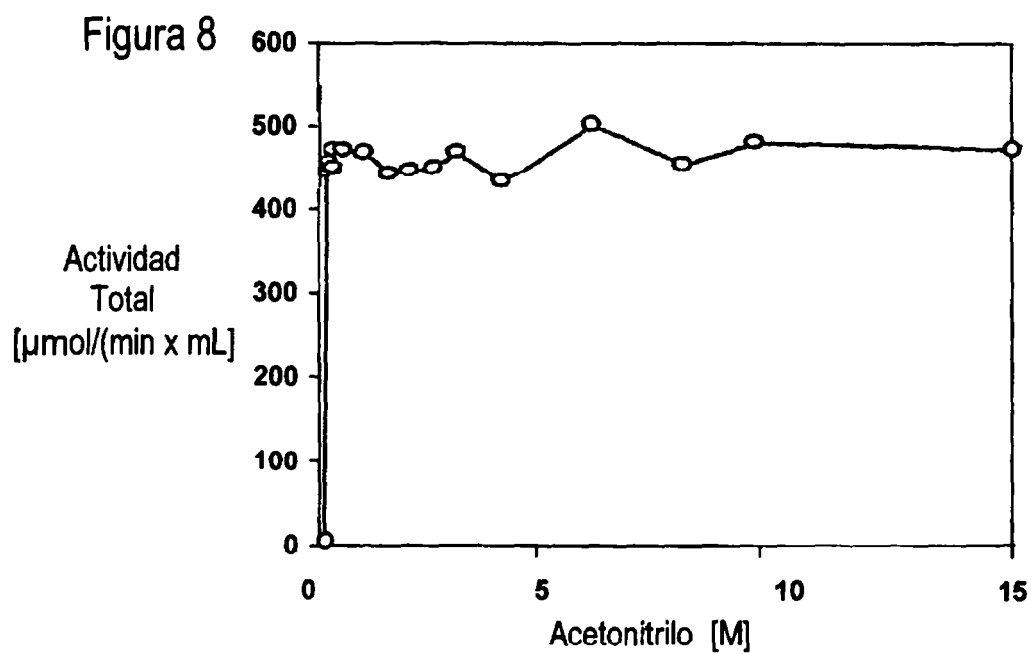


Figura 10

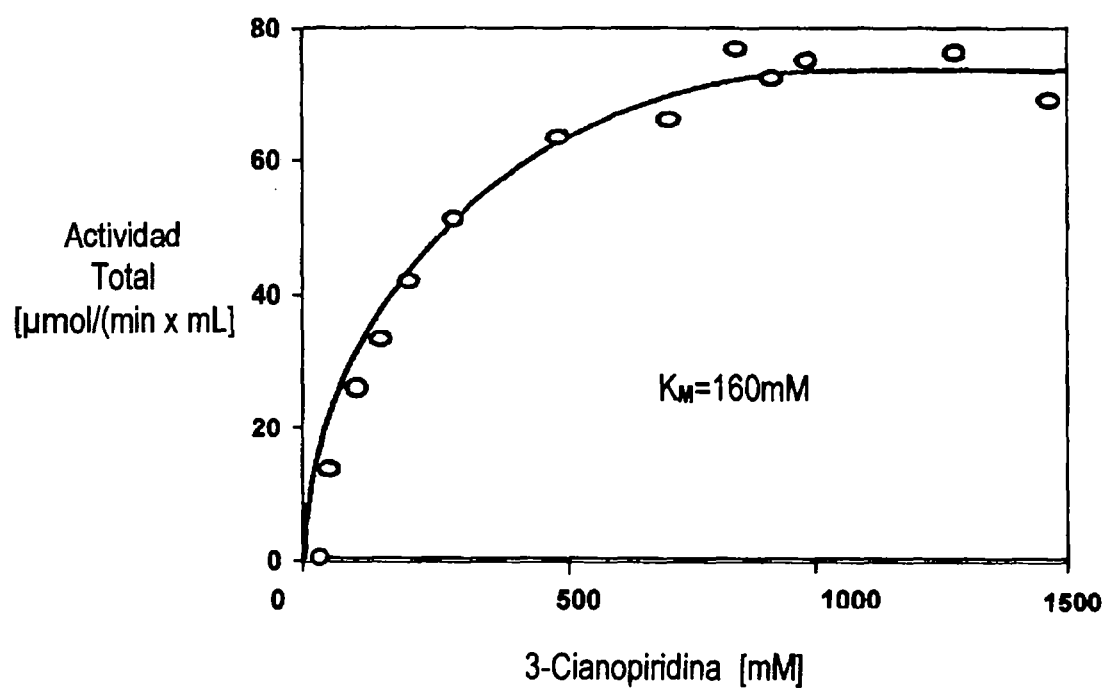


Figura 11

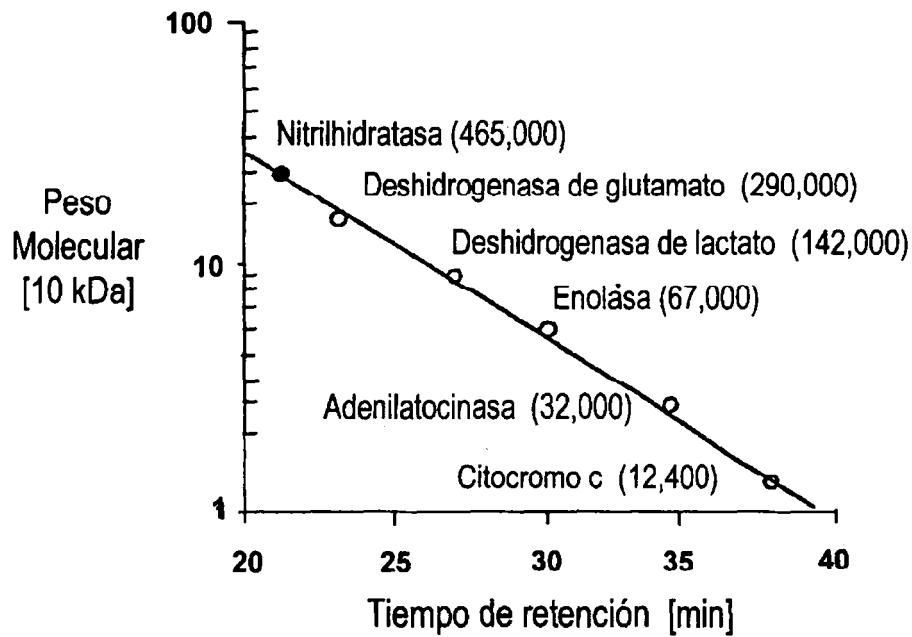


Figura 12

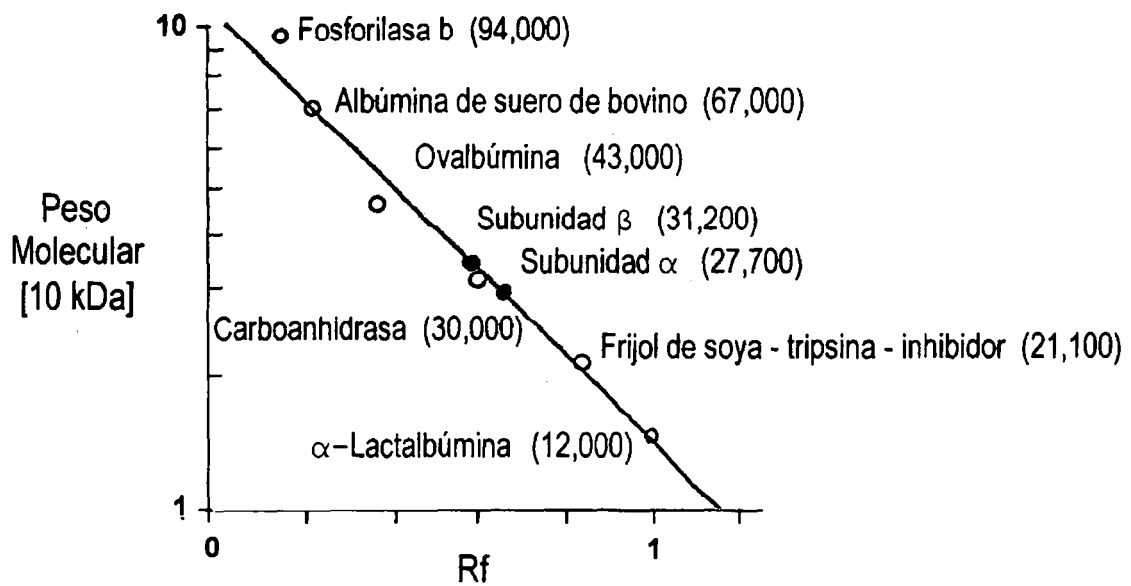


Figura 13

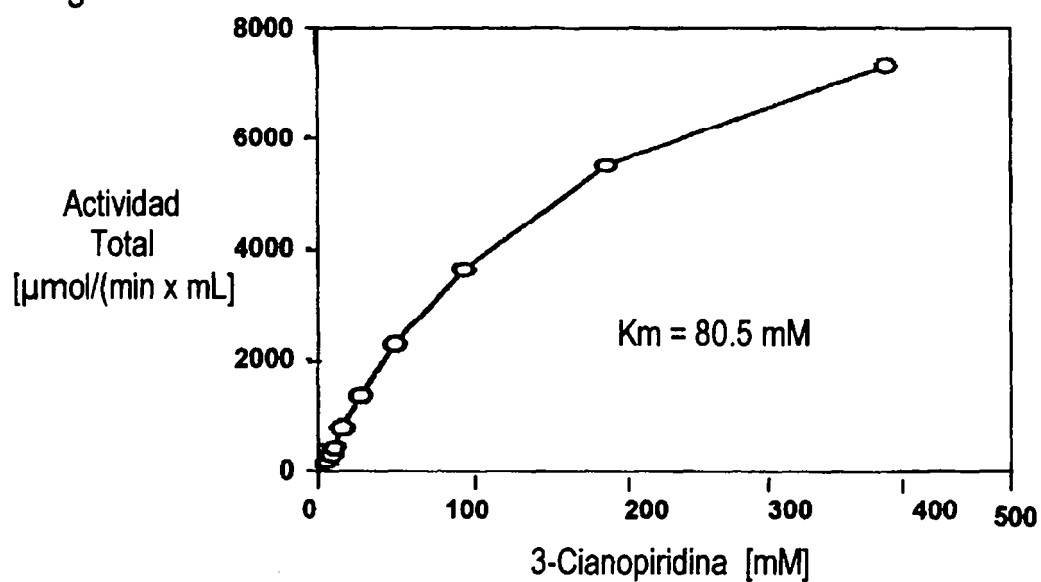


Figura 14

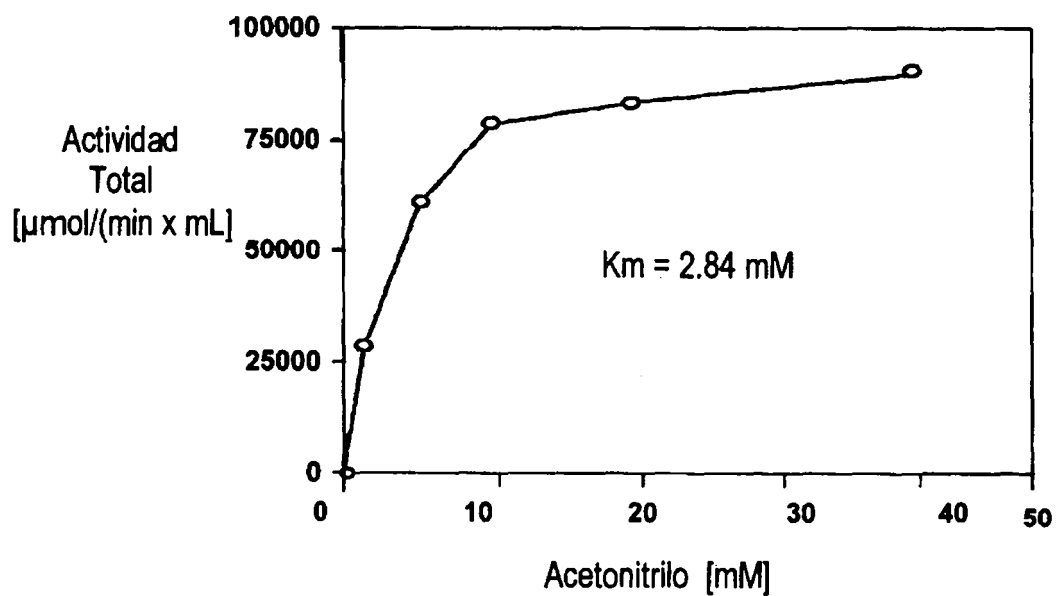


Figura 15

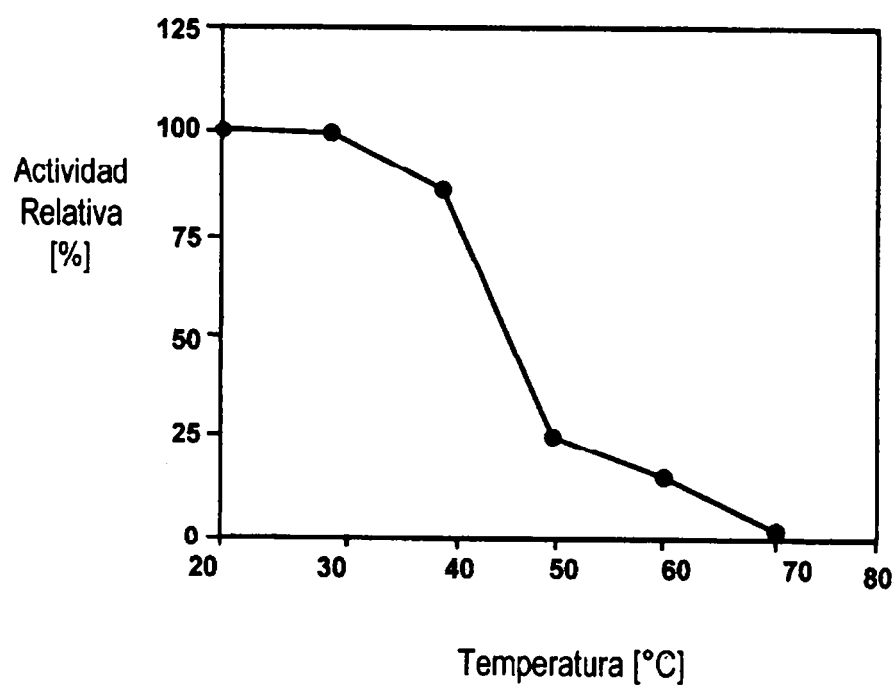
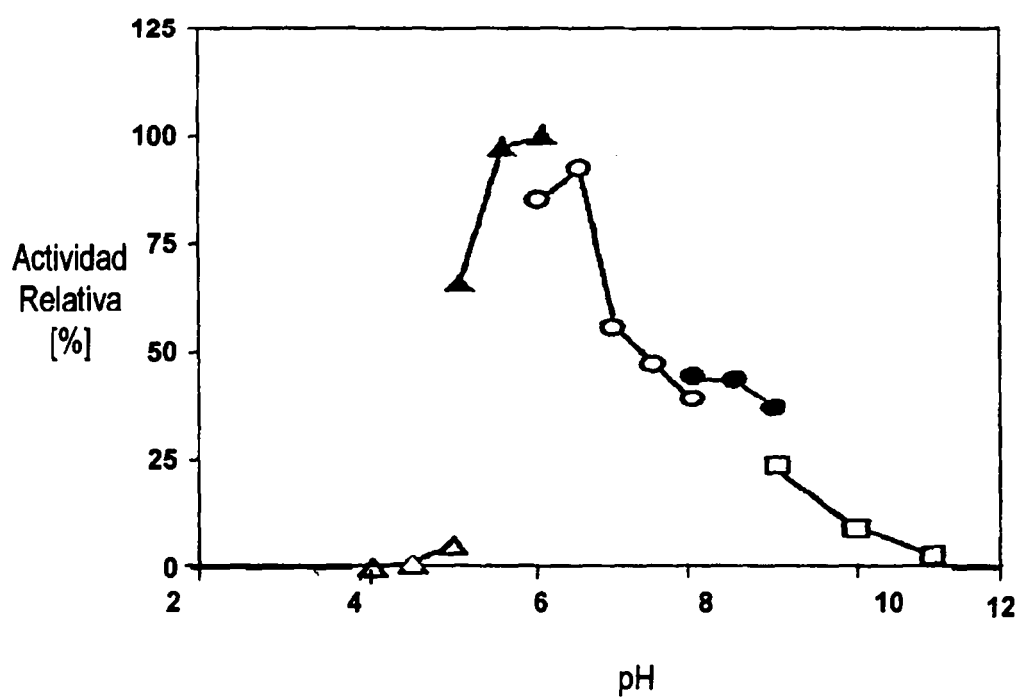
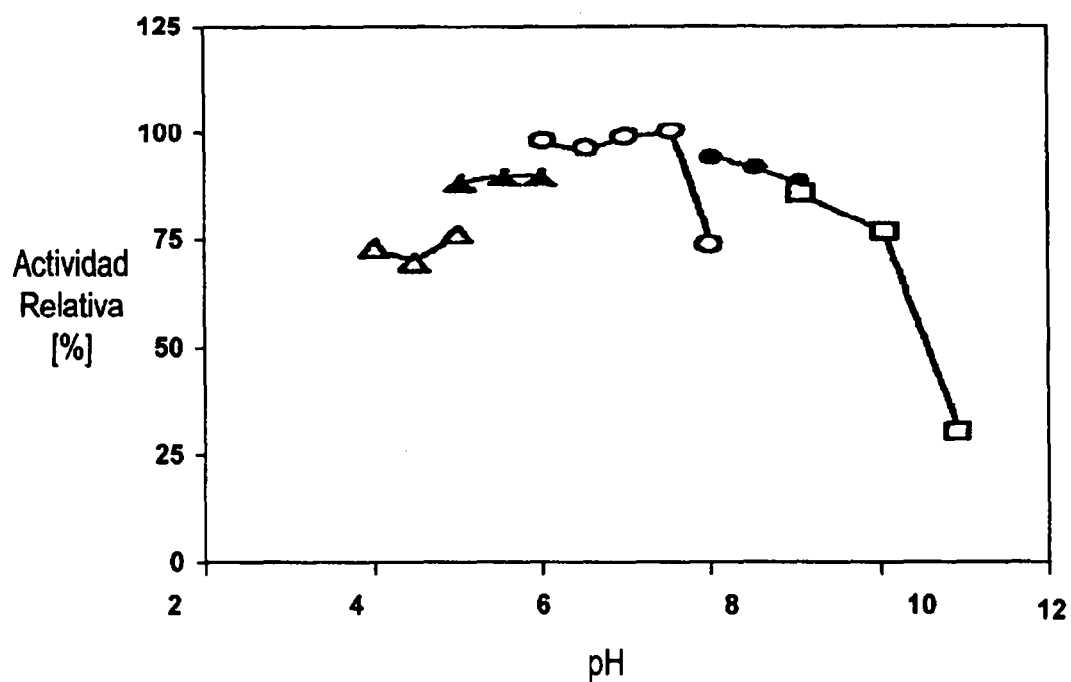


Figura 16



- △— Amortiguador de Acetato
- ▲— Amortiguador de Acetato
- Amortiguador de Fosfato de Potasio
- Amortiguador de Tris - HCl
- Amortiguador de Carbonato Ácido de Sodio

Figura 17



—Δ— Amortiguador de Acetato

—▲— Amortiguador de Acetato

—○— Amortiguador de Fosfato de Potasio

—●— Amortiguador de Tris - HCl

—□— Amortiguador de Carbonato Ácido de Sodio