



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 323 462**

51 Int. Cl.:
C12N 9/88 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04713857 .3**

96 Fecha de presentación : **24.02.2004**

97 Número de publicación de la solicitud: **1613748**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **11.01.2006**

54 Título: **R-hidroxinitrilo liasas con una aceptación mejorada por el sustrato y su utilización.**

30 Prioridad: **20.03.2003 AT A 447/2003**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.07.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.07.2009

73 Titular/es:
DSM Fine Chemicals Austria Nfg GmbH & Co. KG.
St.-Peter-Strasse 25
4021 Linz, AT

72 Inventor/es: **Skranc, Wolfgang;**
Glieder, Anton;
Gruber, Karl;
Weis, Roland y
Luiten, Ruud

74 Agente: **Lehmann Novo, María 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

R-hidroxinitrilo liasas con una aceptación mejorada por el sustrato y su utilización.

Los procedimientos biocatalíticos han adquirido una gran importancia para la industria química. La realización de reacciones químicas mediando toma de ayuda de catalizadores biológicos es interesante, en este caso, sobre todo en aquellos sectores de utilización, en los que se puede aprovechar la propiedad, que se presenta frecuentemente, de ciertas enzimas de convertir o formar de manera preferente uno de los dos enantiómeros, en el caso de reacciones químicas con componentes quirales o proquirales.

Unas premisas esenciales para el aprovechamiento de estas favorables propiedades de ciertas enzimas son su disponibilidad en unas cantidades requeridas técnicamente y con una reactividad lo suficientemente alta, así como una estabilidad en las condiciones reales de un procedimiento técnico.

Una clase especialmente interesante de compuestos químicos quirales la constituyen las cianhidrinas. Las cianhidrinas son importantes, por ejemplo, en el caso de la síntesis de α -hidroxiácidos, α -hidroxicetonas y β -aminoalcoholes, que encuentran utilización para la obtención de sustancias biológicamente activas, p.ej. sustancias activas farmacéuticas, vitaminas o compuestos piretroides.

La preparación de estas cianhidrinas se efectúa mediante una reacción por adición de ácido cianhídrico con el grupo carbonilo de una cetona o de un aldehído.

La preparación a escala técnica de compuestos quirales, tales como, por ejemplo, (S)-cianhidrinas, se pudo realizar mediante el descubrimiento de la enzima (S)-hidroxinitrilo liasa procedente de *Hevea brasiliensis*, y se describe, por ejemplo, en el documento de solicitud de patente internacional WO 97/03204, y en los documentos de patentes europeas EP 0.951.561 y EP 0.927.766.

Sin embargo, existe una gran cantidad de compuestos químicos interesantes, en los que los enantiómeros R son importantes para ciertas aplicaciones técnicas. Hasta ahora sólo se describieron unos procedimientos para la producción de una serie de productos, que sólo se pueden emplear a la escala del laboratorio (véanse p.ej.: los documentos EP 0.276.375, EP 0.326.063 y EP 0.547.655). En estos casos, se emplearon predominantemente unas preparaciones enzimáticas, que se habían obtenido a partir de plantas de la familia de las Rosaceae, por ejemplo, a partir de los corazones de almendras (*Prunus amygdalus*). Otras *R*-HNL's empleadas hasta ahora son, por ejemplo, las de plantículas de semillas de lino (*Linum usitatissimum*; *Lu*HNL), que fueron clonadas como el primer gen de una *R*-HNL y expresados en *E. Coli* y *Pichia pastoris*, o una *R*-HNL procedente de *Phlebodium aureum*.

Hasta ahora no se han realizado aplicaciones técnicas a mayor escala. La causa esencial de esto es que las preparaciones enzimáticas a base de plantas de la familia Rosaceae con actividad de hidroxinitrilo liasa (HNL) o para las de plantículas de semillas de lino no estaban a disposición hasta ahora en unas cantidades suficientes y con unos costes soportables, y además, que ellas mostraban una estabilidad demasiado pequeña a muy bajos valores del pH.

Con el fin de obtener unos productos con una alta pureza óptica, en la bibliografía se describen como ventajosos parámetros de reacción, unas muy bajas temperaturas (véase p.ej. Persson y colaboradores: Enzyme and Microbial Technology 30(7), 916-923; 2002), un valor del pH situado por debajo de 4 (véase p.ej. Kragl y colaboradores: Annals of the New York Academy of Science; 613 (enzyme Eng. 10), 167-75, 1990), así como la utilización de sistemas de 2 fases (véase por ejemplo, el documento EP 0.547.655) o de emulsiones (véase p.ej. el documento EP 1.238.094).

Desafortunadamente, la mayoría de las *R*-HNL's tienen, a un valor del pH situado por debajo de 4, unos períodos de tiempo de semidesintegración de menos que una hora.

A partir del documento de solicitud de patente europea EP 1.223.220 A1 se conocen unas enzimas recombinantes, que se preparan mediante clonación de un gen de *Prunus amygdalus*, que codifica una isoenzima *R*-HNL, por ejemplo la isoenzima 5 (*Pa*HNL5), así como mediante expresión heteróloga, por ejemplo, en *Pichia pastoris*, que se distinguen, tal como se desprende de los Ejemplos, por una estabilidad esencialmente aumentada a unos muy bajos valores del pH en comparación con las otras *R*-HNL's conocidas.

Como desventaja se comprobó una aceptación no satisfactoria por el sustrato, puesto que la conversión de algunos sustratos, en presencia de, por ejemplo, una *Pa*HNL5 recombinante, se efectúa con una velocidad de reacción manifiestamente más pequeña que en presencia de preparaciones de (*R*)-HNL naturales de procedencia vegetal, procedentes de corazones de almendra, que se pueden adquirir comercialmente.

Fue misión del invento, por lo tanto, poner a punto *R*-hidroxinitrilo liasas de la familia de las Rosaceae, que se puedan poner a disposición por primera vez para conversiones técnicas a una escala industrial en una cantidad suficiente y de una manera barata, y que tengan una aceptación mejorada por el sustrato, así como una estabilidad aumentada.

Objeto del invento son, por consiguiente, unas *R*-hidroxinitrilo liasas con una aceptación mejorada por el sustrato y una estabilidad aumentada, que están caracterizadas porque, en el centro activo de las *R*-hidroxinitrilo liasas, un resto de alanina está sustituido por uno de glicina.

Las *R*-HNL's conformes al invento son unas mutantes de *R*-hidroxinitrilo liasas procedentes de *Prunus amygdalis* (*PaHNL*) o de *Prunus serotina* (*PsHNL*).

Como *R*-HNL's naturales se emplean preferiblemente *R*-HNL's procedentes de *Prunus amygdalis* (*PaHNL*), de *Prunus domestica* (*PdHNL*) o de *Prunus serotina* (*PsHNL*).

R-HNL's recombinantes preferidas son las *R*-HNL's *PaHNL1* hasta *PaHNL5* recombinantes que se describen en el documento EP 1.223.220, siendo preferida en particular la *PaHNL5* recombinante.

La producción de las *R*-HNL's conformes al invento se efectúa mediante una mutagénesis específica para un sitio, por ejemplo por medio de los estuches Quick Change (XL) Site Directed Mutagenesis Kit, Quick Change Multi Site Directed Mutagenesis Kit (de la entidad Stratagene), así como de estuches de Invitrogen o Promega, etc., según las instrucciones del fabricante, o de acuerdo con otros métodos usuales, tales como los que se describen, por ejemplo, en Current Protocols in Molecular Biology [Protocolos actuales en biología molecular], Ausubel y colaboradores, 2003.

Los estuches para la mutagénesis dirigida a un sitio son unos sistemas prestos para el uso para la producción de unos mutantes específicos y son distribuidos comercialmente, por ejemplo, por la entidad Stratagene Cloning Systems, La Jolla CA (EE.UU.).

En el caso de la mutagénesis dirigida a un sitio conforme al invento, en el centro activo de la *R*-HNL se sustituye un radical de alanina por uno de glicina.

Para la conversión de sustratos grandes, tales como, por ejemplo, de aldehídos o de cetonas aromáticos(as) con radicales voluminosos, o respectivamente con sustituyentes situados en posición orto o meta, o de aldehídos o cetonas alifáticos(as) voluminosos(as), se intercambia de manera preferida una alanina por una glicina.

Se prefieren especialmente las mutantes de las *R*-hidroxinitrilo liasas recombinantes *PaHNL1* - *PaHNL5* que se conocen, por ejemplo, a partir del documento EP 1.223.220.

Se prefieren en particular las mutantes de la *R*-hidroxinitrilo liasa recombinante *PaHNL5*, en la cual en el centro activo el radical alanina en la posición 111 está sustituido por uno de glicina.

Las numeraciones parten de las correspondientes posiciones en la *R*-hidroxinitrilo liasa recombinante *PaHNL5* inalterada madura (véase la Figura 2), pero las posiciones se pueden desplazar correspondientemente por medio de las modificaciones de la secuencia, que se han expuesto más arriba, tales como, por ejemplo, un acortamiento o una prolongación de la secuencia.

A continuación, se efectúa la expresión secretoria en unos microorganismos adecuados, tal como, por ejemplo, en *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae* o *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Kluyveromyces lactis*, *Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum*, *Pichia methanolica*, *Pichia polymorpha*, *Pichia anomala*, *Schizosaccharomyces pombe*, etc.

La purificación de las resultantes mutantes de *R*-HNL conformes al invento, se efectúa según métodos clásicos, por ejemplo, análogamente a Dreveny y colaboradores; Structure (Cambridge; MA, EE.UU.) 9(9), 803-815; 2001.

Las mutantes de *R*-HNL conformes al invento se adecuan para la preparación de *R*- ó *S*-cianhidrinas puras en cuanto a los enantiómeros, con una velocidad de conversión aumentada con respecto al estado de la técnica, distinguiéndose las mutantes de *R*-HNL conformes al invento también por una alta estabilidad frente al pH a unos bajos valores del pH.

Un objeto adicional del invento es, por consiguiente, la utilización de las mutantes de *R*-HNL conformes al invento para la preparación de *R*- ó *S*-cianhidrinas puras en cuanto a los enantiómeros.

En particular, las mutantes de *R*-HNL conformes al invento se emplean en los casos de aldehídos y cetonas alifáticos(as) y aromáticos(as) como sustratos.

Por aldehídos se deben de entender en este caso aldehídos alifáticos, aromáticos o heteroaromáticos. Por aldehídos alifáticos se deben de entender en este caso aldehídos saturados o insaturados, alifáticos, lineales, ramificados o cíclicos. Aldehídos alifáticos preferidos son unos aldehídos lineales o ramificados que tienen en particular de 2 a 30 átomos de C, de manera preferida de 4 a 18 átomos de C, que están saturados o insaturados una vez o múltiples veces. El aldehído puede tener en este caso tanto enlaces C-C dobles como también enlaces C-C triples. Los aldehídos alifáticos, aromáticos o heteroaromáticos pueden estar adicionalmente sin sustituir o sustituidos con grupos inertes en las condiciones de reacción, por ejemplo con grupos arilo o heteroarilo eventualmente sustituidos, tales como grupos fenilo, fenoxi o indolilo, con grupos halógeno, hidroxilo, hidroxilo-alquilo de C₁-C₅, alcoxi de C₁-C₅, (alquil de C₁-C₅)-tio, de éter, de alcohol, de éster de ácido carboxílico, nitro o azido.

Ejemplos de aldehídos alifáticos preferidos son butanal, 2-butenal, 3-fenil-propanal, aldehído hidroxipivalico, etc.

Ejemplos de aldehídos aromáticos o heteroaromáticos son benzaldehído o respectivamente benzaldehídos sustituidos diversamente tales como, por ejemplo, 2-cloro-benzaldehído, 3-cloro-benzaldehído, 4-cloro-benzaldehído,

ES 2 323 462 T3

3,4-difluoro-benzaldehído, 3-fenoxi-benzaldehído, 4-fluoro-3-fenoxi-benzaldehído, hidroxibenzaldehídos, metoxibenzaldehídos, además furfural, metil-furfural, antraceno-9-carbaldehído, furano-3-carbaldehído, indol-3-carbaldehído, naftaleno-1-carbaldehído, ftalodialdehído, pirazol-3-carbaldehído, pirrol-2-carbaldehído, tiofeno-2-carbaldehído, isoftalaldehído o piridina-aldehídos, tienil-aldehídos, etc.

Las cetonas son unas cetonas alifáticas, aromáticas o heteroaromáticas, en las que el átomo de carbono del carbonilo está sustituido de manera desigual. Por cetonas alifáticas se deben de entender unas cetonas saturadas o insaturadas, lineales, ramificadas o cíclicas. Las cetonas pueden estar saturadas o insaturadas una vez o múltiples veces. Ellas pueden estar sin sustituir, o estar sustituidas con grupos inertes en las condiciones de reacción, por ejemplo con grupos arilo o heteroarilo eventualmente sustituidos, tales como grupos fenilo o indolilo, con grupos halógeno, de éter, de alcohol, de ésteres de ácidos carboxílicos, nitro o azido.

Ejemplos de cetonas aromáticas o heteroaromáticas son acetofenona, indolil-acetona, etc.

Los aldehídos y las cetonas, que se adecuan conforme al invento, son conocidos(as) o se pueden preparar de una manera usual.

Los substratos se hacen reaccionar en presencia de las HNL's conformes al invento con un compuesto donante de grupos cianuro.

Como compuesto donante de grupos cianuro entran en consideración ácido cianhídrico, cianuros de metales alcalinos o una cianhidrina de la fórmula general I



En la fórmula I, R_1 y R_2 significan, independientemente uno de otro, hidrógeno o un grupo hidrocarbilo sin sustituir, o R_1 y R_2 significan en común un grupo alquileo con 4 o 5 átomos de C, no significando R_1 y R_2 al mismo tiempo hidrógeno. Los grupos hidrocarbilo son grupos alifáticos o aromáticos, de manera preferida grupos alifáticos. De manera preferida R_1 y R_2 significan grupos alquilo con 1 - 6 átomos de C, se prefiere totalmente el compuesto donante de grupos cianuro cianhidrina de acetona.

La preparación del compuesto donante de grupos cianuro se puede efectuar según procedimientos conocidos. Las cianhidrinas, en particular la cianhidrina de acetona, se pueden adquirir también comercialmente.

De manera preferida, se emplea como compuesto donante de grupos cianuro ácido cianhídrico (HCN), KCN, NaCN o la cianhidrina de acetona, de manera especialmente preferida ácido cianhídrico.

El ácido cianhídrico puede ser liberado, en este caso, tan sólo poco antes de la reacción a partir de una de sus sales tales como, por ejemplo, NaCN o KCN, y se añade en sustancia o en una forma disuelta a la mezcla de reacción.

La reacción se puede llevar a cabo en un sistema orgánico, acuoso o de 2 fases, o en emulsión, así como en sustancia.

Como sistema acuoso se utiliza una solución acuosa o una solución tamponadora, que contiene la HNL conforme al invento. Ejemplos de ellas son un tampón de citrato de Na, un tampón de fosfato, etc.

Como agente diluyente orgánico se pueden utilizar unos hidrocarburos alifáticos o aromáticos, que no son miscibles o tan sólo escasamente miscibles, los cuales están eventualmente halogenados, alcoholes, éteres o ésteres, o mezclas de éstos, o se puede utilizar el substrato propiamente dicho. De manera preferida, se emplean metil-terc.-butil-éter (MTBE), diisopropil-éter, dibutil-éter y acetato de etilo, o mezclas de éstos.

Las HNL's conformes al invento se pueden presentar o bien como tales o inmovilizadas en el agente diluyente orgánico, pero la reacción se puede efectuar también en un sistema de dos fases o en emulsión con una HNL no inmovilizada. La reacción se efectúa en este caso a unas temperaturas de -10°C hasta +50°C, de manera preferida a -5°C hasta +45°C.

El valor del pH de la mezcla de reacción puede ser de 1,8 a 7, de manera preferida de 2 a 4 y de manera especialmente preferida de 2,5 a 3,5.

Ejemplo 1

Clonación del gen *PaHNL4* procedente de *Prunus amygdalus*

Se produjeron unos cebadores de PCR específicos para un gen, que se basan en la homología de secuencias del gen *mdl4* de *Prunus serotina*:

La amplificación se efectuó en un tanda de 50 μ l con 1,2 U de la polimerasa de ADN Taq "Hotstar" (de Qiagen, Hilden, Alemania), con 50 ng de un ADN genómico de almendra (aislado a partir de corazones de almendras Farmgold,

número de carga L4532, cosecha de 1999) como “molde”, en cada caso 10 pmol de los cebadores mandlp2f (oBT2204) y mandlp5r (oBT2206), 5 µl de una mezcla de dNTPs (nucleótido - trifosfatos) (en cada caso 2 mM), todos ellos en 1 x tampón para PCR correspondientemente al manual del estuche Hotstar (en inglés “Hotstar Kit”) (de Qiagen, Hilden, Alemania), comenzando con una etapa de desnaturalización durante 15 minutos a 95°C, seguida por 10 ciclos (1 min a 94°C, 1 min a 45°C; 1 min a 72°C,) para la amplificación previa, por otros 20 ciclos (1 min a 94°C, 1 min a 68°C, 1 min a 72°C) para la amplificación de productos específicos, y por una incubación final durante 5 min a 72°C. Mediante esta PCR se obtuvo un fragmento de ADN con el tamaño de aproximadamente 2,2 kb [kilobases] (comprobado por un análisis mediante electroforesis en gel de agarosa). Este producto de la PCR se purificó a partir de un gel de agarosa mediante el “Qiaquick Kit” [estuche Qiaquick] (de Qiagen, Hilden, Alemania) correspondientemente al manual adjunto, se introdujo por clonación en el vector de clonación pBSSK(-) a través de los sitios de corte con *EcoRI*, y mediante utilización del estuche “Dye Deoxy Terminator Cycle Sequencing” [secuenciación con ciclo de terminador desoxi y colorante] (de Applied Biosystems Inc., Forster City, CA, EE.UU.) se secuenció según la estrategia de la migración de cebadores (en inglés “primer walking”). A partir de las regiones 5' y 3' del ADN se derivaron nuevos cebadores de PCR y se emplearon para una renovada PCR. En este caso, se escogió la siguiente tanda de reacción: 20 ng de un ADN genómico, en cada caso 10 pMol de los dos cebadores pamhnl4a (oBT2544) y pamhnl4e (oBT2543), 2 µl de una mezcla de dNTPs (en cada caso 5 mM), 1 x tampón para PCR Hotstar y 1,2 U de la polimerasa de ADN Hotstar (de Qiagen, Hilden, Alemania). La amplificación se efectuó después de una etapa de 15 minutos a 95°C con 30 ciclos (de 1 min a 94°C, 30 s a 60°C, 2 min a 72°C) y de 15 min a 72°C. El producto de la PCR se purificó 2 veces a través de columnitas de Qiaquick (de Qiagen, Hilden, Alemania) y se secuenció directamente, con el fin de evitar errores en las secuencias de los productos clonados de la PCR. En la secuencia de ADN obtenida del fragmento de PCR, que tiene una longitud de en total 2.232 pares de bases, se identificaron los exones y a partir de la secuencia codificadora se derivó la secuencia proteínica de la isoenzima PaHNL4.

oBT2204 mandlp2f: 5'-ACTACGAATTCGACCATGGAGAAATCAAC-3'

oBT2206 mandlp5r: 5'-CACTGGAATTCAAAGAGCAACACTTATCCACGG-3'

oBT2543 pamhnl4e: 5'-AAGAGGAACACTTAGCCACG-3'

oBT2544 pamhnl4a: 5'-CAACAATGTCCGCTGTAGTG-3'

Ejemplo 2

Intercambio de la secuencia de señal

Como extremo terminal de N de la proteína madura calculada (la proteína segregada después de una separación del péptido de señal y de la secuencia GluAlaGluAla adicional) se escogieron 2 variantes, a fin de evitar una acumulación de una enzima procesada de una manera incompleta en el interior de la célula:

A) Leucina como aminoácido en el terminal de N, tal como se presenta también en la secuencia de tipo salvaje y que es considerada como aminoácido primariamente desestabilizador según la regla del extremo terminal de N (Varshavsky y colaboradores, Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America, 93 (22), 12.142-12.149, 1996).

B) Glutamina (mutación L1Q) como aminoácido en el terminal de N, que se describe como aminoácido terciariamente desestabilizador (Varshavsky y colaboradores, 1996).

PCR I

La secuencia de señal del factor de apareamiento alfa de *Saccharomyces cerevisiae* se amplificó grandemente a partir del molde pPICZB (de Invitrogen Inc, San Diego, Ca, nº de catálogo V19520). Los cebadores de PCR se construyeron de tal manera que se destruía el sitio de corte con *EcoRI* del plásmido de Invitrogen junto al extremo 3' de la secuencia de señal. De esta manera, se proporcionó la posibilidad de clonar la construcción génica total, inclusive la secuencia de señal, a través de los sitios de corte con *EcoRI* en diferentes vectores de expresión en *Pichia*. Para ello, se utilizaron los pares de cebadores alfa11/alfa21a o respectivamente alfa11/alfa21aQ. Los cebadores alfa11 y hnl5a21 contienen un sitio de corte con *EcoRI*. Los cebadores alfa21a o respectivamente alfa21aQ contenían también una región de la secuencia de ADN, que codifica el extremo 5' de la isoenzima madura PaHNL5. El cebador alfa21aQ contenía una modificación de la secuencia, que conduce a la mutación L1Q junto al extremo terminal de N de la proteína segregada madura esperada. Junto al extremo de la secuencia de señal del factor alfa se encontraba un sitio de disociación con Kex2 y una secuencia GluAlaGluAla procesada por Ste13,

La PCR se llevó a cabo en una tanda de 50 µl (10 ng del molde, en cada caso 0,1 µM de un cebador, 0,2 mM de dNTPs, 5 µl de un tampón para PCR, 1 U de la polimerasa *Pwo* de Roche) en un termociclador de Applied Biosystems (Forster City, CA, EE.UU.). Después de una etapa de desnaturalización durante 2 min a 94°C, se efectuó la amplificación en 30 ciclos (30 s a 94°C, 60 s a 62°C, 1 min 30 s a 72°C) y en una etapa de finalización durante 7 min a 72°C.

PCR II

El gen *hnl5* se amplificó grandemente a partir del plásmido pHILDPaHNL5a (BT4256) con los pares de cebadores *hnl5α11*/ *hnl5α21* o respectivamente *hnl5α11Q*/*hnl5α21*. Los cebadores *hnl5α11* y *hnl5α11Q* contenían también una
 5 región de la secuencia de ADN, que correspondía al extremo 3' del fragmento con la secuencia de señal del factor alfa (véase más arriba). El cebador *hnl5α21* contenía un sitio de corte con *EcoRI*.

La PCR se llevó a cabo en una tanda de 50 μ l (10 ng del molde, en cada caso 0,1 μ M de un cebador, 0,2 mM de dNTPs, 5 μ l de un tampón para PCR, 1 U de la polimerasa *Pwo* de Roche) en un termociclador de Applied Biosystems.
 10 Después de una etapa de desnaturalización durante 2 min a 94°C, se efectuó la amplificación en 30 ciclos (30 s a 94°C, 60 s a 65°C, 3 min 30 s a 72°C) y en una etapa de finalización durante 7 min a 72°C.

Prolongación del solapamiento

En cada caso 3 μ l de los dos productos de la PCR I y de la PCR II se emplearon como molde y al mismo tiempo como cebadores para una compleción destinada a proporcionar un producto coherente. La prolongación (en inglés extension) se efectuó en una tanda de 45 μ l con 5 μ l de un tampón para PCR de *Pwo*, 0,2 mM de dNTPs y 1 unidad de la polimerasa *Pwo* (de Roche, Mannheim, Alemania). La tanda se calentó durante 2 min a 94°C y luego se incubó con 10 ciclos durante 30 s a 94°C y durante 3 min a 72°C en el termociclador.
 20

PCR III

Para la amplificación del producto procedente de la prolongación del solapamiento, se utilizaron los cebadores *alfa11* y *hnl5α21*. A la tanda de la PCR para la prolongación del solapamiento se le añadieron 5 μ l de una mezcla de cebadores (3 μ l de agua y en cada caso 1 μ l del cebador *alfa11* o respectivamente *hnl5α21*, siendo de 5 μ M la concentración de los cebadores), y el producto se amplificó con 20 ciclos (30 s a 94°C, 45 s a 62°C, 4 min a 72°C). Para la finalización, se efectuó una incubación a 72°C durante 7 min. El producto de la PCR se purificó según el protocolo de purificación Qiaquick de Qiagen (Hilden, Alemania), se cortó con *EcoRI* y se clonó en el vector pHILD2 (de Invitrogen, San Diego, Ca).
 30

Secuencias de los cebadores

oBT2835 *alpha11*: 5'- tcttgaagaattcagcATGAGATTTCTTCAATTTTTACTGC- 3'

35 **oBT2841 *alpha21a*: 5'- gaagtattggcaagAGCTTCAGCCTCTCTTTTCTCG- 3'**

oBT2843 *alpha21aQ*: 5'- gaagtattggcttgAGCTTCAGCCTCTCTTTTCTCG- 3'

40 **oBT2837 *hnl5α11*: 5'- agagaggctgaagctCTTGCCAATACTTCTGCTCATG- 3'**

oBT2842 *hnl5α11Q*: 5'- agagaggctgaagctCAAGCCAATACTTCTGCTCATG- 3'

oBT2838 *hnl5α21*: 5'- atggtaccgaattcTCACATGGACTCTTGAATATTATGAATAG- 3'

45 Las prolongaciones están escritas en letras minúsculas.

Los plásmidos resultantes se denominaron pHILDPaHNL5α (BT4338) o respectivamente pHILD-PaHNL5α_L1Q (BT4339). La transformación en el seno de *Pichia pastoris* se efectuó según la prescripción general de Invitrogen.
 50

En cada caso 2.000 transformantes fueron inoculados con palillos esterilizados en placas de cultivo de pocillos profundos (en inglés deep well) y se cultivaron para el escrutinio en cuanto a transformantes activos.

Ejemplo 3

*Cultivación de transformantes en Pichia pastoris y producción de variantes de PaHNL5*a) *Microcultivos en placas de pocillos profundos*

60 250 μ l del medio BM0,5G (fosfato de potasio 0,2 M, de pH 6,0; 13,4 g/l de una base nitrogenada de levadura, 5 g/l de glicerol, 0,8 mg/l de biotina) en placas de pocillos profundos de 2 ml de capacidad, se inocularon con colonias individuales de transformantes y se sacudieron a 28°C y 340 rpm (revoluciones por minuto). La inducción de la expresión a través del promotor AOX1 se efectuó mediante una adición de 250 μ l del medio BMM2 (fosfato de potasio 0,2 M, de pH 6,0; 13,4 g/l de una base nitrogenada de levadura, 20 ml/l de metanol, 0,8 mg/l de biotina)
 65 después de 60 - 70 horas. Después de 10, 24 y 48 horas se efectuaron más entregas de metanol mediante una adición de cada vez 50 μ l de BMM10 (fosfato de potasio 0,2 M, de pH 6,0; 13,4 g/l de una base nitrogenada de levadura, 100 ml/l de metanol, 0,8 mg/l de biotina).

ES 2 323 462 T3

Aproximadamente a las 72 horas después de la inducción, las células se separaron por centrifugación y el material sobrenadante de cultivo se empleó directamente, diluido, o aumentado de concentración mediante una ultrafiltración a través de membranas de exclusión de 30 kDa Vivaspín de Sartorius (Göttingen, Alemania), para la medición de la actividad enzimática.

b) Aumento de la escala de tamaños (en inglés "scale-up") en matraces de sacudimiento

225 ml del medio BM0,5G (fosfato de potasio 0,2 M, de pH 6,0; 13,4 g/l de una base nitrogenada de levadura, 5 g/l de glicerol, 0,8 mg/l de biotina) en matraces con obstáculos de 2 l de capacidad se inocularon con un colonia individual grande y se sacudieron a 28°C y 120 rpm. La inducción de la expresión a través del promotor AOX1 se efectuó mediante una adición de 25 ml del medio BMM10 (fosfato de potasio 0,2 M, de pH 6,0; 13,4 g/l de una base nitrogenada de levadura, 100 ml/l de metanol, 0,8 mg/l de biotina) después de 60 - 70 horas. Después de 10, 24 y 48 horas se efectuaron más entregas de metanol de 2,5 ml por cada matraz de sacudimiento (250 ml).

Aproximadamente a las 72 horas después de la inducción, las células se separaron por centrifugación y el material sobrenadante de cultivo se empleó directamente, diluido, o aumentado de concentración mediante ultrafiltración a través de membranas de exclusión de 30 kDa, para la medición de la actividad enzimática.

Ejemplo 4

Mutagénesis específica para un sitio

10 ng del plásmido de expresión *pHILDPaHNL5 α _L1Q* (*PaHNL5* con la secuencia de señal del factor alfa) se emplearon como molde para la reacción de mutagénesis mediante el estuche Quik Change XL Site Directed Mutagenesis de Stratagene (nº de catálogo 200516). Para la reacción se emplearon en cada caso 200 ng de los dos cebadores para la mutagénesis. Se utilizó el siguiente programa de temperaturas:

A) Desnaturalización a 95°C durante un minuto

B) 18 ciclos con 50 s a 95°C, 50 s a 60°C y 20 min a 68°C

C) Prolongación durante 7 min a 68°C

El ADN de molde se digirió con *Dpn* tal como se describe en el protocolo del estuche, y 2 μ l de la tanda se emplearon tal como se describe para la transformación de células *E. coli* XL10 Gold ultracompetentes. A partir de los transformantes se preparó un ADN plasmídico y se secuenció. Los plásmidos de las mutantes con una secuencia correcta en la región de la inserción de ADN codificadora se multiplicaron y se transformaron con ayuda de la prescripción patrón de trabajo de Invitrogen en el seno de *Pichia pastoris* GS115.

Varios cientos de transformantes en *Pichia*, que son autótrofos en cuanto a histidina, se cultivaron tal como se ha descrito antes, en placas de pocillos profundos y la actividad de los materiales sobrenadantes de cultivo se determinó con mandelonitrilo racémico en placas de 96 pocillos. Se seleccionaron los clones con la actividad enzimática más alta en cada caso de las mutantes individuales. La actividad enzimática de los materiales sobrenadantes de cultivo se determinó con el sustrato mandelonitrilo (de DSM Fine Chemicals Linz, Austria).

Se llevaron a cabo las siguientes mutaciones:

A111G, A111L, A111V, F72A, L331A y L343A, al igual que como ensayo de comparación, V317A y V317G.

Cebadores de PCR para la mutagénesis específica para un sitio

oBT2966 oPaHNL5A111Gf:

5'-GTGGCACGACCATAATCAATGGAGGCGTCTACGCCAGAGCTAAC-3'

oBT2967 oPaHNL5A111Gr:

5'-GTTAGCTCTGGCGTAGACGCCTCCATTGATTATGGTCGTGCCAC-3'

oBT3080 oPaHNL5A111Lf

5' GCACGACCATAATCAATGCTTGCGTCTACGCCAGAGCTAAC 3'

oBT3081 oPaHNL5A111Lr

5' GTTAGCTCTGGCGTAGACGCAAGCATTGATTATGGTCGTGCCAC 3'

oBT3078 oPaHNL5A111Vf

5' GTGGCACGACCATAATCAATGGTTGCGTCTACGCCAGAGCTAAC 3'

oBT3079 oPaHNL5A111Vr

5' GTTAGCTCTGGCGTAGACGCAACCATTTGATTATGGTCGTGCCAC 3'

oBT2983 oPaHNL5V317(A,G)f:

5' TCCAATTGAAGCCTCTGTTGSAACTGTTTTAGGCATTAGAAGTG 3'

oBT2984 oPaHNL5V317(A,G)r:

5' CTAATGCCTAAAACAGTTSCAACAGAGGCTTCAATTGGATTTGG 3'

oBT3017 oPaHNL5F72Af:

5' CACGTTGACTGCAGATGGGGCTGCATATAATCTGCAGCAACAAG 3'

oBT3018 oPaHNL5F72Ar:

5' CTTGTTGCTGCAGATTATATGCAGCCCCATCTGCAGTCAACGTG 3'

oBT3019 oPaHNL5L343Af:

5' CCACTCCACCCTTTAGTGCTTTTCCTACAACATCTTACCCCCTC 3'

oBT3020 oPaHNL5L343Ar:

5' AAGATGTTGTAGGAAAAGCACTAAAGGGTGGAGTGGAAAATGGC 3'

oBT3021 oPaHNL5L331Af:

5' AGTGATTATTATCAAGTTTCTGCCTCAAGCTTGCCATTTTCCAC 3'

oBT3022 oPaHNL5L331Ar

5' GGAAAATGGCAAGCTTGAGGCAGAACTTGATAATAATCACTTC 3'

S = G ó C

Ejemplo 5

Control de las secuencias mediante una "PCR de colonia"

Para el control de si no se había dejado pasar ningún error, en el caso de la transformación en *Pichia* o durante la selección de la cepa, el gen de HNL5 mutado integrado se amplificó mediante una PCR, y se secuenció en la región de la mutación que se había llevado a cabo.

Para ello, una colonia individual se suspendió con 0,5 ml de agua y se hirvió durante 30 min a 95°C. Esta tanda se centrifugó entonces durante 1 min a 13.500 rpm en una centrifugadora de mesa. 5 µl del material sobrenadante se emplearon como molde para la amplificación por PCR del gen hnl5 mutado. La tanda total, con un volumen de 50 µl, contenía además en cada caso 0,2 mM de los dos cebadores oBT2907 y oBT2908a, 0,2 mM de dNTP's, 1x tampón para PCR Hotstar (de Qiagen) y 2,5 U de la polimerasa de ADN Hotstar. La PCR de 3 etapas se efectuó en las siguientes fases:

Una vez a 95°C durante 15 min, luego 30 ciclos con 30 segundos a 94°C, 1 min a 55°C y 2,5 min a 72°C, y para finalizar una vez a 72°C durante 10 min.

ES 2 323 462 T3

3 μ l de esta tanda de PCR se emplearon, después de la amplificación, como molde para la reamplificación, con el fin de obtener una cantidad suficiente de material para la secuenciación del ADN. Las condiciones de reacción fueron las mismas que en la primera amplificación. El producto de la PCR procedente de la reamplificación se empleó después de una purificación realizada dos veces según el método Qiaquick de Qiagen para la secuenciación.

oBT2907: 5'- GCAAATGGCATTCTGACATCC -3'

oBT2908a: 5'- GACTGGTTCCAATTGACAAGC -3'

Los transformantes, que expresaban las mutantes de *PaHNL5*, fueron aislados y se secuenció la región de la mutación para el control según el método de PCR de colonia.

En la Tabla 1 se representa una recopilación de las respectivas cepas de expresión de las mutantes:

TABLA 1

Modificaciones introducidas en el gen pahl5

Secuencia de señal	Nombre del clon de Pichia	N° del clon de Pichia	Plásmido para la transformación en Pichia	Intercambio de aminoácidos	Secuencia de ADN
Señal de <i>PaHNL5</i> vegetal	GS115pHILDPaHNL1a37	BT2578	BT4256		
Factor alfa	GS115pHILDPaHNL5alfa_G13	BT2617	BT4338		
Factor alfa	GS115pHILDPaHNL5alfaL1Q_H21	BT2620	BT4339	L1Q	CTT->CAA
Factor alfa	GS115pHILDPaHNL5alfaL1Q, A111G (= sp1a8F9)	BT2621	BT4345	L1Q A111G	CTT->CAA GCA->GGA
Factor alfa	GS115pHILDPaHNL5alfaL1Q, V317A (= spA2.2)	BT2623	BT4375	L1Q V317A	CTT->CAA GTA->GCA
Factor alfa	GS115pHILDPaHNL5alfaL1Q, V317G (= spAa)	BT2624	BT4376	L1Q V317G	CTT->CAA GTA->GGA
Factor alfa	GS115pHILDPaHNL5alfaL1Q, F72A	BT2632	BT4400	L1Q F72A	CTT->CAA TTT->GCT
Factor alfa	GS115pHILDPaHNL5alfaL1Q, L331A	BT2633	BT4401	L1Q L331A	CTT->CAA CTG->GCC
Factor alfa	GS115pHILDPaHNL5alfaL1Q, L343A	BT2634	BT4402	L1Q L343A	CTT->CAA CTT->GCT
Factor alfa	GS115pHILDPaHNL5alfaL1Q, F72A, L331A	BT2635	BT4403	L1Q F72A L331A	CTT->CAA TTT->GCT CTG->GCC
Factor alfa	GS115pHILDPaHNL5alfaL1Q, F72A, L331A, L343A	BT2636	BT4404	L1Q F72A L331A L343A	CTT->CAA TTT->GCT CTG->GCC CTT->GCT
Factor alfa	GS115pHILDPaHNL5alfaL1Q, A111L	BT2637	BT4405	L1Q A111L	CTT->CAA GCA->CTA
Factor alfa	GS115pHILDPaHNL5alfaL1Q, A111V	BT2638	BT4406	L1Q A111V	CTT->CAA GCA->GTT

Ejemplo 6

Purificación y caracterización de variantes enzimáticas de Prunus amygdalus

Para la determinación de la actividad específica de las respectivas mutantes con diferentes sustratos, se llevaron a cabo en cada caso varios cultivos de los clones de expresión en matraces con sacudimiento. El material sobrenadante de cultivo se aumentó de concentración mediante ultrafiltración (tamaño de exclusión 30 kDa) con unas columnitas de centrifugación Vivaspin PES de 20 ml de capacidad, de Sartorius (Göttingen, Alemania), y a continuación se purificó por cromatografía.

Antes de la purificación el material sobrenadante de cultivo, aumentado de concentración, se equilibró mediante una dilución y una concentración repetidas con un tampón de fijación A (tampón de citrato-fosfato 20 mM, de pH 5,5) en módulos de centrifugación con ultrafiltración de 30 kDa (Vivaspin, de Sartorius) con el tampón de fijación A pobre en sales, y luego se purificó en una instalación ÄKTApurifier 10 FPLC de Amersham Biosciences UK Limited (Buckinghamshire, Reino Unido) a través de una columna intercambiadora de aniones Q-Sepharose Fast Flow (QFF) con un volumen de columna de 10 ml. La elución se efectuó con un tampón de elución B (tampón de citrato-fosfato 20 mM + NaCl 1 M, de pH 5,5), utilizándose el siguiente perfil de gradientes para las diferentes variantes de *PaHNL5* procedentes de la producción heteróloga con *Pichia pastoris*:

Un volumen de columna como etapa de lavado se manifestó como ideal para separar por lavado todos los componentes proteínicos no fijados. Dentro de una mitad del volumen de columna se aumentó a 4% la concentración del tampón B (tampón de elución: tampón de citrato-fosfato 20 mM, NaCl 1 M, de pH 5,5), para aumentarla seguidamente a 48% dentro de un volumen de columna adicional. En la siguiente etapa se aumentó a 70% la concentración del tampón de elución B, necesitándose aquí 1 ½ volúmenes de columna.

Finalmente, se aumentó la concentración dentro de un volumen de columna hasta el máximo de 100%, y para terminar se dejó allí para otro volumen de columna (etapa de lavado sin fraccionamiento).

De aquellas fracciones que, según una evaluación del cromatograma, deberían contener proteínas (dependiendo de localización del pico), se determinó el contenido de proteínas con el sistema de ensayo de proteínas Biorad (de Hercules, Ca)(método de Bradford) y se determinó la actividad enzimática con el sustrato mandelonitrilo. Las 2-3 fracciones con la actividad más alta, se agruparon y se emplearon para el análisis de las características enzimáticas. La determinación de la concentración de proteínas se llevó a cabo con un sistema de ensayo de proteínas Biorad (de Hercules, Ca)(método de Bradford). Como patrón para la producción de una línea de calibración sirvió una *PaHNL* natural de Sigma (M-6782 Lote 41H4016).

Los materiales sobrenadantes de cultivo se concentraron a ~20 veces mediante una filtración en flujo cruzado (en inglés "cross-flow") y se purificaron a continuación por cromatografía. De las enzimas purificadas se extrajeron unas muestras y se aplicaron directamente sobre un gel (Proteingel NuPAGE 4-12% Bis Gel 1 mm x 17 pocillos; de Invitrogen), o respectivamente ~500 ng con la endoglicosidasa H (#Po702L, de NEB), se desglicosilaron (según la prescripción contenida) y luego se aplicaron. Como patrón se utilizó el "SeeBlue Plus2 Pre-Stained Standard" de Invitrogen (Carlsbad, EE.UU.).

Como comparación de las especificidades para sustratos se midió la concentración de proteínas de las enzimas purificadas y se midió el contenido de proteínas en el material sobrenadante de cultivo con el sistema de ensayo de proteínas Biorad (de Hercules, Ca), y las actividades específicas se compararon fotométricamente con mandelonitrilo racémico o respectivamente con 2-, 3- y 4-cloro-benzaldehído mediante una GC (cromatografía de gases):

Para ello, se disolvieron 15 mMol de un sustrato en 2,1 ml de terc.-butil-metil-éter (MTBE). 0,25 mg de la correspondiente *PaHNL* se diluyeron con un tampón de K_2HPO_4 /citrato 50mM, de pH 3,4, hasta un volumen final de 3,7 ml, el tampón se ajustó de nuevo a un pH de 3,4 y luego se mezcló en redomas de vidrio con una capacidad de 20 ml, con el sustrato en MTBE. La solución se enfrió a 10°C y se añadieron 1,2 ml de HCN con una jeringa y se agitó en un agitador magnético para la formación de una emulsión a 10°C. En diferentes momentos se extrajeron muestras, se derivatizaron con anhídrido de ácido acético en presencia de piridina y diclorometano, y se analizaron mediante una GC en una columna de ciclodextrina (CP-Chirasil-Dex CB) o mediante una HPLC (cromatografía de fase líquida de alto rendimiento).

TABLA 2

Actividades específicas ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$)

Mutante	Mandelonitrilo (disociación)	2-Cl- benzaldehído	3-Cl- benzaldehído	4-Cl- benzaldehído
WT	295 +/- 30	n.d.	n.d.	n.d.
AlfaWT	325 +/- 30	92 +/- 30	260 +/- 120	514 +/- 80
A111G	8 +/- 3	402 +/- 90	482 +/- 60	458 +/- 50
V317G	6 +/- 1,5	<10 (racémico)	226 +/- 40	21 +/- 10

n.d. no determinado

WT: PaHNL5 con una secuencia de señal vegetal natural expresada

AlfaWT: PaHNL5 con la secuencia directora prepro del factor de apareamiento alfa (en "inglés alpha mating factor preproleader") de *S. cerevisiae*, la secuencia EAEA y la mutación L1Q

A111G: como AlfaWT, con la mutación adicional A111G

V317G: como AlfaWT, con la mutación adicional V317G (ensayo de comparación)

Las mediciones dieron como resultado, en comparación con las isoenzimas PaHNL5 recombinantes de tipo salvaje WT y AlfaWT, una actividad específica aproximadamente 3-5 veces más alta de la mutante A111G con el sustrato (R)-2-cloro-mandelonitrilo. También la actividad con 3-cloro-benzaldehído era más alta con la mutante A111G que con la AlfaWT.

Ejemplo 7

Producción de la mutante A111G

Del clon mejorado de *Pichia pastoris* GS115 pHILDPaHNL5alfa_L1Q,A111G (=BT2621) se produjo en una fermentación experimental una cantidad suficiente de la enzima para conversiones experimentales.

8 matraces con obstáculos (de 2 l de capacidad, de boca ancha) en cada caso con 250 ml de un medio BMG (según el protocolo patrón de Invitrogen) se inocularon con colonias individuales de la cepa de *Pichia pastoris* GS115pHILDPaHNL5alfa_L1Q,A111G y se sacudieron durante 36 horas a 28°C (a 120 rpm). Los productos químicos 1-9, dimensionados para 20 litros, se llevaron con agua desionizada hasta un peso total de 15 kg y se dispusieron previamente en un biorreactor de 40 l de capacidad (de MBR, Oftringen, Suiza). Después de una esterilización *in situ*, el valor del pH del medio se ajustó con amoníaco al 28%, a través de una bomba de afluencia estéril, a un pH de 5,0. Después de esto, se introdujeron en el biorreactor 200 ml de una "solución de elementos traza" filtrada en condiciones estériles (en común con vitamina H - biotina) a través de una botella de afluencia. Otros 200 ml de la "solución de elementos traza" se añadieron también una vez cada dos días hasta llegar al final de la fermentación. La inoculación se efectuó con 1,4 kg del cultivo previo procedente de los matraces de sacudimiento. El peso inicial del contenido del fermentador estaba situado en aproximadamente 15 kg. A una temperatura de trabajo de 28°C, con una aireación de 10-30 litros de aire/min y con un número de revoluciones del agitador comprendido entre 350 y 700 rpm, se mantuvo la presión parcial de oxígeno (pO₂) a un valor > 10% de la concentración de saturación. Después de 27 horas, la biomasa había aumentado hasta un valor de 122,8 g/l de peso en húmedo de las células o respectivamente de 30 g/l de peso en seco de las células (ZTG). A partir de este momento, por cada hora se añadieron dosificadamente en pequeñas porciones aproximadamente 70 g de glicerol estéril. En esta fase de crecimiento lineal se pudo conseguir, en un período de tiempo de 60 horas, una concentración de la biomasa situada en la región de 100 g/l de ZTG.

Después de esto, se comenzó la tercera fase con la inducción de la expresión mediante una adición dosificada de metanol. En este caso, se ajustó el contenido de metanol en el caldo de cultivo a un valor de 0,8-1% en peso. Con un consumo creciente de oxígeno en el transcurso de la fermentación, se añadió en cada caso de nuevo metanol (0,8-1 por ciento en peso). El aumento de la actividad enzimática se vigiló mediante una determinación fotométrica de la actividad en el material sobrenadante de cultivo de unas muestras, que se habían extraído del fermentador aproximadamente cada 12 horas. Después de 210 horas de inducción con metanol, el aumento de la actividad enzimática seguía siendo solamente muy pequeño y las células se cosecharon mediante una centrifugación realizada dos veces a 4.000 g durante 20 min, y se reunió el material sobrenadante de cultivo. La actividad enzimática en el material sobrenadante

ES 2 323 462 T3

de cultivo era, después de la centrifugación, de 3,3 U/ml (ensayo patrón de HNL con mandelonitrilo racémico), lo que se estableció, con un rendimiento total de aproximadamente 6,5 litros del material sobrenadante de cultivo de 14,3 kg de contenido del fermentador, un rendimiento enzimático de aproximadamente 22.000 U.

- 5 Mediante una filtración en flujo cruzado de $0,2\ \mu$ (VIVASCIENCE Vivaflow 50 de Sartorius, Göttingen, Alemania), el material sobrenadante de cultivo se purificó con respecto del material celular restante. La concentración se efectuó mediante una ultrafiltración en flujo cruzado con módulos de exclusión de tamaños de 30kDa, con un área de 50 cm^2 , de la entidad Sartorius. Así, se produjeron unos preparados enzimáticos con 24,5 U/ml y 57 U/ml para ensayos experimentales para la síntesis de cianhidrina. Puesto que el *Pichia pastoris* apenas segrega proteínas propias dentro del material sobrenadante de cultivo, la enzima producida y aumentada de concentración de esta manera era ya muy
10 pura en comparación con unos preparados enzimáticos vegetales.

Se utilizaron los siguientes productos químicos para la preparación del medio de cultivo (cantidad por litro):

- 15 1. ácido ortofosfórico al 85 % 35 ml
2. CaSO_4 0,68 g
20 3. K_2SO_4 18,8 g
4. $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 13,4 g
5. KOH 5,7 g
25 (los productos químicos 1 hasta 5 en calidad p.a.
(analíticamente pura)):

- 30 6. glicerol, calidad técnica 50 ml
7. agua desionizada, conductibilidad 5,5-9,1 $\mu\text{S}/\text{cm}$
35 8. agente antiespumante Acepol 83E al 10 % (de Carl
Becker Chemie GmbH, Hamburgo, Alemania) 1 ml
40 9. amoníaco al 25 %, calidad técnica 70 g/l

Elementos traza y vitamina H (todos los productos químicos en calidad p.a.):

- 45 10. biotina 0,8 mg
11. $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 24,0 mg
50 12. KI 0,32 mg
13. $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 12,0 mg
55 14. $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,2 mg
15. H_3BO_3 0,08 mg
60 16. CoCl_2 2,0 mg
17. $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 80 mg
18. $\text{Fe(II)SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 260 mg
65

Ejemplo 8

Reacciones preparativas con benzaldehído y 2-cloro-benzaldehído

- 5 Para el análisis de las propiedades enzimáticas en la síntesis preparativa se hicieron reaccionar 150 mMol de un sustrato en un reactor.

150 mM del sustrato se diluyeron o disolvieron con 21 ml de MTBE. 5 mg de la enzima "PaHNL5alfa_L1Q, A111G" (mutante A111G) se diluyeron con un tampón de K_2HPO_4 /citrato 50 mM, de pH 3,4, a un volumen de 37,5
 10 ml, y se ajustaron a un pH de 3,4 con ácido cítrico al 10%. Esta fase acuosa se cargó en la fase orgánica y se agitó durante 5 min en un agitador Schmizo KPG de 100 ml de capacidad. La temperatura se mantuvo a 10°C y se añadió dosificadamente HCN mediante una bomba de perfusión durante 1 hora. La mezcla de reacción se agitó a 10°C a 900 rpm. Para el tratamiento, la solución de reacción se diluyó con 140 ml de MTBE, se agitó durante 5 min y, después de 10 min, se separaron las fases. La fase acuosa se extrajo de nuevo con 40 ml de MTBE. Después de una separación
 15 espontánea de las fases, las fases orgánicas se reunieron, se estabilizaron con ácido cítrico y se concentraron por evaporación rotatoria. El análisis mediante GC se llevó a cabo tal como se ha descrito más arriba.

Las conversiones químicas proporcionaron después de 7 horas un rendimiento de 95,1% de la cianhidrina de 2-cloro-benzaldehído con un ee (exceso enantiomérico) de 95,7% o respectivamente un rendimiento de más de 99% de mandelonitrilo con un ee > 99%.

Ejemplo 9

25 *Estabilidad enzimática a un valor del pH muy bajo*

Las muestras enzimáticas de una PaHNL natural, adquirible comercialmente, procedente de corazones de almendra (de Sigma) y de la mutante A111G se diluyeron en un tampón de citrato-fosfato 50 mM de pH 6,5 durante tanto tiempo hasta que, después de una dilución adicional a 1:70, se debía de esperar un aumento de aproximadamente
 30 100 mOD en el caso de la determinación fotométrica de la actividad a 280 nm, según el ensayo patrón de la HNL con mandelonitrilo racémico. De estas diluciones se transfirieron 150 μ l a 900 μ l de un tampón de fosfato 0,1 M, con un valor del pH ajustado correspondientemente (dilución 1:7) y, después de una incubación a 22°C en diferentes momentos se emplearon entonces 100 μ l de estas diluciones para la determinación de la actividad (100 μ l de una solución enzimática, 700 μ l de un tampón de fosfato-citrato 1 M, de pH 5,0, y 200 μ l de mandelonitrilo 60 mM en
 35 un tampón de citrato-fosfato 3 mM, de pH 3,5). La estabilidad frente al pH de la mutante PaHNL5alfa-L1Q,A111G (A111G) a un pH de 2,6 en comparación con una PaHNL natural, adquirible comercialmente, procedente de corazones de almendra (de Sigma), se puede observar en la Figura 1.

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. *R*-hidroxinitrilo liasas procedentes de *Prunus amygdalus* o de *Prunus serotina*, **caracterizadas** porque se consigue una aceptación aumentada por el sustrato y una estabilidad aumentada mediante la sustitución de un resto de alanina por un resto de glicina en una posición correspondiente a la posición 111 en la secuencia de la *R*-hidroxinitrilo liasa *PaHNL5* recombinante inalterada madura.

2. *R*-hidroxinitrilo liasas de acuerdo con la reivindicación 1, que se pueden preparar mediante una mutagénesis específica para un sitio.

3. *R*-hidroxinitrilo liasas de acuerdo con la reivindicación 2, **caracterizadas** porque la preparación se efectúa mediante una mutagénesis específica para un sitio en un microorganismo escogido entre el conjunto formado por *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Kluyveromyces lactis*, *Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum*, *Pichia methanolica*, *Pichia polymorpha*, *Pichia anomala*, *Schizosaccharomyces pombe*.

4. Utilización de *R*-hidroxinitrilo liasas de acuerdo con una de las reivindicaciones 1-3 para la preparación de *R*- ó *S*-cianhidrinas puras en cuanto a los enantiómeros.

5. Procedimiento para la preparación de *R*- ó *S*-cianhidrinas puras en cuanto a los enantiómeros, **caracterizado** porque se hacen reaccionar aldehídos y/o cetonas alifáticos(as), aromáticos(as) o heteroaromáticos(as) con *R*-hidroxinitrilo liasas de acuerdo con una de las reivindicaciones 1-3 en el seno de un sistema orgánico, acuoso o de 2 fases, o en emulsión, o en sustancia, a una temperatura de -10°C hasta +50°C, y a un valor del pH de 1,8 a 7 en presencia de un compuesto donante de grupos cianuro.

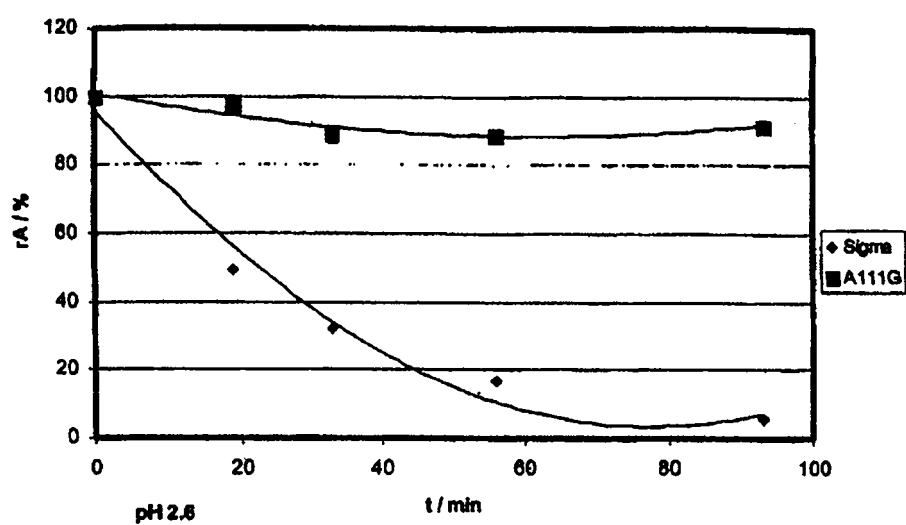


Figura 1:

La mutante PaHNL5alfa_L1Q,A11G (A111G) mostró una estabilidad muy buena a un valor del pH bajo en comparación con una PaHNL natural, adquirible comercialmente, procedente de corazones de almendra.

rA: actividad relativa en %

t/min: período de tiempo de incubación a un pH de 2,6 en minutos

ES 2 323 462 T3

Figura 2: Secuencia de una PAHNL5 inalterada, madura (documento EP 1.223.220)

1	11	21	31	41
LANTSARDES	YLKEVYNATD	TSSEGSYDYI	VIGGGTSGCP	LAATLSEKYK
51	61	71	81	91
VLLLERGTIA	TEYPNTLTAD	GFAYNLQQOD	DGKTPVERFV	SEDGIDNVRA
101	111	121	131	141
RILGGTTIIN	AGVYARANIS	FYSQTGIEWD	LDLVNKTYEW	VEDAIVVKPN
151	161	171	181	191
NQSWQSVIGE	GFLEAGILPD	NGFSLDHEAG	TRLTGSTFDN	NGTRHADEL
201	211	221	231	241
LNKGDPNLL	VAVQASVEKI	LFSSNTSNLS	AIGVIYTDSD	GNSHQAFVRG
251	261	281	291	301
NGEVIVSAGT	IGTPQLLLLS	GVGPESYLSS	LNITVVQPNP	YVGQFVYDNP
311	321	331	341	351
RNFINILPPN	PIEASVVTVL	GIRSDYYQVS	LSSLPFSTPP	FSLFPTTSYP
361	371	381	391	401
LPNSTFAHIV	SQVPGPLSHQ	SVTLNSSSDV	RIAPNIKFN	YSNSTDLANC
411	421	431	441	451
VSGMKFLGDL	LRTKALEPYK	ARDVLGIDGF	NYLGVELPEN	QTDDASPETF
461	471	481	491	501
CLDNVASYWH	YHGGSLVGKV	LDDSPRVMGI	KALRVVDAST	FPYEPNSHPQ
511	521	531	541	
GFYMLGRYV	GLQILQERSI	RLEAIEHQE	SM	