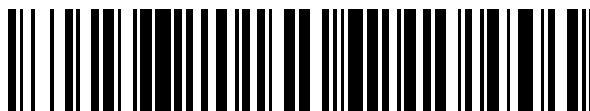


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 549 593**

51 Int. Cl.:

C07K 14/195 (2006.01)

C12N 9/42 (2006.01)

C12N 9/78 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.10.2011** **E 11791198 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.07.2015** **EP 2627666**

54 Título: **Nitrilasas con actividad mejorada**

30 Prioridad:

12.10.2010 EP 10013548

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
29.10.2015

73 Titular/es:

C-LECTA GMBH (100.0%)
Perlickstrasse 5
04103 Leipzig, DE

72 Inventor/es:

VOGEL, ANDREAS;
SCHWARZE, DANIEL y
GREINER-STÖFFELE, THOMAS

74 Agente/Representante:

AZNÁREZ URBIETA, Pablo

ES 2 549 593 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Nitrilasas con actividad mejorada

- La invención se refiere a nitrilasas de alta actividad y estabilidad a la temperatura. Las nitrilasas se utilizan para la síntesis de ácidos carboxílicos a partir de los nitrilos correspondientes. En comparación con los catalizadores químicos, se caracterizan por unas condiciones de reacción más suaves y se utilizan preferentemente para hidrólisis regioselectivas y estereoselectivas, para las que hasta la fecha no existe una alternativa química. La utilización de nitrilasas para la síntesis de ácidos carboxílicos se ha descrito en la literatura (R. Singh, R. Sharma, N. Tewari, y D. S. Rawat. *Chem Biodivers.* 3 (12):1279-1287, 2006).
- Para realizar un proceso de síntesis económico, preferentemente se utilizan nitrilasas que presentan una alta actividad específica y una larga estabilidad de proceso. Así, es posible utilizar una menor cantidad de catalizador. En la mayoría de los casos, una alta estabilidad de proceso está en correlación con una mayor estabilidad frente a la temperatura de las enzimas. Además, una enzima con una mayor estabilidad frente a la temperatura tiene la ventaja de permitir un desarrollo eficaz del proceso también a altas temperaturas, lo que con frecuencia conduce a unos tiempos de reacción todavía más cortos.
- Ya se han aislado nitrilasas de diferentes microorganismos, por ejemplo de los géneros *Aspergillus*, *Arthrobacter*, *Geobacillus*, *Fusarium*, *Norcadia*, *Rhodococcus*, *Alcaligenes*, *Acidovorax*, *Acinetobacter*, *Bradyrhizopium*, *Pseudomonas*, *Pyrococcus*, *Bacillus*. (R. N. Thuku, D. Brady, M. J. Benedik, y B. T. Sewell. *Journal of Applied Microbiology* 106 (3):703-727, 2009; C. O'Reilly y P. D. Turner. *Journal of Applied Microbiology* 95 (6):1161-1174, 2003.)
- La nitrilasa de *Acidovorax facilis* se describió por vez primera en el documento US 6.870.038. La expresión heteróloga de la enzima en *E. coli* condujo a un aumento de la actividad pro biomasa aproximadamente en un factor 3 (US 6.870.038).
- Una posibilidad para mejorar enzimas es la utilización de ingeniería enzimática. El objetivo de la ingeniería enzimática es desarrollar variantes de una enzima inicial con mejores propiedades.
- En S. Wu, A. J. Fogiel, K. L. Petrillo, E. C. Hann, L. J. Mersinger, R. DiCosimo, D. P. O'Keefe, A. Ben Bassat, y M. S. Payne. *Biotechnol Bioeng.* 97 (4):689-693, 2007, y en el documento US 7148051 se describen mutaciones para aumentar la actividad de una nitrilasa en la producción de ácido 3-hidroxivaleriánico. Un cambio de los aminoácidos en las posiciones T219 a A o C y en F168 a K, V o L condujo a un aumento de la actividad. Otras mutaciones de la nitrilasa de *Acidovorax facilis* se describen en S. Wu, A. J. Fogiel, K. L. Petrillo, R. E. Jackson, K. N. Parker, R. DiCosimo, A. Ben Bassat, D. P. O'Keefe, y M. S. Payne. *Biotechnol. Bioeng.* 99 (3):717-720, 2008, y en el documento US 7198927. En dichos documentos se describe un aumento de la actividad para la síntesis de ácido glicólico a partir de glicolonitrilo para las mutaciones individuales F168 a V, K, M, T, L201 a N, Q, K. H, S, T, A, G, y para algunas variantes con combinaciones de estas mutaciones individuales. En la variante F168V se comprobó además una mayor estabilidad a la temperatura de la suspensión celular enzimática en comparación con la célula que contiene la enzima natural. En este contexto se analizó la estabilidad frente a la temperatura del biocatalizador dentro de la célula intacta de *E. coli*, que en general influye positivamente en la estabilidad proteínica.
- El documento US 2009/111158 describe un procedimiento para la producción de catalizadores enzimáticos con actividad nitrilasa para la hidrólisis de glicolonitrilo con el fin de producir ácido glicólico.
- El documento WO 2006/069114 se refiere a un procedimiento para la producción de ácido glicólico a partir de formaldehído y ácido cianhídrico.
- El documento US 2010/240109 describe un procedimiento para mejorar la actividad específica de catalizadores enzimáticos con actividad nitrilasa en la reacción de glicolonitrilo para obtener ácido glicólico en medio acuoso.
- El documento WO 2006/069110 describe diversos métodos para la producción enzimática de ácido glicólico a partir de glicolonitrilo.
- K.T. Barglow y col., *Biochemistry* 2008, 47, 13514-13525 dan a conocer investigaciones funcionales y estructurales para el reconocimiento molecular en caso de enzimas de la familia de las nitrilasas.
- El documento EP 1 767 624 describe proteínas con actividad nitrilohidratasa mejorada y resistencia al calor mejorada.
- El documento de L. Martinkova y col., *Curr Op in Chem Biol*, tomo 14, nº 2, 2010, 130-137, se refiere a investigaciones de biotransformaciones con ayuda de nitrilasas.
- G. DeSantis y col., *J Am Chem Soc* 125(83), 2003, 11476-11477, dan a conocer la producción de nitrilasas productivas, sumamente enantioselectivas, con ayuda de mutagénesis por saturación (GSSM).

El documento de S. Chauvan y col., Appl Microbiol Biotech, tomo 61, nº 2, 2003, 118-122, se refiere a la purificación, clonación, secuenciación y sobreexpresión de una nitrilasa alifática regioselectiva a partir de Acidovorax facilis 72W en E. coli.

5 Los documentos US 2009/111162 A1 y US 2009/325250 A1 describen un procedimiento para mejorar la actividad específica de un catalizador enzimático con actividad nitrilasa en la transformación de gliconitrilo en ácido glicólico bajo condiciones de reacción acuosas.

10 La invención tiene como objetivo proporcionar una nitrilasa con propiedades mejoradas. En comparación con las nitrilasas conocidas, esta nitrilasa se debería caracterizar por una mayor actividad para reducir la cantidad utilizada de enzima o acortar los tiempos de reacción. Además, la nitrilasa debería presentar una mayor estabilidad, en particular una mayor estabilidad frente a la temperatura, para posibilitar una mayor vida útil durante la reacción catalizada por la misma. De este modo, la reacción se podría realizar con una menor cantidad de enzima durante más tiempo o con una alta velocidad de reacción a temperatura elevada.

Este objetivo se resuelve mediante el objeto de las reivindicaciones.

15 Sorprendentemente se han descubierto posiciones de aminoácidos en la secuencia proteínica de la nitrilasa de Acidovorax facilis (ID Sec. Nº 2) que mediante sustitución (cambio) de los aminoácidos en posiciones individuales y/o mediante combinación de varias posiciones presenta una actividad elevada con diferentes sustratos y/o una mayor estabilidad frente a la temperatura. Este efecto también se observa sorprendentemente en las enzimas aisladas que se encuentran fuera de células intactas. En particular, sorprendentemente se han podido identificar posiciones de aminoácidos en las que mutaciones individuales conducen simultáneamente a una mejora de la actividad y de la
20 estabilidad de la enzima. Del mismo modo, sorprendentemente también se han podido identificar posiciones de aminoácidos cuya combinación conduce a una mejora sinérgica de las propiedades relevantes de la enzima (posibilidad de combinación de las mutaciones individuales).

25 Gracias al aumento de la actividad es posible reducir la cantidad de enzima a utilizar o acortar los tiempos de reacción. Ambas posibilidades influyen positivamente en los costes de la síntesis y, en consecuencia, tienen importancia económica. La estabilidad mejorada, en especial la estabilidad frente a la temperatura de la enzima, posibilita una vida útil más larga durante la reacción. Así, la reacción se puede llevar a cabo con una cantidad menor de enzima durante más tiempo o la reacción se puede llevar a cabo a una alta velocidad de reacción a temperatura elevada. Las dos medidas conducen a reducir los costes de la síntesis.

30 En el gen de la nitrilasa de Acidovorax facilis se han podido identificar posiciones de aminoácidos que conducen a un aumento de la actividad y la estabilidad de la enzima. Esto se ha podido demostrar para las posiciones L9, V63, T70, R94, F168, L194, T208, C250, V305 y D308. Sorprendentemente, las sustituciones han conducido tanto a un aumento de la actividad en las posiciones L9, V63, T70, F168, T208, C250 como a un aumento de la estabilidad frente a la temperatura en las posiciones L9, V63, T70, R94, F168, C250, V305. Sorprendentemente se ha comprobado que es posible combinar sustituciones en las posiciones individuales, lográndose un aumento adicional de la actividad y la
35 estabilidad frente a la temperatura.

Definiciones

Enzima inicial

40 El concepto "enzima inicial" se refiere a la nitrilasa de Acidovorax facilis según la ID Sec. 2, que es codificada mediante la secuencia de nucleótidos correspondiente a la Sec. 1. La enzima se puede producir por expresión heteróloga. En este contexto, un gen con una secuencia de nucleótidos que codifica la enzima inicial se incorpora en un vector de expresión correspondiente y se introduce en una célula huésped. Como células huésped son adecuadas las cepas del género Escherichia, Bacillus, Saccharomyces, Pichia, Hansenula y Kluyveromyces.

Sustitución

45 Mediante la modificación de la secuencia de los aminoácidos en el polipéptido de la enzima inicial se logra una mejora de sus propiedades. En la sustitución, un aminoácido se reemplaza por otro. También es posible sustituir varios aminoácidos de forma sucesiva o simultánea.

Actividad

50 La actividad de la enzima nitrilasa se mide mediante observación de la reacción catalizada por la misma de la hidrólisis de nitrilos para obtener ácidos carboxílicos. En este contexto se utilizan diversos nitrilos, como 2-metilglutaronitrilo (2MG), 1-(cianometil)ciclohexano-1-carbonitrilo (CH-dinitrilo) o benzonitrilo. Una unidad enzimática corresponde a la hidrólisis de 1 µmol de nitrilo en 1 minuto bajo condiciones definidas y se indica en unidades (U). El análisis de la reacción se lleva a cabo normalmente por análisis CG o HPLC. Las condiciones estándar para las investigaciones aquí descritas son: 2MG 5 mM en tampón fosfato de potasio 100 mM pH 7,0 se ponen en contacto con una nitrilasa a 30°C

- 5 durante 15 minutos en un volumen de gas de 200 µl. Una vez transcurrido este tiempo, la reacción se mezcla con 30 µl de solución de ácido clorhídrico 1N, interrumpiéndose la reacción. La solución de reacción acidificada se extrae con 230 µl de tampón de metil terc-butiléter(MTBE), transfiriendo el nitrilo y el ácido carboxílico formado a la fase orgánica. Después, la fase de MTBE se analiza por cromatografía de gases (CG) (columna: ZB-5HT (Phenomenex, Alemania), 1 minuto a 80°C, calentamiento a 130°C a razón de 20°C/minuto, 1 minuto a 130°C. La detección se realiza con un detector de ionización de llama (DIL)).

Estabilidad frente a la temperatura

- 10 La estabilidad frente a la temperatura se mide incubando una solución enzimática en tampón fosfato de potasio 100 mM pH 7,0 con DTT 1 mM durante 15 minutos a una temperatura definida. Una vez transcurrido este tiempo, la solución enzimática se incuba durante 10 minutos sobre hielo. La solución se centrifuga para separar los componentes insolubles y se mide la actividad de la solución sobrenadante. La actividad residual en % se obtiene dividiendo la actividad después del tratamiento térmico entre la actividad medida sin tratamiento térmico.

- 15 Las nitrilasas catalizan la hidrólisis de nitrilos en ácidos carboxílicos sin etapa intermedia, esto es la reacción se desarrolla por completo por adición de dos moléculas de agua hasta el ácido carboxílico, con liberación de amoníaco, sin que se pueda aislar la etapa amida intermedia. Las nitrilasas también se denominan sistemáticamente "nitrilo-aminohidrolasas" (E.C. 3.5.5.1).

La invención se refiere a una nitrilasa que incluye una secuencia de aminoácidos con al menos un 60% de identidad con la secuencia de aminoácidos según (ID Sec. N°: 2) que, en comparación con la nitrilasa según (ID Sec. N°: 2),

- 20 i) presenta un incremento de al menos un 15% de la actividad en la reacción de un nitrilo para producir el ácido carboxílico correspondiente, seleccionándose el nitrilo preferentemente entre el grupo consistente en 2-metilglutaronitrilo, 1-(cianometil)ciclohexano-1-carbonitrilo y benzonitrilo;y
ii) presenta determinadas sustituciones de aminoácidos.

- 25 En la Tabla 1 están recopiladas las sustituciones de aminoácidos. Las sustituciones especialmente preferentes están representadas en la columna derecha. La invención se refiere también a todas las combinaciones posibles de las sustituciones de aminoácidos mostradas:

Tabla 1

Pos. AA	AA natural	Sustituciones con mayor actividad y estabilidad de temperatura	Preferentes	Especialmente preferentes
9	Leu	Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, Val	Lys, Glu, Ile, Arg	Lys
63	Val	Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr	Ile, Met, Pro, Thr	Pro
70	Thr	Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Trp, Tyr, Val	Ala, Cys, Asp, Glu, Phe, Gly, Ile, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Ser, Tyr, Arg, Val	Ile
94	Arg	Ala, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, Val	Glu, Phe, Gly, Lys, Met, Asn, Pro, Gln, Ala, Gly, His, Ile, Leu, Ser, Thr, Val, Tyr	Gln
194	Leu	Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, Val	Cys, Lys, Met, Tyr	Tyr
208	Thr	Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Trp, Tyr, Val	Ala, Gly, Leu	Ala
250	Cys	Ala, Arg, Asn, Asp, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, Val	Ala, Phe, Gly, Lys, Met, Arg, Ser, Thr, Tyr, His	Gly
305	Val	Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr	Leu, Met	Leu
308	Asp	Ala, Arg, Asn, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, Val	Asn, Trp	Asn

Combinaciones especialmente preferentes incluyen enzimas que contienen todas las combinaciones imaginables de las sustituciones V63P, F168V y C250G, tal como se muestran por ejemplo en los mutantes enzimáticos según (ID Sec. N°: 3), (ID Sec. N°: 4), (ID Sec. N°: 5) y (ID Sec. N°: 6).

Por consiguiente, la invención se refiere a nitrilasas en las que, en comparación con la nitrilasa natural de *Acidovorax facilis* (ID Sec. N° 2),

- 5 • el residuo Leu en la posición correspondiente a la posición 9 está sustituido por un residuo seleccionado entre el grupo consistente en Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, Val; de forma especialmente preferente seleccionado entre el grupo consistente en Lys, Glu, Ile, Arg; en particular Lys; y/o
- 10 • el residuo Val en la posición correspondiente a la posición 63 está sustituido por un residuo seleccionado entre el grupo consistente en Ala, Arg, Asn, Asp, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr; de forma especialmente preferente seleccionado entre el grupo consistente en Pro, Ile, Met, Thr; en particular Pro; y/o
- 15 • el residuo Thr en la posición correspondiente a la posición 70 está sustituido por un residuo seleccionado entre el grupo consistente en Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, Val; de forma especialmente preferente seleccionado entre el grupo consistente en Ile, Ala, Cys, Asp, Glu, Phe, Gly, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Ser, Tyr, Arg, Val; en particular Ile; y/o
- 20 • el residuo Arg en la posición correspondiente a la posición 94 está sustituido por un residuo seleccionado entre el grupo consistente en Ala, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Cys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, Val; de forma especialmente preferente seleccionado entre el grupo consistente en Gln, Glu, Phe, Gly, Lys, Met, Asn, Pro, Ala, Gly, His, Ile, Leu, Ser, Thr, Val, Tyr; en particular Gln y/o
- 25 • el residuo Leu en la posición correspondiente a la posición 194 está sustituido por un residuo seleccionado entre el grupo consistente en Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, Val; de forma especialmente preferente seleccionado entre el grupo consistente en Tyr, Cys, Lys, Met; en particular Tyr; y/o
- el residuo Thr en la posición correspondiente a la posición 208 está sustituido por un residuo seleccionado entre el grupo consistente en Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, Val; de forma especialmente preferente seleccionado entre el grupo consistente en Ala, Gly, Leu; en particular Ala; y/o
- 30 • el residuo Cys en la posición correspondiente a la posición 250 está sustituido por un residuo seleccionado entre el grupo consistente en Ala, Arg, Asn, Asp, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, Val; de forma especialmente preferente seleccionado entre el grupo consistente en Gly, Ala, Phe, Lys, Met, Arg, Ser, Thr, Tyr, His; en particular Gly; y/o
- 35 • el residuo Val en la posición correspondiente a la posición 305 está sustituido por un residuo seleccionado entre el grupo consistente en Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr; de forma especialmente preferente seleccionado entre el grupo consistente en Leu, Met; en particular Leu; y/o
- el residuo Asp en la posición correspondiente a la posición 308 está sustituido por un residuo seleccionado entre el grupo consistente en Ala, Arg, Asn, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, Val; de forma especialmente preferente seleccionado entre el grupo consistente en Asn, Trp; en particular Asn.

Si se define la sustitución en la posición correspondiente a la posición 9 por un residuo de aminoácido seleccionado entre el grupo consistente en Lys, Glu, Ile, Arg; preferentemente Lys como "A"; la sustitución en la posición correspondiente a la posición 63 por un residuo de aminoácido seleccionado entre el grupo consistente en Pro, Ile, Met, Thr; preferentemente Pro como "B"; la sustitución en la posición correspondiente a la posición 70 por un residuo de aminoácido seleccionado entre el grupo consistente en Ile, Ala, Cys, Asp, Glu, Phe, Gly, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Ser, Tyr, Arg, Val; preferentemente Ile, como "C"; la sustitución en la posición correspondiente a la posición 94 por un residuo de aminoácido seleccionado entre el grupo consistente en Gln, Glu, Phe, Gly, Lys, Met, Asn, Pro, Ala, Gly, His, Ile, Leu, Ser, Thr, Val, Tyr, preferentemente Gln, como "D"; la sustitución en la posición correspondiente a la posición 168 por Val como "E"; la sustitución en la posición correspondiente a la posición 194 por un residuo de aminoácido seleccionado entre el grupo consistente en Tyr, Cys, Lys, Met, preferentemente Tyr, como "F"; la sustitución en la posición correspondiente a la posición 208 por un residuo de aminoácido seleccionado entre el grupo consistente en Ala, Gly, Leu, preferentemente Ala, como "G"; la sustitución en la posición correspondiente a la posición 250 por un residuo de aminoácido seleccionado entre el grupo consistente en Gly, Ala, Phe, Lys, Met, Arg, Ser, Thr, Tyr, His, preferentemente Gly, como "H"; la sustitución en la posición correspondiente a la posición 305 por un residuo de aminoácido seleccionado entre el grupo consistente en Leu, Met, preferentemente Leu, como "I"; y la sustitución en la posición correspondiente a la posición 308 por un residuo de aminoácido seleccionado entre el grupo consistente en Asn, Trp, preferentemente Asn, como "J"; en cada caso en comparación con la nitrilasa de *Acidovorax facilis* (ID Sec. N°: 2), algunas formas de realización preferentes de la nitrilasa según la invención se pueden representar de forma abreviada tal como se indica a continuación:

Las sustituciones simples se seleccionan preferentemente entre el grupo consistente en A, B, C, D, E, F, G, H, I y J. En este contexto, la letra G significa por ejemplo que se trata de una nitrilasa en la que, en comparación con la nitrilasa natural de *Acidovorax facilis* (ID Sec. N°: 2), en la posición correspondiente a la posición 208 el residuo Thr del tipo salvaje ha sido sustituido por Ala, Gly o Leu, pero que, por lo demás, todas las posiciones de aminoácidos corresponden a las naturales.

Las sustituciones dobles en un modo de escritura correspondiente se seleccionan preferentemente entre el grupo consistente en AB, AC, AD, AE, AF, AG, AH, AI, AJ, BC, BD, BE, BF, BG, BH, BI, BJ, CD, CE, CF, CG, CH, CI, CJ, DE, DF, DG, DH, DI, DJ, EF, EG, EH, EI, EJ, FG, FH, FI, FJ, GH, GI, GJ, HI, HJ e IJ.

- 5 Las sustituciones triples en un modo de escritura correspondiente se seleccionan preferentemente entre el grupo consistente en ABC, ABD, ABE, ABF, ABG, ABH, ABI, ABJ, ACD, ACE, ACF, ACG, ACH, ACI, ACJ, ADE, ADF, ADG, ADH, ADI, ADJ, AEF, AEG, AEH, AEI, AEJ, AFG, AFH, AFI, AFJ, AGH, AGI, AGJ, AHI, AHJ, AIJ, BCD, BCE, BCF, BCG, BCH, BCI, BCJ, BDE, BDF, BDG, BDH, BDI, BDJ, BEF, BEG, BEH, BEI, BEJ, BFG, BFH, BFI, BFJ, BGH, BGI, BGJ, BHI, BHJ, BIJ, CDE, CDF, CDG, CDH, CDI, CDJ, CEF, CEG, CEH, CEI, CEJ, CFG, CFH, CFI, CFJ, CGH, CGI, CGJ, CHI, CHJ, CIJ, DEF, DEG, DEH, DEI, DEJ, DFG, DFH, DFI, DFJ, DGH, DGI, DGJ, DHI, DHJ, DIJ, EFG, EFH, EFI, EFJ, EGH, EGI, EGJ, EHI, EHJ, EIJ, FGH, FGI, FGJ, FHI, FHJ, FIJ, GHI, GHJ, GIJ, y HIJ.

- 15 En una forma de realización preferente, la nitrilasa según la invención, en comparación con la nitrilasa natural de *Acidovorax facilis* (ID Sec. N°: 2), presenta al menos cuatro sustituciones en las posiciones correspondientes a las posiciones 9, 63, 70, 94, 168, 194, 208, 250, 305 o 308, seleccionándose tres de estas sustituciones entre el grupo consistente en ABC, ABD, ABE, ABF, ABG, ABH, ABI, ABJ, ACD, ACE, ACF, ACG, ACH, ACI, ACJ, ADE, ADF, ADG, ADH, ADI, ADJ, AEF, AEG, AEH, AEI, AEJ, AFG, AFH, AFI, AFJ, AGH, AGI, AGJ, AHI, AHJ, AIJ, BCD, BCE, BCF, BCG, BCH, BCI, BCJ, BDE, BDF, BDG, BDH, BDI, BDJ, BEF, BEG, BEH, BEI, BEJ, BFG, BFH, BFI, BFJ, BGH, BGI, BGJ, BHI, BHJ, BIJ, CDE, CDF, CDG, CDH, CDI, CDJ, CEF, CEG, CEH, CEI, CEJ, CFG, CFH, CFI, CFJ, CGH, CGI, CGJ, CHI, CHJ, CIJ, DEF, DEG, DEH, DEI, DEJ, DFG, DFH, DFI, DFJ, DGH, DGI, DGJ, DHI, DHJ, DIJ, EFG, EFH, EFI, EFJ, EGH, EGI, EGJ, EHI, EHJ, EIJ, FGH, FGI, FGJ, FHI, FHJ, FIJ, GHI, GHJ, GIJ, y HIJ.

- 20 En una forma de realización preferente, la nitrilasa según la invención, en comparación con la nitrilasa natural de *Acidovorax facilis* (ID Sec. N°: 2), presenta al menos cinco sustituciones en las posiciones correspondientes a las posiciones 9, 63, 70, 94, 168, 194, 208, 250, 305 o 308, seleccionándose tres de estas sustituciones entre el grupo consistente en ABC, ABD, ABE, ABF, ABG, ABH, ABI, ABJ, ACD, ACE, ACF, ACG, ACH, ACI, ACJ, ADE, ADF, ADG, ADH, ADI, ADJ, AEF, AEG, AEH, AEI, AEJ, AFG, AFH, AFI, AFJ, AGH, AGI, AGJ, AHI, AHJ, AIJ, BCD, BCE, BCF, BCG, BCH, BCI, BCJ, BDE, BDF, BDG, BDH, BDI, BDJ, BEF, BEG, BEH, BEI, BEJ, BFG, BFH, BFI, BFJ, BGH, BGI, BGJ, BHI, BHJ, BIJ, CDE, CDF, CDG, CDH, CDI, CDJ, CEF, CEG, CEH, CEI, CEJ, CFG, CFH, CFI, CFJ, CGH, CGI, CGJ, CHI, CHJ, CIJ, DEF, DEG, DEH, DEI, DEJ, DFG, DFH, DFI, DFJ, DGH, DGI, DGJ, DHI, DHJ, DIJ, EFG, EFH, EFI, EFJ, EGH, EGI, EGJ, EHI, EHJ, EIJ, FGH, FGI, FGJ, FHI, FHJ, FIJ, GHI, GHJ, GIJ, y HIJ.

- 30 En una forma de realización preferente, la nitrilasa según la invención, en comparación con la nitrilasa natural de *Acidovorax facilis* (ID Sec. N°: 2), presenta al menos seis sustituciones en las posiciones correspondientes a las posiciones 9, 63, 70, 94, 168, 194, 208, 250, 305 o 308, seleccionándose tres de estas sustituciones entre el grupo consistente en ABC, ABD, ABE, ABF, ABG, ABH, ABI, ABJ, ACD, ACE, ACF, ACG, ACH, ACI, ACJ, ADE, ADF, ADG, ADH, ADI, ADJ, AEF, AEG, AEH, AEI, AEJ, AFG, AFH, AFI, AFJ, AGH, AGI, AGJ, AHI, AHJ, AIJ, BCD, BCE, BCF, BCG, BCH, BCI, BCJ, BDE, BDF, BDG, BDH, BDI, BDJ, BEF, BEG, BEH, BEI, BEJ, BFG, BFH, BFI, BFJ, BGH, BGI, BGJ, BHI, BHJ, BIJ, CDE, CDF, CDG, CDH, CDI, CDJ, CEF, CEG, CEH, CEI, CEJ, CFG, CFH, CFI, CFJ, CGH, CGI, CGJ, CHI, CHJ, CIJ, DEF, DEG, DEH, DEI, DEJ, DFG, DFH, DFI, DFJ, DGH, DGI, DGJ, DHI, DHJ, DIJ, EFG, EFH, EFI, EFJ, EGH, EGI, EGJ, EHI, EHJ, EIJ, FGH, FGI, FGJ, FHI, FHJ, FIJ, GHI, GHJ, GIJ, y HIJ.

- 40 En una forma de realización preferente, la nitrilasa según la invención, en comparación con la nitrilasa natural de *Acidovorax facilis* (ID Sec. N°: 2), presenta al menos siete sustituciones en las posiciones correspondientes a las posiciones 9, 63, 70, 94, 168, 194, 208, 250, 305 o 308, seleccionándose tres de estas sustituciones entre el grupo consistente en ABC, ABD, ABE, ABF, ABG, ABH, ABI, ABJ, ACD, ACE, ACF, ACG, ACH, ACI, ACJ, ADE, ADF, ADG, ADH, ADI, ADJ, AEF, AEG, AEH, AEI, AEJ, AFG, AFH, AFI, AFJ, AGH, AGI, AGJ, AHI, AHJ, AIJ, BCD, BCE, BCF, BCG, BCH, BCI, BCJ, BDE, BDF, BDG, BDH, BDI, BDJ, BEF, BEG, BEH, BEI, BEJ, BFG, BFH, BFI, BFJ, BGH, BGI, BGJ, BHI, BHJ, BIJ, CDE, CDF, CDG, CDH, CDI, CDJ, CEF, CEG, CEH, CEI, CEJ, CFG, CFH, CFI, CFJ, CGH, CGI, CGJ, CHI, CHJ, CIJ, DEF, DEG, DEH, DEI, DEJ, DFG, DFH, DFI, DFJ, DGH, DGI, DGJ, DHI, DHJ, DIJ, EFG, EFH, EFI, EFJ, EGH, EGI, EGJ, EHI, EHJ, EIJ, FGH, FGI, FGJ, FHI, FHJ, FIJ, GHI, GHJ, GIJ, y HIJ.

En una forma de realización especialmente preferente, la nitrilasa según la invención presenta al menos tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o diez sustituciones en comparación con la nitrilasa natural de *Acidovorax facilis* (ID Sec. N°: 2), que incluyen las tres sustituciones V63P, F168V y C250G.

- 50 Otra nitrilasa según la invención se obtiene de un organismo no cultivado y se muestra en la (ID Sec. N°: 7). Mediante una combinación adecuada de las secuencias de (ID Sec. N°: 1) con (ID Sec. N°: 7) y una incorporación de una combinación de las sustituciones mostradas en la Tabla 1 se produjo una enzima de la (ID Sec. N°: 8), que sorprendentemente presenta un fuerte aumento de la actividad y la estabilidad frente a la temperatura en comparación con la enzima inicial.
- 55 En comparación con la secuencia de aminoácidos de la nitrilasa de *Acidovorax facilis* (ID Sec. N°: 2), la nitrilasa según la invención presenta preferentemente una homología de al menos el 60% o al menos el 65%, preferiblemente de al menos el 70% o al menos el 75%, de forma especialmente preferente de al menos el 80% o al menos el 85%, de forma totalmente preferente de al menos el 90% o al menos el 92%, de forma igualmente preferente de al menos el 93% o al

menos el 94%, y de forma especialmente preferente al menos el 95%, al menos el 96%, al menos el 97% o al menos el 98%, y con la máxima preferencia de al menos el 99%.

En el sentido de la invención, la homología de una secuencia se calcula como identidad mediante BLASTP 2.2.20+ (Stephen F. Altschul, Thomas L. Madden, Alejandro A. Schäffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, y David J. Lipman (1997)). "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", *Nucleic Acids Res.* 25:33899-3402; Stephen F. Altschul, John C. Wootton, E. Michael Gertz, Richa Agarwala, Aleksandr Morgulis, Alejandro A. Schäffer y Yi-Kuo Yu (2005)".

La posición de las sustituciones reivindicadas en las nitrilasas homólogas a la secuencia de aminoácidos de la nitrilasa de *Acidovorax facilis* (ID Sec. Nº: 2) se determina a partir de una alineación basada en la secuencia o en la estructura. Los especialistas conocen métodos y herramientas para estas alineaciones. Para las alineaciones basadas en la secuencia se utiliza por ejemplo ClustalW (Larkin M.A., Blackshields G., Brown N.P., Chenna R., McGettigan P.A., McWilliam H., Valentin F., Wallace I.M., Wilm A., Lopez R., Thompson J.D., Gibson T.J. y Higgins D.G. (2007), *Bioinformatics* 23(21): 2947-2948), Multialign (F. CORPET, 1988, *Nucl. Acids Res.*, 16 (22), 10881-10890) o Dialign (Subramanian AR, Hiran S, Steinkamp R, Meinicke P, Corel E, Morgenstern B., *Nucleic Acids Res.* 2010 Jul 1;38 Suppl:W19-22) y las alineaciones basadas en la estructura se llevan a cabo mediante Swiss-Model (Arnold K., Bordoli L., Kopp J., y Schwede T. (2006), *Bioinformatics*, 22.195-201.), CPHmodels (Nielsen M., Lundegaard C., Lund O., Petersen TN, *Nucleic Acids Research*, 2010, Vol. 38) o Geno3D (Combet C, Jambon M, Deléage G & Geourjon C, *Bioinformatics*, 2002, 18, 213-214).

Por consiguiente, las posiciones correspondientes en las secuencias homólogas pueden estar desplazadas correspondientemente mediante inserción o delección de uno o más aminoácidos. También es igualmente posible que las nitrilasas homólogas correspondientes presenten en las posiciones asignadas por la alineación un aminoácido diferente a la nitrilasa de *Acidovorax facilis* (ID Sec. Nº: 2), de modo que por ejemplo Leu9 de la ID Sec. Nº: 2 corresponde en la nitrilasa homóloga 1 a Ile11, en la nitrilasa homóloga 2 a Val8 o en la nitrilasa homóloga X corresponde al aminoácido Y. Esto es aplicable correspondientemente para todas las demás posiciones.

La enzima según la invención corresponde preferentemente a una nitrilasa con una homología de más del 60% con respecto a la secuencia de aminoácidos conforme a la (ID Sec. Nº: 2), que presenta al menos 1, preferentemente al menos 2, preferiblemente al menos 3, de forma especialmente preferente al menos 4, de forma igualmente preferente al menos 5 y de forma totalmente preferente al menos 6 sustituciones de aminoácidos seleccionadas entre el siguiente grupo:

- a. una sustitución en la posición correspondiente a la posición 9 en (ID Sec. Nº: 2);
- b. una sustitución en la posición correspondiente a la posición 63 en (ID Sec. Nº: 2);
- c. una sustitución en la posición correspondiente a la posición 70 en (ID Sec. Nº: 2);
- d. una sustitución en la posición correspondiente a la posición 94 en (ID Sec. Nº: 2);
- e. una sustitución en la posición correspondiente a la posición 194 en (ID Sec. Nº: 2);
- f. una sustitución en la posición correspondiente a la posición 208 en (ID Sec. Nº: 2);
- g. una sustitución en la posición correspondiente a la posición 250 en (ID Sec. Nº: 2);
- h. una sustitución en la posición correspondiente a la posición 305 en (ID Sec. Nº: 2);
- i. una sustitución en la posición correspondiente a la posición 308 en (ID Sec. Nº: 2);

y/o la enzima presenta, en comparación con la enzima inicial, un aumento de al menos el 15% de la actividad en la reacción de un nitrilo para obtener un ácido carboxílico, y/o la enzima, después de un tratamiento térmico en el que la actividad de la enzima inicial se reduce al menos en un 40%, posee una actividad residual al menos un 10% mayor en comparación con la enzima inicial.

Es preferible la enzima según la invención que, además de las sustituciones arriba mencionadas, presenta al menos 1, preferentemente al menos 2, preferiblemente al menos 3, de forma especialmente preferente al menos 4 y de forma totalmente preferente al menos 5 sustituciones adicionales de aminoácidos seleccionadas entre el siguiente grupo:

- a) el residuo Tyr en la posición correspondiente a la posición 65 en (ID Sec. Nº: 2) está sustituido por un residuo seleccionado entre el grupo consistente en Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Val; de forma especialmente preferente Cys;
- b) el residuo Phe en la posición correspondiente a la posición 168 en (ID Sec. Nº: 2) está sustituido por un residuo seleccionado entre el grupo consistente en Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, Val; de forma especialmente preferente Val;
- c) el residuo Phe en la posición correspondiente a la posición 174 en (ID Sec. Nº: 2) está sustituido por un residuo seleccionado entre el grupo consistente en Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, Val; de forma especialmente preferente Ile;
- d) el residuo Leu en la posición correspondiente a la posición 201 en (ID Sec. Nº: 2) está sustituido por un residuo seleccionado entre el grupo consistente en Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, Val; de forma especialmente preferente Asn;

e) el residuo Thr en la posición correspondiente a la posición 210 en (ID Sec. N°: 2) está sustituido por un residuo seleccionado entre el grupo consistente en Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Trp, Tyr, Val; de forma especialmente preferente Ala.

5 En una forma de realización preferente, la nitrilasa según la invención presenta una de las siguientes combinaciones de mutaciones:

- a) V63P, C250G (ID Sec. N°: 3)
- b) F168V, C250G (ID Sec. N°: 4).

10 En una forma de realización preferente, la nitrilasa según la invención es la nitrilasa según (ID Sec. N°: 8) o una nitrilasa homóloga, que presenta las mismas mutaciones con respecto a su enzima inicial que (ID Sec. N°: 8) en comparación con (ID Sec. N°: 2). La nitrilasa según (ID Sec. N°: 8) presenta, en comparación con la enzima inicial, un aumento de la actividad de un 335% con CH-dinitrilo.

15 Preferentemente, la nitrilasa según la invención presenta una identidad con respecto a (ID Sec. N°: 8) de más del 90%, preferiblemente más del 95%, de forma especialmente preferente más del 98% y de forma totalmente preferente más del 99%.

20 En comparación con la enzima inicial (ID Sec. N°: 2), la nitrilasa según la invención presenta preferentemente un aumento de la actividad en la reacción de un nitrilo para obtener un ácido carboxílico del 20%, preferiblemente del 30%, más preferentemente del 40%, de forma especialmente preferente del 60%, de forma igualmente preferente del 80%, de forma todavía más preferente del 150% y de forma totalmente preferente del 200%.

En las formas de realización preferentes A1-A5 a F1-F5, la nitrilasa según la invención, después de un tratamiento térmico en el que la actividad de la enzima inicial se reduce al menos en los porcentajes indicados en la siguiente tabla, presenta al menos las actividades residuales indicadas en la siguiente Tabla 2 en comparación con la enzima inicial (ID Sec. N°: 2):

25 **Tabla 2**

N°	Inactivación enzima inicial	Actividad residual elevada de las nitrilasas reivindicadas					
		A	B	C	D	E	F
1	20%	10%	20%	30%	50%	100%	200%
2	40%	10%	20%	30%	50%	100%	200%
3	60%	10%	20%	30%	50%	100%	200%
4	80%	10%	20%	30%	50%	100%	200%
5	90%	10%	20%	30%	50%	100%	200%

30 En la tabla anterior, por ejemplo la forma de realización C3 significa que la nitrilasa según la invención, después de un tratamiento térmico en el que la actividad de la enzima inicial se reduce al menos en un 60%, presenta en comparación con la enzima inicial un incremento de la actividad residual de al menos un 30%, preferentemente al menos un 50%, de forma especialmente preferente al menos un 10% y de forma totalmente preferente al menos un 200%.

35 Otro aspecto de la invención se refiere a un procedimiento para la producción de un ácido carboxílico a partir de nitrilos mediante la puesta en contacto de un nitrilo con una nitrilasa según una de las reivindicaciones anteriores. Preferentemente, la reacción tiene lugar en presencia de agua, es decir, en medio acuoso. Preferiblemente, el procedimiento sirve para producir un ácido carboxílico seleccionado entre el grupo consistente en ácido 4-cianopentanoico, ácido 2-(1-cianociclohexil)acético y ácido benzoico.

Los siguientes ejemplos sirven para explicar más detalladamente la invención, pero no han de ser interpretados como limitativos.

Ejemplos

40 Las variantes enzimáticas se produjeron con ayuda de procedimientos convencionales y se analizaron en cuanto a sus propiedades. Para la preparación de las variantes enzimáticas, en primer lugar se incorporaron las mutaciones a nivel de gen mediante métodos usuales de biología molecular. Los genes de las variantes enzimáticas se clonaron en vectores de expresión. Con éstos se transformaron después las cepas de expresión de *Escherichia coli*. El plásmido de ADN contenía la información para regular la expresión de las variantes enzimáticas. La secuencia codificadora de la enzima o de la variante enzimática se puso bajo el control de un promotor inducible. De este modo, la expresión de las variantes enzimáticas se pudo controlar mediante adición de un inductor (en general se utilizó isopropil-β-D-tiogalactopiranosido (IPTG)). Las cepas de *E. coli* así transformadas se cultivaron después en medios nutritivos convencionales (por ejemplo Lennox-Broth, medio mínimo M9) y se indujeron con IPTG. Después de la expresión, la

biomasa se recogió por centrifugación. A partir de la biomasa se obtuvieron y purificaron las variantes enzimáticas después de una lisis celular correspondiente. Para ello se utilizaron procedimientos de centrifugación, precipitación, ultrafiltración y/o cromatografía.

5 Las variantes enzimáticas descritas presentan los aumentos de actividad mostrados en la Tabla 3 en comparación con la enzima inicial con 3 sustratos de nitrilo diferentes.

Tabla 3

Pos.	Enzima (ID Sec. N°: 2)	2MG	CH-dinitrilo	Benzonitrilo
9	Leu9Lys	134%	131%	98%
	Leu9glu	160%	177%	114%
	Leu9Ile	147%	171%	100%
	Val63Ile	163%	238%	90%
63	Val63Met	165%	183%	97%
	Val63Pro	142%	198%	89%
	Val63Thr	173%	175%	99%
	Thr70Ala	124%	183%	111%
70	Thr70Cys	149%	153%	128%
	Thr70Asp	136%	224%	114%
	Thr70Glu	125%	207%	113%
	Thr70Phe	132%	170%	104%
	Thr70Gly	134%	230%	114%
	Thr70Ile	123%	151%	113%
	Thr70Leu	128%	200%	105%
	Thr70Met	122%	180%	102%
	Thr70Asn	122%	216%	108%
	Thr70Pro	126%	206%	99%
	Thr70Gln	129%	222%	118%
	Thr70Ser	138%	177%	122%
	Thr70Tyr	130%	164%	103%
	Arg94Glu	111%	107%	97%
94	Arg94Phe	117%	97%	113%
	Arg94Gly	123%	63%	110%
	Arg94Lys	112%	98%	95%
	Arg94Met	125%	80%	110%
	Arg94Asn	120%	81%	101%
	Arg94Pro	113%	97%	101%
	Arg94Gln	118%	101%	108%
	Leu194Cys	117%	105%	71%
194	Leu194Lys	121%	67%	73%
	Leu194Met	116%	121%	68%
	Leu194Tyr	118%	122%	76%
	Thr208Ala	114%	194%	124%
208	Thr208Gly	154%	181%	131%
	Thr208Leu	132%	152%	123%
	Cys250Ala	112%	221%	41%
250	Cys250Phe	111%	194%	40%
	Cys250Gly	126%	281%	40%
	Cys250Lys	135%	97%	45%
	Cys250Met	125%	146%	40%
	Cys250Arg	124%	165%	39%
	Cys250Ser	128%	246%	40%
	Cys250Thr	104%	186%	38%
	Cys250Tyr	116%	196%	39%
	Val305Leu	126%	98%	116%
305	Val305Met	128%	76%	116%
	Asp308Asn	133%	118%	104%
308	Asp308Trp	128%	105%	92%

La Tabla 4 muestra sustituciones individuales según la invención y sus actividades residuales después de 15 minutos de tratamiento a 55°C o 60°C.

Tabla 4

Pos.	Enzima	55°C	Aumento de la actividad residual en %	60°C	Aumento de la actividad residual en %
	ID Sec. N°: 2	57%		14%	
9	Leu9Lys	80%	40%	20%	43%
	Leu9Glu	83%	45%	35%	151%
	Leu9Ile	73%	28%	46%	229%
	Leu9Arg	89%	56%	71%	409%
63	Val63Pro	68%	19%	19%	36%
	Val63Ile	64%	12%	15%	7%
70	Thr70Ile	68%	19%	25%	79%
	Thr70Cys	59%	4%	30%	118%
	Thr70Phe	76%	33%	4%	-71%
	Thr70Leu	85%	50%	22%	56%
	Thr70Met	67%	18%	19%	37%
	Thr70Arg	82%	44%	40%	188%
	Thr70Val	91%	60%	41%	190%
94	Thr70Tyr	98%	72%	46%	231%
	Arg94Gln	81%	42%	18%	29%
	Arg94Ala	90%	58%	66%	370%
	Arg94Glu	82%	44%	38%	173%
	Arg94Phe	85%	49%	16%	16%
	Arg94Gly	89%	57%	8%	-40%
	Arg94His	79%	39%	30%	112%
	Arg94Ile	96%	68%	63%	354%
	Arg94Lys	85%	49%	49%	247%
	Arg94Leu	96%	69%	68%	385%
	Arg94Met	93%	63%	6%	-56%
	Arg94Asn	91%	60%	40%	189%
94	Arg94Pro	77%	35%	36%	156%
	Arg94Ser	93%	64%	57%	310%
	Arg94Thr	88%	54%	42%	198%
	Arg94Val	77%	35%	29%	111%
168	Arg94Tyr	95%	66%	59%	320%
	Phe168Val	94%	65%	62%	343%
250	Cys250Gly	80%	40%	20%	43%
	Cys250Ala	85%	49%	40%	183%
	Cys250Phe	90%	58%	48%	240%
	Cys250His	98%	73%	61%	335%
	Cys250Met	79%	38%	44%	213%
	Cys250Arg	77%	35%	36%	158%
	Cys250Ser	61%	7%	21%	51%
	Cys250Tyr	99%	73%	68%	384%
305	Val305Leu	99%	74%	28%	100%
	Val305Met	79%	39%	45%	219%

5

La Tabla 5 muestra la actividad de mutantes múltiples según la invención en comparación con la enzima inicial (ID Sec. N°: 2), en los que la combinación de sustituciones individuales conduce a una mejora sinérgica de la actividad de la enzima:

Tabla 5

	Sustrato	
Mutante enzimático	2MG	Benzonitrilo
ID Sec. Nº: 2	100%	100%
V63P	142%	89%
C250G	126%	
V63P / F168V (ID Sec. Nº: 5)		171%
V63P / C250G (ID Sec. Nº: 3)	206%	

LISTADO DE SECUENCIAS

5	<110>	c-LEcta GmbH	
	<120>	Nitrilasas	
	<130>	IV0010(EP)	
10	<160>	8	
	<170>	PatentIn versión 3.5	
15	<210>	1	
	<211>	1110	
	<212>	ADN	
	<213>	Acidovorax facilis	
	<400>	1	
	atggtgtctt acaactctaa atttctggcg gcgactgtgc aggcggagcc agtttggtc	60	
	gacgcggatg ctacgatcga caaatctatc ggtatcatcg aagaagcggc gcagaaaggt	120	
	gcgtctctga tcgctttccc ggaagtattt atccctggtt acccatactg ggcgtaggtc	180	
	ggcgacgtaa aatacagcct gagcttcaat tctcgctacc acgaaaactc tctcgagctg	240	
	ggtgatgacc gtatgcgtcg tctccaactc gctgcacgtc gcaacaaaat tgcgctggtt	300	
	atgggctaca gcgagcgtga agcgggtagc cgctacctgt cccaggtttt catcgacgag	360	
	cgcggtgaaa ttgtcgcgaa ccgtcgtaaa ctcaagccga cccatgttga gcgcaccatc	420	
	tacggtgaag gtaacggcac ggatttcttc acccatgact tcgcttcggt tcgtgttggt	480	
	ggcctcaact gctgggagca ctttcagccg ctctccaaat tcatgatgta ctctctgggc	540	
	gaacaagttc atgtcgcata ctggcctgca atgtccccgc tgcaaccgga tgttttccag	600	
	ctgtctatcg aagcgaatgc gaccgtcacc cgtagctatg ccatcgaggg tcagaccttc	660	
	gtgtgtgtgt ctacgcaggt tatcggtccg tctgcaatcg agacgttctg cctgaatgac	720	
	gaacagcgtg cgctgctgcc gcagggttgt ggttgggcgc gtatctatgg cccggatggt	780	
	tccgaactgg caaacctctt cgcagaagat gcggagggtg tcctgtatgc ggaaatcgac	840	
	ctggaacaga ttctctctcg aaaagcaggc gctgaccogg ttggccacta ttctcgtcca	900	
	gatgtttctc gcgttcagtt cgaccacgt aaccataccc cgttctatcg tatcggcatt	960	
	gatggccgcc tggatgtaaa caccggttcc cgtgtagaaa actttcgcct ccgccaggct	1020	
	gctgagcagg agcgtcaggc gtccaaacgc ctgggcacca agctctttga acagtctctg	1080	
20	ctcgccgaag agccggtgcc ggctaaatga	1110	
	<210>	2	

ES 2 549 593 T3

<211> 369
 <212> PRT
 <213> Acidovorax facilis

5 <400> 2

```

Met Val Ser Tyr Asn Ser Lys Phe Leu Ala Ala Thr Val Gln Ala Glu
1          5          10          15

Pro Val Trp Leu Asp Ala Asp Ala Thr Ile Asp Lys Ser Ile Gly Ile
          20          25          30

Ile Glu Glu Ala Ala Gln Lys Gly Ala Ser Leu Ile Ala Phe Pro Glu
          35          40          45

Val Phe Ile Pro Gly Tyr Pro Tyr Trp Ala Trp Leu Gly Asp Val Lys
          50          55          60

Tyr Ser Leu Ser Phe Thr Ser Arg Tyr His Glu Asn Ser Leu Glu Leu
65          70          75          80

Gly Asp Asp Arg Met Arg Arg Leu Gln Leu Ala Ala Arg Arg Asn Lys
          85          90          95

Ile Ala Leu Val Met Gly Tyr Ser Glu Arg Glu Ala Gly Ser Arg Tyr
          100          105          110

Leu Ser Gln Val Phe Ile Asp Glu Arg Gly Glu Ile Val Ala Asn Arg
          115          120          125

Arg Lys Leu Lys Pro Thr His Val Glu Arg Thr Ile Tyr Gly Glu Gly
          130          135          140

Asn Gly Thr Asp Phe Leu Thr His Asp Phe Ala Phe Gly Arg Val Gly
145          150          155          160

Gly Leu Asn Cys Trp Glu His Phe Gln Pro Leu Ser Lys Phe Met Met
          165          170          175

Tyr Ser Leu Gly Glu Gln Val His Val Ala Ser Trp Pro Ala Met Ser
          180          185          190

Pro Leu Gln Pro Asp Val Phe Gln Leu Ser Ile Glu Ala Asn Ala Thr
          195          200          205

Val Thr Arg Ser Tyr Ala Ile Glu Gly Gln Thr Phe Val Leu Cys Ser
210          215          220
  
```

ES 2 549 593 T3

Thr Gln Val Ile Gly Pro Ser Ala Ile Glu Thr Phe Cys Leu Asn Asp
225 230 235 240

Glu Gln Arg Ala Leu Leu Pro Gln Gly Cys Gly Trp Ala Arg Ile Tyr
245 250 255

Gly Pro Asp Gly Ser Glu Leu Ala Lys Pro Leu Ala Glu Asp Ala Glu
260 265 270

Gly Ile Leu Tyr Ala Glu Ile Asp Leu Glu Gln Ile Leu Leu Ala Lys
275 280 285

Ala Gly Ala Asp Pro Val Gly His Tyr Ser Arg Pro Asp Val Leu Ser
290 295 300

Val Gln Phe Asp Pro Arg Asn His Thr Pro Val His Arg Ile Gly Ile
305 310 315 320

Asp Gly Arg Leu Asp Val Asn Thr Arg Ser Arg Val Glu Asn Phe Arg
325 330 335

Leu Arg Gln Ala Ala Glu Gln Glu Arg Gln Ala Ser Lys Arg Leu Gly
340 345 350

Thr Lys Leu Phe Glu Gln Ser Leu Leu Ala Glu Glu Pro Val Pro Ala
355 360 365

Lys

- 5 <210> 3
<211> 369
<212> PRT
<213> Desconocido
- 10 <220>
<223> Sintetizado químicamente
<400> 3

ES 2 549 593 T3

Met	Val	Ser	Tyr	Asn	Ser	Lys	Phe	Leu	Ala	Ala	Thr	Val	Gln	Ala	Glu	1	5	10	15
Pro	Val	Trp	Leu	Asp	Ala	Asp	Ala	Thr	Ile	Asp	Lys	Ser	Ile	Gly	Ile	20	25	30	
Ile	Glu	Glu	Ala	Ala	Gln	Lys	Gly	Ala	Ser	Leu	Ile	Ala	Phe	Pro	Glu	35	40	45	
Val	Phe	Ile	Pro	Gly	Tyr	Pro	Tyr	Trp	Ala	Trp	Leu	Gly	Asp	Pro	Lys	50	55	60	
Tyr	Ser	Leu	Ser	Phe	Thr	Ser	Arg	Tyr	His	Glu	Asn	Ser	Leu	Glu	Leu	65	70	75	80
Gly	Asp	Asp	Arg	Met	Arg	Arg	Leu	Gln	Leu	Ala	Ala	Arg	Arg	Asn	Lys	85	90	95	
Ile	Ala	Leu	Val	Met	Gly	Tyr	Ser	Glu	Arg	Glu	Ala	Gly	Ser	Arg	Tyr	100	105	110	
Leu	Ser	Gln	Val	Phe	Ile	Asp	Glu	Arg	Gly	Glu	Ile	Val	Ala	Asn	Arg	115	120	125	
Arg	Lys	Leu	Lys	Pro	Thr	His	Val	Glu	Arg	Thr	Ile	Tyr	Gly	Glu	Gly	130	135	140	
Asn	Gly	Thr	Asp	Phe	Leu	Thr	His	Asp	Phe	Ala	Phe	Gly	Arg	Val	Gly	145	150	155	160
Gly	Leu	Asn	Cys	Trp	Glu	His	Phe	Gln	Pro	Leu	Ser	Lys	Phe	Met	Met	165	170	175	
Tyr	Ser	Leu	Gly	Glu	Gln	Val	His	Val	Ala	Ser	Trp	Pro	Ala	Met	Ser	180	185	190	
Pro	Leu	Gln	Pro	Asp	Val	Phe	Gln	Leu	Ser	Ile	Glu	Ala	Asn	Ala	Thr	195	200	205	
Val	Thr	Arg	Ser	Tyr	Ala	Ile	Glu	Gly	Gln	Thr	Phe	Val	Leu	Cys	Ser	210	215	220	
Thr	Gln	Val	Ile	Gly	Pro	Ser	Ala	Ile	Glu	Thr	Phe	Cys	Leu	Asn	Asp	225	230	235	240

ES 2 549 593 T3

Glu Gln Arg Ala Leu Leu Pro Gln Gly Gly Gly Trp Ala Arg Ile Tyr
245 250 255

Gly Pro Asp Gly Ser Glu Leu Ala Lys Pro Leu Ala Glu Asp Ala Glu
260 265 270

Gly Ile Leu Tyr Ala Glu Ile Asp Leu Glu Gln Ile Leu Leu Ala Lys
275 280 285

Ala Gly Ala Asp Pro Val Gly His Tyr Ser Arg Pro Asp Val Leu Ser
290 295 300

Val Gln Phe Asp Pro Arg Asn His Thr Pro Val His Arg Ile Gly Ile
305 310 315 320

Asp Gly Arg Leu Asp Val Asn Thr Arg Ser Arg Val Glu Asn Phe Arg
325 330 335

Leu Arg Gln Ala Ala Glu Gln Glu Arg Gln Ala Ser Lys Arg Leu Gly
340 345 350

Thr Lys Leu Phe Glu Gln Ser Leu Leu Ala Glu Glu Pro Val Pro Ala
355 360 365

Lys

- 5 <210> 4
<211> 369
<212> PRT
<213> Desconocido
- 10 <220>
<223> Sintetizado químicamente
<400> 4

ES 2 549 593 T3

Met	Val	Ser	Tyr	Asn	Ser	Lys	Phe	Leu	Ala	Ala	Thr	Val	Gln	Ala	Glu	1	5	10	15
Pro	Val	Trp	Leu	Asp	Ala	Asp	Ala	Thr	Ile	Asp	Lys	Ser	Ile	Gly	Ile	20	25	30	
Ile	Glu	Glu	Ala	Ala	Gln	Lys	Gly	Ala	Ser	Leu	Ile	Ala	Phe	Pro	Glu	35	40	45	
Val	Phe	Ile	Pro	Gly	Tyr	Pro	Tyr	Trp	Ala	Trp	Leu	Gly	Asp	Val	Lys	50	55	60	
Tyr	Ser	Leu	Ser	Phe	Thr	Ser	Arg	Tyr	His	Glu	Asn	Ser	Leu	Glu	Leu	65	70	75	80
Gly	Asp	Asp	Arg	Met	Arg	Arg	Leu	Gln	Leu	Ala	Ala	Arg	Arg	Asn	Lys	85	90	95	
Ile	Ala	Leu	Val	Met	Gly	Tyr	Ser	Glu	Arg	Glu	Ala	Gly	Ser	Arg	Tyr	100	105	110	
Leu	Ser	Gln	Val	Phe	Ile	Asp	Glu	Arg	Gly	Glu	Ile	Val	Ala	Asn	Arg	115	120	125	
Arg	Lys	Leu	Lys	Pro	Thr	His	Val	Glu	Arg	Thr	Ile	Tyr	Gly	Glu	Gly	130	135	140	
Asn	Gly	Thr	Asp	Phe	Leu	Thr	His	Asp	Phe	Ala	Phe	Gly	Arg	Val	Gly	145	150	155	160

ES 2 549 593 T3

Gly Leu Asn Cys Trp Glu His Val Gln Pro Leu Ser Lys Phe Met Met
165 170 175

Tyr Ser Leu Gly Glu Gln Val His Val Ala Ser Trp Pro Ala Met Ser
180 185 190

Pro Leu Gln Pro Asp Val Phe Gln Leu Ser Ile Glu Ala Asn Ala Thr
195 200 205

Val Thr Arg Ser Tyr Ala Ile Glu Gly Gln Thr Phe Val Leu Cys Ser
210 215 220

Thr Gln Val Ile Gly Pro Ser Ala Ile Glu Thr Phe Cys Leu Asn Asp
225 230 235 240

Glu Gln Arg Ala Leu Leu Pro Gln Gly Gly Gly Trp Ala Arg Ile Tyr
245 250 255

Gly Pro Asp Gly Ser Glu Leu Ala Lys Pro Leu Ala Glu Asp Ala Glu
260 265 270

Gly Ile Leu Tyr Ala Glu Ile Asp Leu Glu Gln Ile Leu Leu Ala Lys
275 280 285

Ala Gly Ala Asp Pro Val Gly His Tyr Ser Arg Pro Asp Val Leu Ser
290 295 300

Val Gln Phe Asp Pro Arg Asn His Thr Pro Val His Arg Ile Gly Ile
305 310 315 320

Asp Gly Arg Leu Asp Val Asn Thr Arg Ser Arg Val Glu Asn Phe Arg
325 330 335

Leu Arg Gln Ala Ala Glu Gln Glu Arg Gln Ala Ser Lys Arg Leu Gly
340 345 350

Thr Lys Leu Phe Glu Gln Ser Leu Leu Ala Glu Glu Pro Val Pro Ala
355 360 365

Lys

<210>

5

<211>

369

<212>

PRT

<213>

Desconocido

<220>

<223>

Sintetizado químicamente

<400> 5

Met Val Ser Tyr Asn Ser Lys Phe Leu Ala Ala Thr Val Gln Ala Glu
1 5 10 15

Pro Val Trp Leu Asp Ala Asp Ala Thr Ile Asp Lys Ser Ile Gly Ile
20 25 30

Ile Glu Glu Ala Ala Gln Lys Gly Ala Ser Leu Ile Ala Phe Pro Glu
35 40 45

Val Phe Ile Pro Gly Tyr Pro Tyr Trp Ala Trp Leu Gly Asp Pro Lys
50 55 60

Tyr Ser Leu Ser Phe Thr Ser Arg Tyr His Glu Asn Ser Leu Glu Leu
65 70 75 80

Gly Asp Asp Arg Met Arg Arg Leu Gln Leu Ala Ala Arg Arg Asn Lys
85 90 95

Ile Ala Leu Val Met Gly Tyr Ser Glu Arg Glu Ala Gly Ser Arg Tyr
100 105 110

Leu Ser Gln Val Phe Ile Asp Glu Arg Gly Glu Ile Val Ala Asn Arg
115 120 125

Arg Lys Leu Lys Pro Thr His Val Glu Arg Thr Ile Tyr Gly Glu Gly
130 135 140

Asn Gly Thr Asp Phe Leu Thr His Asp Phe Ala Phe Gly Arg Val Gly
145 150 155 160

Gly Leu Asn Cys Trp Glu His Val Gln Pro Leu Ser Lys Phe Met Met
165 170 175

Tyr Ser Leu Gly Glu Gln Val His Val Ala Ser Trp Pro Ala Met Ser
180 185 190

Pro Leu Gln Pro Asp Val Phe Gln Leu Ser Ile Glu Ala Asn Ala Thr
195 200 205

Val Thr Arg Ser Tyr Ala Ile Glu Gly Gln Thr Phe Val Leu Cys Ser
210 215 220

Thr Gln Val Ile Gly Pro Ser Ala Ile Glu Thr Phe Cys Leu Asn Asp
225 230 235 240

ES 2 549 593 T3

Glu Gln Arg Ala Leu Leu Pro Gln Gly Cys Gly Trp Ala Arg Ile Tyr
245 250 255

Gly Pro Asp Gly Ser Glu Leu Ala Lys Pro Leu Ala Glu Asp Ala Glu
260 265 270

Gly Ile Leu Tyr Ala Glu Ile Asp Leu Glu Gln Ile Leu Leu Ala Lys
275 280 285

Ala Gly Ala Asp Pro Val Gly His Tyr Ser Arg Pro Asp Val Leu Ser
290 295 300

Val Gln Phe Asp Pro Arg Asn His Thr Pro Val His Arg Ile Gly Ile
305 310 315 320

Asp Gly Arg Leu Asp Val Asn Thr Arg Ser Arg Val Glu Asn Phe Arg
325 330 335

Leu Arg Gln Ala Ala Glu Gln Glu Arg Gln Ala Ser Lys Arg Leu Gly
340 345 350

Thr Lys Leu Phe Glu Gln Ser Leu Leu Ala Glu Glu Pro Val Pro Ala
355 360 365

Lys

<210> 6
<211> 369
<212> PRT
5 <213> Desconocido

<220>
<223> Sintetizado químicamente

<400> 6

10

Met Val Ser Tyr Asn Ser Lys Phe Leu Ala Ala Thr Val Gln Ala Glu
1 5 10 15

Pro Val Trp Leu Asp Ala Asp Ala Thr Ile Asp Lys Ser Ile Gly Ile
20 25 30

Ile Glu Glu Ala Ala Gln Lys Gly Ala Ser Leu Ile Ala Phe Pro Glu
35 40 45

Val Phe Ile Pro Gly Tyr Pro Tyr Trp Ala Trp Leu Gly Asp Pro Lys
50 55 60

ES 2 549 593 T3

Tyr	Ser	Leu	Ser	Phe	Thr	Ser	Arg	Tyr	His	Glu	Asn	Ser	Leu	Glu	Leu	65	70	75	80
Gly	Asp	Asp	Arg	Met	Arg	Arg	Leu	Gln	Leu	Ala	Ala	Arg	Arg	Asn	Lys	85	90	95	
Ile	Ala	Leu	Val	Met	Gly	Tyr	Ser	Glu	Arg	Glu	Ala	Gly	Ser	Arg	Tyr	100	105	110	
Leu	Ser	Gln	Val	Phe	Ile	Asp	Glu	Arg	Gly	Glu	Ile	Val	Ala	Asn	Arg	115	120	125	
Arg	Lys	Leu	Lys	Pro	Thr	His	Val	Glu	Arg	Thr	Ile	Tyr	Gly	Glu	Gly	130	135	140	
Asn	Gly	Thr	Asp	Phe	Leu	Thr	His	Asp	Phe	Ala	Phe	Gly	Arg	Val	Gly	145	150	155	160
Gly	Leu	Asn	Cys	Trp	Glu	His	Val	Gln	Pro	Leu	Ser	Lys	Phe	Met	Met	165	170	175	
Tyr	Ser	Leu	Gly	Glu	Gln	Val	His	Val	Ala	Ser	Trp	Pro	Ala	Met	Ser	180	185	190	
Pro	Leu	Gln	Pro	Asp	Val	Phe	Gln	Leu	Ser	Ile	Glu	Ala	Asn	Ala	Thr	195	200	205	
Val	Thr	Arg	Ser	Tyr	Ala	Ile	Glu	Gly	Gln	Thr	Phe	Val	Leu	Cys	Ser	210	215	220	
Thr	Gln	Val	Ile	Gly	Pro	Ser	Ala	Ile	Glu	Thr	Phe	Cys	Leu	Asn	Asp	225	230	235	240

ES 2 549 593 T3

Glu Gln Arg Ala Leu Leu Pro Gln Gly Gly Gly Trp Ala Arg Ile Tyr
245 250 255

Gly Pro Asp Gly Ser Glu Leu Ala Lys Pro Leu Ala Glu Asp Ala Glu
260 265 270

Gly Ile Leu Tyr Ala Glu Ile Asp Leu Glu Gln Ile Leu Leu Ala Lys
275 280 285

Ala Gly Ala Asp Pro Val Gly His Tyr Ser Arg Pro Asp Val Leu Ser
290 295 300

Val Gln Phe Asp Pro Arg Asn His Thr Pro Val His Arg Ile Gly Ile
305 310 315 320

Asp Gly Arg Leu Asp Val Asn Thr Arg Ser Arg Val Glu Asn Phe Arg
325 330 335

Leu Arg Gln Ala Ala Glu Gln Glu Arg Gln Ala Ser Lys Arg Leu Gly
340 345 350

Thr Lys Leu Phe Glu Gln Ser Leu Leu Ala Glu Glu Pro Val Pro Ala
355 360 365

Lys

5 <210> 7
<211> 381
<212> PRT
<213> Desconocido

10 <220>
<223> Sintetizado químicamente

<400> 7

Met Leu Thr Tyr Lys Gly Val Phe Lys Ala Ala Thr Val Gln Ala Glu
1 5 10 15

Pro Val Trp Met Asp Ala Asp Ala Thr Ile Thr Lys Ala Ile Arg Ile
20 25 30

Ile Glu Glu Ala Ala Asp Asn Gly Ala Lys Phe Val Ala Phe Pro Glu
35 40 45

ES 2 549 593 T3

Val Phe Ile Pro Gly Tyr Pro Trp Trp Ile Trp Leu Gly Thr Ala Met
50 55 60

Trp Gly Ala Lys Phe Val Val Pro Phe His Glu Asn Cys Leu Glu Leu
65 70 75 80

Gly Asp Lys Arg Met Gln Arg Ile Gln Ala Ala Ala Lys Gln Asn Gly
85 90 95

Ile Ala Leu Val Met Gly Tyr Gly Glu Arg Asp Gly Gly Ser Arg Tyr
100 105 110

Met Ser Gln Val Phe Ile Asp Asp Ser Gly Lys Ile Val Ala Asn Arg
115 120 125

Arg Lys Leu Lys Pro Thr His Glu Glu Arg Thr Ile Phe Gly Glu Gly
130 135 140

Asn Gly Ser Asp Phe Ile Thr His Asp Phe Pro Phe Ala Arg Val Gly
145 150 155 160

Gly Phe Asn Cys Trp Glu His Leu Gln Pro Leu Ser Lys Tyr Met Met
165 170 175

Tyr Ser Leu Gln Glu Gln Val His Val Ala Ser Trp Pro Ala Met Cys
180 185 190

Thr Tyr Gln Pro Asp Val Pro Gln Leu Gly Ala Gly Ala Asn Glu Ala
195 200 205

Val Thr Arg Ser Tyr Ala Ile Glu Gly Ala Cys Tyr Val Leu Gly Ala
210 215 220

Thr Leu Val Ile Gly Lys Ala Ala His Asp Ala Phe Cys Asp Thr Glu
225 230 235 240

Glu His His Lys Leu Leu Gly Met Gly Gly Gly Trp Ala Arg Ile Phe
245 250 255

Gly Pro Asp Gly Glu Tyr Leu Ala Glu Ser Leu Ala His Asp Ala Glu
260 265 270

Gly Ile Leu Tyr Ala Asp Ile Asp Leu Ser Lys Ile Leu Leu Ala Lys
275 280 285

Ala Asn Thr Asp Thr Val Gly His Tyr Ala Arg Pro Asp Val Leu Ser
290 295 300

ES 2 549 593 T3

Leu Leu Val Asn Thr His Asn Pro Gly Pro Val Arg Tyr Leu Asp Glu
305 310 315 320

Glu Gly Arg Gln Val Ser Thr Ser Ile Arg Arg His Glu Lys Leu Glu
325 330 335

Gly Gln Ser Leu Asp Leu Glu Val Thr Pro Ala Thr Pro Ala Thr Leu
340 345 350

Asp Ile Ala Ser Leu Val Gln Gln Ala Lys Pro Ser Thr Val Lys Ser
355 360 365

Glu Ser Asn Ala Ser Thr Lys Gln Pro Asp Leu Ala Val
370 375 380

- <210> 8
- <211> 369
- <212> PRT
- 5 <213> Desconocido
- <220>
- <223> Sintetizado químicamente
- 10 <400> 8

ES 2 549 593 T3

Met Leu Thr Tyr Lys Gly Val Phe Lys Ala Ala Thr Val Gln Ala Glu
 1 5 10 15
 Pro Val Trp Met Asp Ala Asp Ala Thr Ile Thr Lys Ala Ile Arg Ile
 20 25 30
 Ile Glu Glu Ala Ala Asp Asn Gly Ala Lys Phe Val Ala Phe Pro Glu
 35 40 45
 Val Phe Ile Pro Gly Tyr Pro Tyr Trp Ala Trp Leu Gly Asp Pro Lys
 50 55 60
 Tyr Ser Leu Ser Phe Thr Ser Arg Tyr His Glu Asn Ser Leu Glu Leu
 65 70 75 80
 Gly Asp Asp Arg Met Arg Arg Leu Gln Leu Ala Ala Arg Gln Asn Lys
 85 90 95
 Ile Ala Leu Val Met Gly Tyr Ser Glu Arg Glu Ala Gly Ser Arg Tyr
 100 105 110
 Leu Ser Gln Val Phe Ile Asp Glu Arg Gly Glu Ile Val Ala Asn Arg
 115 120 125
 Arg Lys Leu Lys Pro Thr His Val Glu Arg Thr Ile Tyr Gly Glu Gly
 130 135 140
 Asn Gly Thr Asp Phe Leu Thr His Asp Phe Ala Phe Gly Arg Val Gly
 145 150 155 160
 Gly Leu Asn Cys Trp Glu His Val Gln Pro Leu Ser Lys Phe Met Met
 165 170 175
 Tyr Ser Leu Gly Glu Gln Val His Val Ala Ser Trp Pro Ala Met Ser
 180 185 190
 Pro Tyr Gln Pro Asp Val Phe Gln Leu Ser Ile Glu Ala Asn Ala Ala
 195 200 205
 Val Thr Arg Ser Tyr Ala Ile Glu Gly Gln Thr Phe Val Leu Cys Ser
 210 215 220

ES 2 549 593 T3

Thr Gln Val Ile Gly Pro Ser Ala Ile Glu Thr Phe Cys Leu Asn Asp
225 230 235 240

Glu Gln Arg Ala Leu Leu Pro Gln Gly Gly Gly Trp Ala Arg Ile Tyr
245 250 255

Gly Pro Asp Gly Ser Glu Leu Ala Lys Pro Leu Ala Glu Asp Ala Glu
260 265 270

Gly Ile Leu Tyr Ala Glu Ile Asp Leu Glu Gln Ile Leu Leu Ala Lys
275 280 285

Ala Gly Ala Asp Pro Val Gly His Tyr Ser Arg Pro Asp Val Leu Ser
290 295 300

Leu Gln Phe Asp Pro Arg Asn His Thr Pro Val His Arg Ile Gly Ile
305 310 315 320

Asp Gly Arg Leu Asp Val Asn Thr Arg Ser Arg Val Glu Asn Phe Arg
325 330 335

Leu Arg Gln Ala Ala Glu Gln Glu Arg Gln Ala Ser Lys Arg Leu Gly
340 345 350

Thr Lys Leu Phe Glu Gln Ser Leu Leu Ala Glu Glu Pro Val Pro Ala
355 360 365

Lys

REIVINDICACIONES

1. Nitrilasa que incluye una secuencia de aminoácidos con al menos un 60% de identidad con respecto a la secuencia de aminoácidos según la ID Sec. N°: 2, que en comparación con la nitrilasa según la ID Sec. N°: 2
 - i) presenta un incremento de al menos un 15% de la actividad en la reacción de un nitrilo para producir el ácido carboxílico correspondiente, seleccionándose el nitrilo preferentemente entre el grupo consistente en 2-metilglutaronitrilo, 1-(cianometil)ciclohexano-1-carbonitrilo y benzonitrilo; y
 - ii) presenta al menos una sustitución de aminoácido seleccionada entre el grupo consistente en:
 - a) sustitución de Leu en la posición que corresponde a la posición 9 de ID Sec. N°: 2 por un aminoácido seleccionado entre el grupo consistente en Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr y Val;
 - b) sustitución de Val en la posición que corresponde a la posición 63 de ID Sec. N°: 2 por un aminoácido seleccionado entre el grupo consistente en Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp y Tyr;
 - c) sustitución de Thr en la posición que corresponde a la posición 70 de ID Sec. N°: 2 por un aminoácido seleccionado entre el grupo consistente en Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Trp, Tyr y Val;
 - d) sustitución de Arg en la posición que corresponde a la posición 94 de ID Sec. N°: 2 por un aminoácido seleccionado entre el grupo consistente en Ala, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr y Val;
 - e) sustitución de Leu en la posición que corresponde a la posición 194 de ID Sec. N°: 2 por un aminoácido seleccionado entre el grupo consistente en Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr y Val;
 - f) sustitución de Thr en la posición que corresponde a la posición 208 de ID Sec. N°: 2 por un aminoácido seleccionado entre el grupo consistente en Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Trp, Tyr y Val;
 - g) sustitución de Cys en la posición que corresponde a la posición 250 de ID Sec. N°: 2 por un aminoácido seleccionado entre el grupo consistente en Ala, Arg, Asn, Asp, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr y Val;
 - h) sustitución de Val en la posición que corresponde a la posición 305 de ID Sec. N°: 2 por un aminoácido seleccionado entre el grupo consistente en Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp y Tyr; y
 - i) sustitución de Asp en la posición que corresponde a la posición 308 de ID Sec. N°: 2 por un aminoácido seleccionado entre el grupo consistente en Ala, Arg, Asn, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr y Val.
2. Nitrilasa según la reivindicación 1, caracterizada porque presenta al menos una sustitución de aminoácido seleccionada entre el grupo consistente en:
 - a) sustitución de Leu en la posición que corresponde a la posición 9 de ID Sec. N°: 2 por Lys, Glu, Ile o Arg;
 - b) sustitución de Val en la posición que corresponde a la posición 63 de ID Sec. N°: 2 por Pro, Ile, Met o Thr;
 - c) sustitución de Thr en la posición que corresponde a la posición 70 de ID Sec. N°: 2 por Ile, Ala, Cys, Asp, Glu, Phe, Gly, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Ser, Tyr; Arg o Val;
 - d) sustitución de Arg en la posición que corresponde a la posición 94 de ID Sec. N°: 2 por Gln, Glu, Phe, Gly, Lys, Met, Asn, Pro, Ala, Gly, His, Ile, Leu, Ser, Thr, Val o Tyr;
 - e) sustitución de en la posición que corresponde a la posición 194 de ID Sec. N°: 2 por Tyr, Cys, Lys o Met;
 - f) sustitución de Thr en la posición que corresponde a la posición 208 de ID Sec. N°: 2 por Ala, Gly o Leu;
 - g) sustitución de Cys en la posición que corresponde a la posición 250 de ID Sec. N°: 2 por Gly, Ala, Phe, Lys, Met, Arg, Ser, Thr, Tyr o His;
 - h) sustitución de Val en la posición que corresponde a la posición 305 de ID Sec. N°: 2 por Leu o Met; y
 - i) sustitución de Asp en la posición que corresponde a la posición 308 de ID Sec. N°: 2 por Asn o Trp.
3. Nitrilasa según la reivindicación 1 o 2, caracterizada porque presenta al menos dos sustituciones de aminoácidos seleccionadas entre el grupo consistente en a), b), c), d), e), f), g), h) e i).
4. Nitrilasa según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizada porque presenta al menos tres sustituciones de aminoácidos seleccionadas entre el grupo consistente en a), b), c), d), e), f), g), h) e i).
5. Nitrilasa según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizada porque adicionalmente presenta al menos otra sustitución de aminoácido seleccionada entre el grupo consistente en:
 - j) sustitución de Tyr en la posición que corresponde a la posición 65 de ID Sec. N°: 2 por un aminoácido seleccionado entre el grupo consistente en Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp y Val;

- 5 k) sustitución de Phe en la posición que corresponde a la posición 168 de ID Sec. Nº: 2 por un aminoácido seleccionado entre el grupo consistente en Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr y Val;
- l) sustitución de Phe en la posición que corresponde a la posición 174 de ID Sec. Nº: 2 por un aminoácido seleccionado entre el grupo consistente en Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr y Val;
- 10 m) sustitución de Ile en la posición que corresponde a la posición 201 de ID Sec. Nº: 2 por un aminoácido seleccionado entre el grupo consistente en Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr y Val; y
- n) sustitución de Thr en la posición que corresponde a la posición 210 de ID Sec. Nº: 2 por un aminoácido seleccionado entre el grupo consistente en Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Trp, Tyr y Val.
- 15 6. Nitrilasa según una de las reivindicaciones anteriores, que, después de un tratamiento térmico en el que la actividad de la nitrilasa según ID Sec. Nº: 2 se reduce al menos en un 40%, posee una actividad residual al menos un 10% mayor en comparación con la nitrilasa según ID Sec. Nº: 2 en lo que respecta a la reacción de un nitrilo para obtener el ácido carboxílico correspondiente, seleccionándose el nitrilo entre el grupo consistente en 2-metilglutaronitrilo, 1-(cianometil)ciclohexano-1-carbonitrilo y benzonitrilo.
7. Nitrilasa que incluye una secuencia de aminoácidos que presenta una identidad de más de un 95% con respecto a la secuencia de aminoácidos según ID Sec. Nº: 8.
- 20 8. Procedimiento para la producción de un ácido carboxílico a partir de nitrilos mediante la puesta en contacto de un nitrilo con una nitrilasa según una de las reivindicaciones anteriores.
9. Procedimiento según la reivindicación 8 para la producción de un ácido carboxílico seleccionado entre el grupo consistente en ácido 4-cianopentanoico, ácido 3-hidroxivalérico y ácido glicólico.