

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
19. April 2012 (19.04.2012)

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2012/048865 A2

- (51) **Internationale Patentklassifikation:**
C07K 14/195 (2006.01) C12N 9/78 (2006.01)
C12N 9/42 (2006.01)
- (21) **Internationales Aktenzeichen:** PCT/EP2011/005115
- (22) **Internationales Anmeldedatum:**
12. Oktober 2011 (12.10.2011)
- (25) **Einreichungssprache:** Deutsch
- (26) **Veröffentlichungssprache:** Deutsch
- (30) **Angaben zur Priorität:**
10013548.2 12. Oktober 2010 (12.10.2010) EP
- (71) **Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US):** C-LECTA GMBH [DE/DE]; Deutscher Platz 5, 04103 Leipzig (DE).
- (72) **Erfinder; und**
- (75) **Erfinder/Anmelder (nur für US):** VOGEL, Andreas [DE/DE]; Funkenburgstr. 29, 04105 Leipzig (DE). SCHWARZE, Daniel [DE/DE]; Saalbahnhof str. 4, 07743 Jena (DE). GREINER-STÖFFELE, Thomas [DE/DE]; Dürrstraße 55, 04279 Leipzig (DE).
- (74) **Anwälte:** BÜLLE, Jan et al.; Kutzenberger & Wolff, Theodor-Heuss-Ring 23, 50668 Köln (DE).
- (81) **Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare nationale Schutzrechtsart):** AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) **Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart):** ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Veröffentlicht:**
— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts (Regel 48 Absatz 2 Buchstabe g)

(54) **Title:** NITRILASES

(54) **Bezeichnung:** NITRILASEN

(57) **Abstract:** The invention relates to a nitrilase having improved activity in the reaction of a nitrile to form the corresponding carboxylic acid, in particular with respect to reacting 2-methylglutaronitrile, 1-(cyanomethyl)cyclohexane-1-carbonitrile, and benzonitrile. The nitrilase according to the invention is related to nitrilase from *acidovorax facilis*.

(57) **Zusammenfassung:** Die Erfindung betrifft eine Nitrilase mit verbesserter Aktivität bei der Umsetzung eines Nitrils zur entsprechenden Carbonsäure, insbesondere im Hinblick auf die Umsetzung von 2-Methylglutaronitril, 1-(Cyanomethyl)cyclohexan-1-carbonitril und Benzonitril. Die erfindungsgemäße Nitrilase ist der Nitrilase aus *Acidovorax facilis* verwandt.



WO 2012/048865 A2

Nitrilasen

Die Erfindung betrifft Nitrilasen mit erhöhter Aktivität und Temperaturstabilität. Nitrilasen werden für die Synthese von Carbonsäuren aus den entsprechenden Nitrilen eingesetzt. Sie zeichnen sich gegenüber chemischen Katalysatoren durch mildere Reaktionsbedingungen aus und werden bevorzugt für regio- und stereoselektive Hydrolysen eingesetzt, bei denen es bisher keine chemische Alternative gibt. Der Einsatz von Nitrilasen zur Synthese von Carbonsäuren ist in der Literatur beschrieben (R. Singh, R. Sharma, N. Tewari, and D. S. Rawat. *Chem Biodivers.* 3 (12):1279-1287, 2006.)

Um einen kostengünstigen Syntheseprozess realisieren zu können, werden bevorzugt Nitrilasen eingesetzt, die eine hohe spezifische Aktivität und eine lange Prozessstabilität besitzen. Dadurch ist es möglich, eine geringere Katalysatormenge einzusetzen. Eine hohe Prozessstabilität korreliert zumeist mit einer erhöhten Temperaturstabilität der Enzyme. Ein Enzym mit erhöhter Temperaturstabilität hat darüber hinaus den Vorteil, dass der Prozess auch bei höheren Temperaturen effektiv durchgeführt werden kann, was häufig zu noch schnelleren Reaktionszeiten führt.

Nitrilasen sind aus verschiedenen Mikroorganismen isoliert worden, z.B. aus den Gattungen *Aspergillus*, *Arthrobacter*, *Geobacillus*, *Fusarium*, *Norcadia*, *Rhodococcus*, *Alcaligenes*, *Acidovorax*, *Acinetobacter*, *Bradyrhizopium*, *Pseudomonas*, *Pyrococcus*, *Bacillus*. (R. N. Thuku, D. Brady, M. J. Benedik, and B. T. Sewell. *Journal of Applied Microbiology* 106 (3):703-727, 2009; C. O'Reilly and P. D. Turner. *Journal of Applied Microbiology* 95 (6):1161-1174, 2003.)

Die Nitrilase aus *Acidovorax facilis* wurde erstmals beschrieben in US 6,870,038. Die heterologe Expression des Enzyms in *E. coli* führte zu einer Steigerung der Aktivität pro Biomasse um ca. Faktor 3 (US 6,870,038).

Eine Möglichkeit zur Verbesserung von Enzymen besteht in der Anwendung von Enzym-Engineering. Enzym-Engineering zielt auf die Entwicklung von Varianten eines Ausgangsenzyms mit verbesserten Eigenschaften ab.

Mutationen zur Aktivitätssteigerung einer Nitrilase für die Herstellung von 3-Hydroxyvalerinsäure sind beschrieben in: S. Wu, A. J. Fogiel, K. L. Petrillo, E. C. Hann, L. J.

Mersinger, R. DiCosimo, D. P. O'Keefe, A. Ben Bassat, and M. S. Payne. *Biotechnol. Bioeng.* 97 (4):689-693, 2007 und US 7148051. Ein Austausch der Aminosäuren an den Positionen T210 zu A oder C und an F168 zu K, V oder L führte zu einer erhöhten Aktivität. Weitere Mutationen der *Acidovorax facilis* Nitrilase sind beschrieben in S. Wu, A. J. Fogiel, K. L. Petrillo, R. E. Jackson, K. N. Parker, R. DiCosimo, A. Ben Bassat, D. P. O'Keefe, and M. S. Payne. *Biotechnol. Bioeng.* 99 (3):717-720, 2008. und US 7198927. Es wird dort eine Aktivitätssteigerung für die Synthese von Glykolsäure aus Glykolnitril für die Einzelmutationen F168 zu V, K, M, T, L201 zu N, Q, K, H, S, T, A, G sowie für einige Varianten mit Kombinationen dieser Einzelmutationen beschrieben. Bei der Variante F168V wurde zudem eine gesteigerte Temperaturstabilität der enzymhaltigen Zellsuspension gegenüber der Zelle, die das Wildtyp-Enzym enthält, festgestellt. Hier wurde die Temperaturstabilität des Biokatalysators innerhalb der intakten *E. coli* Zelle getestet, die i.d.R. einen günstigen Einfluss auf die Proteinestabilität hat.

US 2009/111158 offenbart ein Verfahren zur Herstellung enzymatischer Katalysatoren mit Nitrilase-Aktivität zur Hydrolyse von Glykolnitril zu Glykolsäure.

WO 2006/069114 betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Glykolsäure aus Formaldehyd und Blausäure.

US 2010/240109 offenbart ein Verfahren zur Verbesserung der spezifischen Aktivität enzymatischer Katalysatoren mit Nitrilase-Aktivität bei der Umsetzung von Glykolnitril zu Glykolsäure in wässrigem Medium.

WO 2006/069110 verschiedene Methoden zur enzymatischen Herstellung von Glykolsäure aus Glykolnitril.

K.T. Barglow et al., *Biochemistry* 2008, 47, 13514-13525 offenbart funktionelle und strukturelle Untersuchungen zur molekularen Erkennung bei Enzymen der Familie der Nitrilasen.

EP 1 767 624 offenbart Proteine mit verbesserter Nitrilhydratase-Aktivität und verbesserter Hitzeresistenz.

L. Martinkova et al., *Curr Op in Chem Biol*, Bd. 14, Nr. 2, 2010, 130-137 betrifft Untersuchungen zu Biotransformationen mit Hilfe von Nitrilasen.

G. DeSantis et al., J Am Chem Soc 125(83), 2003, 11476-11477 offenbart die Erzeugung produktiver, hochgradig enantioselektiver Nitrilasen mit Hilfe von Sättigungs-Mutagenese (GSSM).

S. Chauvan et al., Appl Microbiol Biotech, Bd. 61, Nr. 2, 2003, 118-122 betrifft die Reinigung, Klonierung, Sequenzierung und Überexprimierung einer regioselektiven aliphatischen Nitrilase aus *Acidovorax facilis* 72W in *E. coli*.

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, eine Nitrilase mit verbesserten Eigenschaften bereitzustellen. Die Nitrilase sollte sich im Vergleich zu den bekannten Nitrilasen durch eine erhöhte Aktivität auszeichnen, so dass die Einsatzmenge des Enzyms verringert oder die Reaktionszeiten verkürzt werden können. Ferner sollte die Nitrilase eine erhöhte Stabilität, insbesondere eine erhöhte Temperaturstabilität aufweisen, um eine längere Lebensdauer während der durch sie katalysierten Umsetzung zu ermöglichen. Die Umsetzung kann dann mit geringerer Enzymmenge für längere Zeit bzw. mit hoher Reaktionsgeschwindigkeit bei erhöhter Temperatur durchgeführt werden.

Diese Aufgabe wird durch den Gegenstand der Patentansprüche gelöst.

Es wurden überraschend Aminosäure-Positionen in der Protein-Sequenz der Nitrilase aus *Acidovorax facilis* (Seq ID No: 2) gefunden, die durch Substitution (Austausch) der Aminosäuren an einzelnen Positionen und/oder durch Kombination mehrerer Positionen eine erhöhte Aktivität mit verschiedenen Substraten und/oder eine erhöhte Temperaturstabilität zeigen. Dieser Effekt ist überraschenderweise auch bei den isolierten Enzymen, die sich außerhalb intakter Zellen befinden, zu beobachten. Insbesondere konnten überraschenderweise Aminosäure-Positionen identifiziert werden, an denen Einzelmutationen gleichzeitig zu einer Verbesserung der Aktivität und der Stabilität des Enzyms führen. Ebenfalls überraschenderweise konnten Aminosäure-Positionen identifiziert werden, deren Kombination zu einer synergistischen Verbesserung der relevanten Eigenschaften des Enzyms führen (Kombinierbarkeit der Einzelmutationen).

Infolge der Erhöhung der Aktivität kann die Einsatzmenge des Enzyms verringert oder die Reaktionszeiten verkürzt werden. Beides wirkt sich direkt positiv auf die Synthesekosten aus und hat damit wirtschaftliche Bedeutung. Die verbesserte Stabilität, im speziellen der Temperaturstabilität des Enzyms, ermöglicht eine längere Lebensdauer während der Umsetzung. Die Umsetzung kann daher mit geringerer Enzymmenge für längere Zeit durchgeführt werden oder die Umsetzung kann mit hoher Reaktionsgeschwindigkeit bei

erhöhter Temperatur durchgeführt werden. Beide Maßnahmen führen zu einer Reduktion der Synthesekosten.

Im Gen der Nitrilase aus *Acidovorax facilis* konnten Aminosäure-Positionen identifiziert werden, die zu einer Steigerung der Aktivität und der Stabilität des Enzyms führen. Gezeigt werden konnte dies für die Positionen L9, V63, T70, R94, F168, L194, T208, C250, V305 und D308. Die Substitutionen führten dabei überraschenderweise sowohl zu einer Aktivitätssteigerung bei den Positionen L9, V63, T70, F168, T208, C250 als auch zu einer Erhöhung der Temperaturstabilität an den Positionen L9, V63, T70, R94, F168, C250, V305. Es wurde überraschend gefunden, dass Substitutionen an den einzelnen Positionen kombiniert werden können, wodurch eine weitere Steigerung der Aktivität und Temperaturstabilität erreicht wird.

Definitionen

Ausgangsenzym

Mit dem Ausgangsenzym ist die Nitrilase aus *Acidovorax facilis* gemäß Seq ID 2 gemeint, welches durch die Nukleotidsequenz entsprechend Seq 1 kodiert wird. Das Enzym kann durch heterologe Expression produziert werden. Dabei wird ein Gen mit einer für das Ausgangsenzym kodierenden Nukleotidsequenz in einen entsprechenden Expressionsvektor eingebaut und in eine Wirtszelle eingebracht. Als Wirtszelle eignen sich unter anderem Stämme der Gattung *Escherichia*, *Bacillus*, *Saccharomyces*, *Pichia*, *Hansenula* und *Kluyveromyces*.

Substitution

Eine Verbesserung der Enzymeigenschaften wird durch eine veränderte Abfolge der Aminosäuren im Polypeptid des Ausgangsenzyms erreicht. Bei einer Substitution wird eine Aminosäure durch eine andere ersetzt. Es können dabei auch mehrere Aminosäuren entweder nacheinander oder gleichzeitig ersetzt werden.

Aktivität

Die Aktivität der Nitrilase Enzyme wird durch die Beobachtung der von Ihnen katalysierten Reaktion der Hydrolyse von Nitrilen zu Carbonsäuren gemessen. Dabei werden verschiedene Nitrile, wie 2-Methylglutaronitril (2MG), 1-(Cyanomethyl)cyclohexan-1-carbonitril (CH-dinitril) oder Benzonitril eingesetzt. Eine Enzym Einheit entspricht dabei der Hydrolyse von 1 µmol Nitril in 1 Minute unter definierten Bedingungen und wird in Units (U) angegeben. Die Reaktionsanalyse geschieht in der Regel über GC- oder HPLC-Analytik. Standard-

bedingungen für die hier beschriebenen Untersuchungen sind: 5 mM 2MG in 100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7.0 wird bei 30°C für 15 min mit einer Nitrilase in Kontakt gebracht in einem Gesamtvolumen von 200 µl. Die Reaktion wird nach dieser Zeit mit 30 µl 1 N Salzsäurelösung gemischt, wodurch die Reaktion gestoppt wird. Die angesäuerte Reaktionslösung wird mit 230 µl Methyl-tert-butylether (MTBE) extrahiert wobei das Nitril und die entstandene Carbonsäure in die organische Phase überführt werden. Die MTBE Phase wird dann mittels Gaschromatographie (GC) analysiert (Säule: ZB-5HT (Phenomenex, Germany), 1 min bei 80°C, auf 130°C mit 20°C/min, 1 min bei 130°C. Die Detektion erfolgt mit einem Flammenionisationsdetektor (FID)).

Temperaturstabilität

Die Temperaturstabilität wird gemessen in dem eine Enzymlösung in 100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7.0 mit 1 mM DTT für 15 min bei einer definierten Temperatur inkubiert wird. Nach dieser Zeit wird die Enzymlösung für 10 min auf Eis inkubiert. Die Lösung wird zentrifugiert um unlösliche Bestandteile abzutrennen und die Aktivität der überstehenden Lösung gemessen. Die Restaktivität in % wird erhalten in dem die Aktivität nach der Temperaturbehandlung durch die gemessene Aktivität ohne Temperaturbehandlung dividiert wird.

Nitrilasen katalysieren die Hydrolyse von Nitrilen zu Carbonsäuren ohne Zwischenstufe, d.h. die Reaktion verläuft durch Addition zweier Wassermoleküle vollständig bis zur Carbonsäure unter Freisetzung von Ammoniak, ohne dass die Amid-Zwischenstufe isoliert werden kann. Nitrilasen werden systematisch auch als "Nitril-Aminohydrolasen" bezeichnet (E.C. 3.5.5.1).

Die Erfindung betrifft eine Nitrilase umfassend eine Aminosäuresequenz mit mindestens 60% Homologie zur Aminosäuresequenz gemäß (Seq ID No: 2), welche im Vergleich zur Nitrilase gemäß (Seq ID No: 2)

- (i) eine um mindestens 15% gesteigerte Aktivität bei der Umsetzung eines Nitrils zur entsprechenden Carbonsäure aufweist, wobei das Nitril bevorzugt ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus 2-Methylglutaronitril, 1-(Cyanomethyl)cyclohexan-1-carbonitril und Benzonitril;

und/oder

- (ii) bestimmte Aminosäure-Substitutionen aufweist.

Bevorzugte Aminosäure-Substitutionen sind in Tabelle 1 zusammengestellt. Besonders bevorzugte Substitutionen sind in der rechten Spalte dargestellt. Die Erfindung betrifft auch alle möglichen Kombinationen der gezeigten Aminosäure-Substitutionen:

Tabelle 1:

AS-Position	Wildtyp AS	Substitutionen mit erhöhter Aktivität und Temperaturstabilität	bevorzugt	besonders bevorzugt
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

Besonders bevorzugte Kombinationen beinhalten Enzyme die alle denkbaren Kombinationen der Substitutionen V63P, F168V und C250G enthalten, wie sie zum Beispiel bei den Enzym-Mutanten gemäß (Seq ID No: 3), (Seq ID No: 4), (Seq ID No: 5), und (Seq ID No: 6) gezeigt sind.

Bevorzugte Ausführungsformen der Erfindung betreffen somit Nitrilasen, bei denen im Vergleich zur Wildtyp Nitrilase aus *Acidovorax facilis* (Seq ID No: 2)

- der Rest Leu an der Position, welche Position 9 entspricht, ausgetauscht ist durch einen Rest ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, Val; besonders bevorzugt ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Lys, Glu, Ile, Arg; insbesondere Lys; und/oder
- der Rest Val an der Position, welche Position 63 entspricht, ausgetauscht ist durch einen Rest ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr; besonders bevorzugt ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Pro, Ile, Met, Thr; insbesondere Pro; und/oder
- der Rest Thr an der Position, welche Position 70 entspricht, ausgetauscht ist durch einen Rest ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Trp, Tyr, Val; besonders bevorzugt ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Ile, Ala, Cys, Asp, Glu, Phe, Gly, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Ser, Tyr, Arg, Val; insbesondere Ile; und/oder
- der Rest Arg an der Position, welche Position 94 entspricht, ausgetauscht ist durch einen Rest ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Ala, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, Val; besonders bevorzugt ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Gln, Glu, Phe, Gly, Lys, Met, Asn, Pro, Ala, Gly, His, Ile, Leu, Ser, Thr, Val, Tyr; insbesondere Gln und/oder
- der Rest Leu an der Position, welche Position 194 entspricht, ausgetauscht ist durch einen Rest ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, Val; besonders bevorzugt ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Tyr, Cys, Lys, Met; insbesondere Tyr; und/oder
- der Rest Thr an der Position, welche Position 208 entspricht, ausgetauscht ist durch einen Rest ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Trp, Tyr, Val; besonders bevorzugt ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Ala, Gly, Leu; insbesondere Ala; und/oder
- der Rest Cys an der Position, welche Position 250 entspricht, ausgetauscht ist durch einen Rest ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Ala, Arg, Asn, Asp, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, Val; besonders bevorzugt ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Gly, Ala, Phe, Lys, Met, Arg, Ser, Thr, Tyr, His; insbesondere Gly; und/oder

- der Rest Val an der Position, welche Position 305 entspricht, ausgetauscht ist durch einen Rest ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr; besonders bevorzugt ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Leu, Met; insbesondere Leu; und/oder
- der Rest Asp an der Position, welche Position 308 entspricht, ausgetauscht ist durch einen Rest ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Ala, Arg, Asn, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, Val; besonders bevorzugt ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Asn, Trp; insbesondere Asn.

Definiert man die Substitution an der Position, welche Position 9 entspricht, durch einen Aminosäurerest ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Lys, Glu, Ile, Arg; bevorzugt Lys; als "A"; die Substitution an der Position, welche Position 63 entspricht, durch einen Aminosäurerest ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Pro, Ile, Met, Thr; bevorzugt Pro; als "B"; die Substitution an der Position, welche Position 70 entspricht, durch einen Aminosäurerest ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Ile, Ala, Cys, Asp, Glu, Phe, Gly, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Ser, Tyr, Arg, Val; bevorzugt Ile; als "C"; die Substitution an der Position, welche Position 94 entspricht, durch einen Aminosäurerest ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Gln, Glu, Phe, Gly, Lys, Met, Asn, Pro, Ala, Gly, His, Ile, Leu, Ser, Thr, Val, Tyr; bevorzugt Gln; als "D"; die Substitution an der Position, welche Position 168 entspricht, durch Val als "E"; die Substitution an der Position, welche Position 194 entspricht, durch einen Aminosäurerest ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Tyr, Cys, Lys, Met; bevorzugt Tyr; als "F"; die Substitution an der Position, welche Position 208 entspricht, durch einen Aminosäurerest ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Ala, Gly, Leu; bevorzugt Ala; als "G"; die Substitution an der Position, welche Position 250 entspricht, durch einen Aminosäurerest ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Gly, Ala, Phe, Lys, Met, Arg, Ser, Thr, Tyr, His; bevorzugt Gly; als "H"; die Substitution an der Position, welche Position 305 entspricht, durch einen Aminosäurerest ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Leu, Met; bevorzugt Leu; als "I"; und die Substitution an der Position, welche Position 308 entspricht, durch einen Aminosäurerest ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Asn, Trp; bevorzugt Asn; als "J"; jeweils im Vergleich zur Wildtyp Nitrilase aus *Acidovorax facilis* (Seq ID No: 2), so lassen sich bevorzugte Ausführungsformen der erfindungsgemäßen Nitrilase in Kurzschreibweise wie folgt darstellen:

Einfache Substitutionen sind bevorzugt ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus A, B, C, D, E, F, G, H, I und J. Dabei bedeutet beispielsweise der Buchstabe G, dass es sich um eine Nitrilase handelt, bei der im Vergleich zur Wildtyp Nitrilase aus *Acidovorax facilis* (Seq ID No:

2) an der Position, welche Position 208 entspricht Thr des Wildtyps durch Ala, Gly oder Leu ausgetauscht wurde, ansonsten jedoch alle Aminosäurepositionen dem Wildtyp entsprechen.

Zweifache Substitutionen sind in entsprechender Schreibweise bevorzugt ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus 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 und IJ.

Dreifache Substitutionen sind in entsprechender Schreibweise bevorzugt ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus 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, und HIJ.

In einer bevorzugten Ausführungsform weist die erfindungsgemäße Nitrilase im Vergleich zur Wildtyp Nitrilase aus *Acidovorax facilis* (Seq ID No: 2) wenigstens vier Substitutionen an den Positionen, welche Positionen 9, 63, 70, 94, 168, 194, 208, 250, 305, oder 308 entsprechen, auf, wobei drei dieser Substitutionen ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus 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, und HIJ.

In einer bevorzugten Ausführungsform weist die erfindungsgemäße Nitrilase im Vergleich zur Wildtyp Nitrilase aus *Acidovorax facilis* (Seq ID No: 2) wenigstens fünf Substitutionen an Positionen, welche Positionen 9, 63, 70, 94, 168, 194, 208, 250, 305, oder 308 entsprechen, auf, wobei drei dieser Substitutionen ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus 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, und HIJ.

In einer bevorzugten Ausführungsform weist die erfindungsgemäße Nitrilase im Vergleich zur Wildtyp Nitrilase aus *Acidovorax facilis* (Seq ID No: 2) wenigstens sechs Substitutionen an Positionen, welche Positionen 9, 63, 70, 94, 168, 194, 208, 250, 305, oder 308 entsprechen, auf, wobei drei dieser Substitutionen ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus 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, und HIJ.

In einer bevorzugten Ausführungsform weist die erfindungsgemäße Nitrilase im Vergleich zur Wildtyp Nitrilase aus *Acidovorax facilis* (Seq ID No: 2) wenigstens sieben Substitutionen an Positionen, welche Positionen 9, 63, 70, 94, 168, 194, 208, 250, 305, oder 308 entsprechen, auf, wobei drei dieser Substitutionen ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus 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, und HIJ.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform weist die erfindungsgemäße Nitrilase wenigstens drei, vier, fünf, sechs, sieben, acht, neun oder zehn Substitutionen im Vergleich zur Wildtyp Nitrilase aus *Acidovorax facilis* (Seq ID No: 2) auf, umfassend die drei Substitutionen V63P, F168V und C250G.

Eine weitere erfindungsgemäße Nitrilase wurde aus einem unkultivierbaren Organismus gewonnen und ist in (Seq ID No: 7) gezeigt. Durch eine geeignete Kombination der Sequenzen aus (Seq ID No: 1) mit (Seq ID No: 7) und Einfügen einer Kombination der in Tabelle 1 gezeigten Substitutionen wurde ein Enzym der (Seq ID No: 8) erzeugt, das überraschenderweise eine stark gesteigerte Aktivität und Temperaturstabilität im Vergleich mit dem Ausgangsenzym aufweist.

Die erfindungsgemäße Nitrilase weist bevorzugt im Vergleich zu der Aminosäuresequenz der Nitrilase aus *Acidovorax facilis* (Seq ID No: 2) eine Homologie von mindestens 60% oder mindestens 65%, bevorzugt mindestens 70% oder mindestens 75%, besonders bevorzugt mindestens 80% oder mindestens 85%, ganz besonders bevorzugt mindestens 90% oder mindestens 92%, ebenso bevorzugt mindestens 93% oder mindestens 94%, sowie besonders bevorzugt mindestens 95%, mindestens 96%, mindestens 97% oder mindestens 98% und am bevorzugtesten mindestens 99% auf.

Im Sinne der Erfindung wird die Homologie einer Sequenz bevorzugt berechnet als Identität mittels BLASTP 2.2.20+ (Stephen F. Altschul, Thomas L. Madden, Alejandro A. Schäffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997)), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402; Stephen F. Altschul, John C. Wootton, E. Michael Gertz, Richa Agarwala, Aleksandr Morgulis, Alejandro A. Schäffer, and Yi-Kuo Yu (2005) ".

Die Position der beanspruchten Substitutionen wird bei zu der Aminosäuresequenz der Nitrilase aus *Acidovorax facilis* (Seq ID No: 2) homologen Nitrilasen aus einem Sequenz- oder Struktur-basierten Alignment bestimmt. Methoden und Werkzeuge für solche Alignments sind dem Fachmann bekannt. So werden für Sequenz-basierte Alignments zum Beispiel 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. and Higgins D.G. (2007), *Bioinformatics* 23(21): 2947-2948), Multialign (F. CORPET, 1988, *Nucl. Acids Res.*, 16 (22), 10881-10890) oder Dialign (Subramanian AR, Hiran S, Steinkamp R, Meinicke P, Corel E, Morgenstern B., *Nucleic Acids Res.* 2010 Jul 1;38 Suppl:W19-22) und Struktur-basierte Alignments durch Swiss-Model (Arnold K., Bordoli L., Kopp J., and Schwede T. (2006), *Bioinformatics*, 22,195-201.), CPHmodels (Nielsen M., Lundegaard C., Lund O., Petersen TN, *Nucleic Acids Research*, 2010, Vol. 38) oder Geno3D (Combet C, Jambon M, Deléage G & Geourjon C, *Bioinformatics*, 2002, 18, 213-214) genutzt.

Die entsprechenden Positionen in den homologen Sequenzen können somit durch Insertion oder Deletion von einer oder mehreren Aminosäuren entsprechend verschoben sein. Weiterhin ist es ebenso möglich, dass die entsprechend homologen Nitrilasen an der durch die Aligments zugeordneten Positionen eine andere Aminosäure als die Nitrilase aus *Acidovorax facilis* (Seq ID No: 2) aufweisen, so dass zum Beispiel Leu9 aus Seq ID No. 2 in der homologen Nitrilase 1 Ile11, in der homologen Nitrilase 2 Val8 oder in der homologen Nitrilase X Aminosäure Y entspricht. Für alle anderen genannten Positionen gilt dies entsprechend.

Das erfindungsgemäße Enzym entspricht bevorzugt einer Nitrilase mit mehr als 60% Homologie zu der Aminosäuresequenz gemäß (Seq ID No: 2), welche mindestens 1, bevorzugt mindestens 2, bevorzugter mindestens 3, besonders bevorzugt mindestens 4, ebenso bevorzugt mindestens 5 und am bevorzugtesten mindestens 6 Aminosäure-Substitution(en) ausgewählt aus der folgenden Gruppe aufweist:

- a) eine Substitution in der Position, die Position 9 in (Seq ID No: 2) entspricht
- b) eine Substitution in der Position, die Position 63 in (Seq ID No: 2) entspricht
- c) eine Substitution in der Position, die Position 70 in (Seq ID No: 2) entspricht
- d) eine Substitution in der Position, die Position 94 in (Seq ID No: 2) entspricht
- e) eine Substitution in der Position, die Position 194 in (Seq ID No: 2) entspricht
- f) eine Substitution in der Position, die Position 208 in (Seq ID No: 2) entspricht
- g) eine Substitution in der Position, die Position 250 in (Seq ID No: 2) entspricht
- h) eine Substitution in der Position, die Position 305 in (Seq ID No: 2) entspricht
- i) eine Substitution in der Position, die Position 308 in (Seq ID No: 2) entspricht

und/oder das Enzym im Vergleich zum Ausgangsenzym eine um mindestens 15% gesteigerte Aktivität bei der Umsetzung eines Nitrils zu einer Carbonsäure aufweist und/oder das Enzym nach einer Temperaturbehandlung, bei der die Aktivität des Ausgangsenzym mindestens um 40% reduziert wird, im Vergleich zum Ausgangsenzym eine um mindestens 10% erhöhte Restaktivität besitzt.

Bevorzugt ist das erfindungsgemäße Enzym, welches zusätzlich zu den oben genannten Substitutionen noch mindestens 1, bevorzugt mindestens 2, bevorzugter mindestens 3, besonders bevorzugt mindestens 4 und am bevorzugtesten mindestens 5 zusätzliche Aminosäure-Substitution(en) ausgewählt aus der folgenden Gruppe aufweist:

- a) der Rest Tyr an der Position, welche Position 65 in (Seq ID No. 2) entspricht, ausgetauscht ist durch einen Rest ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Val; besonders bevorzugt Cys;

- b) der Rest Phe an der Position, welche Position 168 in (Seq ID No. 2) entspricht, ausgetauscht ist durch einen Rest ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, Val; besonders bevorzugt Val;
- c) der Rest Phe an der Position, welche Position 174 in (Seq ID No. 2) entspricht, ausgetauscht ist durch einen Rest ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, Val; besonders bevorzugt Ile;
- d) der Rest Leu an der Position, welche Position 201 in (Seq ID No. 2) entspricht, ausgetauscht ist durch einen Rest ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, Val; besonders bevorzugt Asn;
- e) der Rest Thr an der Position, welche Position 210 in (Seq ID No. 2) entspricht, ausgetauscht ist durch einen Rest ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Trp, Tyr, Val; besonders bevorzugt Ala.

In einer bevorzugten Ausführungsform weist die erfindungsgemäße Nitrilase eine der folgenden Mutations-Kombinationen auf:

- a) V63P, C250G (Seq ID No: 3)
- b) F168V, C250G (Seq ID No: 4).

In einer bevorzugten Ausführungsform ist die erfindungsgemäße Nitrilase die Nitrilase gemäß (Seq ID No: 8) oder eine homologe Nitrilase, welche die gleichen Mutationen zu ihrem Ausgangsenzym, wie (Seq ID No: 8) im Vergleich zu (Seq ID No: 2) aufweist. Die Nitrilase gemäß (Seq ID No: 8) weist im Vergleich zum Ausgangsenzym mit CH-Dinitril eine um 335% erhöhte Aktivität auf.

Bevorzugt weist die erfindungsgemäße Nitrilase eine Homologie zur (Seq ID No: 8) von mehr als 90%, bevorzugt mehr als 93%, besonders bevorzugt mehr als 95%, ganz besonders bevorzugt mehr als 98% und am bevorzugtesten von mehr als 99% auf.

Die erfindungsgemäße Nitrilase weist im Vergleich zum Ausgangsenzym (Seq ID No: 2) bevorzugt eine um 20%, bevorzugt um 30%, bevorzugter um 40%, besonders bevorzugt um 60%, ebenfalls bevorzugt um 80%, noch bevorzugter um 150% and am bevorzugtesten um 200% gesteigerte Aktivität bei der Umsetzung eines Nitrils zu einer Carbonsäure auf.

In bevorzugten Ausführungsformen A1-A5 bis F1-F5 weist die erfindungsgemäße Nitrilase nach einer Temperatur-Behandlung, bei der die Aktivität des Ausgangsenzym mindestens um die in der nachstehenden Tabelle angegebene Prozentsätze reduziert wird, im Vergleich mit dem Ausgangsenzym (Seq ID No: 2) mindestens die in der nachstehenden Tabelle 2 angegebenen Rest-Aktivitäten auf:

Tabelle 2:

Nr.	Inaktivierung Ausgangsenzym	Erhöhte Restaktivität der beanspruchten Nitrilase					
		A	B	C	D	E	F
	mindestens						
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%

In vorstehender Tabelle bedeutet beispielsweise Ausführungsform C3, dass die erfindungsgemäße Nitrilase nach einer Temperatur-Behandlung, bei der die Aktivität des Ausgangsenzym mindestens um 60% reduziert wird, im Vergleich mit dem Ausgangsenzym eine um wenigstens 30%, bevorzugt um wenigstens 50%, noch bevorzugter um wenigstens 100% und am bevorzugtesten um wenigstens 200% erhöhte Restaktivität aufweist.

Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung einer Carbonsäure aus Nitrilen durch in Kontaktbringen eines Nitrils mit einer Nitrilase gemäß einem der vorstehenden Ansprüche. Vorzugsweise erfolgt die Umsetzung in Gegenwart von Wasser, d.h. in einem wässrigen Medium. Bevorzugt dient das Verfahren der Herstellung einer Carbonsäure ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus 4-Cyano-Pentansäure 2-(1-Cyanocyclohexyl)essigsäure, sowie Benzoessäure.

Die nachfolgenden Beispiele dienen der näheren Erläuterung der Erfindung, sind jedoch nicht einschränkend auszulegen.

Beispiele

Die Enzymvarianten wurden mit Hilfe herkömmlicher Verfahren hergestellt und im Hinblick auf ihre Eigenschaften untersucht. Für die Bereitstellung der Enzymvarianten wurden zunächst die Mutationen auf Gen-Ebene mittels üblicher molekularbiologischer Methoden eingeführt. Die Gene der Enzym-Varianten wurden in Expressionsvektoren kloniert. Mit diesem wurden dann *Escherichia coli* Expressions-Stämme transformiert. Das DNA Plasmid

beinhaltete die Information für die Expressions-Regulation der Enzymvarianten.. Die kodierende Sequenz des Enzyms oder der Enzymvariante wurde dabei unter die Kontrolle eines induzierbaren Promoters gestellt. Dadurch ließ sich durch Zugabe eines Induktors die Expression der Enzymvarianten steuern (i.d.R. wurde Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) verwendet). Die so transformierten *E. coli* Stämme wurden dann in herkömmlichen Nährmedien (z.B. Lennox-Broth, Minimalmedium M9) kultiviert und mit IPTG induziert. Nach Expression wurde die Biomasse durch Zentrifugation geerntet. Aus der Biomasse wurden dann die Enzymvarianten nach entsprechender Zellyse gewonnen und gereinigt. Dabei wurden Zentrifugations-, Fällungs-, Ultrafiltrations- und/oder Chromatographieverfahren eingesetzt.

Die beschriebenen Enzymvarianten weisen die in Tabelle 3 gezeigten Aktivitätssteigerungen im Vergleich zum Ausgangsenzym mit 3 unterschiedlichen Nitrilsubstraten auf.

Tabelle 3:

Pos.	Enzym (Seq ID No: 2)	2MG	CH-Dinitril	Benzonitril
9	Leu9Lys	134%	131%	98%
	Leu9glu	160%	177%	114%
	Leu9lle	147%	171%	100%
63	Val63lle	163%	238%	90%
	Val63Met	165%	183%	97%
	Val63Pro	142%	198%	89%
	Val63Thr	173%	175%	99%
70	Thr70Ala	124%	183%	111%
	Thr70Cys	149%	153%	128%
	Thr70Asp	136%	224%	114%
	Thr70Glu	125%	207%	113%
	Thr70Phe	132%	170%	104%
	Thr70Gly	134%	230%	114%
	Thr70lle	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%	
94	Arg94Glu	111%	107%	97%
	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%

194	Leu194Cys	117%	105%	71%
	Leu194Lys	121%	67%	73%
	Leu194Met	116%	121%	68%
	Leu194Tyr	118%	122%	76%
208	Thr208Ala	144%	194%	124%
	Thr208Gly	154%	181%	131%
	Thr208Leu	132%	152%	123%
250	Cys250Ala	112%	221%	41%
	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%	
305	Val305Leu	126%	98%	116%
	Val305Met	128%	76%	116%
308	Asp308Asn	133%	118%	104%
	Asp308Trp	128%	105%	92%

Tabelle 4 zeigt erfindungsgemäße Einzelsubstitutionen und deren Restaktivitäten nach einer 15 minütigen Behandlung bei 55°C oder 60°C.

Tabelle 4:

Pos.	Enzym	55°C	Erhöhung der Rest-Aktivität in %	60°C	Erhöhung der Rest-Aktivität in %
	Seq ID No: 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%
Thr70Tyr	98%	72%	46%	231%	
94	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%
	Arg94Pro	77%	35%	36%	156%
	Arg94Ser	93%	64%	57%	310%
	Arg94Thr	88%	54%	42%	198%
	Arg94Val	77%	35%	29%	111%
	Arg94Tyr	95%	66%	59%	320%
168	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%

Tabelle 5 zeigt die Aktivität von erfindungsgemäßen Mehrfachmutanten im Vergleich zum Ausgangsenzym (Seq ID No: 2), bei denen die Kombination von Einzelsubstitutionen zu einer synergistischen Verbesserung der Aktivität des Enzyms führt:

Tabelle 5:

Enzym-Mutante	Substrat	
	2MG	Benzonitril
Seq ID No: 2	100 %	100 %
V63P	142 %	89 %
C250G	126%	
V63P / F168V (Seq ID No: 5)		171%
V63P / C250G (Seq ID No: 3)	206 %	

Patentansprüche:

1. Nitrilase umfassend eine Aminosäuresequenz mit mindestens 60% Homologie zur Aminosäuresequenz gemäß (Seq ID No: 2), welche im Vergleich zur Nitrilase gemäß (Seq ID No: 2)

(i) eine um mindestens 15% gesteigerte Aktivität bei der Umsetzung eines Nitrils zur entsprechenden Carbonsäure aufweist, wobei das Nitril ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus 2-Methylglutaronitril, 1-(Cyanomethyl)cyclohexan-1-carbonitril und Benzonitril;

und/oder

(ii) mindestens eine Aminosäure-Substitution aufweist ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus:

a) Substitution von Leu in der Position, welche Position 9 von (Seq ID No: 2) entspricht, durch eine Aminosäure ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr und Val;

b) Substitution von Val in der Position, welche Position 63 von (Seq ID No: 2) entspricht, durch eine Aminosäure ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp und Tyr;

c) Substitution von Thr in der Position, welche Position 70 von (Seq ID No: 2) entspricht, durch eine Aminosäure ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Trp, Tyr und Val;

d) Substitution von Arg in der Position, welche Position 94 von (Seq ID No: 2) entspricht, durch eine Aminosäure ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Ala, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr und Val;

e) Substitution von Leu in der Position, welche Position 194 von (Seq ID No: 2) entspricht, durch eine Aminosäure ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr und Val;

- f) Substitution von Thr in der Position, welche Position 208 von (Seq ID No: 2) entspricht, durch eine Aminosäure ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Trp, Tyr und Val;
- g) Substitution von Cys in der Position, welche Position 250 von (Seq ID No: 2) entspricht, durch eine Aminosäure ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Ala, Arg, Asn, Asp, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr und Val;
- h) Substitution von Val in der Position, welche Position 305 von (Seq ID No: 2) entspricht, durch eine Aminosäure ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp und Tyr; und
- i) Substitution von Asp in der Position, welche Position 308 von (Seq ID No: 2) entspricht, durch eine Aminosäure ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Ala, Arg, Asn, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr und Val.

2. Nitrilase nach Anspruch 1, welche mindestens eine Aminosäure-Substitution aufweist ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus:

- a) Substitution von Leu in der Position, welche Position 9 von (Seq ID No: 2) entspricht, durch Lys, Glu, Ile oder Arg;
- b) Substitution von Val in der Position, welche Position 63 von (Seq ID No: 2) entspricht, durch Pro, Ile, Met oder Thr;
- c) Substitution von Thr in der Position, welche Position 70 von (Seq ID No: 2) entspricht, durch Ile, Ala, Cys, Asp, Glu, Phe, Gly, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Ser, Tyr; Arg oder Val;
- d) Substitution von Arg in der Position, welche Position 94 von (Seq ID No: 2) entspricht, durch Gln, Glu, Phe, Gly, Lys, Met, Asn, Pro, Ala, Gly, His, Ile, Leu, Ser, Thr, Val oder Tyr;
- e) Substitution von Leu in der Position, welche Position 194 von (Seq ID No: 2) entspricht, durch Tyr, Cys, Lys oder Met;
- f) Substitution von Thr in der Position, welche Position 208 von (Seq ID No: 2) entspricht, durch Ala, Gly oder Leu;

- g) Substitution von Cys in der Position, welche Position 250 von (Seq ID No: 2) entspricht, durch Gly, Ala, Phe, Lys, Met, Arg, Ser, Thr, Tyr oder His;
 - h) Substitution von Val in der Position, welche Position 305 von (Seq ID No: 2) entspricht, durch Leu oder Met; und
 - i) Substitution von Asp in der Position, welche Position 308 von (Seq ID No: 2) entspricht, durch Asn oder Trp.
3. Nitrilase nach Anspruch 1 oder 2, welche mindestens zwei Aminosäure-Substitutionen aufweist ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus a), b), c), d), e), f), g), h) und i).
4. Nitrilase nach einem der vorstehenden Ansprüche, welche mindestens drei Aminosäure-Substitutionen aufweist ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus a), b), c), d), e), f), g), h) und i).
5. Nitrilase nach einem der vorstehenden Ansprüche, welche zusätzlich mindestens eine weitere Aminosäure-Substitution aufweist ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus:
- j) Substitution von Tyr in der Position, welche Position 65 von (Seq ID No: 2) entspricht, durch eine Aminosäure ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp und Val;
 - k) Substitution von Phe in der Position, welche Position 168 von (Seq ID No: 2) entspricht, durch eine Aminosäure ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr und Val;
 - l) Substitution von Phe in der Position, welche Position 174 von (Seq ID No: 2) entspricht, durch eine Aminosäure ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr und Val;
 - m) Substitution von Ile in der Position, welche Position 201 von (Seq ID No: 2) entspricht, durch eine Aminosäure ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr und Val; und
 - n) Substitution von Thr in der Position, welche Position 210 von (Seq ID No: 2) entspricht, durch eine Aminosäure ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus

Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Trp, Tyr und Val.

6. Nitrilase nach einem der vorstehenden Ansprüche, welche nach einer Temperaturbehandlung, bei der die Aktivität der Nitrilase gemäß (Seq ID No: 2) mindestens um 40% reduziert wird, im Vergleich zur Nitrilase gemäß (Seq ID No: 2) eine um mindestens 10% erhöhte Restaktivität besitzt im Hinblick auf die Umsetzung eines Nitrils zur entsprechenden Carbonsäure, wobei das Nitril ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus 2-Methylglutaronitril, 1-(Cyanomethyl)cyclohexan-1-carbonitril und Benzonitril.
7. Nitrilase umfassend eine Aminosäuresequenz mit mindestens 90% Homologie zur Aminosäuresequenz gemäß (Seq ID No: 8).
8. Verfahren zur Herstellung einer Carbonsäure aus Nitrilen durch in Kontaktbringen eines Nitrils mit einer Nitrilase gemäß einem der vorstehenden Ansprüche.
9. Verfahren nach Anspruch 8 zur Herstellung einer Carbonsäure ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus 4-Cyano-Pentansäure, 3-Hydroxyvalerinsäure und Glykolsäure.