

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202191069** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2021.08.13

(51) Int. Cl. *C12P 7/40* (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2019.10.09

(54) **СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ АКРИЛОВОЙ КИСЛОТЫ ИЛИ ЕЕ СОЛЕЙ**

(31) 18201085.0; 19164303.0

(32) 2018.10.18; 2019.03.21

(33) EP

(86) PCT/EP2019/077369

(87) WO 2020/078798 2020.04.23

(71) Заявитель:
БАСФ SE (DE)

(72) Изобретатель:

Гхислири Диего, Циммерманн Тобиас

Ёахим, Земайер Штефан, Бройер

Михаель, Шахчабель Дорен (DE)

(74) Представитель:

Беляева Е.Н. (BY)

(57) Настоящее изобретение касается способов получения акрилата аммония или его солей из акрилонитрила с использованием нитралазы в качестве катализатора.

202191069
A1

202191069

A1

Способ получения акриловой кислоты или ее солей

Область изобретения

Настоящее изобретение касается способов получения акрилата аммония или его солей из акрилонитрила с использованием нитриказы в качестве катализатора.

Описание изобретения

Акриловая кислота и ее производные (сложные эфиры, соли и амиды) являются основными элементарными звеньями или мономерами в производстве акрилатных полимеров и сополимеров, с многочисленными известными вариантами применения, например, при производстве поверхностных покрытий, клеев, герметиков и т.д. Акриловая кислота представляет собой ценный химический реагент общего производственного назначения. По различным оценкам, годовой объем ее производства составляет 4,2 миллиона тонн. Спрос на акриловую кислоту постоянно растет из-за все более широкого применения суперпоглощающих веществ, которые находят применение, в основном, при производстве товаров для личной гигиены. Кроме того, акриловая кислота может использоваться для производства акрилатов, которые входят в состав акриловых волокон, покрытий, красок и чернил.

В настоящее время основным способом производства акриловой кислоты в нефтехимической промышленности является окисление пропилена. Некоторыми из проблем, возникающих при синтезе акриловой кислоты из пропилена, являются разрушение катализаторов и полимеризация образующихся продуктов. Хотя пропилен легко может быть получен из ископаемых углеводородов, было бы желательно получить акриловую кислоту и ее производные из возобновляемых источников с эквивалентными или более низкими затратами.

Использование биологических систем для преобразования нитрилсодержащих субстратов в карбоновые кислоты может выступать в качестве заманчивой альтернативы химическим методам производства из-за того, что зачастую можно обеспечить высокий выход продукта, из-за нежестких условий реакции и особой активности, которой обладают некоторые ферменты. Катализируемый ферментами гидролиз различных алифатических или ароматических динитрилов, особенно предпочтительный по сравнению с

химическим гидролизом, может быть очень региоселективным, поскольку гидролизуется только одна из нитрильных групп. Преимущества использования биотехнологических подходов заключаются в высокой селективности и высоком выходе продукта, снижении производственных затрат, поскольку при таких технологиях требуется меньше энергии и производится меньшее количество отходов.

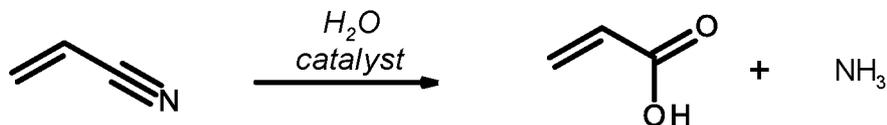
Существуют два различных способа ферментативной гидратации нитрилов в растениях и микроорганизмах, которые применяются при промышленном производстве акриловой кислоты. Один способ включает две ферментативные стадии, на которых происходит преобразование нитрилгидратазой нитрила в амид, который впоследствии гидролизуется амидазой с получением акриловой кислоты (US6670158). Другой способ представляет собой одноэтапную катализируемую нитрилазами реакцию (US6162624), которая является преимущественной по сравнению с двухэтапной реакцией, поскольку для двух этапов реакции требуется большой объем оборудования.

В данной области существует потребность в получении дополнительных нитрилаз для катализа этой реакции, в частности, нитрилаз, катализирующих реакцию более эффективно, чем доступные в настоящее время нитрилазы, чтобы обеспечить более высокий выход и снизить остаточное содержание акрилонитрила в конечном продукте.

Подробное описание изобретения

Один вариант осуществления рассматриваемого изобретения касается выделенной нитрилазы, способной катализировать реакцию из (мет-)акрилонитрила в (мет-)акрилат аммония в водной среде, содержащей воду, нитрилазу и (мет-)акрилонитрил и/или (мет-)акрилат аммония и, при необходимости, буферный раствор с pH от 4 до 9 включительно, причем концентрация (мет-)акрилата аммония в водной среде после инкубации составляет, по меньшей мере, 10%, по меньшей мере, 15%, по меньшей мере, 20%, по меньшей мере, 25%, по меньшей мере, 30%, по меньшей мере, 35%, предпочтительно, по меньшей мере, 40%, по меньшей мере, 45%, более предпочтительно, по меньшей мере, 50%, более предпочтительно, по меньшей мере, 51%, более предпочтительно, по меньшей мере, 52%, более предпочтительно, по меньшей мере, 53%, еще более предпочтительно, по меньшей мере, 54%, наиболее предпочтительно, по меньшей

мере, 55% (мас./мас.), и концентрация (мет-)акрилонитрила составляет менее 0,1%, предпочтительно менее 0,01%, более предпочтительно менее 0,001%, наиболее предпочтительно менее 0,0001% (мас./мас.) (мет-)акрилонитрила в водной среде в конце инкубации.



Реакция, катализируемая нитрилазами согласно изобретению.

Водная среда может быть раствором или суспензией, или раствором и суспензией, при этом любое из веществ, содержащихся в указанной водной среде, может быть полностью или частично растворено и/или частично или полностью суспендировано.

В предпочтительном варианте осуществления, концентрация акрилонитрила во время инкубации и биоконверсии не должны превышать 8 мас.%, например, 6 мас.% и может, например, находиться в диапазоне 0.1 мас.% - 6 мас.%, предпочтительно 0.2 мас.% - 5 мас.%, более предпочтительно 0.3 мас.% - 4 мас.%, еще более предпочтительно 0.5 мас.% - 3 мас.%, наиболее предпочтительно 0.8 мас.% - 2 мас.%, все еще наиболее предпочтительно 1 мас.% - 1.5 мас.%, в отношении общего количества всех компонентов водной смеси.

В альтернативном варианте, концентрация (мет-)акрилонитрила в водной среде может составлять до 8% в растворе, предпочтительно 6% в растворе в начале инкубации и может поддерживаться в этой концентрации во время инкубации примерно за 10 мин, предпочтительно 15 мин, более предпочтительно 20 мин, еще более предпочтительно 30 мин, еще более предпочтительно 45 мин, наиболее предпочтительно 60 мин перед концом инкубации.

В предпочтительном варианте осуществления, инкубацию осуществляют при 5 °C - 40 °C в течение 10 минут - 48 часов, предпочтительно при 5 °C - 35 °C в течение 1 часа - 24 часов, более предпочтительно при 15 °C - 30 °C в течение 10 мин - 48 часов, наиболее предпочтительно при 18 °C - 28 °C в течение 3 часов - 15 часов.

В предпочтительном варианте осуществления, способ осуществляют с использованием полунепрерывного процесса.

В предпочтительном варианте осуществления, содержание акрилонитрила измеряют с помощью Фурье-ИК-спектроскопии (Фурье-ИКС).

В другом варианте осуществления изобретения, выделенная нитрилаза содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из

Молекулы аминокислоты SEQ ID NO: 2, 4, 6 и 8 или ее функционального фрагмента, и

- a. молекулы аминокислоты, имеющая, по меньшей мере, 55% идентичности с молекулой аминокислоты SEQ ID NO: 2, 4, 6 или 8, или ее функционального фрагмента, и
- b. молекулы аминокислоты, кодируемой молекулой нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 1, 3, 5, или 7, или ее функционального фрагмента, и
- c. молекулы аминокислоты, кодируемая молекулой нуклеиновой кислоты, имеющей, по меньшей мере, 70% идентичности с SEQ ID NO: 1, 3, 5, или 7, или ее функционального фрагмента, и
- d. молекулы аминокислоты, кодируемой молекулой нуклеиновой кислоты, которая гибридизирует в жестких условиях, с получением фрагмента, по меньшей мере, 250 оснований, комплементарных с SEQ ID NO: 1, 3, 5 или 7, или ее функционального фрагмента,

причем молекула аминокислоты, как определено в пунктах b., d. и e., катализирует реакцию из (мет-)акрилонитрила в (мет-)акрилат аммония в водной среде и

причем концентрация (мет-)акрилата аммония в водной среде после инкубации составляет, по меньшей мере, 10%, по меньшей мере, 15%, по меньшей мере, 20%, по меньшей мере, 25%, по меньшей мере, 30%, по меньшей мере, 35%, предпочтительно, по меньшей мере, 40%, по меньшей мере, 45%, более предпочтительно, по меньшей мере, 50%, более предпочтительно, по меньшей мере, 51%, более предпочтительно, по меньшей мере, 52%, более предпочтительно, по меньшей мере, 53%, еще более предпочтительно, по меньшей мере, 54%, наиболее предпочтительно, по меньшей мере, 55% (мас./мас.), и концентрация (мет-)акрилонитрила составляет менее 0,1%, предпочтительно менее 0,01%, более предпочтительно менее 0,001%, наиболее предпочтительно менее 0,0001% (мас./мас.) (мет-)акрилонитрила в водной среде в конце инкубации.

В одном варианте осуществления изобретения, указанная выделенная нитрилаза, способная катализировать реакцию из (мет-)акрилонитрила в (мет-)акрилат аммония, причем концентрация (мет-)акрилата аммония в водной среде после инкубации составляет, по меньшей мере, 10%, по меньшей мере, 15%, по меньшей мере, 20%, по меньшей мере, 25%, по меньшей мере, 30%, по меньшей мере, 35%, предпочтительно, по меньшей мере, 40%, по меньшей мере, 45%, более предпочтительно, по меньшей мере, 50%, более предпочтительно, по меньшей мере, 51%, более предпочтительно, по меньшей мере, 52%, более предпочтительно, по меньшей мере, 53%, еще более предпочтительно, по меньшей мере, 54%, наиболее предпочтительно, по меньшей мере, 55% (мас./мас.), и концентрация (мет-)акрилонитрила составляет менее 0,1%, предпочтительно менее 0,01%, более предпочтительно менее 0,001%, наиболее предпочтительно менее 0,0001% (мас./мас.) (мет-)акрилонитрила в водной среде в конце инкубации, содержит в положении, соответствующем положениям 56/190 SEQ ID NO: 2, аминокислоты 56W/190L или 56Q/190S, или 56D/190S, и/или содержит в положении, соответствующем положению 190/192 SEQ ID NO: 2, аминокислоты 190S/192S или 190S/192G, или 190L/192P, и/или содержит в положении, соответствующем положению 190/193 SEQ ID NO: 2, аминокислоты 190L/193D или 190S/193E, или 190L/193N, и/или содержит в положении, соответствующем положению 202/249 SEQ ID NO: 2, аминокислоты 202L/249E или 202V/249H, или 202I/249F, или 202N/249W, и/или содержит в положении, соответствующем положению 286/287 SEQ ID NO: 2, аминокислоты 286M/287A или 286R/287L, или 286A/287G, или 286S/287L.

Дополнительный вариант осуществления изобретения касается способа получения (мет-)акрилата аммония, включающего следующие этапы: предоставление водной среды, содержащей воду, одну или более нитрилаз и (мет-)акрилонитрил, и, при необходимости, буферный раствор с pH 4 - 9

- a) инкубирование водной среды, и
- b) при необходимости, выделение (мет-)акрилата аммония из реакционной смеси,

причем одна или более нитрилаз выбраны из группы, состоящей из

- i. молекулы аминокислоты SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 18, 20, 22, 26, 28, 30, 32, 34, 38, 40, 42, 46, 48, 52, 54, 56, 60, 62, 64, 66 и 68 или ее функционального фрагмента, и

- ii. молекулы аминокислоты, имеющей, по меньшей мере, 55% идентичности с молекулой аминокислоты SEQ ID NO: SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 18, 20, 22, 26, 28, 30, 32, 34, 38, 40, 42, 46, 48, 52, 54, 56, 60, 62, 64, 66 или 68, или ее функционального фрагмента, и
- iii. молекулы аминокислоты, кодируемой молекулой нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 25, 27, 29, 31, 33, 37, 39, 41, 45, 47, 51, 53, 55, 59, 61, 63, 65 или 67, или ее функционального фрагмента, и
- iv. молекулы аминокислоты, кодируемой молекулой нуклеиновой кислоты, имеющей, по меньшей мере, 70% идентичности с SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 25, 27, 29, 31, 33, 37, 39, 41, 45, 47, 51, 53, 55, 59, 61, 63, 65 или 67, или ее функционального фрагмента, и
- v. молекулы аминокислоты, кодируемой молекулой нуклеиновой кислоты, которая гибридизирует в жестких условиях, с получением фрагмента, по меньшей мере, 250 оснований, комплементарных с SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 25, 27, 29, 31, 33, 37, 39, 41, 45, 47, 51, 53, 55, 59, 61, 63, 65 или 67, или ее функционального фрагмента, причем молекулы аминокислоты как определено в пунктах ii., iv. и v. обладают активностью превращения (мет-)акрилонитрила в (мет-)акрилат аммония.

В Таблице 1 приведены функциональные варианты молекул аминокислоты SEQ ID 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 18, 20, 22, 26, 28, 30, 32, 34, 38, 40, 42, 46, 48, 52, 54, 56, 60, 62, 64, 66 и 68, имеющих определенную идентичность с соответствующим SEQ ID. Ниже приведен перечень последовательностей соответствующей нуклеиновой кислоты, которая кодирует соответствующий функциональный вариант молекулы аминокислоты.

Таблица 1

Seq. ID	Донор	SEQ ID аминоксилоты	SEQ ID нуклеиновой кислоты	Идентичность
2	Не известен	77	76	90%
		79	78	85%
		81	80	80%
4	Не известен	83	82	90%
		85	84	85%
		87	86	80%
6	<i>Flaviumibacter solisilvae</i>	89	88	90%
		91	90	85%
		93	92	80%
8	<i>Acidovorax facilis</i>	95	94	90%
		97	96	85%
		99	98	80%
10	<i>Pseudomonas sp</i>	101	100	90%
		103	102	85%
		105	104	80%
12	<i>Nocardia brasiliensis</i>	107	106	90%
		109	108	85%
		111	110	80%
14	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	113	112	90%
		115	114	85%
		117	116	80%
16	<i>Agrobacterium rubi</i>	119	118	90%
		121	120	85%
		123	122	80%
18	Не известен	125	124	90%
		127	126	85%
		129	128	80%
20	<i>Candidatus Dadabacteria</i>	131	130	90%
		133	132	85%
		135	134	80%
22	Не известен	137	136	90%
		139	138	85%
		141	140	80%
26	<i>Teridicaulis marinus</i>	149	148	90%
		151	150	85%
		153	152	80%
28	Не известен	155	154	90%
		157	156	85%
		159	158	80%
30	Не известен	161	160	90%
		163	162	85%
		165	164	80%

32	Не известен	167	166	90%
		169	168	85%
		171	170	80%
34	<i>Synechococcus</i> sp.	173	172	90%
		175	174	85%
		177	176	80%
38	<i>Aquimarina atlantica</i>	185	184	90%
		187	186	85%
		189	188	80%
40	<i>Arthrobacter</i> sp.	191	190	90%
		193	192	85%
		195	194	80%
42	<i>Cupriavidus basilensis</i>	197	196	90%
		199	198	85%
		201	200	80%
46	<i>Sphingomonas wittichii</i>	209	208	90%
		211	210	85%
		213	212	80%
48	<i>Pseudomonas mandelii</i>	215	214	90%
		217	216	85%
		219	218	80%
52	<i>Arabidopsis thaliana</i>	227	226	90%
		229	228	85%
		231	230	80%
54	<i>Brassica oleracea</i>	233	232	90%
		235	234	85%
		237	236	80%
56	<i>Salinisphaera shabanensis</i>	239	238	90%
		241	240	85%
		243	242	80%
60	<i>Smithella</i> sp.	251	250	90%
		253	252	85%
		255	254	80%
62	<i>Bradyrhizobium diazoefficiens</i>	257	256	90%
		259	258	85%
		261	260	80%
64	<i>Actinobacteria bacterium</i>	263	262	90%
		265	264	85%
		267	266	80%
66	<i>Rhizobium</i> sp.	269	268	90%
		271	270	85%
		273	272	80%
68	<i>bacterium YEK0313</i>	275	274	90%
		277	276	85%
		279	278	80%

Водная среда в конце инкубации содержит менее 1% (мас./мас.) акриламида в качестве побочного продукта, предпочтительно менее 0,5%, более предпочтительно менее 0,1%.

В начале способа согласно изобретению, водная среда может содержать, по меньшей мере, 0,05% (мет-)акрилонитрила, предпочтительно, по меньшей мере, 0,1% (мет-)акрилонитрила, более предпочтительно, по меньшей мере, 0,5% (мет-)акрилонитрила, наиболее предпочтительно, по меньшей мере, 1,0% (мет-)акрилонитрила (мас./мас.). На протяжении всей инкубации концентрация (мет-)акрилонитрила может поддерживаться на уровне концентрации около 0,5% - 1,5%, предпочтительно около 1,0% (мет-)акрилонитрила путем непрерывной подачи (мет-)акрилонитрила.

В альтернативном варианте, концентрация (мет-)акрилонитрила в водной среде может составлять 5% или 6% в начале инкубации и может поддерживаться на этом уровне концентрации, или во время инкубации дополнительный (мет-)акрилонитрил может не добавляться совсем.

Время инкубации водной среды может составлять, по меньшей мере, 5ч, по меньшей мере, 10ч или, по меньшей мере, 12ч. Предпочтительно время инкубации составляет, по меньшей мере, 18ч, например, около 24ч или 30ч. Более предпочтительно время инкубации составляет около 36ч или около 42ч. Наиболее предпочтительно, время инкубации составляет около 48ч. В зависимости от используемой нитриказы и скорости реакции указанной нитриказы, время инкубации может также превышать 48ч.

Водная среда может быть инкубирована при, по меньшей мере, 15⁰С, по меньшей мере, 20⁰С, по меньшей мере, 24⁰С или, по меньшей мере, 28⁰С. Предпочтительно водную среду инкубируют при 27⁰С - 33⁰С включительно, более предпочтительно водную среду инкубируют при 28⁰С - 30⁰С включительно. Наиболее предпочтительно водную среду инкубируют при 28⁰С. Водная среда может быть также инкубирована при 38⁰С, 39⁰С, 40⁰С, 41⁰С, 42⁰С, 43⁰С, 44⁰С, 45⁰С, 46⁰С, 47⁰С, 48⁰С, 49⁰С или 50⁰С.

В предпочтительном варианте осуществления, способ осуществляют с использованием полунепрерывного процесса.

В предпочтительном варианте осуществления, содержание акрилонитрила измеряют с помощью Фурье-ИК-спектроскопии (Фурье-ИКС).

В одном варианте осуществления изобретения, производство водных растворов (мет-)акрилата аммония может осуществляться с использованием стационарной химической установки, после чего водные растворы могут транспортироваться в другое место для дальнейшей обработки. В еще одном предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения производство (мет-)акрилата аммония может осуществляться в модульной мобильной установке. Кроме того, предпочтительным является, например, мобильный юлок конверсии, который может использоваться в комбинации со стационарными установками и/или блоками стационарной химической установки. Такая комбинация существующей установки с модульным, мобильным блоком конверсии обеспечивает гибкость при разработке конструкции производственной линии с учетом определенных потребностей в каждом конкретном случае. В случае изменения требований производства конструкцию такой производственной линии на конкретной установке можно легко изменить. Существующая установка, например, может представлять собой стационарную установку полимеризации для производства гомополимеров (мет-)акриловой кислоты и/или сополимеров, например, (мет-)акриловой кислоты и акриламида. Таким образом, комбинация с мобильным блоком конверсии дает возможность комбинировать производство (мет-)акрилата аммония с блоками для дальнейшей обработки (мет-)акрилата аммония, полученного в мобильном блоке биоконверсии.

Нитрилаза, используемая в способе согласно изобретению, может быть выделена из организма, естественным образом экспрессирующего указанную нитрилазу. В альтернативном варианте нитрилаза может быть добавлена к водной среде путем добавления клеток, содержащих указанную нитрилазу, или добавления суспензии, содержащей инактивированные, например, разрушенные клетки. В другом варианте осуществления изобретения, нитрилаза может продуцироваться в рекомбинантных организмах, в том числе в микроорганизмах, экспрессирующих нитрилазу согласно изобретению из гетерологичной конструкции. Полученная таким образом нитрилаза может быть выделена из рекомбинантного организма и добавлена к водной среде, или нитрилаза может быть добавлена путем инактивации, например, путем разрушения клеток и добавления суспензии.

Может осуществляться, по меньшей мере, частичная концентрация клеток или суспензии, содержащей инактивированные клетки, например, путем сушки перед добавлением к водной среде, используемой в способах согласно изобретению или в композиции согласно изобретению.

Нитрилаза может быть (частично) иммобилизована, например, заключена в гель, или может использоваться, например, в виде суспензии свободных клеток. Для иммобилизации могут применяться известные стандартные способы, например, поперечная сшивка, такая как сшивка с использованием глутаральдегид-полиэтиленимина (GA-PEI), сшивка с матрицей и/или с носителем и т.д., включая различные вариации и/или комбинации вышеупомянутых способов. В альтернативном варианте фермент нитрилазы может быть экстрагирован и, например, может быть использован непосредственно в процессе получения амида. При использовании инактивированных или частично инактивированных клеток такие клетки могут быть инактивированы термической или химической обработкой.

Дополнительный вариант осуществления изобретения относится к выделенной нитрилазе, содержащей последовательность, выбранную из группы, состоящей из

молекулы аминокислоты SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 18, 20, 22, 26, 28, 30, 32, 34, 38, 40, 42, 46, 48, 52, 54, 56, 60, 62, 64, 66 и 68, или ее функционального фрагмента, и

молекулы аминокислоты, имеющей, по меньшей мере, 55% идентичности с молекулой аминокислоты SEQ ID NO: SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 18, 20, 22, 26, 28, 30, 32, 34, 38, 40, 42, 46, 48, 52, 54, 56, 60, 62, 64, 66 или 68, или ее функционального фрагмента, и,

молекулы аминокислоты, кодируемой молекулой нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 25, 27, 29, 31, 33, 37, 39, 41, 45, 47, 51, 53, 55, 59, 61, 63, 65 или 67, или ее функционального фрагмента, и

молекулы аминокислоты, кодируемой молекулой нуклеиновой кислоты, имеющей, по меньшей мере, 70% идентичности с SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 25, 27, 29, 31, 33, 37, 39, 41, 45, 47, 51, 53, 55, 59, 61, 63, 65 или 67, или ее функционального фрагмента, и

молекулы аминокислоты, кодируемой молекулой нуклеиновой кислоты, которая гибридизирует в жестких условиях, с получением фрагмента, по меньшей

мере, 250 оснований, комплементарных с SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 25, 27, 29, 31, 33, 37, 39, 41, 45, 47, 51, 53, 55, 59, 61, 63, 65 или 67, или ее функционального фрагмента,

причем молекула аминокислоты, как определено в пунктах b., d. и e., катализирует реакцию из (мет-)акрилонитрила в (мет-)акрилат аммония в водной среде.

Дополнительный вариант осуществления изобретения относится к рекомбинантной конструкции, содержащей нитрилазу, причем нитрилаза выбрана из группы, состоящей из

молекулы аминокислоты SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 18, 20, 22, 26, 28, 30, 32, 34, 38, 40, 42, 46, 48, 52, 54, 56, 60, 62, 64, 66 и 68 или ее функционального фрагмента, и

молекулы аминокислоты, имеющей, по меньшей мере, 55% идентичности с молекулой аминокислоты SEQ ID NO: SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66 или 68, или ее функционального фрагмента, и,

молекулы аминокислоты, кодируемой молекулой нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 25, 27, 29, 31, 33, 37, 39, 41, 45, 47, 51, 53, 55, 59, 61, 63, 65 или 67, или ее функционального фрагмента, и

молекулы аминокислоты, кодируемой молекулой нуклеиновой кислоты, имеющей, по меньшей мере, 70% идентичности с SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 25, 27, 29, 31, 33, 37, 39, 41, 45, 47, 51, 53, 55, 59, 61, 63, 65 или 67, или ее функционального фрагмента, и

молекулы аминокислоты, кодируемой молекулой нуклеиновой кислоты, которая гибридизирует в жестких условиях, с получением фрагмента, по меньшей мере, 250 оснований, комплементарных с SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 25, 27, 29, 31, 33, 37, 39, 41, 45, 47, 51, 53, 55, 59, 61, 63, 65 или 67, или ее функционального фрагмента,

причем молекула аминокислоты, как определено в пунктах ii., iv. и v., катализирует реакцию из (мет-)акрилонитрила в (мет-)акрилат аммония в водной среде.

Для продуцирования и выделения соответствующей нитриказы указанная рекомбинантная конструкция может интегрироваться в геном организма, или нитриказы может быть экспрессирована из вектора, такого как плазмидный или

вирусный вектор, который вводят в организм для продуцирования и выделения указанной нитриказы.

Нитриказа в рекомбинантной конструкции может быть функционально связана с гетерологичным промотором, гетерологичным терминатором или любым другим гетерологичным генетическим элементом.

Еще один вариант осуществления изобретения относится к рекомбинантному вектору, такому как вектор экспрессии или вирусный вектор, содержащий указанную рекомбинантную конструкцию.

Рекомбинантный микроорганизм, содержащий указанную рекомбинантную конструкцию или указанный рекомбинантный вектор, также является вариантом осуществления изобретения.

В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантный микроорганизм представляет собой прокариотическую клетку. Соответствующие прокариотические клетки включают грамположительные, грамотрицательные и грамвариабельные бактериальные клетки, предпочтительно грамотрицательные.

Таким образом, микроорганизм, который может быть использован в настоящем изобретении, включают, но не ограничиваются ими, *Gluconobacter oxydans*, *Gluconobacter asaii*, *Achromobacter delmarvae*, *Achromobacter viscosus*, *Achromobacter lacticum*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Agrobacterium radiobacter*, *Alcaligenes faecalis*, *Arthrobacter citreus*, *Arthrobacter tumescens*, *Arthrobacter paraffineus*, *Arthrobacter hydrocarboglutamicus*, *Arthrobacter oxydans*, *Aureobacterium saperdae*, *Azotobacter indicus*, *Brevibacterium ammoniagenes*, *Brevibacterium divaricatum*, *Brevibacterium lactofermentum*, *Brevibacterium flavum*, *Brevibacterium globosum*, *Brevibacterium fuscum*, *Brevibacterium ketoglutamicum*, *Brevibacterium helcolum*, *Brevibacterium pusillum*, *Brevibacterium testaceum*, *Brevibacterium roseum*, *Brevibacterium immariophilum*, *Brevibacterium linens*, *Brevibacterium protopharmiae*, *Corynebacterium acetophilum*, *Corynebacterium glutamicum*, *Corynebacterium callunae*, *Corynebacterium acetoacidophilum*, *Corynebacterium acetoglutamicum*, *Enterobacter aerogenes*, *Erwinia amylovora*, *Erwinia carotovora*, *Erwinia herbicola*, *Erwinia chrysanthemi*, *Flavobacterium peregrinum*, *Flavobacterium fucatum*, *Flavobacterium aurantium*, *Flavobacterium rhenanum*, *Flavobacterium sewanense*, *Flavobacterium breve*, *Flavobacterium meningosepticum*, *Micrococcus* sp. CCM825,

Morganella morganii, *Nocardia opaca*, *Nocardia rugosa*, *Planococcus eucinatus*, *Proteus rettgeri*, *Propionibacterium shermanii*, *Pseudomonas synxantha*, *Pseudomonas azotoformans*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas ovalis*, *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas acidovorans*, *Pseudomonas mucidolens*, *Pseudomonas testosteroni*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Rhodococcus erythropolis*, *Rhodococcus rhodochrous*, *Rhodococcus* sp. ATCC 15592, *Rhodococcus* sp. ATCC 19070, *Sporosarcina ureae*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio metschnikovii*, *Vibrio tyrogenes*, *Actinomyces madurae*, *Actinomyces violaceochromogenes*, *Kitasatosporia parulosa*, *Streptomyces avermitilis*, *Streptomyces coelicolor*, *Streptomyces flavelus*, *Streptomyces griseolus*, *Streptomyces lividans*, *Streptomyces olivaceus*, *Streptomyces tanashiensis*, *Streptomyces virginiae*, *Streptomyces antibioticus*, *Streptomyces cacaoi*, *Streptomyces lavendulae*, *Streptomyces viridochromogenes*, *Aeromonas salmonicida*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus circulans*, *Bacillus thiaminolyticus*, *Escherichia freundii*, *Microbacterium ammoniophilum*, *Serratia marcescens*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella schottmulleri*, *Xanthomonas citri*, *Synechocystis* sp., *Synechococcus elongatus*, *Thermosynechococcus elongatus*, *Microcystis aeruginosa*, *Nostoc* sp., *N. commune*, *N. sphaericum*, *Nostoc punctiforme*, *Spirulina platensis*, *Lyngbya majuscula*, *L. lagerheimii*, *Phormidium tenue*, *Anabaena* sp., *Leptolyngbya* sp и т.д.

В некоторых вариантах осуществления, микроорганизм представляет собой эукариотическую клетку. Подходящие эукариотические клетки включают дрожжевые клетки, такие как, например, *Saccharomyces* spec, такие как *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula* spec, такие как *Hansenula polymorpha*, *Schizosaccharomyces* spec, такие как *Schizosaccharomyces pombe*, *Kluyveromyces* spec, такие как *Kluyveromyces lactis* и *Kluyveromyces marxianus*, *Yarrowia* spec, такие как *Yarrowia lipolytica*, *Pichia* spec, такие как *Pichia methanolica*, *Pichia stipites* и *Pichia pastoris*, *Zygosaccharomyces* spec, такие как *Zygosaccharomyces rouxii* и *Zygosaccharomyces bailii*, *Candida* spec, такие как *Candida boidinii*, *Candida utilis*, *Candida freyschussii*, *Candida glabrata* и *Candida sonorensis*, *Schwanniomyces* spec, такие как *Schwanniomyces occidentalis*, *Arxula* spec, такие как *Arxula adenivorans*, *Ogataea* spec такие как *Ogataea minuta*, *Klebsiella* spec, такие как *Klebsiella pneumoniae*.

Микроорганизмы рода *Cupriavidus basilensis*, *Flavohumibacter solisilvae*, *Acidovorax facilis* 72W, *Pseudomonas* sp. RIT357, *Nocardia brasiliensis* NBRC 14402, *Pseudomonas fluorescens*, *Agrobacterium rubi*, *Candidatus Dadabacteria bacterium*

CSP1-2, *Tepidicaulis marinus*, *Synechococcus* sp. CC9605, *Aquimarina atlantica*, *Arthrobacter* sp., *Sphingomonas wittichii* RW1, *Pseudomonas mandelii* JR-1, *Salinisphaera shabanensis* E1L3A, *Smithella* sp. SDB, *Bradyrhizobium diazoefficiens*, *Actinobacteria bacterium* RBG_13_55_18, *Rhizobium* sp. YK2 или *Bacterium* YEK0313, экспрессирующие любую из нитрилаз согласно изобретению представляют собой еще один вариант осуществления изобретения.

Еще один вариант осуществления изобретения представляет способ получения нитрилазы, включающий следующие этапы:

- a) предоставление рекомбинантного микроорганизма, экспрессирующего, по меньшей мере, одну из нитрилаз согласно изобретению или микроорганизма, естественным образом экспрессирующего нитрилазу согласно изобретению, и
- b) культивирование указанного микроорганизма в условиях, обеспечивающих экспрессию указанного гена нитрилазы, и
- c) при необходимости, выделение нитрилазы согласно изобретению из указанного микроорганизма.

Другой вариант осуществления изобретения касается композиции, содержащей воду, нитрилазу, (мет-)акрилонитрил и/или (мет-)акрилат аммония, причем нитрилаза выбрана из группы, состоящей из

молекулы аминокислоты SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 18, 20, 22, 26, 28, 30, 32, 34, 38, 40, 42, 46, 48, 52, 54, 56, 60, 62, 64, 66 и 68 или ее функционального фрагмента, и

молекулы аминокислоты, имеющей, по меньшей мере, 55% идентичности с молекулой аминокислоты SEQ ID NO: SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 18, 20, 22, 26, 28, 30, 32, 34, 38, 40, 42, 46, 48, 52, 54, 56, 60, 62, 64, 66 или 68, и,

молекулы аминокислоты, кодируемой молекулой нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 25, 27, 29, 31, 33, 37, 39, 41, 45, 47, 51, 53, 55, 59, 61, 63, 65 или 67, или ее функционального фрагмента, и

молекулы аминокислоты, кодируемой молекулой нуклеиновой кислоты, имеющей, по меньшей мере, 70% идентичности с SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 25, 27, 29, 31, 33, 37, 39, 41, 45, 47, 51, 53, 55, 59, 61, 63, 65 или 67, или ее функционального фрагмента, и

молекулы аминокислоты, кодируемая молекулой нуклеиновой кислоты, которая гибридизирует в жестких условиях, с получением фрагмента, по меньшей мере, 250 оснований, комплементарных с SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 25, 27, 29, 31, 33, 37, 39, 41, 45, 47, 51, 53, 55, 59, 61, 63, 65 или 67, или ее функционального фрагмента,

причем молекула аминокислоты, как определено в пунктах ii., iv. и v., катализирует реакцию из (мет-)акрилонитрила в (мет-)акрилат аммония в водной среде.

Молекулы аминокислоты и молекулы нуклеиновой кислоты, имеющие определенную идентичность с любой из аминокислот последовательностей SEQ ID NO: 1 - 68, включают молекулы нуклеиновой кислоты и молекулы аминокислоты, имеющие 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, или более идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 1 - 68.

Предпочтительно, аминокислотные последовательности нитрилазы, имеющие определенную идентичность с нитрилазами SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 18, 20, 22, 26, 28, 30, 32, 34, 38, 40, 42, 46, 48, 52, 54, 56, 60, 62, 64, 66 и 68, содержат несколько, предпочтительно преимущественно консервативных аминокислотных замен. Консервативные замены – это замены, при которых одна аминокислота заменяется аналогичной аминокислотой. Для определения процента идентичности применяются следующие условия, которые также соответствуют матрице BLOSUM62, которая является одной из наиболее часто используемых матриц сравнения аминокислот для поиска в базе данных и выравнивания последовательностей:

Аминокислота А является сходной с аминокислотой S

Аминокислота D является сходной с аминокислотами E; N

Аминокислота E является сходной с аминокислотами D; K; Q

Аминокислота F является сходной с аминокислотами W; Y

Аминокислота H является сходной с аминокислотами N; Y

Аминокислота I является сходной с аминокислотами L; M; V

Аминокислота K является сходной с аминокислотами E; Q; R

Аминокислота L является сходной с аминокислотами I; M; V

Аминокислота M является сходной с аминокислотами I; L; V

Аминокислота N является сходной с аминокислотами D; H; S

Аминокислота Q является сходной с аминокислотами E; K; R

Аминокислота R является сходной с аминокислотами K; Q

Аминокислота S является сходной с аминокислотами A; N; T

Аминокислота T является сходной с аминокислотами S

Аминокислота V является сходной с аминокислотами I; L; M

Аминокислота W является сходной с аминокислотами F; Y

Аминокислота Y является сходной с аминокислотами F; H; W

Консервативные аминокислотные замены могут происходить по всей длине последовательности полипептидной последовательности функционального белка, такого как фермент. В одном варианте осуществления такие мутации не относятся к функциональным доменам фермента. В одном варианте осуществления консервативные мутации не относятся к каталитическим центрам фермента.

Функциональный фрагмент молекул аминокислоты, выбранных из SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 18, 20, 22, 26, 28, 30, 32, 34, 38, 40, 42, 46, 48, 52, 54, 56, 60, 62, 64, 66 и 68, содержит, по меньшей мере, 100 аминокислот, предпочтительно, по меньшей мере, 150 аминокислот, более предпочтительно, по меньшей мере, 200 аминокислот, более предпочтительно, по меньшей мере, 250 аминокислот, наиболее предпочтительно, по меньшей мере, 300 аминокислот.

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Очевидно, что настоящее изобретение не ограничено конкретной методологией или протоколами. Также необходимо понимать, что терминология изобретения используется только для описания частных примеров осуществления изобретения и не ограничивает объем настоящего изобретения. Объем настоящего изобретения ограничен лишь пунктами формулы изобретения. Следует отметить, что используемые в настоящем документе и в приложенной формуле изобретения формы единственного числа подразумевают множественное число, если контекстом не подразумевается иное. Так, например, «вектор» может означать один или несколько векторов, а также их эквиваленты, известные специалистам. Термин «приблизительно» в настоящем документе означает «около», «ориентировочно», «приблизённо» или «в области». Когда термин «приблизительно» используется в отношении числового диапазона, границы этого

диапазона расширены выше и ниже указанных числовых значений. В целом, термин «приблизительно» в настоящем документе означает вариацию указанного числового значения на 20 процентов (в сторону увеличения или уменьшения), предпочтительно на 10 процентов (в сторону увеличения или уменьшения). При использовании по тексту настоящего документа термин «или» означает «любой из указанного перечня», а также любую комбинацию элементов этого списка. Термины «содержать» и «содержащий», «включать», «включающий» а также их грамматические варианты при использовании в настоящем описании и в формуле изобретения указывают на присутствие одного или нескольких заявленных свойств, целых чисел, компонентов или этапов, при этом использование таких терминов означает, что дополнительно также могут присутствовать одно или несколько других свойств, целых чисел, этапов, компонентов или их групп. Во избежание неопределенности, некоторые термины в настоящем описании используются в следующих значениях:

Кодирующая область. При использовании по тексту настоящего документа термин «кодирующая область» при использовании в отношении структурного гена относится к нуклеотидным последовательностям, которые кодируют аминокислоты в растущем полипептиде в результате трансляции молекулы мРНК. Кодирующая область ограничена у эукариот на 5'-стороне триплетом нуклеотидов «ATG», который кодирует инициатор метионин, у прокариотов также используются триплеты «GTG» и «TTG» в качестве стартового кодона. На 3'-стороне она ограничена одним из трех триплетов, которые определяют стоп-кодона (т.е. TAA, TAG, TGA). Кроме того, ген может включать последовательности, расположенные как на 5'-, так и на 3'-конце последовательностей, присутствующих в транскрипте РНК. Эти последовательности называются «фланкирующими» последовательностями или областями (такие фланкирующие последовательности расположены на 5'- или 3'-конце от нетранслируемых последовательностей, присутствующих в транскрипте мРНК). 5'-фланкирующая область может содержать регуляторные последовательности, такие как промоторы и энхансеры, которые контролируют транскрипцию гена или влияют на нее. 3'-фланкирующая область может содержать последовательности, которые управляют терминацией транскрипции, посттранскрипционным расщеплением и полиаденилированием.

Комплементарный. Термин «комплементарный» или «комплементарность» относится к двум нуклеотидным последовательностям, которые содержат антипараллельные нуклеотидные последовательности, способные спариваться друг с другом (по правилам спаривания оснований) при образовании водородных связей между комплементарными остатками оснований в антипараллельных нуклеотидных последовательностях. Например, последовательность 5'-AGT-3' комплементарна последовательности 5'-ACT-3'. Комплементарность может быть «частичной» или «полной». «Частичная» комплементарность – это когда одно или несколько оснований нуклеиновой кислоты не совпадают в соответствии с правилами спаривания оснований. «Полная» комплементарность между молекулами нуклеиновой кислоты – это когда все основания нуклеиновой кислоты располагаются относительно других оснований в соответствии с правилами спаривания оснований. Степень комплементарности цепочек молекул нуклеиновых кислот имеет значительное влияние на эффективность и силу гибридизации цепочек молекул нуклеиновых кислот. При использовании по тексту настоящего документа термин «комплементарная нуклеотидная последовательность» относится к нуклеотидной последовательности, которая демонстрирует полную комплементарность другой нуклеотидной последовательности.

Эндогенный. «Эндогенная» нуклеотидная последовательность означает нуклеотидную последовательность, которая присутствует в геноме микроорганизма дикого типа.

Повышенная экспрессия: термины «повышать» и «усиливать» в отношении экспрессии молекулы нуклеиновой кислоты в микроорганизме в настоящем документе являются взаимозаменяемыми и означают, что уровень экспрессии молекулы нуклеиновой кислоты в микроорганизме становится выше по сравнению с эталонным микроорганизмом, например, дикого типа. При использовании по тексту настоящего документа термины «усиленный» или «увеличенный» означают более высокую, предпочтительно значительно более высокую экспрессию молекулы нуклеиновой кислоты, которая должна быть экспрессирована. При использовании по тексту настоящего документа «усиление» или «повышение» уровня агента, такого как белок, мРНК или РНК, означает, что уровень повышен по сравнению по существу с идентичным микроорганизмом, выращенным по

существо в идентичных условиях. При использовании по тексту настоящего документа термин «усиление» или «повышение» в отношении уровня агента, такого как, например, преРНК, мРНК, рРНК, тРНК, экспрессируемого целевым геном и/или кодируемым им белковым продуктом, означает, что уровень увеличивается на 50% или более, например, 100% или более, предпочтительно 200% или более, более предпочтительно в 5 раз или более, еще более предпочтительно в 10 раз или более, наиболее предпочтительно в 20 раз или более, например, в 50 раз по сравнению с соответствующим эталонным микроорганизмом. Повышение или увеличение может быть определено способами, известными специалистам. Таким образом, увеличение или увеличение количества нуклеиновой кислоты или белка может быть определено, например, путем иммунологической детекции белка. Более того, для измерения количества определенного белка или РНК в микроорганизме могут использоваться такие методы, как белковый анализ, флюоресцентный анализ, Нозерн-гибридизация, денситометрическое измерение концентрации нуклеиновых кислот в геле, анализ с защитой от действия нуклеаз, обратная транскрипция (количественная ОТ-ПЦР), ELISA (иммуноферментный анализ), вестерн-блоттинг, радиоиммуноанализ (RIA) или другие иммуноанализы и клеточный анализ с активацией флуоресценции (FACS). В зависимости от типа искусственного белкового продукта также может быть определена его активность или влияние на фенотип микроорганизма. Способы определения количества белка известны специалистам. Можно упомянуть следующие примеры: микробиуретовый метод (Goa J (1953) Scand J Clin Lab Invest 5:218-222), метод Фолина-Чокальтеу (Lowry OH et al. (1951) J Biol Chem 193:265-275) или измерение абсорбции СВВ G-250 (Bradford MM (1976) Analyt Biochem 72:248-254).

Экспрессия. «Экспрессия» относится к биосинтезу продукта гена, в частности к транскрипции и/или трансляции нуклеотидной последовательности, например, эндогенного гена или гетерологичного гена, в клетке. Например, в случае структурного гена экспрессия включает транскрипцию структурного гена в мРНК и, при необходимости, последующую трансляцию мРНК в один или несколько полипептидов. В других случаях экспрессия может относиться только к транскрипции ДНК, кодирующей молекулу РНК.

Чужеродный. Термин «чужеродный» относится к любой молекуле нуклеиновой кислоты (например, к геновой последовательности), которая введена в клетку путем экспериментальных модификаций, и может включать природные последовательности, при условии, что введенная последовательность содержит некоторую модификацию (например, точечную мутацию, наличие селектируемого маркерного гена и т.д.) и поэтому отличается от природной последовательности.

Функциональный фрагмент. Термин «функциональный фрагмент» относится к любой нуклеотидной или аминокислотной последовательности, которая включает только часть нуклеотидной или аминокислотной последовательности полной длины, соответственно, но все же имеет схожую или подобную активность и/или функцию. В одном варианте осуществления фрагмент содержит по меньшей мере, 70%, по меньшей мере, 80 %, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере, 90 %, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 97%, по меньшей мере, 98 %, по меньшей мере, 99% исходной последовательности. В одном варианте осуществления функциональный фрагмент содержит смежные нуклеиновые кислоты или аминокислоты по сравнению с исходной нуклеотидной или с исходной аминокислотной последовательностью, соответственно.

Функциональная связь. Термины «функциональная связь» или «функционально связанный» эквивалентны термину «оперативная связь» или «оперативно связанный» и означают, например, последовательное расположение регуляторного элемента (например, промотора) с нуклеотидной последовательностью, которая экспрессируется, и, при необходимости, дополнительных регуляторных элементов (таких как, например, терминатор) таким образом, чтобы каждый из регуляторных элементов мог выполнять соответствующую функцию, для экспрессии, модификации экспрессии, стимуляции экспрессии или влияния иным образом на экспрессию указанной нуклеотидной последовательности. Выражение «оперативная связь» или «оперативно связанный» является синонимичным. В результате этого, экспрессия может быть зависимой от расположения нуклеотидных последовательностей по отношению к смысловой или бессмысловой РНК. Для этого не обязательно требуется прямая связь в химическом смысле. Кроме того, воздействие на целевую последовательность могут оказывать последовательности для генетического

регулирования, такие как, например, энхансерные последовательности, из положений, которые находятся дальше от других молекул ДНК. Предпочтительными являются расположения, при которых нуклеотидная последовательность, подлежащая рекомбинантной экспрессии, расположена позади последовательности, выступающей в качестве промотора, так что две последовательности ковалентно связаны друг с другом. В предпочтительном варианте осуществления транскрибируемая нуклеотидная последовательность расположена за промотором таким образом, что начало транскрипции идентично целевому началу химерной РНК согласно изобретению. Функциональная связь и экспрессионная конструкция могут быть созданы с использованием обычных методов рекомбинации и клонирования в соответствии с описанием в литературе (например, Sambrook J, Fritsch EF and Maniatis T (1989); Silhavy et al. (1984) Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor (NY); Ausubel et al. (1987) Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience; Gelvin et al. (Изд.) (1990) Plant Molecular Biology Manual; Kluwer Academic Publisher, Дордрехт, Нидерланды). Тем не менее, между двумя последовательностями также могут быть расположены дополнительные последовательности, которые, например, действуют в качестве линкера со специфическими сайтами расщепления для рестрикционных ферментов или в качестве сигнального пептида. Вставка последовательностей также может приводить к экспрессии белков слияния. Предпочтительно, экспрессионная конструкция, состоящая из связанных регуляторной области, например, промотора, и экспрессируемой нуклеотидной последовательности, может присутствовать в форме, интегрированной с вектором, или может быть введена в геном, например, путем трансформации.

Ген. Термин «ген» относится к области, функционально связанной с соответствующими регуляторными последовательностями, способными каким-либо образом регулировать экспрессию генного продукта (например, полипептида или функциональной РНК). Ген включает нетранслируемые регуляторные области ДНК (например, промоторы, энхансеры, репрессоры и т.д.), которые расположены перед (против хода транскрипции) или после (по ходу транскрипции) кодирующей областью (открытая рамка считывания, ОРС). При использовании по тексту настоящего документа термин «структурный ген» означает последовательность

ДНК, которая транскрибируется в мРНК, которая затем транслируется в последовательность аминокислот, характерную для определенного полипептида.

Геном и геномная ДНК. Термины «геном» или «геномная ДНК» относятся к наследуемой генетической информации организма-хозяина. Указанная геномная ДНК включает ядерную ДНК, а также ДНК самореплицирующейся плазмиды.

Гетерологичный. Термин «гетерологичный» по отношению к молекуле нуклеиновой кислоты или ДНК относится к молекуле нуклеиновой кислоты, которая функционально связана со второй молекулой нуклеиновой кислоты, с которой она функционально не связана в природе или с которой она оперативно связана в природе, но в другом месте, или которая в результате генетической модификации становится функционально связанной со второй молекулой нуклеиновой кислоты, с которой она функционально не связана в природе или с которой она оперативно связана в природе, но в другом месте. Гетерологичная экспрессионная конструкция, содержащая молекулу нуклеиновой кислоты и одну или несколько связанных с ней регуляторных молекул нуклеиновой кислоты (например, промотор или сигнал терминации транскрипции), например, представляет собой конструкцию, полученную в результате экспериментальных модификаций, при которых а) указанная молекула нуклеиновой кислоты, или б) указанная регуляторная молекула нуклеиновой кислоты или с) обе эти последовательности по пп. а) и б) расположены вне в природной (нативной) генетической среде или подверглись модификации, примером такой модификации является замена, добавление, удаление, инверсия или вставка одного или нескольких нуклеотидных остатков. Под «естественной генетической средой» понимают естественный геномный локус в исходном организме или внутри организма-хозяина или нахождение в геномной библиотеке. В случае геномной библиотеки, естественная генетическая среда нуклеотидной последовательности предпочтительно сохраняется, по меньшей мере, частично. Среда примыкает к нуклеотидной последовательности, по меньшей мере, с одной стороны и имеет последовательность длиной, по меньшей мере, 50 п. о., предпочтительно, по меньшей мере, 500 п. о., особенно предпочтительно, по меньшей мере, 1000 п. о. и наиболее предпочтительно, по меньшей мере, 5000 п. о. Природная экспрессионная конструкция, например, природная комбинация промотора с соответствующим геном, становится трансгенной экспрессионной конструкцией, когда она

изменяется с помощью не природных, синтетических («искусственных») методов, таких как, например, мутагенная обработка. Такие методы описаны в литературе (US 5,565,350; WO 00/15815), например, молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая белок, функционально связанная с промотором, которая не является нативным промотором этой молекулы, считается гетерологичной по отношению к промотору. Предпочтительно, гетерологичная ДНК не является эндогенной по отношению к клетке, в которую она введена, или не связана с ней естественным образом, но была получена из другой клетки или получена синтетическим путем. Гетерологичная ДНК также включает эндогенную последовательность ДНК, которая содержит некоторую модификацию, не встречающуюся в природе, множественные копии эндогенной последовательности ДНК или последовательность ДНК, физически связанную с другой последовательностью ДНК, которая в природе с ней не связана. Как правило, но не всегда, гетерологичная ДНК кодирует РНК или белки, которые обычно не продуцируются клеткой, в которой она экспрессируется.

Гибридизация. Термин «гибридизация» согласно определению в настоящем документе – это процесс, при котором в значительной степени комплементарные нуклеотидные последовательности гибридизируют друг с другом. Процесс гибридизации может происходить полностью в растворе, т.е. обе взаимодействующие нуклеиновые кислоты находятся в растворе. Также процесс может проходить с участием одной из комплементарных нуклеиновых кислот, иммобилизованных в матрице, такой как магнитные гранулы, гранулы сефарозы или любой другой смолы. Процесс гибридизации, кроме того, может быть осуществлен с одной из комплементарных нуклеиновых кислот, иммобилизованной в твердой подложке, такой как нитроцеллюлоза или нейлоновая мембрана, или иммобилизованной, например, путем фотолиитографии, например, на кремнийсодержащей стеклянной подложке (последние известны как нуклеиновокислотные матрицы или микроматрицы или как нуклеиновокислотные чипы). Для того чтобы осуществить возможную гибридизацию, молекулы нуклеиновой кислоты обычно термически или химически денатурируют, чтобы перевести двойную цепь в две единичные цепи и/или удалить «шпильки» или другие вторичные структуры из единичных цепных нуклеиновых кислот.

Термин «жесткость» относится к условиям, в которых протекает гибридизация. К таким условиям относятся температура, концентрация соли, ионная сила или состав буфера гибридизации. Обычно выбирают следующие условия с низкой жесткостью: 30°C ниже точки плавления (T_m) для определенной последовательности при определенной ионной силе и pH. Условия средней жесткости – 20°C ниже T_m , высокой жесткости – 10°C ниже T_m . Жесткие условия гибридизации обычно используют для выделения гибридизирующих последовательностей, которые имеют высокую степень идентичности с целевыми нуклеотидными последовательностями. Тем не менее, аминокислоты могут отклоняться в последовательности и все еще кодировать в значительной степени подобный полипептид вследствие вырожденности генетического кода. Поэтому для определения таких молекул аминокислот иногда могут быть необходимы условия средней жесткости.

T_m – это температура (при определенной ионной силе и pH), при которой 50% целевой последовательности гибридизует с подобранным зондом. T_m зависит от состояния раствора, состава оснований и длины зонда. Например, более длинные последовательности гибридизуют при более высоких температурах. С наибольшей скоростью гибридизация происходит при температуре приблизительно от 16°C до 32°C ниже T_m . Наличие одновалентных катионов в растворе гибридизации уменьшает электростатическое отталкивание между двумя цепочками аминокислот, тем самым способствуя гибриднему образованию; данный эффект наблюдается при концентрациях натрия до 0,4 М (при более высоких концентрациях им можно пренебречь). Формамид уменьшает температуру плавления двойных спиралей ДНК-ДНК и ДНК-РНК на 0,6 – 0,7°C на каждый процент формамида, а добавление 50% формамида позволяет осуществить гибридизацию при 30 – 45°C, хотя скорость гибридизации будет ниже. Несоответствия пар оснований снижают скорость гибридизации и термальную стабильность двойных спиралей. В среднем и для больших зондов, T_m снижается на приблизительно 1°C на % несоответствия основания. T_m можно рассчитать по следующим формулам, в зависимости от типа гибрида:

ДНК-ДНК гибриды (Meinkoth and Wahl, Anal. Biochem., 138: 267-284, 1984):

$T_m = 81.5^\circ\text{C} + 16.6 \times \log[\text{Na}^+]_a + 0.41 \times \%[\text{G/Cb}] - 500 \times [\text{Lc}]^{-1} - 0.61 \times \% \text{ формамид}$

ДНК-РНК или РНК-РНК гибриды:

$$T_m = 79.8 + 18.5 (\log_{10}[\text{Na}^+]_a) + 0.58 (\%G/C_b) + 11.8 (\%G/C_b)^2 - 820/L_c$$

олиго-ДНК или олиго-РНКd гибриды:

Для <20 нуклеотидов: $T_m = 2 (\ln)$

Для 20–35 нуклеотидов: $T_m = 22 + 1.46 (\ln)$

a либо для другого однозарядного катиона, но только в диапазоне 0,01 - 0,4 M.

b только для % GC в диапазоне 30% - 75%.

c L = длина двойных спиралей в парах оснований.

d олиго, олигонуклеотид; \ln , = эффективная длина праймера = $2 \times (\%G/C) + (\%A/T)$.

Неспецифическое связывание может контролироваться с помощью известных технологий, например, таких как блокирование мембраны путем растворов с содержанием белка, добавление гетерологичных РНК, ДНК и SDS (додецилсульфата натрия) в буфер гибридизации, обработка рибонуклеазой. Для неродственных зондов может осуществляться серия гибридизаций путем сильного понижения температуры гибридизации (например, с 68°C до 42°C) или уменьшения концентрации формамида (например, с 50% до 0%). Специалисту известны различные параметры, которые могут изменяться во время гибридизации и которые помогут сохранить или изменить условия жесткости.

Помимо условий гибридизации, специфичность гибридизации зависит также от функции промывки после гибридизации. Чтобы убрать фон после неспецифичной гибридизации, образцы промывают в разбавленных соляных растворах. Решающие факторы промывки включают ионическую силу и температуру последнего раствора: чем более низкая концентрация соли и более высокая температура, тем выше жесткость условий промывки. Промывка обычно проводится при условиях той же жесткости, что и условия гибридизации, либо при условиях более низкой жесткости. Положительная гибридизация дает сигнал с интенсивностью, по меньшей мере, в два раза выше фона. Обычно соответствующие жесткие условия для анализа гибридизации нуклеиновых кислот или процедур по определению амплификации генов такие же, как изложены выше. Могут быть также выбраны более или менее жесткие условия. Специалисту известны различные параметры, которые могут изменяться во время промывки и которые помогут сохранить или изменить условия жесткости.

Например, условия высокой жесткости гибридизации для гибридов ДНК, длиной более 50 нуклеотидов, включают гибридизацию при 65°C в 1 x SSC или при 42°C в 1x SSC и 50% формамида, затем промывка при 65°C в 0,3x SSC. Условия гибридизации средней жесткости для гибридов ДНК длиной более 50 нуклеотидов, включают гибридизацию при температуре 50° С в 4x SSC или при 40° С в 6 x SSC и 50% формамида, затем промывку при 50° С в 2x SSC. Длина гибрида – это предполагаемая длина гибридизируемой нуклеиновой кислоты. Когда нуклеиновые кислоты известной последовательности гибридизируются, длина гибрида определяется путем выравнивания последовательностей и определения консервативных областей, описание которых приводится в настоящем документе. 1 × SSC – 0,15 М NaCl, 15 мМ цитрат тринатрия, растворы гибридизации и промывки могут также дополнительно включать 5 × раствор Денхардта, 0,5 - 1,0 % SDS, 100 мкг/мл денатурированной фрагментированной ДНК из молок лососевых, 0,5% пиррофосфат натрия. Еще один пример условий высокой жесткости – гибридизация при 65°C в растворе 0,1x SSC, содержащем 0,1 SDS и, при необходимости, 5x раствора Денхардта, 100 мкг/мл денатурированной, фрагментированной ДНК из молок лососёвых, 0,5% пиррофосфата натрия, с последующей промывкой при 65°C в 0,3x SSC.

Для определения уровня жесткости условий, можно обратиться к работе Sambrook et al. (2001) *Molecular Cloning: a laboratory manual*, 3ье Издание Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, CSH, Нью-Йорк или к *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, N.Y. (1989 и ежегодные обновления).

«Идентичность»: «Идентичность» в отношении сравнения двух или более молекул нуклеиновой кислоты или аминокислоты означает, что последовательности указанных молекул имеют определенную степень сходства последовательностей, причем последовательности частично идентичны.

Варианты ферментов можно определить по идентичности их последовательностей по сравнению с исходным ферментом. Степень идентичности последовательностей обычно указывается как «процент идентичности последовательности» или «процент идентичности». Для определения процента идентичности двух аминокислотных последовательностей на первом этапе производится попарное выравнивание этих двух последовательностей, при этом две последовательности выравниваются по их полной длине (то есть попарное

глобальное выравнивание). Выравнивание осуществляется с помощью программы, реализующей алгоритм Нидлмана-Вунша (J. Mol. Biol. (1979) 48, стр. 443-453), предпочтительно с помощью программы «NEEDLE» (The European Molecular Biology Open Software Suite (EMBOSS)) с параметрами программы по умолчанию (штраф на внесение гэпа = 10,0, штраф за продолжение гэпа = 0,5 и матрица EBLOSUM62). Для целей настоящего изобретения предпочтительным выравниванием является такое выравнивание, при котором может быть определена наибольшая идентичность последовательностей.

В следующем примере для иллюстрации приведены две нуклеотидные последовательности, но те же вычисления применимы и к белковым последовательностям:

Seq A: AAGATACTG длина: 9 оснований

Seq B: GATCTGA длина: 7 оснований

Таким образом, последовательность B – более короткая последовательность.

Попарное глобальное выравнивание обеих последовательностей по полной длине дает следующее:

Seq A: AAGATACTG-

||| |||

Seq B: --GAT-CTGA

Символ «|» в выравнивании указывает на идентичные остатки (основания для ДНК или аминокислоты для белков). Количество идентичных остатков – 6.

Символ «-» в выравнивании указывает на гэпы. Количество гэпов, вносимых при выравнивании в последовательность B, составляет 1. Количество гэпов, вносимых при выравнивании в пограничный район последовательности B, составляет 2, а в пограничный район последовательности A – 1.

Длина выравнивания, показывающая выравненные последовательности по всей их длине, составляет 10.

Создание попарного выравнивания, которое показывает более короткую последовательность по всей ее длине в соответствии с изобретением, следовательно, приводит к следующему:

Seq A: GATACTG-

||| |||

Seq B: GAT-CTGA

Создание попарного выравнивания, которое показывает последовательность А по всей ее длине в соответствии с изобретением, следовательно, приводит к следующему:

Seq A: AAGATACTG

||| |||

Seq B: --GAT-CTG

Создание попарного выравнивания, которое показывает последовательность В по всей ее длине в соответствии с изобретением, следовательно, приводит к следующему:

Seq A: GATACTG-

||| |||

Seq B: GAT-CTGA

Длина выравнивания, показывающая более короткую последовательность по всей ее длине, равна 8 (присутствует один гэп, который учитывается в длине выравнивания более короткой последовательности).

Соответственно, длина выравнивания, показывающая последовательность А по всей его длине, будет равна 9 (что означает, что последовательностью согласно изобретению является последовательность А).

Соответственно, длина выравнивания, показывающая последовательность В по всей его длине, будет равна 8 (что означает, что последовательностью согласно изобретению является последовательность В).

После выравнивания двух последовательностей на втором этапе из полученного выравнивания определяется значение процента идентичности. Для целей настоящего описания процент идентичности рассчитывается по следующей формуле = (идентичные остатки/длина области выравнивания, которая показывает соответствующую последовательность данного изобретения по всей ее длине) *100. Таким образом, в соответствии с этим вариантом осуществления идентичность последовательности при сравнении двух аминокислотных

последовательностей вычисляется путем деления количества идентичных остатков на длину области выравнивания, которая показывает соответствующую последовательность данного изобретения по всей ее длине. Для получения процента идентичности это значение умножается на 100. Согласно примеру, приведенному выше, процент идентичности составляет: для последовательности А, являющейся последовательностью согласно изобретению $(6/9) * 100 = 66,7 \%$; последовательности В, являющейся последовательностью согласно изобретению $(6/8) * 100 = 75\%$.

Выделенный. При использовании по тексту настоящего документа термин «выделенный» означает, что материал был удален человеком из своей исходной естественной среды и существует отдельно от нее и, следовательно, не является природным продуктом. Выделенный материал или молекула (например, молекула ДНК или фермент) могут существовать в очищенной форме или может существовать в неприродной среде, например, в трансгенной клетке-хозяине. Например, природная молекула нуклеиновой кислоты или полипептид, присутствующие в живой клетке, не являются выделенными, а выделенными являются та же самая молекула нуклеиновой кислоты или полипептид, отделенные от некоторых или всех материалов, которые находятся вместе с ними в природной системе. Такие молекулы нуклеиновой кислоты могут быть частью вектора, и/или такие молекулы нуклеиновой кислоты или полипептиды могут быть частью композиции, и являются выделенными, если такой вектор или композиция не являются частью исходного окружения такой молекулы. Предпочтительно, термин «выделенный», когда он используется в отношении молекулы нуклеиновой кислоты, например, «выделенная последовательность нуклеиновой кислоты», относится к последовательности нуклеиновой кислоты, которая идентифицирована и отделена, по меньшей мере, от одной посторонней молекулы нуклеиновой кислоты, с которой она обычно связана в природе. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты – это молекула нуклеиновой кислоты, присутствующая в такой форме или в такой окружающей среде, которые отличаются от формы или от окружающей среды, в которой эта молекула встречается в природе. Напротив, невыделенные молекулы нуклеиновых кислот представляют собой молекулы нуклеиновых кислот, такие как ДНК и РНК, которые находятся в том же окружении, в котором они существуют в природе. Например, определенная

последовательность ДНК (например, ген) находится на хромосоме клетки-хозяина в непосредственной близости от соседних генов; последовательности РНК, такие как определенная последовательность мРНК, кодирующая определенный белок, обнаруживаются в клетке в виде смеси с множеством других мРНК, которые кодируют множество белков. Тем не менее, выделенная нуклеотидная последовательность, содержащая, например, последовательность SEQ ID NO:1 включает, например, такие последовательности нуклеиновой кислоты в клетках, которые обычно содержат SEQ ID NO:1, которые находятся в таком положении в геноме или в плазмиде, которое отличается от такого положения в природных клетках или иным образом фланкированы нуклеотидной последовательностью, отличной от природной нуклеотидной последовательности. Выделенная нуклеотидная последовательность может присутствовать в одноцепочечном или в двухцепочечном виде. Если выделенная нуклеотидная последовательность должна использоваться для экспрессии белка, эта нуклеотидная последовательность должна, по меньшей мере, часть смысловой или кодирующей цепи (т.е. такая нуклеотидная последовательность может быть одноцепочечной). В альтернативном варианте она может содержать как смысловую, так и антисмысловую цепь (т.е. последовательность нуклеиновой кислоты может быть двухцепочечной).

Нитрилаза. При использовании по тексту настоящего документа термин «нитрилаза» относится к ферменту, катализирующему реакцию конверсии метакрилонитрила в акрилат метаммония и/или реакцию конверсии акрилонитрила в акрилат аммония. Он также включает ферменты, которые катализируют иные реакции, помимо упомянутых выше.

Некодирующий. Термин «некодирующий» относится к молекулам нуклеиновых кислот, которые не кодируют часть или весь экспрессируемый белок. Некодирующие последовательности включают, помимо прочего, энхансеры, промоторные области, 3'-нетранслируемые области и 5'-нетранслируемые области.

Нуклеиновые кислоты и нуклеотиды. Термины «нуклеиновые кислоты» и «нуклеотиды» относятся к природным, синтетическим или искусственным нуклеиновым кислотам или нуклеотидам. Термины «нуклеиновые кислоты» и «нуклеотиды» включают дезоксирибонуклеотиды или рибонуклеотиды или аналоги любого нуклеотида и их полимеры или гибриды в одно- или

двухцепочечной, смысловой или бессмысловой форме. За исключением случаев, когда указано иное, подразумевается, что определенная нуклеотидная последовательность также потенциально включает ее консервативно модифицированные варианты (например, замены вырожденных кодонов) и комплементарные последовательности, а также напрямую указанные последовательности. Термин «нуклеиновая кислота» в настоящем документе используется взаимозаменяемо с терминами «ген», «кДНК», «мРНК», «олигонуклеотид» и «молекула нуклеиновой кислоты». Аналоги нуклеотидов включают нуклеотиды с модификациями в химической структуре основания, сахара и/или фосфата, в том числе, помимо прочего, модификации пиримидина в положении 5, модификации пурина в положении 8, модификации экзоциклических аминов цитозина, замещение 5-бромо-урацила и подобных групп; и модификации сахара в положении 2, в том числе, помимо прочего, рибонуклеотиды, модифицированные сахаром, в которых 2'-ОН заменен группой, выбранной из H, OR, R, галогена, SH, SR, NH₂, NHR, NR₂ или CN. Короткие шпильчатые РНК (кшРНК) также могут содержать неприродные элементы, такие как неприродные основания, например, ионозин и ксантин, неприродные сахара, например, 2'-метоксирибозу, или неприродные фосфодифирные связи, например, метилфосфонаты, фосфоротиоаты и пептиды.

Нуклеотидная последовательность. Термин «нуклеотидная последовательность» относится к одно- или двухцепочечному полимеру дезоксирибонуклеотидных или рибонуклеотидных оснований, считываемых, начиная с 5'- к 3'-конца. Он включает хромосомную ДНК, самореплицирующиеся плазмиды, инфекционные полимеры ДНК или РНК и ДНК или РНК, которые играют главным образом структурную роль. «Нуклеотидная последовательность» также относится к последовательному списку сокращений, букв, символов или слов, которые означают нуклеотиды. В одном варианте осуществления нуклеиновая кислота может являться зондом, который представляет собой относительно короткую нуклеиновую кислоту, обычно длиной менее 100 нуклеотидов. Зачастую зонд на основе нуклеиновой кислоты имеет длину приблизительно от 50 нуклеотидов до приблизительно 10 нуклеотидов. «Целевая область» нуклеиновой кислоты – представляющая интерес часть нуклеиновой кислоты. «Кодирующая область» нуклеиновой кислоты представляет собой часть

нуклеиновой кислоты, которая транскрибируется и транслируется последовательно-специфическим образом с получением определенного полипептида или белка под контролем соответствующих регуляторных последовательностей. Таким образом, кодирующая область кодирует такой полипептид или белок.

Олигонуклеотид. Термин «олигонуклеотид» относится к олигомеру или полимеру рибонуклеиновой кислоты (РНК) или дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) или их миметикам, а также к олигонуклеотидам, имеющим не встречающиеся в природе части, которые функционируют схожим образом. Такие модифицированные или замещенные олигонуклеотиды часто предпочтительнее нативных форм из-за целевых свойств, таких как, например, повышенный клеточный захват, повышенное сродство к целевой нуклеиновой кислоте и повышенная стабильность в присутствии нуклеаз. Олигонуклеотид предпочтительно включает два или более нуклеомомера, ковалентно соединенных друг с другом связями (например, фосфодиэфирами) или замещающими связями.

Липкий конец. «Липкий конец» – это относительно короткая одноцепочечная нуклеотидная последовательность на 5'- или 3'-гидроксильном конце двухцепочечной олигонуклеотидной молекулы (которая также может именоваться «выступающим концом»).

Полипептид. Термины «полипептид», «пептид», «олигопептид», «полипептид», «генный продукт», «продукт экспрессии» и «белок» используются в настоящем документе взаимозаменяемо для обозначения полимера или олигомера из следующих друг за другом аминокислотных остатков.

Промотор. Термины «промотор» или «промоторная последовательность» являются эквивалентами и при использовании по тексту настоящего документа относятся к последовательности ДНК, которая, будучи функционально связанной с целевой нуклеотидной последовательностью, способна контролировать транскрипцию целевой нуклеотидной последовательности в РНК. Промотор расположен перед (против хода транскрипции) сайтом начала транскрипции целевой нуклеотидной последовательности, транскрипцией которой в мРНК он управляет, вблизи от нее, и обеспечивает сайт для специфического связывания

РНК-полимеразой и другими факторами транскрипции для инициации транскрипции. Промотор не содержит кодирующих областей или 5'-нетранслируемых областей. Промотор может, например, быть гетерологичным или гомологичным соответствующей клетке. Последовательность молекулы нуклеиновой кислоты является «гетерологичной» в отношении организма или второй последовательности молекулы нуклеиновой кислоты, если она происходит из чужеродного вида или, если она происходит из того же вида, она является модифицированной по сравнению с исходной формой. Например, промотор, функционально связанный с гетерологичной кодирующей последовательностью, относится к кодирующей последовательности вида, отличного от того вида, из которого был получен промотор, или, если он происходит из того же вида, – к кодирующей последовательности, которая в природе не связана с промотором (например, к генетически модифицированной кодирующей последовательности или к аллелю из другого экотипа или сорта). Соответствующие промоторы могут происходить из генов клеток-хозяев, в которых должна происходить экспрессия, или из патогенов этого хозяина.

Очищенный. При использовании по тексту настоящего документа термин «очищенный» относится к нуклеотидным или к аминокислотным последовательностям, которые удалены, изолированы или выделены из природной окружающей среды. «Существенно очищенные» молекулы, по меньшей мере, на 60%, предпочтительно, по меньшей мере, на 75%, более предпочтительно, по меньшей мере, на 90%, не содержат других компонентов, с которыми они связаны в природе. Очищенная нуклеотидная последовательность может представлять собой выделенную нуклеотидную последовательность.

Значительное увеличение. Увеличение, например, ферментативной активности, экспрессии гена, производства или выхода определенного продукта, которое больше, чем предел погрешности, присущий методике измерения, предпочтительно, означает увеличение, по меньшей мере, приблизительно на 10% или 25%, предпочтительно на 50% или 75%, более предпочтительно в 2 или в 5 или более раз выше, чем активность, экспрессия, производство или выход контрольного фермента или экспрессия в контрольной клетке, еще более предпочтительно – увеличение приблизительно в 10 раз или выше.

Значительное уменьшение. Уменьшение, например, ферментативной активности, экспрессии гена, производства или выхода определенного продукта, которое больше, чем предел погрешности, присущий методике измерения, предпочтительно, уменьшение, по меньшей мере, приблизительно на 5% или 10%, предпочтительно, по меньшей мере, приблизительно на 20% или 25%, более предпочтительно, по меньшей мере, приблизительно на 50% или 75%, еще более предпочтительно, по меньшей мере, приблизительно на 80% или 85%, наиболее предпочтительно по меньшей степени приблизительно на 90%, 95%, 97%, 98% или 99%.

Значительно комплементарный. В самом широком смысле термин «значительно комплементарный» при использовании в настоящем документе по отношению к нуклеотидной последовательности по отношению к эталонной или целевой нуклеотидной последовательности, означает нуклеотидную последовательность с процентом идентичности между существенно комплементарной нуклеотидной последовательностью и точной комплементарной последовательностью указанной эталонной или целевой нуклеотидной последовательности, составляющим, по меньшей мере, 60%, предпочтительно, по меньшей мере, 70%, более предпочтительно, по меньшей мере, 80% или 85%, предпочтительно, по меньшей мере, 90%, более предпочтительно, по меньшей мере, 93%, еще более предпочтительно, по меньшей мере, 95% или 96%, еще более предпочтительно, по меньшей мере, 97% или 98%, еще более предпочтительно, по меньшей мере, 99% или наиболее предпочтительно 100% (в контексте настоящего документа 100% процент идентичности эквивалентен термину «идентичный»). Предпочтительно идентичность оценивается на участке длиной, по меньшей мере, 19 нуклеотидов, предпочтительно, по меньшей мере, 50 нуклеотидов, более предпочтительно по всей длине последовательности нуклеиновой кислоты относительно указанной эталонной последовательности (если ниже не указано иное). Сравнение последовательностей проводят с использованием GAP-анализа с настройками по умолчанию с помощью приложения GAP SEQWEB пакета программ Wisconsin GCG на основании алгоритма Нидлмана-Вунша (Needleman and Wunsch (1970) J Mol. Biol. 48: 443-453; в соответствии с определением выше). Нуклеотидная последовательность, которая является «значительно комплементарной» эталонной нуклеотидной последовательности, гибридизуется с

эталонной нуклеотидной последовательностью в условиях низкой жесткости, предпочтительно в условиях средней жесткости, наиболее предпочтительно в условиях высокой жесткости (в соответствии с определением выше).

Трансген. При использовании по тексту настоящего документа термин «трансген» относится к любой нуклеотидной последовательности, которая вводится в геном клетки путем экспериментальных модификаций. Трансген может представлять собой «эндогенную последовательность ДНК» или «гетерологичную последовательность ДНК» (т.е. «чужеродную ДНК»). Термин «эндогенная последовательность ДНК» относится к нуклеотидной последовательности, которая находится в природном окружении в клетке, в которую она введена, при условии, что она не содержит какой-либо модификации (например, точечной мутации, селективируемого маркерного гена и т.д.) относительно природной последовательности.

Трансгенный. Термин трансгенный, когда он относится к организму, означает трансформированный, предпочтительно стабильно трансформированный с помощью, по меньшей мере, одной рекомбинантной молекулы нуклеиновой кислоты.

Вектор. В данном контексте, понятие «вектор» относится к молекуле нуклеиновой кислоты, способной переносить другую молекулу нуклеиновой кислоты, с которой она связана. Один тип вектора представляет собой интегрированный в геном вектор или «интегрированный вектор», который может быть встроен в геномную ДНК клетки-хозяина. Другой тип вектора – это эписомальный вектор, то есть плаزمид или молекула нуклеиновой кислоты, способная к внехромосомной репликации. Векторы, которые способны направлять экспрессию генов, с которыми они функционально связаны, в настоящем документе именуется векторами экспрессии. За исключением случаев, когда из контекста ясно иное, в настоящем описании термины «плазмид» и «вектор» используются взаимозаменяемо.

Дикого типа. Термины «дикий тип», «природный» или «естественное происхождение» означают в отношении организма, что указанный организм не изменен, мутирован и не модифицирован человеком иным образом. В отношении последовательности полипептида или нуклеиновой кислоты термины «дикий тип», «природный» или «естественное происхождение» означают, что такая

последовательность полипептида или нуклеиновой кислоты встречается в природе или присутствует, по меньшей мере, в одном естественном организме, который не изменен, не мутирован или не модифицирован человеком иным образом.

Микроорганизм «дикого типа» относится к микроорганизму, геном которого находится в состоянии до генетической модификации определенного гена. Такая генетическая модификация может представлять собой, например, удаление гена или его части, точечную мутацию или введение гена.

Термины «производство» или «продуцирование» известны специалистам и включают концентрацию продукта ферментации (например, дцРНК), образованного в течение заданного времени и заданного объема ферментации (например, кг продукта в час на литр). Термин «эффективность производства» включает время, необходимое для обеспечения определенного уровня производства (например, сколько времени требуется клетке для достижения определенной скорости выхода химического вещества тонкого органического синтеза).

Термин «выход» или «отношение выход продукта/количество углерода» известен специалистам и включает в себя эффективность конверсии источника углерода в продукт (т.е. химическое вещество тонкого органического синтеза). Обычно это отношение выражено как, например, кг продукта на кг источника углерода. При увеличении выхода или производства соединения увеличивается количество полученных молекул или полученных полезных молекул такого соединения в определенном количестве культуры в течение определенного промежутка времени.

Термин «рекомбинантный микроорганизм» включает микроорганизмы, которые были генетически модифицированы таким образом, что они проявляют измененный или другой генотип и/или фенотип (например, когда генетическая модификация влияет на кодирующие нуклеотидные последовательности микроорганизма) по сравнению с микроорганизмом дикого типа из которой был выведен. Рекомбинантный микроорганизм содержит, по меньшей мере, одну рекомбинантную молекулу нуклеиновой кислоты.

Термин «рекомбинантный» по отношению к молекулам нуклеиновой кислоты означает молекулы нуклеиновой кислоты, полученные человеком с

помощью технологии рекомбинантных нуклеиновых кислот. Термин включает молекулы нуклеиновой кислоты, которые сами по себе не существуют в природе или не существуют в организме, из которого получена молекула нуклеиновой кислоты, но которые модифицированы, изменены, мутированы или иным образом изменены человеком. Предпочтительно, «рекомбинантная молекула нуклеиновой кислоты» представляет собой не встречающуюся в природе молекулу нуклеиновой кислоты, последовательность которой отличается от природной молекулы нуклеиновой кислоты, по меньшей мере, на одну нуклеиновую кислоту. «Рекомбинантные молекулы нуклеиновой кислоты» могут также включать «рекомбинантную конструкцию», которая включает, предпочтительно, функционально связанную последовательность молекул нуклеиновых кислот, не встречающихся в природе в таком порядке. Предпочтительные способы получения указанных рекомбинантных молекул нуклеиновых кислот могут включать методы клонирования, направленный или ненаправленный мутагенез, синтез генов или рекомбинантные методы.

Примером такой рекомбинантной молекулы нуклеиновой кислоты является плазида, в которую вставлена гетерологичная ДНК-последовательность, или ген или промотор, который мутирован по сравнению с геном или промотором, из которого произошла рекомбинантная молекула нуклеиновой кислоты. Мутация может быть введена с помощью технологий направленного мутагенеза, известных специалистам, или технологий случайного мутагенеза, таких как химический мутагенез, мутагенез с использованием ультрафиолетового излучения или рентгеновского излучения или технологии направленной эволюции.

Термин «направленная эволюция» используется в настоящем документе в качестве синонима термина «метаболическая эволюция» и включает применение давления отбора, которое способствует росту мутантов с интересующими характеристиками. Для давления отбора могут использоваться различные условия культивирования, АТФ и отбор по росту и отбор, связанный с окислительно-восстановительным процессом. Давление отбора может осуществляться при периодической ферментации с серийный пассированием или при непрерывном культивировании с тем же давлением.

Термин «экспрессия» или «экспрессия гена» означает транскрипцию специфических генов или специфической генной конструкции. Термин

«экспрессия» или «экспрессия гена» в частности означает транскрипцию гена или генов или генной конструкции в мРНК. Этот процесс включает транскрипцию ДНК и может включать обработку полученного продукта РНК. Термин «экспрессия» или «экспрессия гена» может также включать трансляцию мРНК и, следовательно, синтез кодируемого белка, то есть экспрессию белка.

ПРИМЕРЫ

Химические вещества и общие методы

Стандартные методы клонирования, выделения, амплификации и очистки ДНК, для ферментативных реакций с использованием ДНК-лигазы, ДНК-полимеразы, рестрикционных эндонуклеаз и т.п., а также различные методы разделения являются известными и обычно используются специалистами в данной области. Несколько стандартных техник описаны в работе M. Green & J. Sambrook (2012) *Molecular Cloning: лабораторное руководство*, 4-ое Издание Cold Spring Harbor Laboratory Press, CSH, Нью-Йорк; Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley Online Library; Maniatis et al., 1982 *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory, Plainview, N.Y.; Wu (Изд.) 1993 *Meth. Enzymol.* 218, Part I; Wu (Изд.) 1979 *Meth. Enzymol.* 68; Wu et al., (Изд.) 1983 *Meth. Enzymol.* 100 and 101; Grossman and Moldave (Изд.) 1980 *Meth. Enzymol.* 65; Miller (Изд.) 1972 *Experiments in Molecular Genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.; Old and Primrose, 1981 *Principles of Gene Manipulation*, University of California Press, Berkeley; Schleif and Wensink, 1982 *Practical Methods in Molecular Biology*; Glover (Изд.) 1985 *DNA Cloning* Тома I и II, IRL Press, Оксфорд, UK; Hames and Higgins (Изд.) 1985 *Nucleic Acid Hybridization*, IRL Press, Оксфорд, UK; и Setlow and Hollaender 1979 *Genetic Engineering: Principles and Methods*, Тома 1-4, Plenum Press, Нью-Йорк.

За исключением случаев, когда в настоящем документе указано иное, сокращения и номенклатура используются в значениях стандартных для данной области, которые обычно используются в профессиональных журналах, например, в журналах, цитируемых в настоящем документе.

Пример 1

Осуществляли скриннинг 100 нитрилиз-кандидатов в отношении активности конверсии ацетонитрила в акриловую кислоту. Перечень организмов-

доноров и номера аминокислотной последовательности SEQ ID для 37 из этих нитрилаз приведен в Таблице 1. Кодированная область нитрилаз была оптимизирована для экспрессии в *E.coli*, эти последовательности синтезированы и клонированы в векторе экспрессии pDHE (SEQ ID 75) (Stueckler et al. (2010) Tetrahedron 66(3-2).

Векторы экспрессии трансформировали в *E.coli*, индуцировали экспрессию нитрилаз, культуру собирали и исследовали на активность в соответствии с описанием в WO200132890 и Примере 2.

Seq. ID	Донор
2	Неизвестный прокариотический организм
4	Неизвестный прокариотический организм
6	<i>Flaviumibacter solisilvae</i>
8	<i>Acidovorax facilis</i> 72W
10	<i>Pseudomonas</i> sp. RIT357
12	<i>Nocardia brasiliensis</i> NBRC 14402
14	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
16	<i>Agrobacterium rubi</i>
18	Неизвестный прокариотический организм
20	<i>Candidatus Dadabacteria</i>
22	Неизвестный прокариотический организм
26	<i>Terpidicaulis marinus</i>
28	Неизвестный прокариотический организм
30	Неизвестный прокариотический организм
32	Неизвестный прокариотический организм
34	<i>Synechococcus</i> sp. CC9605
38	<i>Aquimarina atlantica</i>
40	<i>Arthrobacter</i> sp. Soil736
42	<i>Cupriavidus basilensis</i>
46	<i>Sphingomonas wittichii</i> RW1
48	<i>Pseudomonas mandelii</i> JR-1
52	<i>Arabidopsis thaliana</i>
54	<i>Brassica oleracea</i>

56	<i>Salinisphaera shabanensis</i> E1L3A
60	<i>Smithella</i> sp. SDB
62	<i>Bradyrhizobium diazoefficiens</i>
64	<i>Actinobacteria bacterium</i> RBG_13_55_18
66	<i>Rhizobium</i> sp. YK2
68	<i>bacterium</i> YEK0313
70	<i>Paenibacillus darwinianus</i>
72	<i>Haloarcula</i> sp. CBA1115
74	<i>Hungatella hathewayi</i>

Таблица 1: Организм-донор и SEQ ID для 32 исследуемых нитриаз

Пример 2

В пробирку Эппендорфа объемом 1,5 мл добавили 20 мкл акрилонитрила к 50 мМ раствору фосфатного буфера при pH 7. Для начала скрининга добавили 100 мкл суспензии клеток *E. coli*, содержащей различные нитриазы, и смесь встряхивали при 25 °С. Через 24 часа реакционную смесь центрифугировали и супернатант ввели в ВЭЖХ-колонку. Расчет степени конверсии производили как количество прореагировавшего акрилонитрила.

Seq. ID	Вещество	Акриловая кислота
2	Акрилонитрил	>99.9%
4	Акрилонитрил	>99.9%
6	Акрилонитрил	>99.9%
8	Акрилонитрил	>99.9%
10	Акрилонитрил	>99.9%
12	Акрилонитрил	95%
14	Акрилонитрил	>99.9%
16	Акрилонитрил	77%
18	Акрилонитрил	>99.9%
20	Акрилонитрил	>99.9%
22	Акрилонитрил	32%
26	Акрилонитрил	>99.9%

28	Акрилонитрил	90%
30	Акрилонитрил	95%
32	Акрилонитрил	97%
34	Акрилонитрил	96%
38	Акрилонитрил	>99.9%
40	Акрилонитрил	>99.9%
46	Акрилонитрил	90%
48	Акрилонитрил	>99.9%
52	Акрилонитрил	>99.9%
54	Акрилонитрил	>99.9%
56	Акрилонитрил	40%
60	Акрилонитрил	65%
62	Акрилонитрил	10%
64	Акрилонитрил	13%
66	Акрилонитрил	72%
68	Акрилонитрил	>99.9%
42	Акрилонитрил	>99.9%
44	Акрилонитрил	>99.9%
70	Акрилонитрил	0%
72	Акрилонитрил	0%
74	Акрилонитрил	0%

Таблица 2: Степень конверсии акрилонитрила для 32 исследуемых нитрилаз

Пример 3

Воду и 28 г ацетонитрила (ACN) поместили в реактор. Количество воды регулировали таким образом, чтобы общее количество вода + биокатализатор составляло 2798 г.

Биокатализатор использовали в виде концентрата клеточной суспензии, содержащей BD5220 (Seq. ID: NO 2), её добавляли в реактор, в результате чего начиналась реакция. В ходе реакции добавили еще 1202 г акрилонитрила. Температуру поддерживали на уровне 26 °C, концентрацию ACN измеряли с помощью инфракрасной спектроскопии на основе преобразования Фурье в

реальном времени, а скорость добавления ACN регулировали таким образом, чтобы концентрация ACN в реакционной смеси поддерживалась на постоянном уровне $1 \pm 0,2\%$ (мас./мас.) до тех пор, пока в реакцию не будет добавлен все количество ACN. Реакцию останавливали после того, как концентрация ACN снизилась до <100 ч./млн. В конце реакции конечная концентрация акрилата аммония составила 51,2 мас.% (акриловая кислота 41,5 мас.%).

Пример 4

Воду и 28 г ACN поместили в реактор. Количество воды регулировали таким образом, чтобы общее количество вода + биокатализатор составляло 3107 г.

Биокатализатор использовали в виде концентрата клеточной суспензии, содержащей нитрилазу из *Flaviumibacter solisilvae* (Seq. ID: NO 6), её добавляли в реактор, в результате чего начиналась реакция. В ходе реакции добавили еще 1005 г акрилонитрила. Температуру поддерживали на уровне 30 °C, концентрацию ACN измеряли с помощью инфракрасной спектроскопии на основе преобразования Фурье в реальном времени, а скорость добавления ACN регулировали таким образом, чтобы концентрация ACN в реакционной смеси поддерживалась на постоянном уровне $1 \pm 0,2\%$ (мас./мас.) до тех пор, пока в реакцию не будет добавлено все количество ACN. Реакцию останавливали после того, как концентрация ACN снизилась до <100 ч./млн. В конце реакции конечная концентрация акрилата аммония составила 41,9 мас.% (акриловая кислота 33,9 мас.%).

Формула изобретения

1. Выделенная нитрилаза, способная катализировать реакцию из (мет-)акрилонитрила в (мет-)акрилат аммония в водной среде, содержащей воду, нитрилазу и (мет-)акрилонитрил и/или (мет-)акрилат аммония, причем концентрация (мет-)акрилат аммония в водной среде после инкубации составляет, по меньшей мере, 50% (мас./мас.), и концентрация (мет-)акрилонитрила составляет менее 0,1% (мас./мас.).

2. Выделенная нитрилаза по п. 1 содержащая последовательность, выбранную из группы, состоящей из

- a. молекулы аминокислоты SEQ ID NO: 2, 4, 6 и 8, и
- b. молекулы аминокислоты, имеющей, по меньшей мере, 55% идентичности с молекулой аминокислоты SEQ ID NO: 2, 4, 6 или 8, или ее функционального фрагмента, и
- c. молекулы аминокислоты, кодируемой молекулой нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 1, 3, 5, или 7, или ее функционального фрагмента, и
- d. молекулы аминокислоты, кодируемой молекулой нуклеиновой кислоты, имеющей, по меньшей мере, 70% идентичности с SEQ ID NO: 1, 3, 5 или 7, или ее функционального фрагмента, и
- e. молекулы аминокислоты, кодируемой молекулой нуклеиновой кислоты, которая гибридизирует в жестких условиях, с получением фрагмента, по меньшей мере, 250 оснований, комплементарных с SEQ ID NO: 1, 3, 5 или 7, или ее функционального фрагмента,

причем молекула аминокислоты, как определено в пунктах b., d. и e., катализирует реакцию из (мет-)акрилонитрила в (мет-)акрилат аммония в водной среде.

3. Способ получения (мет-)акрилат аммония, включающий следующие этапы:

- a. предоставление водной среды, содержащей воду, одну или более нитрилазу и (мет-)акрилонитрил,
- b. инкубирование водной среды, и

с. при необходимости, выделение (мет-)акрилат аммония из реакционной смеси,

причем одна или более нитрилиз выбраны из группы, состоящей из

- i. молекулы аминокислоты SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 18, 20, 22, 26, 28, 30, 32, 34, 38, 40, 42, 46, 48, 52, 54, 56, 60, 62, 64, 66 и 68, или ее функционального фрагмента, и
- ii. молекулы аминокислоты, имеющей, по меньшей мере, 55% идентичности с молекулой аминокислоты SEQ ID NO: SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 18, 20, 22, 26, 28, 30, 32, 34, 38, 40, 42, 46, 48, 52, 54, 56, 60, 62, 64, 66 или 68, или ее функционального фрагмента, и
- iii. молекулы аминокислоты, кодируемой молекулой нуклеиновой кислоты SEQ ID NO 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 25, 27, 29, 31, 33, 37, 39, 41, 45, 47, 51, 53, 55, 59, 61, 63, 65 или 67, или ее функционального фрагмента, и
- iv. молекулы аминокислоты, кодируемой молекулой нуклеиновой кислоты, имеющей, по меньшей мере, 70% идентичности с SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 25, 27, 29, 31, 33, 37, 39, 41, 45, 47, 51, 53, 55, 59, 61, 63, 65 или 67, или ее функционального фрагмента, и
- v. молекулы аминокислоты, кодируемой молекулой нуклеиновой кислоты, которая гибридизирует в жестких условиях, с получением фрагмента, по меньшей мере, 250 оснований, комплементарных с SEQ ID NO 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 25, 27, 29, 31, 33, 37, 39, 41, 45, 47, 51, 53, 55, 59, 61, 63, 65 или 67, или ее функционального фрагмента,

причем молекулы аминокислоты, как определено в пунктах ii., iv. и v., обладают активностью превращения (мет-)акрилонитрила в (мет-)акрилат аммония.

4. Способ по п. 3, **отличающийся тем**, что (мет-)акрилонитрил непрерывно добавляют к водной среде за 10 мин до окончания времени инкубации, тем самым поддерживая концентрацию (мет-)акрилонитрила на уровне около 1 - 2% мас./мас.

5. Способ по п. 3 или 4, **отличающийся тем**, что водную среду инкубируют в течение, по меньшей мере, 2ч - 48ч.

6. Способ по пп. 3 - 5 **отличающийся тем**, что водную среду инкубируют при температуре 15 - 50°C.

7. Способ по пп. 3 - 6, **отличающийся тем**, что нитрилазу получают путем ферментации.

8. Выделенная нитрилаза, содержащая последовательность, выбранную из группы, состоящей из

- a. молекулы аминокислоты SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 18, 20, 22, 26, 28, 30, 32, 34, 38, 40, 42, 46, 48, 52, 54, 56, 60, 62, 64, 66 и 68, или ее функционального фрагмента, и
- b. молекулы аминокислоты, имеющей, по меньшей мере, 55% идентичности с молекулой аминокислоты SEQ ID NO: SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 18, 20, 22, 26, 28, 30, 32, 34, 38, 40, 42, 46, 48, 52, 54, 56, 60, 62, 64, 66 или 68, или ее функционального фрагмента, и
- c. молекулы аминокислоты, кодируемой молекулой нуклеиновой кислоты SEQ ID NO 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 25, 27, 29, 31, 33, 37, 39, 41, 45, 47, 51, 53, 55, 59, 61, 63, 65 или 67, или ее функционального фрагмента, и
- d. молекулы аминокислоты, кодируемой молекулой нуклеиновой кислоты, имеющей, по меньшей мере, 70% идентичности с SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 25, 27, 29, 31, 33, 37, 39, 41, 45, 47, 51, 53, 55, 59, 61, 63, 65 или 67, или ее функционального фрагмента, и
- e. молекулы аминокислоты, кодируемой молекулой нуклеиновой кислоты, которая гибридизирует в жестких условиях, с получением фрагмента, по меньшей мере, 250 оснований, комплементарных с SEQ ID NO 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 25, 27, 29, 31, 33, 37, 39, 41, 45, 47, 51, 53, 55, 59, 61, 63, 65 или 67, или ее функционального фрагмента, причем молекула аминокислоты, как определено в пунктах b., d. и e., катализирует реакцию из (мет-)акрилонитрила в (мет-)акрилат аммония в водной среде.

9. Рекомбинантная конструкция, содержащая нитрилазу, причем нитрилаза выбрана из группы, состоящей из

- i. молекулы аминокислоты SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 18, 20, 22, 26, 28, 30, 32, 34, 38, 40, 42, 46, 48, 52, 54, 56, 60, 62, 64, 66 и 68, или ее функционального фрагмента, и
- ii. молекулы аминокислоты, имеющей, по меньшей мере, 55% идентичности с молекулой аминокислоты SEQ ID NO: SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 18, 20, 22, 26, 28, 30, 32, 34, 38, 40, 42, 46, 48, 52, 54, 56, 60, 62, 64, 66 или 68, или ее функционального фрагмента, и
- iii. молекулы аминокислоты, кодируемой молекулой нуклеиновой кислоты SEQ ID NO 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 25, 27, 29, 31, 33, 37, 39, 41, 45, 47, 51, 53, 55, 59, 61, 63, 65 или 67, или ее функционального фрагмента, и
- iv. молекулы аминокислоты, кодируемой молекулой нуклеиновой кислоты, имеющей, по меньшей мере, 70% идентичности с SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 25, 27, 29, 31, 33, 37, 39, 41, 45, 47, 51, 53, 55, 59, 61, 63, 65 или 67, или ее функционального фрагмента, и
- v. молекулы аминокислоты, кодируемой молекулой нуклеиновой кислоты, которая гибридизирует в жестких условиях, с получением фрагмента, по меньшей мере, 250 оснований, комплементарных с SEQ ID NO 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 25, 27, 29, 31, 33, 37, 39, 41, 45, 47, 51, 53, 55, 59, 61, 63, 65 или 67, или ее функционального фрагмента, причем молекула аминокислоты, как определено в пунктах ii., iv. и v., катализирует реакцию из (мет-)акрилонитрила в (мет-)акрилат аммония в водной среде.

10. Рекомбинантная конструкция по п. 9, **отличающаяся тем**, что нитрилаза функционально связана с гетерологичным промотором.

11. Рекомбинантный вектор, содержащий рекомбинантную конструкцию по п. 9 или 10.

12. Рекомбинантный микроорганизм, содержащий рекомбинантную конструкцию по п. 9 или 10 или рекомбинантный вектор по п. 11.

13. Рекомбинантный микроорганизм по п. 12, **отличающийся тем**, что микроорганизм представляет собой *Rhodococcus rhodocrous*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae* или *Pichia pastoris*.

14. Микроорганизм рода *Cupriavidus basilensis*, *Flaviumicrobium solisilvae*, *Acidovorax facilis* 72W, *Pseudomonas* sp. RIT357, *Nocardia brasiliensis* NBRC 14402, *Pseudomonas fluorescens*, *Agrobacterium rubi*, *Candidatus Dadabacteria bacterium* CSP1-2, *Tepidicaulis marinus*, *Synechococcus* sp. CC9605, *Aquimarina atlantica*, *Arthrobacter* sp., *Sphingomonas wittichii* RW1, *Pseudomonas mandelii* JR-1, *Salinisphaera shabanensis* E1L3A, *Smithella* sp. SDB, *Bradyrhizobium diazoefficiens*, *Actinobacteria bacterium* RBG_13_55_18, *Rhizobium* sp. YK2 или *Bacterium* YEK0313, экспрессирующий любую из нитрилаз, как определено в п. 8.

15. Способ получения нитрилазы, включающий следующие этапы:

- a) предоставление рекомбинантного микроорганизма по п. 12 или 13 или микроорганизма по п. 14, и
- b) культивирование микроорганизма в условиях, обеспечивающих экспрессию указанного гена нитрилазы.

16. Композиция, содержащая воду, нитрилазу, (мет-)акрилонитрил и/или (мет-)акрилат аммония, причем нитрилаза выбрана из группы, состоящей из

- i. молекулы аминокислоты SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 18, 20, 22, 26, 28, 30, 32, 34, 38, 40, 42, 46, 48, 52, 54, 56, 60, 62, 64, 66 и 68, или ее функционального фрагмента, и
- ii. молекулы аминокислоты, имеющей, по меньшей мере, 55% идентичности с молекулой аминокислоты SEQ ID NO: SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 18, 20, 22, 26, 28, 30, 32, 34, 38, 40, 42, 46, 48, 52, 54, 56, 60, 62, 64, 66 или 68, или ее функционального фрагмента, и
- iii. молекулы аминокислоты, кодируемой молекулой нуклеиновой кислоты SEQ ID NO 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 25, 27, 29, 31, 33, 37, 39, 41, 45, 47, 51, 53, 55, 59, 61, 63, 65 или 67, или ее функционального фрагмента, и
- iv. молекулы аминокислоты, кодируемой молекулой нуклеиновой кислоты, имеющей, по меньшей мере, 70% идентичности с SEQ ID NO:

1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 25, 27, 29, 31, 33, 37, 39, 41, 45, 47, 51, 53, 55, 59, 61, 63, 65 или 67, или ее функционального фрагмента, и

v. молекулы аминокислоты, кодируемой молекулой нуклеиновой кислоты, которая гибридизирует в жестких условиях, с получением фрагмента, по меньшей мере, 250 оснований, комплементарных с SEQ ID NO 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 25, 27, 29, 31, 33, 37, 39, 41, 45, 47, 51, 53, 55, 59, 61, 63, 65 или 67, или ее функционального фрагмента, причем молекула аминокислоты, как определено в пунктах ii., iv. и v., катализирует реакцию из (мет-)акрилонитрила в (мет-)акрилат аммония в водной среде.